

N° d'ordre : 1091

50376  
1983  
201

50376  
1983  
201

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE**

par

Franck RENAULD

## **LA BOTRYODIPLODINE, UNE MYCOTOXINE DE *PENICILLIUM ROQUEFORTI* REACTIVITE CHIMIQUE SUR L'ADN ET BIOSYNTHESE**



Soutenu le 7 Octobre 1983 devant la Commission d'Examen

Président	M.	J.	MONTREUIL
Rapporteurs	M.	A.	LABLACHE-COMBIER
	M.	S.	MOREAU
Examineurs	M.	J.H.	HUSSON
	Melle	Y.	MOULÉ
	M.	A.	VERNES



DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT  
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACE, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET  
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique atomique et moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux

M. BRIDOUX Michel	Chimie physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL JACQUES	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques

M. WALLART Francis  
M. WARTEL Michel  
M. WATERLOT Michel  
M. WERNER Georges  
M. WOSNIAK Michel  
Mme ZINN Justin Nicole

Spectrochimie infrarouge et Raman  
Chimie inorganique  
Géologie générale  
Informatique fondamentale appliquée  
Hydrométallurgie  
Algèbre

Ce travail a été effectué à l'Unité I.N.S.E.R.M. U-42  
de Biologie et Biochimie Parasitaire et Fongique

Je remercie Monsieur J. Montreuil, Professeur à l'Université de Lille I de l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Je suis heureux de remercier Monsieur A. Lablache-Combiér, Professeur à l'Université de Lille I et Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, de m'avoir témoigné un grand intérêt tout au long de ce travail.

Mes remerciements vont tout particulièrement à Monsieur S. Moreau, Chargé de recherche à l'I.N.S.E.R.M. pour l'encadrement et la bienveillante attention avec laquelle il a dirigé ce travail.

Je remercie Monsieur H.P. Husson, Directeur de recherche au C.N.R.S. à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie Mademoiselle Y. Moulé, Directeur de recherche au C.N.R.S. à l'Institut de Recherche Scientifique sur le Cancer de Villejuif, d'avoir accepté de juger cette thèse et de l'aide apportée à la conception biologique de ce travail.

Je remercie Monsieur A. Vernes, Professeur à la Faculté de Médecine de Lille II et Directeur de l'Unité I.N.S.E.R.M. U-42 d'avoir accepté de participer à ce jury.



III- Etude par incorporation de carbone 13 .....	63
IV- Synthèse des précurseurs $^{14}\text{C}$ et $^{13}\text{C}$ .....	73
CONCLUSION .....	78
PARTIE EXPERIMENTALE .....	83
BIBLIOGRAPHIE .....	102

INTRODUCTION

L'intérêt accordé aux moisissures comme contaminants de nos denrées alimentaires, est relativement récent. En fait, il faut que se produise en Angleterre, en 1960, une épidémie très grave dans les élevages de dindes ("Turkey X disease"), faisant suite à des incidents dans les élevages de porcs au Maroc, pour que les scientifiques s'intéressent aux propriétés biologiques des toxines synthétisées par ces moisissures et pour apprécier aussi le risque posé par cette forme de contamination fongique.

L'étude des différentes mycotoxicoses devait révéler la diversité de constitution chimique des mycotoxines; la pluralité de leurs effets physico-pathologiques et dans certains cas, l'extraordinaire danger de ces toxines pour les populations humaine et animale.

A titre d'exemples, nous citerons les aflatoxines synthétisées par Aspergillus flavus. L'aflatoxine B<sub>1</sub> est responsable des épidémies citées au début de cette introduction. L'aflatoxine B<sub>1</sub> correspond au plus puissant des hépatocarcinogènes connus à ce jour pour le rat.

Il convient aussi de souligner que l'épidémie extrêmement grave qui ravagea l'Ukraine entre 1943 et 1948 et qui est connue sous le nom de ATA (aleucie toxique alimentaire) est due à des mycotoxines (trichothécènes) synthétisées par différentes souches de Fusarium (1) contaminant le maïs stocké dans de mauvaises conditions.

Une autre espèce, Penicillium roqueforti, moisissure utilisée dans l'affinage du fromage de Roquefort; devait aux alentours de 1970, créer de sérieux problèmes aux responsables de l'industrie fromagère. Certaines souches de cette moisissure synthétisent une série de métabolites sesquiterpéniques dont la P.R. Toxine est de loin le plus toxique.

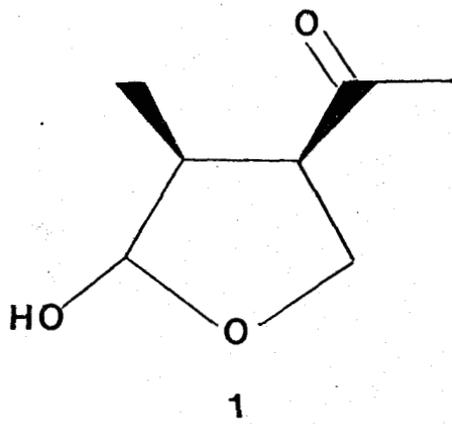
Enfin, rappelons que l'on s'interroge encore sur le rôle joué par la patuline, mycotoxine synthétisée par de nombreuses moisissures dont certaines souches de Penicillium (2),

dans l'étiologie du cancer de l'estomac, que la vomitoxine (toxine synthétisée par de nombreuses souches de Fusarium), pose actuellement des problèmes sérieux au Canada et que la présence de zéaralénone dans les céréales est très suivie par les autorités vétérinaires.

En dehors des études faites pour lutter contre la contamination de l'alimentation humaine et animale par les mycotoxines; il convient de dire que certaines d'entre elles ont fait l'objet de recherches destinées à élucider leur mécanisme d'action et qu'elles se sont révélées être de remarquables modèles d'étude.

La place d'honneur revient certainement à l'aflatoxine B<sub>1</sub> qui a permis d'établir des résultats de première importance sur ses interactions sur le DNA et sur son rôle dans l'induction de systèmes de réparation erronés chez E. Coli. Dans un autre domaine, la mise en évidence des propriétés immunodépressives de certaines mycotoxines comme la T<sub>2</sub>toxine (mycotoxine de la famille des trichothécènes) pourrait expliquer les symptômes pathologiques liés à sa présence.

Dernièrement, au cours de recherches systématiques sur la toxicité de diverses souches de Penicillium Roqueforti, une nouvelle toxine, la botryodiplodine 1 a été isolée (3). Cette mycotoxine a été isolée pour la première fois d'une autre espèce fongique, Botryodiplodia theobromae (4), dans le cadre de recherche d'antibiotiques d'origine fongique.



Ce travail concerne la botryodiplodine, dont l'obtention a permis de concevoir une étude à plusieurs niveaux des propriétés biologiques et chimiques jusqu'ici inconnues de cette mycotoxine.

Ces recherches ont été menées par deux groupes (celui de Y. Moulé à Villejuif et le nôtre) qui ont abordé les problèmes sous des angles complémentaires. Le groupe de Y. Moulé a étudié les effets de la botryodiplodine sur des cellules de mammifères en culture alors que nous nous sommes proposés de définir la nature des interactions de cette mycotoxine sur le DNA. La botryodiplodine constitue un excellent modèle d'étude pour la compréhension des mécanismes de mutation par certains agents chimiques.

### I- Propriétés biologiques de la botryodiplodine

#### a- Action sur le métabolisme cellulaire

Y. Moulé a montré que la mycotoxine inhibe la croissance de tous les types de cellules en culture testées (cellules fibroblastiques et épithéliales). Ceci peut s'expliquer par le fait que la botryodiplodine altère le métabolisme cellulaire au niveau de trois de ses métabolismes essentiels, à savoir les processus de réplication (autoduplication du DNA qui détient l'information génétique), de la transcription (synthèse des différents RNA sur la matrice DNA), et de traduction (synthèse de protéines dont la spécificité est assurée par le décodage des RNAm qui leur correspondent) (5).

L'analyse des courbes de cinétique de l'inhibition des trois métabolismes par la mycotoxine montre que le blocage de la transcription et de la traduction n'est pas dû à des effets secondaires corrélatifs à l'altération de la réplication, mais bien des effets qui s'exercent simultanément sur les 3 processus.

#### b- Effets génotoxiques.

La botryodiplodine possède un pouvoir mutagène qui se traduit par une induction de révertants dans le test de Ames sur Salmonella typhimurium (6) et une induction de mutants résistants à la thioguanine (7).

En outre, la botryodiplodine induit l'augmentation

significative des échanges entre chromatides-soeurs dans des cultures de cellule V79 (7).

Les recherches qui établissent l'activité génotoxique de la mycotoxine, ont permis aussi de montrer que la molécule est directement active (7), qu'elle ne nécessite pas de métabolisation préalable pour acquérir ses potentialités. Ce fait devrait permettre d'aborder plus facilement l'étude des interactions in vitro que la toxine contracte avec les autres molécules.

### c- Induction de pontages DNA-Proteines par la botryodiplodine

En utilisant comme critère la libération du DNA de la chromatine en milieu de force ionique élevée en présence de détergent et la sédimentation isopycnique de ce DNA en gradient de chlorure de césium à une densité de  $1,7\text{g/cm}^3$ , Y.Moulé a montré que la botryodiplodine induit la formation de pontages DNA-proteines. Les propriétés de ces pontages ont été étudiées (8) et montrent que les activités biologiques de la botryodiplodine sont liées au groupe hémiacétalique de la toxine.

## II- But du travail

Le mode d'action de la botryodiplodine, c'est-à-dire l'étude de l'interaction entre les métabolismes cellulaires et cette mycotoxine n'a jamais été précisé. Il nous a semblé important de chercher à comprendre les mécanismes pouvant intervenir dans la toxicité au niveau des gènes d'une cellule.

L'interaction entre DNA, protéines et botryodiplodine (crosslink) permet de penser qu'une liaison covalente entre ces trois molécules est probable. Nous avons donc choisi d'étudier la réactivité de la toxine sur le DNA et les bases nucléiques.

Les difficultés liées à une telle approche nous ont paru justifier, en premier lieu, une étude de la réac-

tivité de la mycotoxine sur des amines aromatiques et des modèles aminopyrimidiques et amino puriques, cette étude devant nous permettre d'aborder ensuite ce problème au niveau des bases nucléiques du DNA.

L'intérêt biologique que présente cette mycotoxine nous a incité à étudier sa biogénèse. En effet, malgré la simplicité structurale; ce squelette carboné n'a jamais fait l'objet d'études biosynthétiques. Son classement actuel repose uniquement sur sa structure chimique de type furanne. Nous avons choisi d'aborder cette étude à l'aide de la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13.

--0000000--

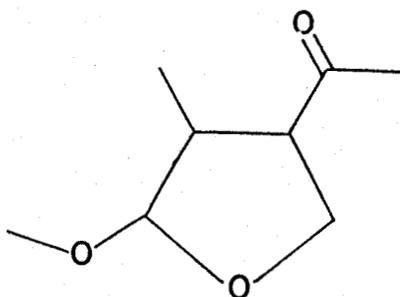
REACTIVITE CHIMIQUE ET  
ACTIVITE BIOLOGIQUE

## REACTIVITE CHIMIQUE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE

### 1- Relation structure activité

La structure de la botryodiplodine présente deux fonctions susceptibles de réagir avec des amines : la cétone, et la fonction hémiacétalique. De ces deux fonctions, il est évident que la fonction aldéhyde potentielle que représente l'hémiacétal, est la plus réactive.

La responsabilité de l'aldéhyde au niveau des activités biologiques est explorée par modification structurale de la botryodiplodine. La méthylation de l'hydroxyle hémiacétalique conduit au composé 2.



2

Les propriétés biologiques de 2, comparées à la botryodiplodine permettent de montrer que l'hémiacétal est indispensable à l'activité biologique de la mycotoxine. En effet, 2 n'est pas mutagène dans le test de Ames et n'est pas capable d'engendrer des pontages DNA-protéines dans la chromatide (8) (9).

Les propriétés biologiques de la botryodiplodine et son interaction avec le DNA sont donc régies par la réactivité de l'hémiacétal.

L'étude de la réactivité de la botryodiplodine sur des amines modèles devrait permettre, par l'étude structurale des produits d'addition obtenus, de préciser les rôles respectifs des groupements fonctionnels.

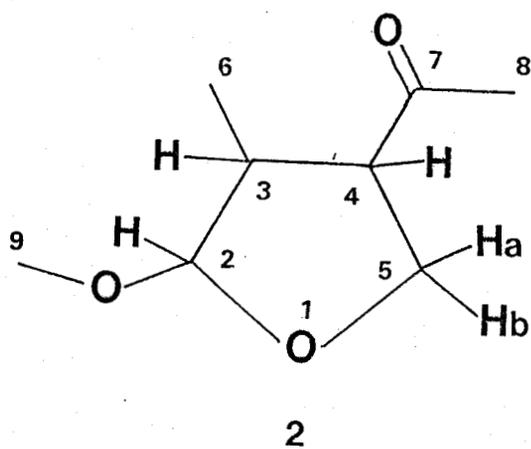
### Synthèse du composé 2

Le composé 2 est obtenu par méthylation de l'hydroxyle hémiacétalique par réaction de la botryodiplodine sur l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent (10).

Les caractéristiques spectrales de 2 sont reportées ci-dessous.

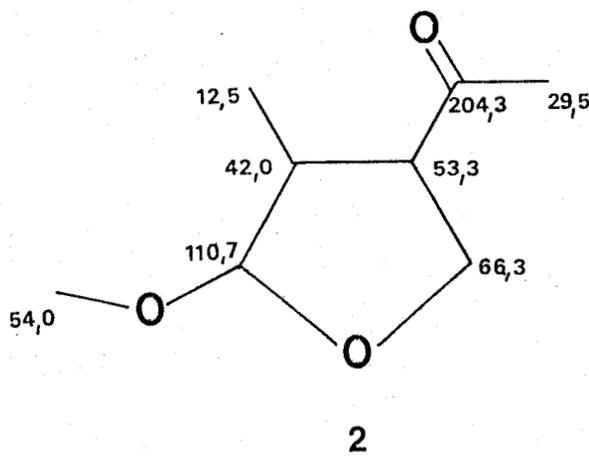
Le spectre de masse haute résolution montre un pic moléculaire à  $m/e$  157,0864  $[M-H]^+$  (calc : 157,0862).

Le spectre R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz est facilement analysable et se décompose ainsi :



$\delta = 0,86$ ppm	CH <sub>3</sub> -6, d, J = 7,3 Hz
$\delta = 2,19$ ppm	CH <sub>3</sub> -8, s.
$\delta = 2,58$ ppm	CH-3, quint, J = 7,3 Hz
$\delta = 3,57$ ppm	CH-4, q, J = 7,3 Hz
$\delta = 3,93$ ppm	CHa-5, t, J = 8,6 Hz
$\delta = 4,29$ ppm	CHb-5, t, J = 8,6 Hz
$\delta = 4,66$ ppm	CH-2, s

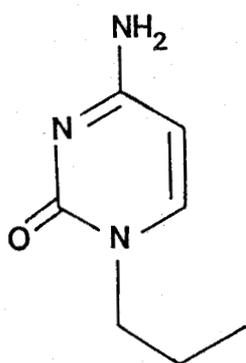
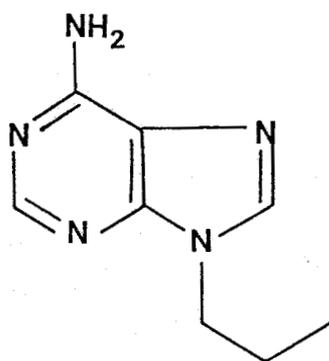
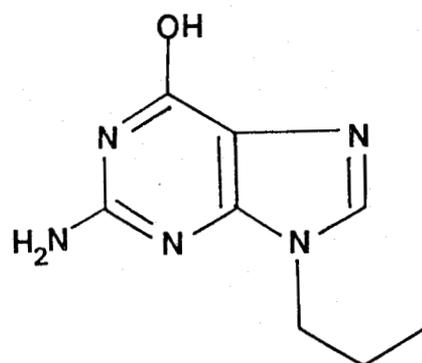
Le spectre R.M.N<sup>13</sup>C montre 8 signaux dont la multiplicité observée en off-resonance permet l'attribution suivante :



La stéréochimie du composé 2 est étudiée p.27

## II- Réactivité de la botryodiplodine sur des modèles aminés

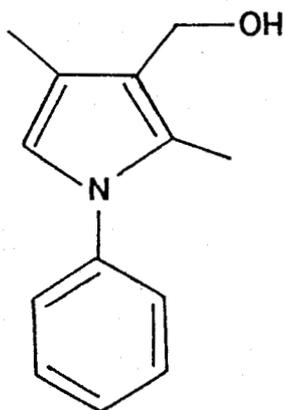
Pour cette étude, nous avons choisi d'une part, des modèles aminés aromatiques simples (aniline, diméthyl-2,6 amino-4 pyrimidine, amino-2 pyrimidine) possédant certaines analogies structurales avec les bases nucléiques et d'autre part; cette étude est étendue à la caractérisation des produits d'addition sur des bases nucléiques alkylées: (propyl-1 cytosine 3, propyl-9 adénine 4, propyl-9 guanine 5).

345

### I- Structure des produits d'addition

#### a- Produit d'addition de la botryodiplodine sur l'aniline

La réaction de la botryodiplodine sur l'aniline est réalisée dans le méthanol pendant 1 h à 20°C et conduit à un dérivé pyrrolique instable 6.

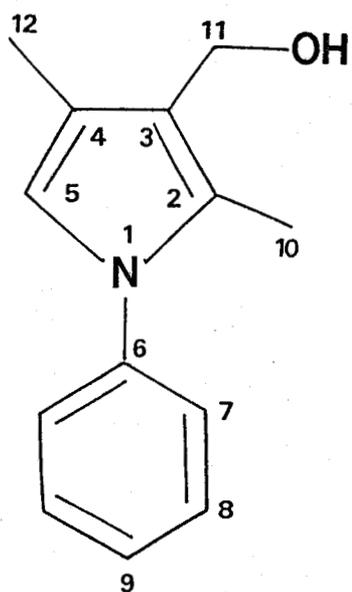
6

La stabilité de 6 n'excède pas 1 heure en solution dans le chloroforme et quelques minutes en absence de solvant .

les caractéristiques spectrales de 6 sont données ci-dessous.

Le spectre de masse montre le pic moléculaire m/e 201 ( $M^+$ )

Le spectre R.M.N<sup>1</sup>H 60 MHz est facilement interprétable et se décompose ainsi :



$\delta = 1,13\text{ppm}$	-OH, s
$\delta = 2,15\text{ppm}$	CH <sub>3</sub> -12, d, J = 1 Hz
$\delta = 2,20\text{ppm}$	CH <sub>3</sub> -10, s
$\delta = 4,65\text{ppm}$	CH <sub>2</sub> -11, s
$\delta = 6,65\text{ppm}$	CH-5, s large
$\delta = 7,35\text{ppm}$	CH-7-8-9, m

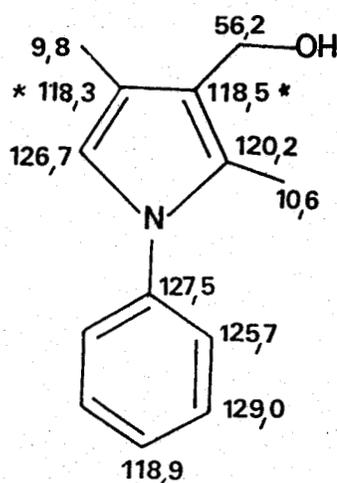
6

- le doublet observé à  $\delta = 2,15$  ppm résulte d'un couplage longue distance avec le proton vinylique en 5.

- l'irradiation du signal à  $\delta = 6,65$  ppm transforme le doublet à  $\delta = 2,15$  ppm en singulet.

- le proton sortant à  $\delta = 1,13$  ppm est échangeable avec  $D_2O$ .

Le spectre R.M.N du  $^{13}C$  présente 11 signaux. La multiplicité observée dans le spectre off-résonance permet de proposer l'attribution suivante :



### 6

#### b- Produit d'addition de la botryodiplodine sur le diméthyl-2,6 amino-4 pyrimidine

La réaction de la botryodiplodine sur le diméthyl-2,6 amino-4 pyrimidine est réalisée pendant 48 heures dans le méthanol à  $60^{\circ}C$ . Le produit d'addition 7 est obtenu avec un rendement de 17 %. Ce produit cristallisé ( $F = 110-112^{\circ}C$ ) est le seul détectable dans les conditions utilisées.

\* Attribution réversible

BUS  
LILLE

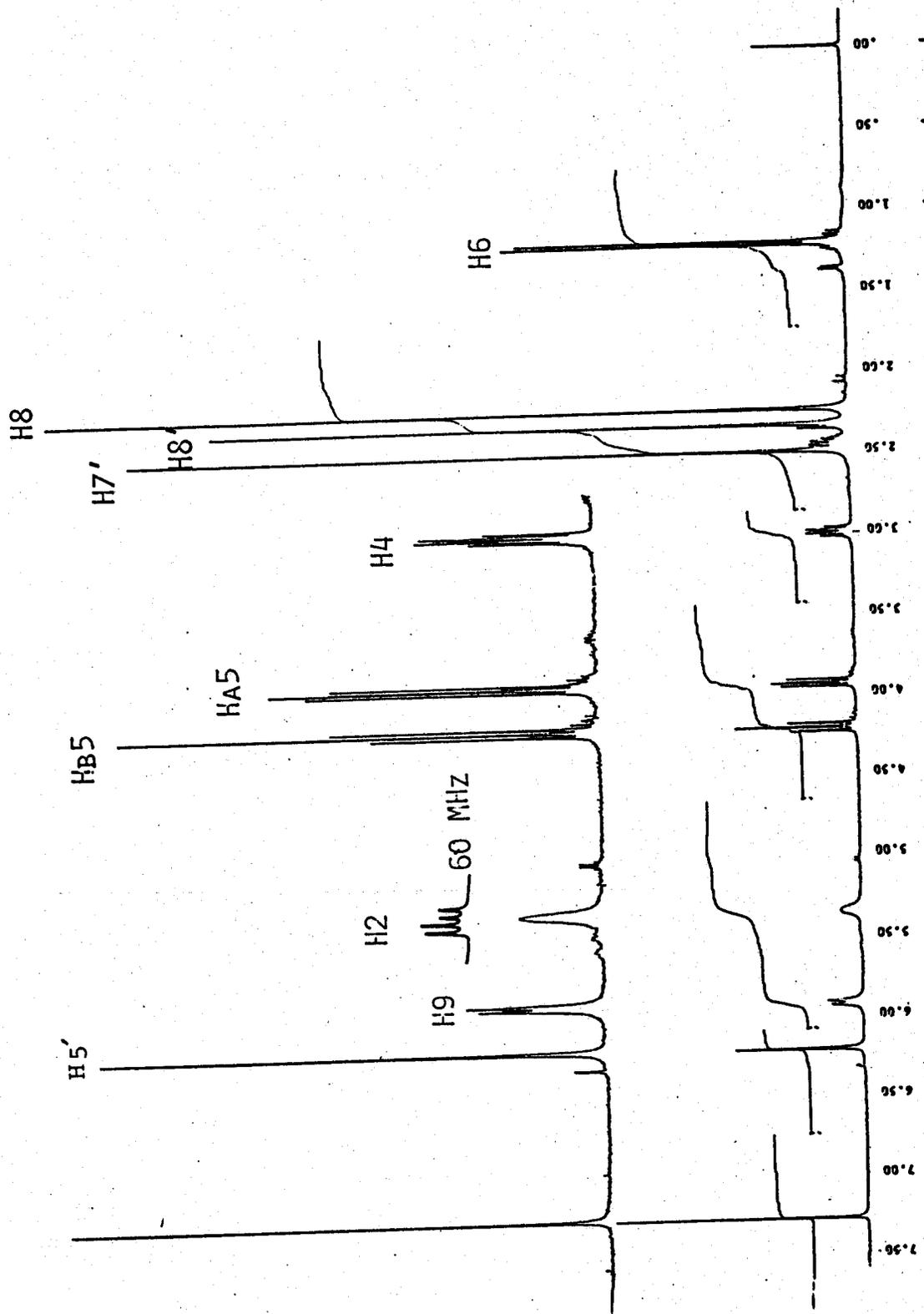
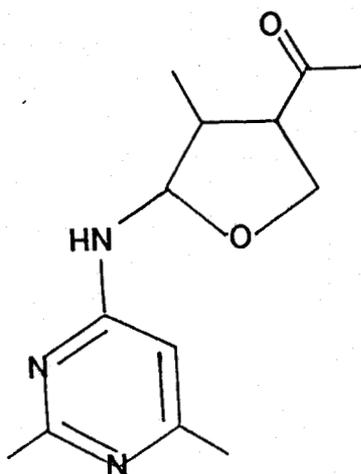


Fig. 1 : Spectre R. M.N. (350 MHz) du produit d'addition 7 Solvant  $\text{CCl}_3$ .

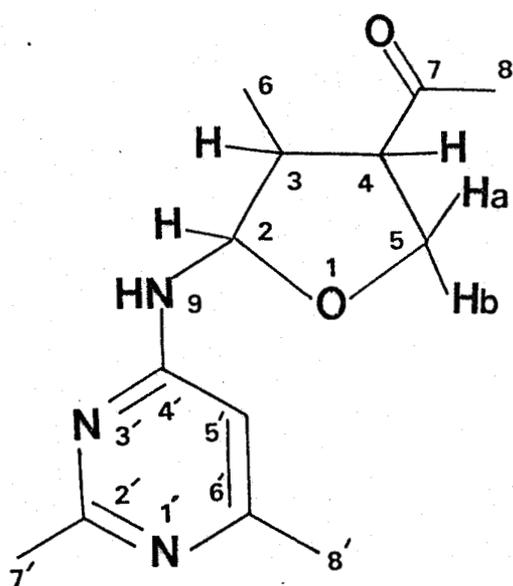
7

L'établissement de la structure repose sur les données suivantes :

- L'analyse élémentaire C = 62,39, H = 7,70, N = 16,92 est en accord avec la formule  $C_{13}H_{19}N_3O_2$  (calc : C = 62,62, H = 7,68, N = 16,84)

- le spectre de masse haute résolution donne le pic moléculaire 249, 1494; qui est en parfait accord avec la formule brute (calc : 249,1477).

- le spectre R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (fig 1) s'analyse aisément et l'attribution des signaux observés est reportée ci-dessous.



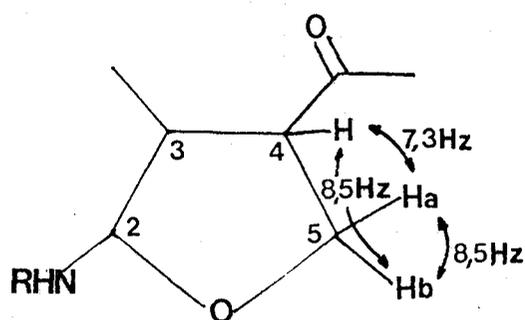
$\delta = 1,21\text{ppm}$	$CH_3-6, d, J = 7,3 \text{ Hz}$
$\delta = 2,24\text{ppm}$	$CH_3-8, s$
$\delta = 2,33\text{ppm}$	$CH_3-8', s$
$\delta = 2,40\text{ppm}$	$CH-3, m$
$\delta = 2,50\text{ppm}$	$CH_3-7', s$
$\delta = 3,01\text{ppm}$	$CH-4, m$
$\ast \delta = 3,94\text{ppm}$	$CHa-5, d.d, J_1 = 8,5 \text{ Hz}$ $J_2 = 7,3 \text{ Hz}$
$\ast \delta = 4,22\text{ppm}$	$CHb-5, t, J = 8,5 \text{ Hz}$
$\delta = 5,36\text{ppm}$	$CH-2, s \text{ large}$
$\delta = 5,90\text{ppm}$	$NH-9, d \text{ large}, J = 9 \text{ Hz}$
$\delta = 6,21\text{ppm}$	$CH-5', s$

7

\* L'attribution des déplacements chimiques des protons Ha et Hb est expliquée dans l'étude de la stéréochimie des produits d'addition p. 26.

- l'irradiation à  $\delta = 1,21$  ppm perturbe le signal observé à  $\delta = 2,40$  ppm (CH-3)
- l'irradiation à  $\delta = 3,01$  ppm modifie les deux signaux à  $\delta = 3,94$  ppm et  $\delta = 4,22$  ppm, ainsi que le multiplet observé à  $\delta = 2,40$  ppm (CH-3)
- la présence de  $D_2O$  élimine le signal observé à  $5,90$  ppm et affine celui à  $\delta = 5,36$  ppm

La multiplicité des signaux des protons Ha-5 et Hb-5 est expliquée par les couplages suivants :



$$J \text{ CHa-5 CHb-5} = 8,5 \text{ Hz}$$

$$J \text{ CHa-5 CH-4} = 7,3 \text{ Hz}$$

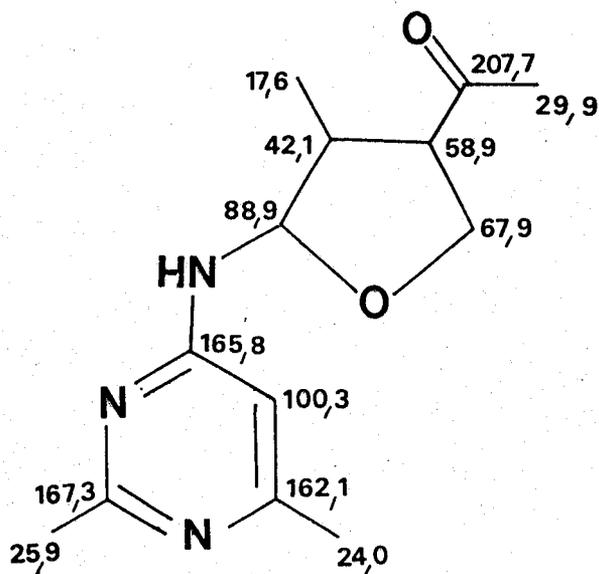
donnant un signal de doublet  
dédoublé à  $\delta = 3,94$  ppm

$$J \text{ CHb-5 CH-4} = 8,5 \text{ Hz}$$

donnant un signal triplet à  $\delta = 4,22$  ppm

L'allure du signal observé pour le proton H-2 à 60 MHz (doublet dédoublé) et à 350 MHz (singulet large) pourrait être interprétée par l'existence de rotamères au niveau de la liaison C-N. Ce phénomène est généralisé sur l'ensemble des produits d'addition hormis l'amino-2 pyrimidine.

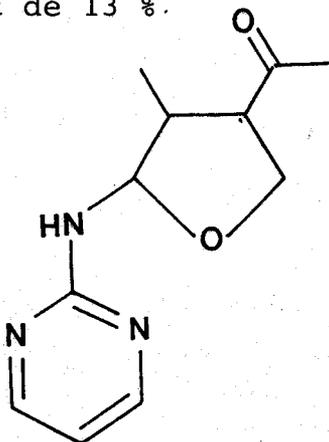
Le spectre R.M.N.<sup>13</sup>C présente 13 signaux. La multiplicité observée dans le spectre off-resonance permet de proposer l'attribution suivante :



7

c- Produit d'addition de la botryodiplodine  
sur l' amino-2 pyrimidine

La réaction de la botryodiplodine sur l' amino-2 pyrimidine est conduite dans le méthanol pendant 48 heures à 60°C. Le seul produit d'addition 8 est obtenu avec un rendement de 13 %.



8

La structure proposée repose sur les caractéristiques spectrales suivantes : le spectre de masse haute résolution montre le pic moléculaire  $m/e$  221,1163 ( $M^+$ ) en total, accord avec la formule brute  $C_{11}H_{15}N_3O_2$  (calc : 221,1164)

Le spectre R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (fig 2), présente de grandes analogies avec le composé 7 : on peut noter en particulier la présence d'un doublet à  $\delta = 1,22$  ppm correspondant au  $CH_3$ -6, la méthyle cétone  $CH_3$ -8 sortant sous forme d'un singulet intense à  $\delta = 2,24$  ppm.

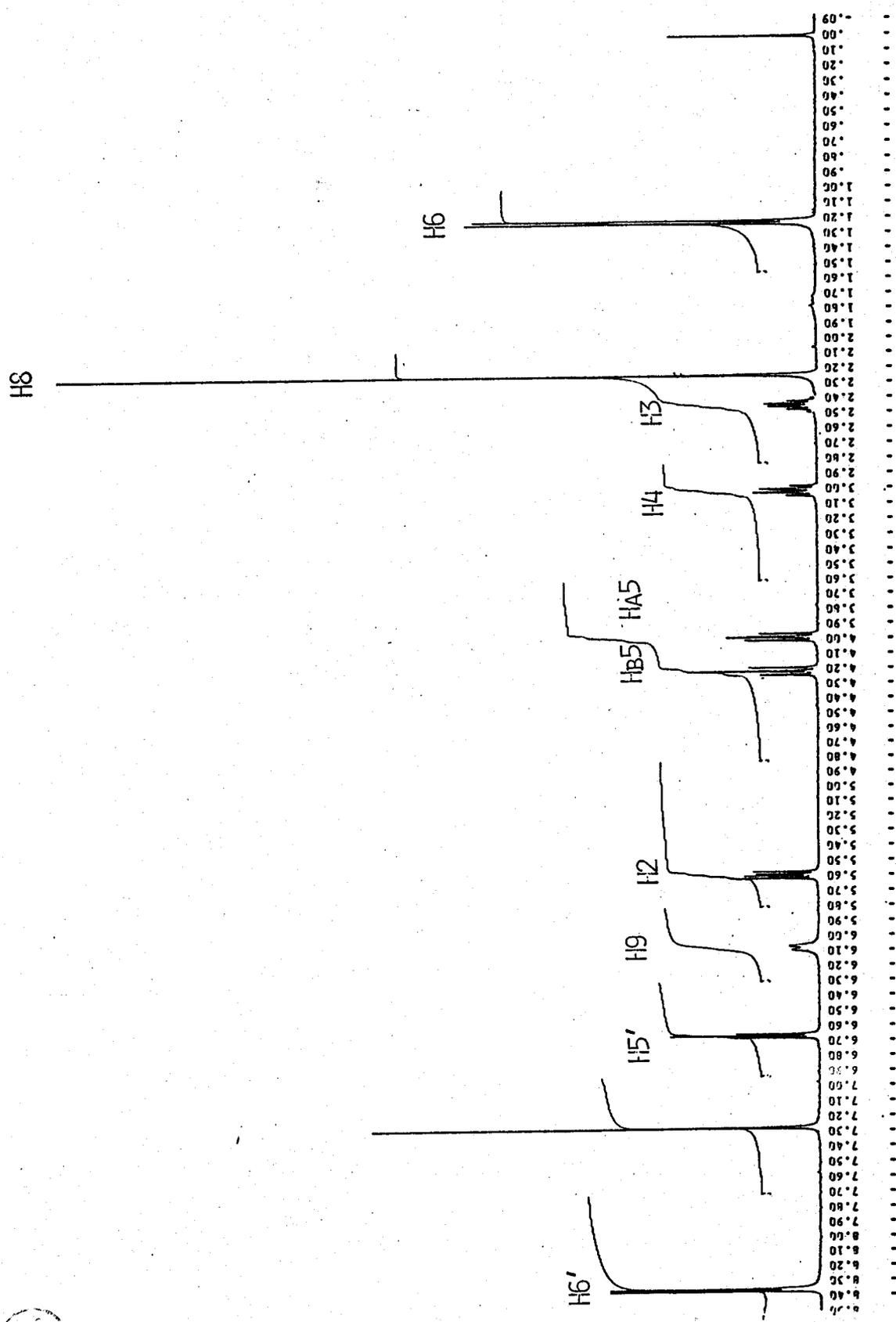
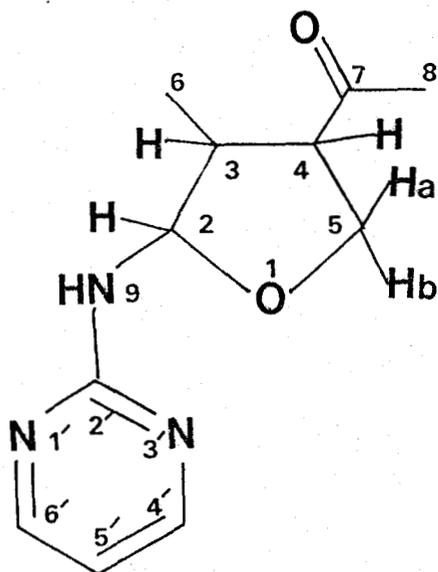


Fig. 2 : Spectre R. M. N. (350 MHz) du produit d'addition 8 . Solvant :  $\text{CDCl}_3$  .

L'attribution des déplacements chimiques observés se décompose ainsi :



8

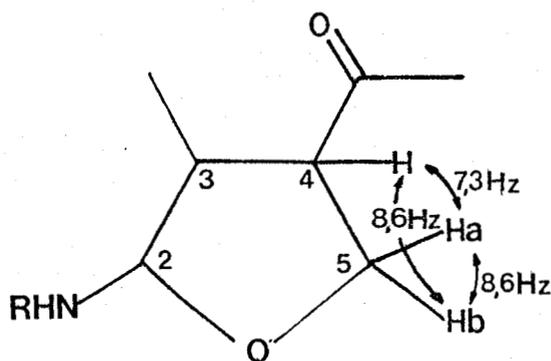
$\delta = 1,22\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-6, d, } J = 7,3 \text{ Hz}$
$\delta = 2,24\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-8, s}$
$\delta = 2,44\text{ppm}$	$\text{CH-3, sext, } J = 7,3 \text{ Hz}$
$\delta = 3,01\text{ppm}$	$\text{CH-4, q, } J = 7,3 \text{ Hz}$
$\delta = 3,98\text{ppm}$	$\text{CHa-5, d.d, } J_1 = 7,3 \text{ Hz}$ $J_2 = 8,6 \text{ Hz}$
$\delta = 4,21\text{ppm}$	$\text{CHb-5, t, } J = 8,6 \text{ Hz}$
$\delta = 5,59\text{ppm}$	$\text{CH-2, d.d, } J_1 = 9 \text{ Hz}$ $J_2 = 7,3 \text{ Hz}$
$\delta = 6,08\text{ppm}$	$\text{NH-9, d large, } J = 9 \text{ Hz}$
$\delta = 6,66\text{ppm}$	$\text{CH-5', t, } J = 4,7 \text{ Hz}$
$\delta = 8,36\text{ppm}$	$\text{CH-6', 4', d, } J = 4,7 \text{ Hz}$

- L'irradiation à  $\delta=1,22\text{ppm}$ ,  $\text{CH}_3\text{-6}$ , perturbe le signal observé à  $\delta=2,44\text{ppm}$  ( $\text{CH-3}$ )

- l'irradiation du  $\text{CH-3}$  à  $\delta=2,44\text{ppm}$  transforme le doublet observé à  $\delta=1,22\text{ppm}$  ( $\text{CH}_3\text{-6}$ ) en simplet, transforme le quadruplet à  $\delta=3,01\text{ppm}$  en triplet, le doublet dédoublé à  $\delta=5,59\text{ppm}$  est modifié en doublet ( $\text{CH-2}$ ).

- la présence de  $\text{D}_2\text{O}$  élimine le signal observé à  $\delta=6,08\text{ppm}$  et transforme le doublet dédoublé à  $\delta=5,59\text{ppm}$  ( $\text{CH-2}$ ) en doublet.

Les protons  $\text{CHa-5}$  et  $\text{CHb-5}$  ne sont pas équivalents. Les couplages observés sont reportés page suivante.



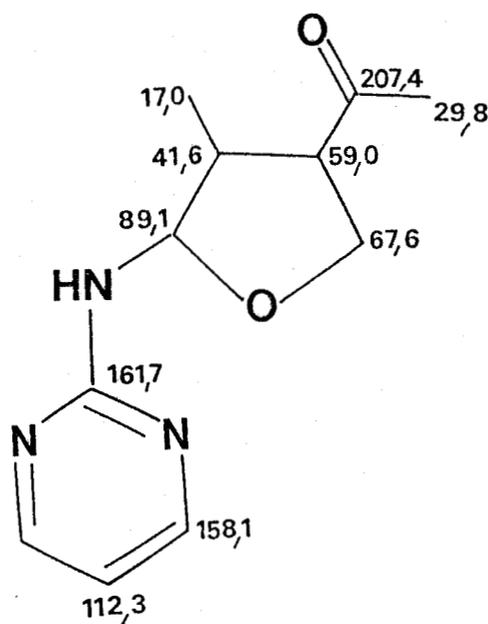
Le doublet dédoublé observé (CHa-5) résulte des couplages suivants :

$$J \text{ CHa-5 CHb-5} = 8,6 \text{ Hz}$$

$$J \text{ CHa-5 CH-4} = 7,3 \text{ Hz}$$

Le couplage  $J \text{ CHb-5 CH-4} = 8,6 \text{ Hz}$  donne un triplet à  $\delta = 4,21 \text{ ppm}$  (CHb-5)

Le spectre R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  présente 10 signaux. La multiplicité observée dans le spectre off-resonance permet de proposer l'attribution suivante :

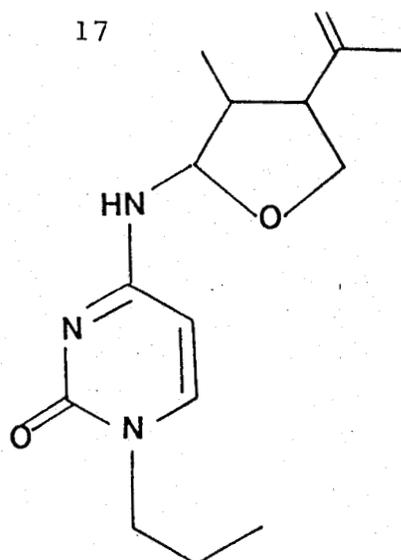


8

d- Produit d'addition de la botryodiplodine  
sur le propyl-1 cytosine

La réaction de la botryodiplodine sur le propyl-1 cytosine est réalisée dans le méthanol à  $60^\circ\text{C}$  pendant 48 heures. Le produit unique d'addition 9 est obtenu avec un rendement de 12 %

17

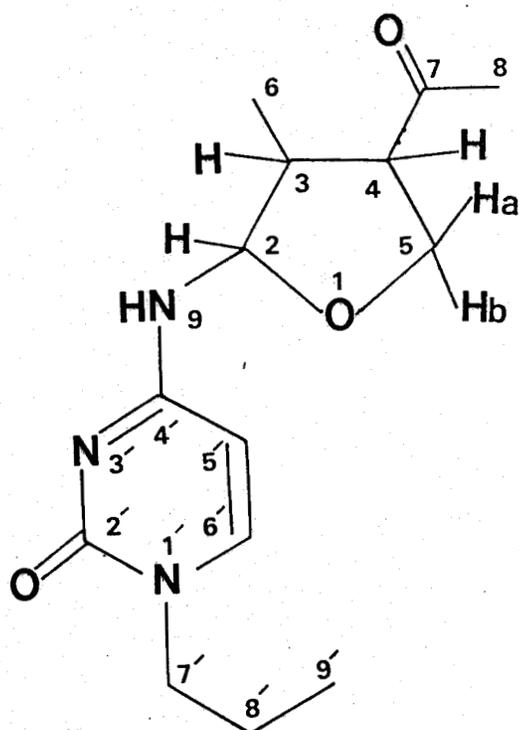
9

L'établissement de la structure repose sur les données suivantes :

le spectre de masse haute résolution montre le pic moléculaire  $m/e$  279,1581 ( $M^+$ ) qui est en accord avec la formule brute  $C_{14}H_{21}N_3O_3$  (calc : 279,1582).

Le spectre R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (fig 3), présente des analogies avec les composés 7 et 8. On y reconnaît aisément le  $CH_3$ -6, doublet sortant à  $\delta$ 1,19ppm, le méthyle en position 8, singulet intense à  $\delta$ 2,25ppm.

L'attribution des déplacements chimiques observés est reportée ci-dessous.



$\delta = 0,92$ ppm	$CH_3$ -9', t, $J = 7,3$ Hz
$\delta = 1,19$ ppm	$CH_3$ -6, d, $J = 7$ Hz
$\delta = 1,76$ ppm	$CH_2$ -8', m, $J=7,3$ Hz
$\delta = 2,25$ ppm	$CH_3$ -8, s
$\delta = 2,46$ ppm	$CH$ -3, m large,
	$L_{\frac{1}{2}} = 21,5$ Hz
$\delta = 2,99$ ppm	$CH$ -4, m
$\delta = 3,75$ ppm	$CH_2$ -7', m, $J = 7,3$ Hz
$\delta = 3,95$ ppm	$CH_a$ -5, d.d, $J_1 = 8,6$ Hz
	$J_2 = 5,6$ Hz
$\delta = 4,18$ ppm	$CH_b$ -5, t, $J = 8,6$ Hz
$\delta = 5,62$ ppm	$CH$ -2, d.d, $J = 7$ Hz
	$J = 13$ Hz
$\delta = 5,89$ ppm	NH-9, s large, $L_{\frac{1}{2}} = 35$ Hz
$\delta = 6,26$ ppm	$CH$ -5', s large
$\delta = 7,22$ ppm	$CH$ -6', s large

9

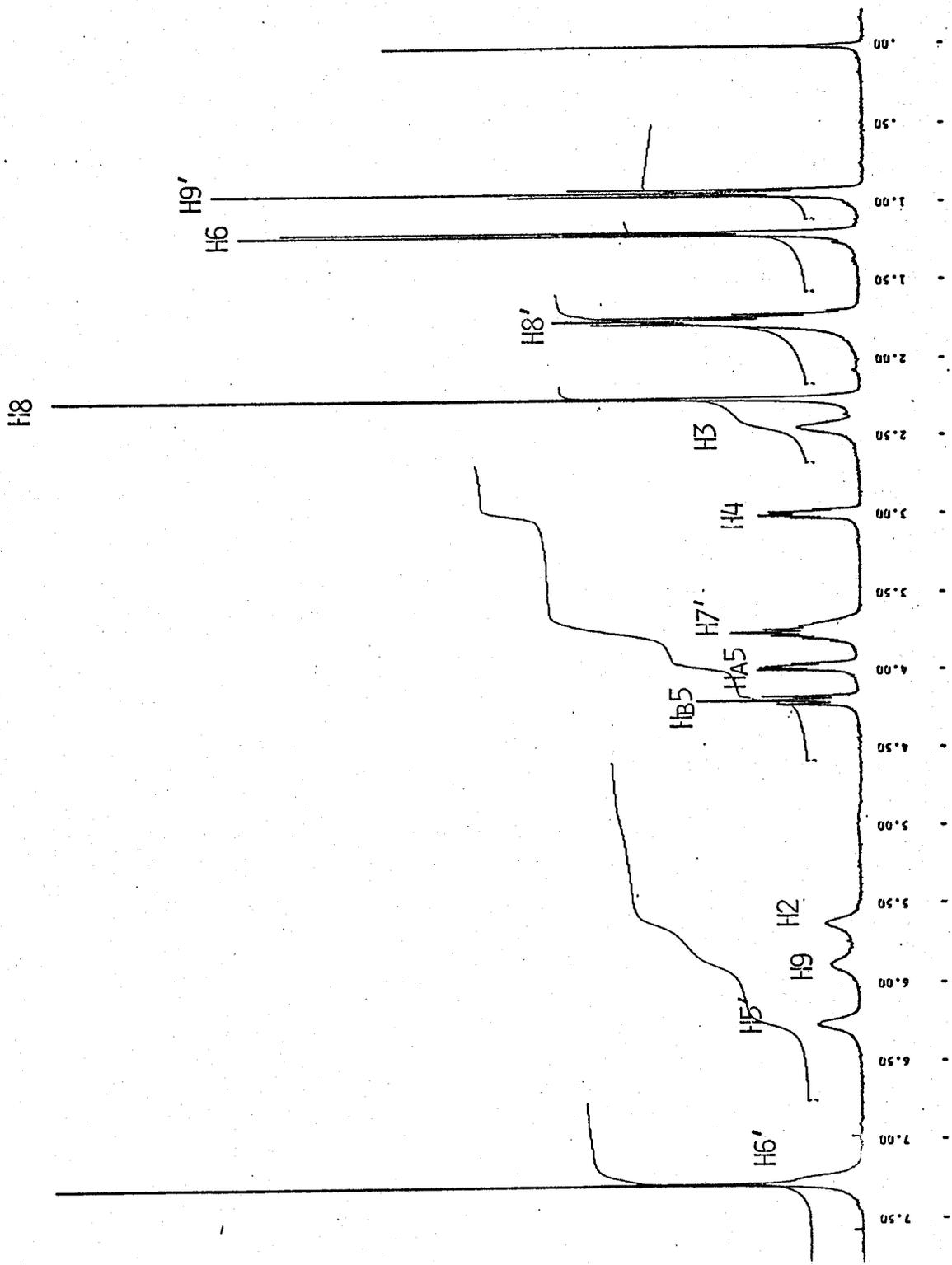


Fig. 3 : Spectre R. M.N. (350 MHz) du produit d'addition 9. Solvant :  $\text{CDCl}_3$ .

- l'irradiation du signal à  $\delta=1,19\text{ppm}$  affine le signal observé à  $\delta=2,46\text{ppm}$ .

- la présence de  $\text{D}_2\text{O}$  élimine le signal à  $\delta=5,89\text{ppm}$  (NH-9) et modifie l'allure du pic à  $\delta=5,62\text{ppm}$ .

Les protons Ha-5, Hb-5 ne sont pas équivalents. Le triplet CHb-5 et le doublet dédoublé CHa-5 observés sont expliqués par les couplages suivants :

$$J\text{CHa-5 CHb-5} = 8,6 \text{ Hz}$$

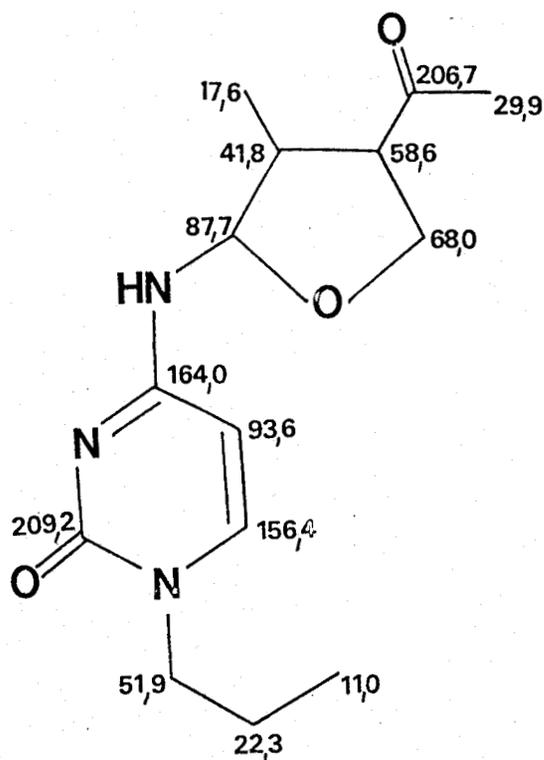
$$J\text{CHa-5 CH-4} = 5,6 \text{ Hz}$$

donnant un doublet dédoublé et

$$J\text{CHb-5 CH-4} = 8,6 \text{ Hz}$$

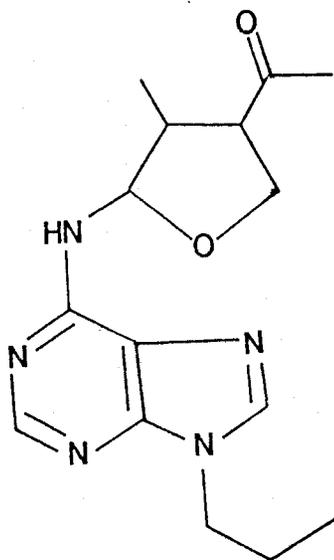
donnant un triplet pour le proton CHb-5

Le spectre R.M.N.<sup>13</sup>C présente 14 signaux. L'attribution des déplacements chimiques est donnée ci-dessous, en accord avec la multiplicité observée dans le spectre off-resonance.



e- Produit d'addition de la botryodiplodine  
sur le propyl-9 adenine

La réaction de la botryodiplodine sur le propyl-9 adénine est réalisée dans le méthanol à 60°C pendant 48 heures. Deux isomères 10a, 10b sont obtenus dans une proportion de 70/30, avec un rendement total de 21 %.



10a 10b

La séparation des isomères 10a et 10b est réalisée par C.L.H.P semi préparative sur une colonne de silice, par recyclages successifs des fractions 10a, 10b les plus pures.

On récupère la première fraction 10a que l'on cristallise dans un mélange éther éthylique-méthanol. La 2ème fraction 10b est légèrement contaminée par 10a.

Les caractéristiques physiques de 10a et 10b sont reportées ci-dessous.

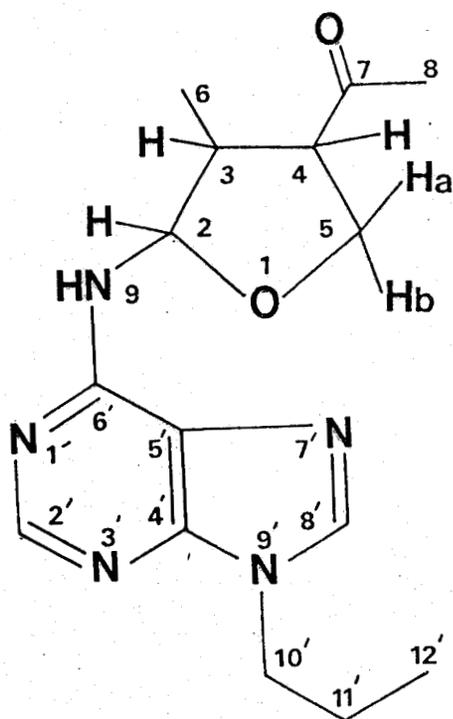
10a L'analyse élémentaire C : 59,61, H : 7,03,  
N : 22,89 est en accord avec la formule brute  
 $C_{15}H_{21}N_5O_2$  (calc : C : 59,38, H : 6,98, N : 23,09).

Le spectre de masse haute résolution montre le pic moléculaire  $m/e$  303,1694 ( $M^+$ ) qui est en accord avec la formule brute (calc : 303,1695).

Le spectre R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (fig 4) est aisément interprétable. On reconnaît le méthyle en position 6, sortant sous forme d'un doublet à  $\delta$ 1,23ppm, et un singulet intense à  $\delta$ =2,24ppm correspondant au méthyle 8.

Les protons aromatiques, caractéristiques de l'adénine, sortent sous forme de 2 singulets à  $\delta$ 7,81ppm et  $\delta$ 8,44ppm.

L'attribution des signaux observés est reportée ci-dessous :

10a

$\delta = 0,93\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-}12'$ , t, $J = 7,3$ Hz
$\delta = 1,23\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-}6$ , d, $J = 7,3$ Hz
$\delta = 1,90\text{ppm}$	$\text{CH}_2\text{-}11'$ , sext, $J = 7,3$ Hz
$\delta = 2,24\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-}8$ , s
$\delta = 2,54\text{ppm}$	$\text{CH-}3$ , sext, $J = 7,3$ Hz
$\delta = 3,03\text{ppm}$	$\text{CH-}4$ , t.d, $J_1 = 7,3$ Hz $J_2 = 8,5$ Hz
$\delta = 4,00\text{ppm}$	$\text{CHa-}5$ , d.d, $J_1 = 7,3$ Hz $J_2 = 8,5$ Hz
$\delta = 4,14\text{ppm}$	$\text{CH}_2\text{-}10'$ , t, $J = 7,3$ Hz
$\delta = 4,24\text{ppm}$	$\text{CHb-}5$ , t, $J = 8,5$ Hz
$\delta = 5,95\text{ppm}$	$\text{CH-}2$ , d.d, $J_1 = 7,3$ Hz $J_2 = 9$ Hz
$\delta = 6,86\text{ppm}$	$\text{NH-}9$ , d, $J = 9$ Hz
$\delta = 7,81\text{ppm}$	$\text{CH-}8'$ , s
$\delta = 8,44\text{ppm}$	$\text{CH-}2'$ , s

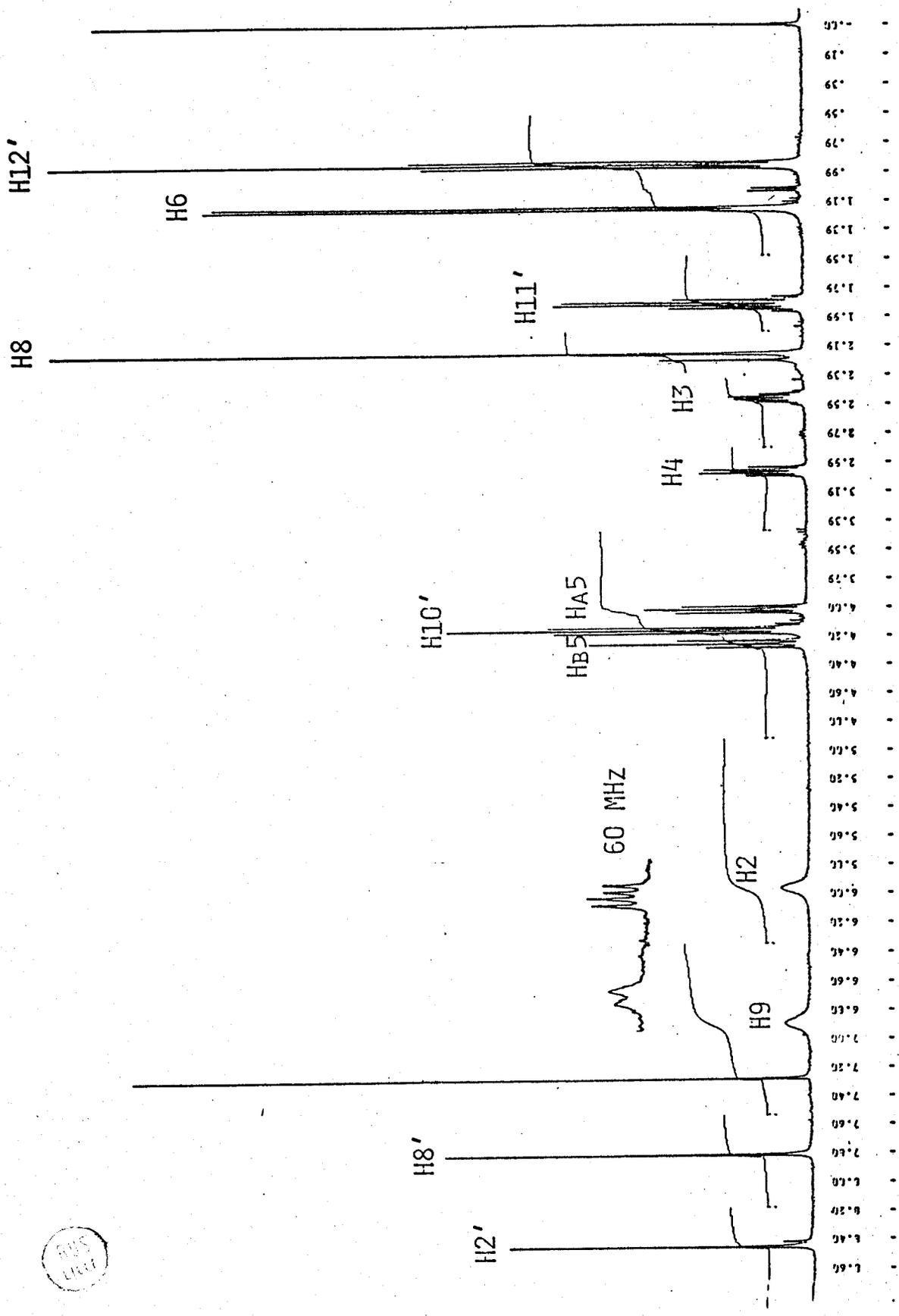


Fig. 4 : Spectre R.M.N. (350 MHz) du produit d'addition 10a . Solvant  $\text{CDCl}_3$  .

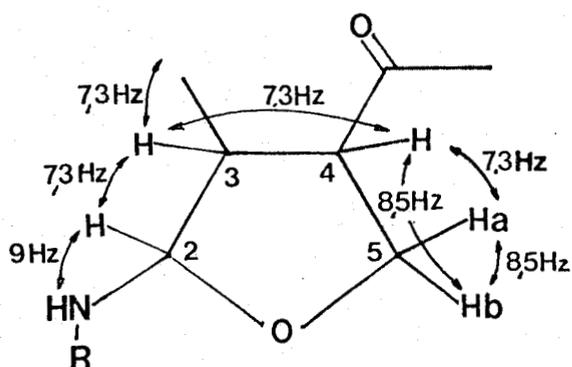
- l'irradiation à  $\delta=1,23\text{ppm}$  perturbe le signal observé à  $\delta=2,54\text{ppm}$

- l'irradiation du sextuplet à  $\delta=2,54\text{ppm}$  modifie le triplet dédoublé à  $\delta=3,03\text{ppm}$  (CH-4), transforme le doublet à  $\delta=1,23\text{ppm}$  (CH<sub>3</sub>-6) en singulet et affine le signal observé à  $\delta=5,95\text{ppm}$  (CH-2).

- l'irradiation à  $\delta=3,03\text{ppm}$  (CH-4) modifie les signaux observés à  $\delta=4,00$  et  $4,24\text{ppm}$  (CHa-5, CHb-5) et perturbe le signal observé à  $\delta=2,54\text{ppm}$ .

- la présence de D<sub>2</sub>O élimine le singulet large observé à  $\delta=6,86\text{ppm}$  (NH-9) et affine le signal à  $\delta=5,95\text{ppm}$ .

Les protons CHa-5, CHb-5 ne sont pas équivalents. La multiplicité des signaux observés est interprétée par les constantes de couplage :



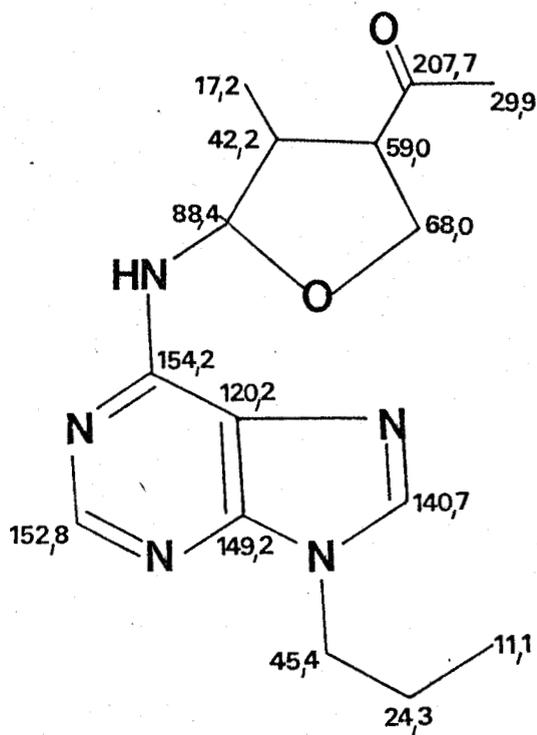
CHa-5 : JCHa-5 CHb-5 : 8,5 Hz

JCHa-5 CH-4 : 7,3 Hz

CHb-5 : JCHb-5 CH-4 : 8,5 Hz

CH-4 : JCH-4 CH-3 : 7,3 Hz

Le spectre R.M.N<sup>13</sup>C du composé 10a présente 15 signaux dont l'attribution est reportée ci-dessous :

10a

Les caractéristiques spectrales du composé 10b sont reportées ci-dessous.

Le spectre de masse haute résolution montre le pic moléculaire  $m/e$  303,1694 ( $M^+$ ) en accord avec la formule brute  $C_{15}H_{21}N_5O_2$  (calc : 303,1695).

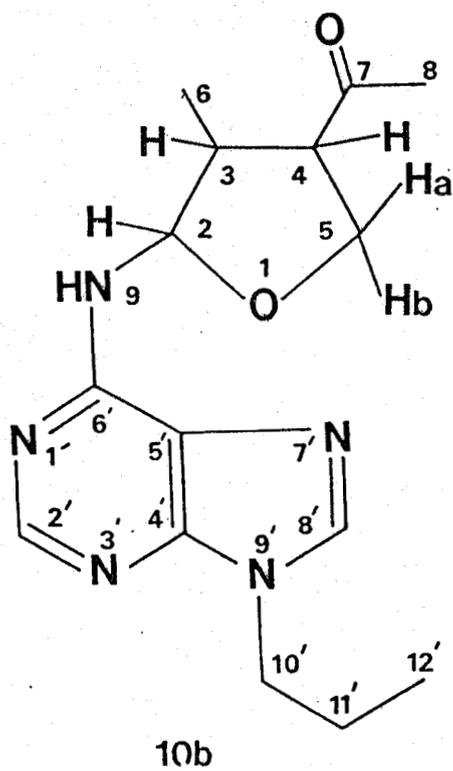
Il est à noter que les fragmentations observées sont identiques au composé 10a.

Le spectre R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (fig 5) présente de grandes analogies avec l'isomère 10a.

Le méthyle en position 6 sort sous forme d'un doublet à  $\delta$  1,12 ppm. Le singulet intense à  $\delta$  2,24 ppm correspond au  $CH_3$ -8.

Les protons aromatiques sortent à  $\delta$  = 7,80 ppm et  $\delta$  = 8,46 ppm.

L'attribution totale des déplacements chimiques observés est reportée ci-dessous :

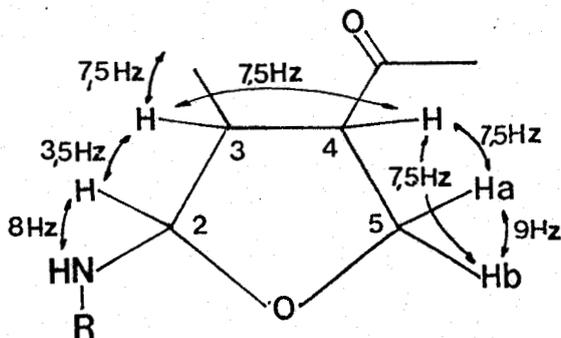


$\delta = 0,96\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-}12'$ , t, $J = 7,5\text{ Hz}$
$\delta = 1,12\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-}6$ , d, $J = 7,5\text{ Hz}$
$\delta = 1,93\text{ppm}$	$\text{CH}_2\text{-}11'$ , sext, $J = 7,5\text{ Hz}$
$\delta = 2,24\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-}8$ , s
$\delta = 2,68\text{ppm}$	$\text{CH-}3$ , quint. d, $J_1 = 7,5\text{ Hz}$ $J_2 = 3,5\text{ Hz}$
$\delta = 3,55\text{ppm}$	$\text{CH-}4$ , q, $J = 7,5\text{ Hz}$
$\delta = 4,10\text{ppm}$	$\text{CHa-}5$ , d. d, $J_1 = 7,5\text{ Hz}$ $J_2 = 9\text{ Hz}$
$\delta = 4,19\text{ppm}$	$\text{CH}_2\text{-}10'$ , t, $J^2 = 7,5\text{ Hz}$
$\delta = 4,26\text{ppm}$	$\text{CHb-}5$ , d. d, $J_1 = 7,5\text{ Hz}$ $J_2 = 9\text{ Hz}$
$\delta = 5,95\text{ppm}$	$\text{CH-}2$ , d. d, $J_1 = 3,5\text{ Hz}$ $J_2 = 8\text{ Hz}$
$\delta = 6,36\text{ppm}$	$\text{NH-}9$ , d large, $J = 8\text{ Hz}$
$\delta = 7,80\text{ppm}$	$\text{CH-}8'$ , s
$\delta = 8,46\text{ppm}$	$\text{CH-}2'$ , s

- l'irradiation à  $\delta=1,12\text{ppm}$  ( $\text{CH}_3\text{-}6$ ) perturbe le signal observé à  $\delta=2,68\text{ppm}$  ( $\text{CH-}3$ ).

- la présence de  $\text{D}_2\text{O}$  supprime le signal observé à  $\delta=6,36\text{ppm}$  et transforme le signal à  $\delta=5,95\text{ppm}$  ( $\text{CH-}2$ ) en doublet.

La multiplicité des signaux correspondant aux protons  $\text{CHa-}5$ ,  $\text{CHb-}5$ ,  $\text{CH-}4$ , et  $\text{CH-}3$  est facilement interprétée par les constantes de couplage observées et se décompose de la façon suivante :



$\text{CHa-}5$ :	$J_{\text{CHa-}5 \text{ CHb-}5} = 9\text{ Hz}$
	$J_{\text{CHa-}5 \text{ CH-}4} = 7,5\text{ Hz}$
$\text{CHb-}5$ :	$J_{\text{CHb-}5 \text{ CH-}4} = 7,5\text{ Hz}$
$\text{CH-}4$ :	$J_{\text{CH-}3 \text{ CH-}4} = 7,5\text{ Hz}$
$\text{CH-}3$ :	$J_{\text{CH-}3 \text{ CH-}6} = 7,5\text{ Hz}$
	$J_{\text{CH-}2 \text{ CH-}3} = 3,5\text{ Hz}$

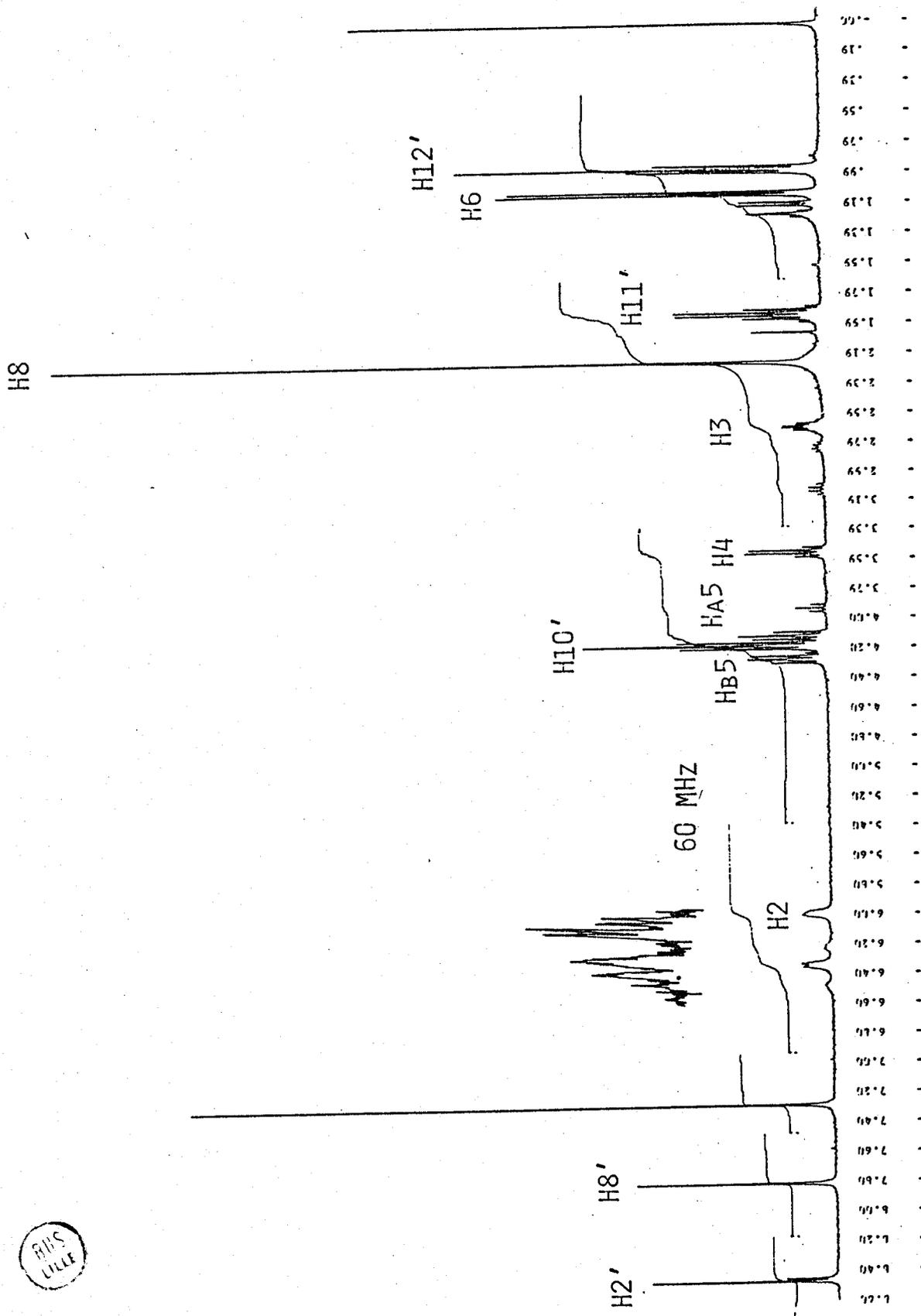
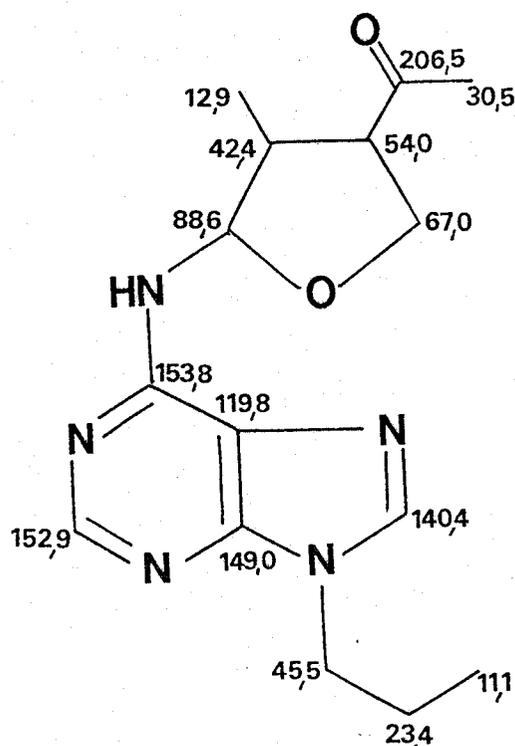


Fig. 5 : Spectre R. M. N. (350 MHz) du produit d'addition 10b . Solvant  $\text{CDCl}_3$  .

Le spectre R.M.N<sup>13</sup>C de 10b présente 15 pics dont la multiplicité observée en off-resonance permet l'attribution suivante :



10b

L'étude de la stéréochimie des isomères 10a, 10b, est étudiée p.27

f- Produit d'addition de la botryodiplodine sur le propyl-9 guanine

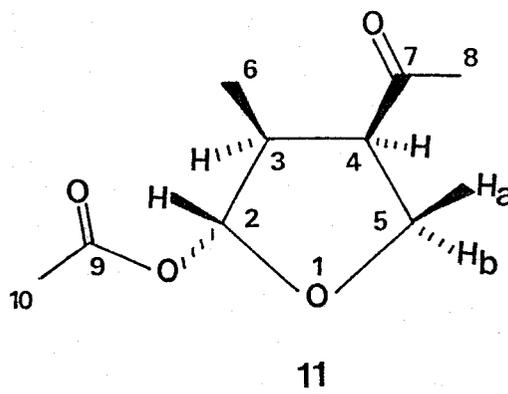
La réaction de la botryodiplodine sur le propyl -9 guanine est réalisée dans le méthanol pendant 48 heures à 60°C. Aucun produit d'addition n'a pu être mis en évidence par chromatographie couche mince.

### III- Etude de la stéréochimie des produits d'addition

Pour aborder cette étude, nous disposons de 2 éléments importants. En premier lieu, la stéréochimie de l'acétyle botryodiplodine 11 a été déterminée par diffraction aux R.X et constitue donc une référence. En second lieu, il convient de remarquer que les carbones 3,4,5 de la botryodiplodine ne sont pas impliqués dans le mécanisme de formation des divers dérivés amino-2 tétrahydrofuranne (la discussion complète du mécanisme réactionnel est décrite §IV). Nous considérerons donc, dans la suite de ce chapitre, que la stéréochimie des carbones 3,4,5 est identique à celle de la botryodiplodine et de l'acétyle botryodiplodine 11.

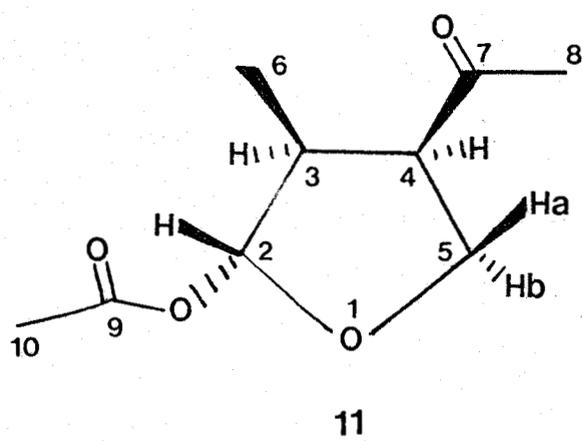
#### 1- Stéréochimie de l'acétyle botryodiplodine

L'acétylation de 1 conduit à un composé unique 11 dont la stéréochimie relative a été déterminée par études chimiques (11) et confirmée par diffraction aux R.X (3).



Le spectre R.M.N<sup>1</sup>H à 60 MHz n'est pas du premier ordre au niveau de l'analyse des protons 4 et 5. L'analyse à 350 MHz (fig 6) permet d'observer tous les couplages attendus. L'interprétation complète de ce

spectre est détaillée ci-dessous :



$\delta = 0,92\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-6, d, } J = 7,5 \text{ Hz}$
$\delta = 2,06\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-8, s}$
$\delta = 2,22\text{ppm}$	$\text{CH}_3\text{-10, s}$
$\delta = 2,69\text{ppm}$	$\text{CH-3, quint, } J = 7,5 \text{ Hz}$
$\delta = 3,58\text{ppm}$	$\text{CH-4, t.d, } J_1 = 7,5 \text{ Hz}$ $J_2 = 9 \text{ Hz}$
$\delta = 4,09\text{ppm}$	$\text{CHa-5, t, } J = 9 \text{ Hz}$
$\delta = 4,35\text{ppm}$	$\text{CHb-5, t, } J = 9 \text{ Hz}$
$\delta = 5,98\text{ppm}$	$\text{CH-2, s}$

Les protons en 5 ne sont pas équivalents (CHa-5, CHb-5). Le proton Ha-5, en cis par rapport à la méthyle cétone, est le plus blindé car il se situe, en moyenne, dans le cône de blindage de la cétone.

La valeur des constantes de couplage des protons H-2, H-3 est gouvernée par l'angle dièdre formé par ces deux protons. Dans ce cas, cette constante est nulle car les protons sont en position trans, c'est-à-dire que l'angle dièdre est très proche de  $90^\circ$ .

Les protons H-3, H-4 en position cis, présentent une constante de couplage de 7,5 Hz. De même, les protons H-4 et Hb-5 en cis sont couplés avec une grande constante de couplage ( $J_{\text{H-4 Hb-5}} = 9 \text{ Hz}$ ). La constante de couplage H-4 Ha-5 n'est pas nulle, bien que ces protons soient dans une configuration trans. Le modèle moléculaire (fig 7) montre qu'il peut exister une conformation du cycle qui assure un angle dièdre d'environ  $130^\circ$  pour les protons H-4, Ha-5 et imposant un angle H-2, H-3 proche de  $90^\circ$ , expliquant ainsi les différences notables entre les valeurs des constantes des protons H-2 H-3 ( $\approx 0 \text{ Hz}$ ) et H4-Ha-5 (7,5 Hz).

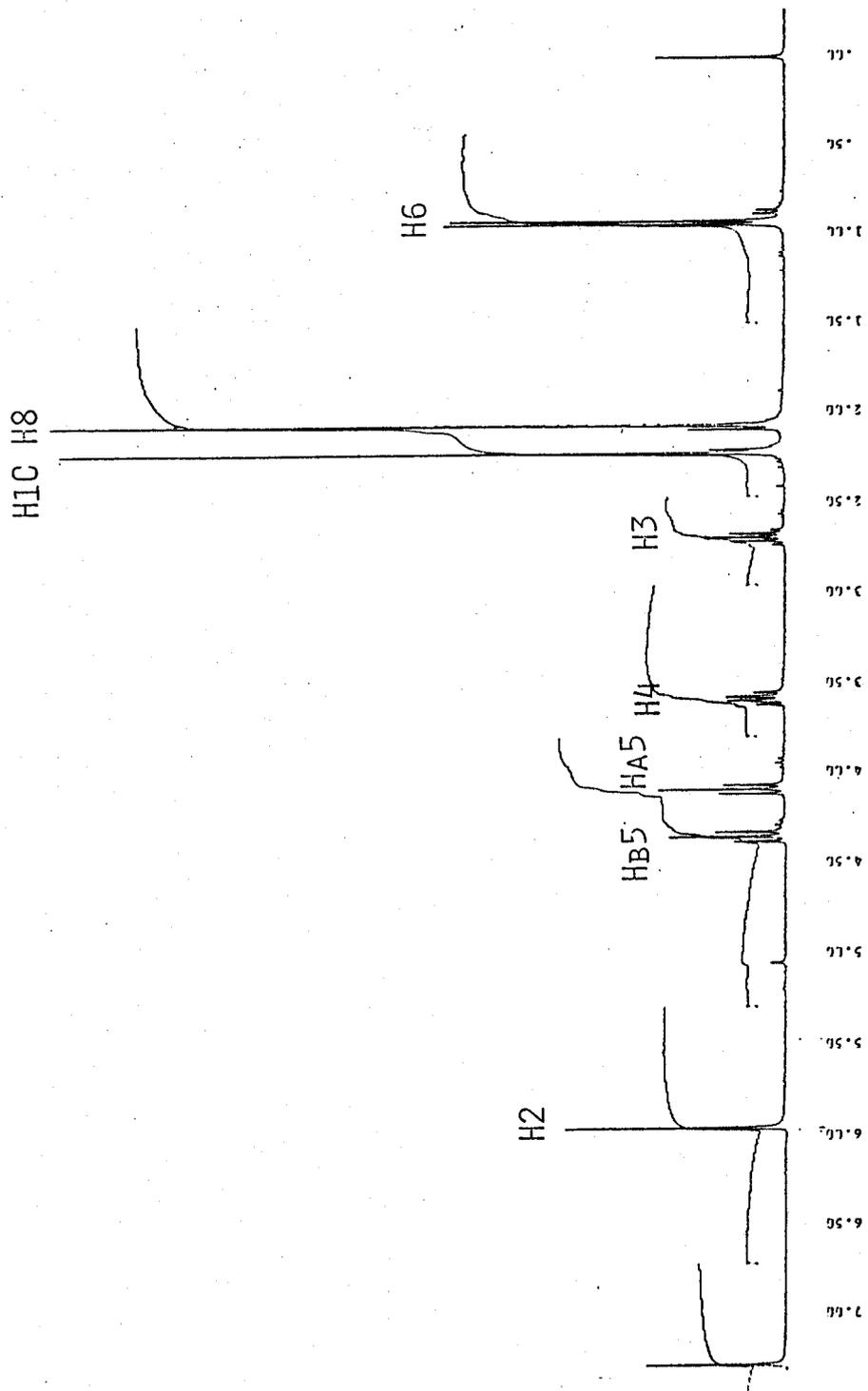


Fig. 6 : Spectre R. M. N. (350 MHz) de l'acétylbotryodiplodine. Solvant  $\text{CDCl}_3$ .

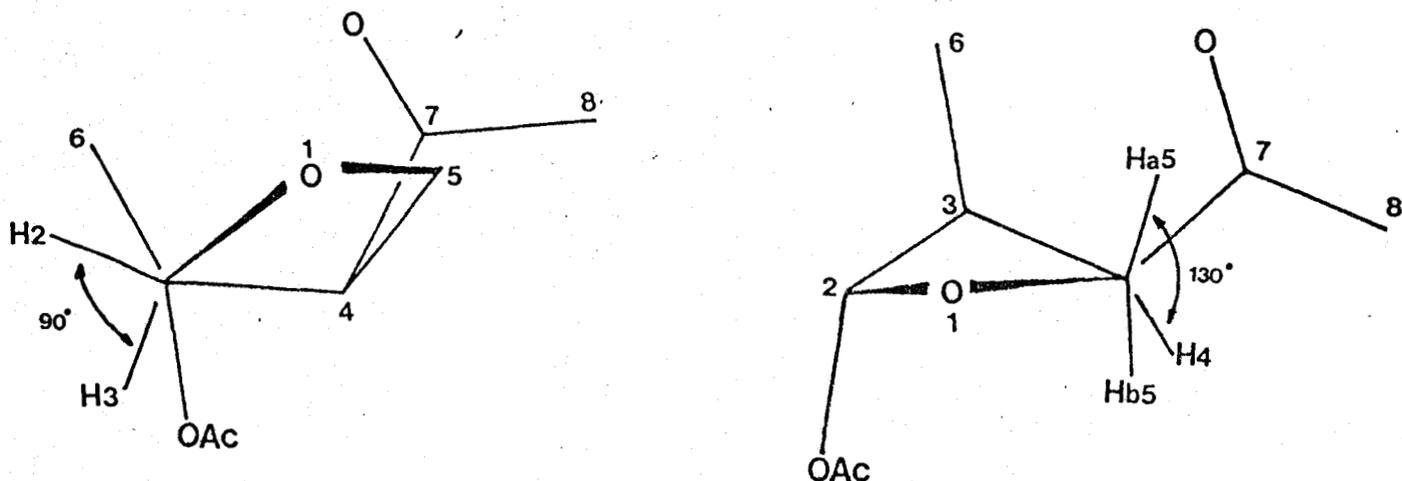


Fig. 7 : Modèle Dreiding de la conformation de 11

## 2- Stéréochimie des composés 10a, 10b, 7, 8, 9, 2.

L'interprétation des couplages proton-proton de 11 va constituer un élément d'accès à la stéréochimie des autres dérivés. De plus, la comparaison des déplacements chimiques du proton et du carbone 13 de la série de dérivés (tableau 1-2) permet de mettre en évidence 2 effets majeurs.

Si l'on s'intéresse particulièrement aux carbones 3, 4, 5, 6 dont les substituants sont identiques dans toute la série, la R.M.N. du proton montre essentiellement un effet important au niveau du proton 4. Les déplacements chimiques de ce proton se regroupent en 2 catégories :  $\delta \approx 3\text{ppm}$  (7, 8, 9, 10a) et  $\delta \approx 3,5\text{ppm}$  (11, 10b, 2)

Si l'on se tourne vers la R.M.N. du carbone 13, on retrouve ces deux mêmes catégories. Le tableau 2 montre que les déplacements chimiques du C-4 et C-6 se regroupent en 2 séries de valeurs :

C-4 :  $\delta \approx 53\text{ppm}$  (11, 10b, 2)  
 $\delta \approx 59\text{ppm}$  (7, 8, 9, 10a)  
 et C-6 :  $\delta \approx 12,5\text{ppm}$  (11, 10b, 2)  
 $\delta \approx 17,5\text{ppm}$  (7, 8, 9, 10a)

Ces deux effets ne suffisent pas pour conclure quant à la stéréochimie de ces 2 séries, mais soulignent l'existence de deux types distincts de dérivés.

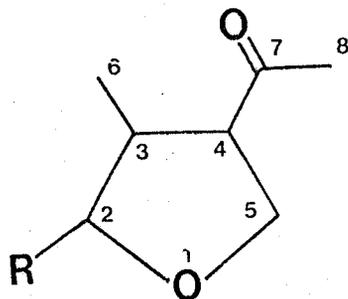


TABLEAU I

H	H-2	H-3	H-4	Ha-5	Hb-5	H-6	H-8
<u>11</u>	5,98	2,69	3,58	4,09	4,35	0,92	2,06
<u>2</u>	4,66	2,58	3,57	3,93	4,29	0,86	2,19
<u>10b</u>	5,95	2,68	3,55	4,10	4,26	1,12	2,24
<u>7</u>	5,36	2,40	3,01	3,94	4,22	1,21	2,24
<u>8</u>	5,59	2,44	3,01	3,98	4,21	1,22	2,24
<u>9</u>	5,62	2,46	2,99	3,95	4,18	1,19	2,25
<u>10a</u>	5,95	2,54	3,03	4,00	4,24	1,23	2,24

TABLEAU 2

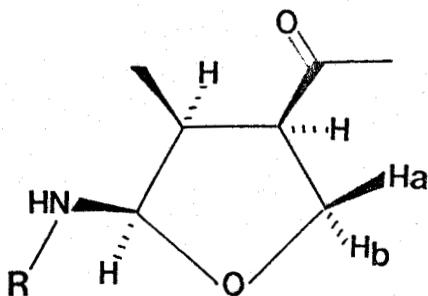
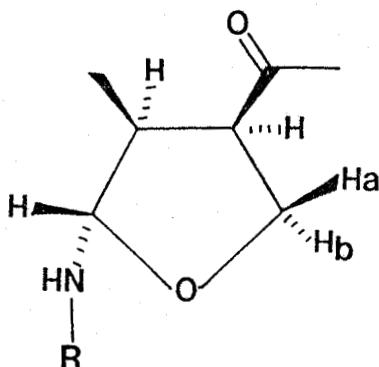
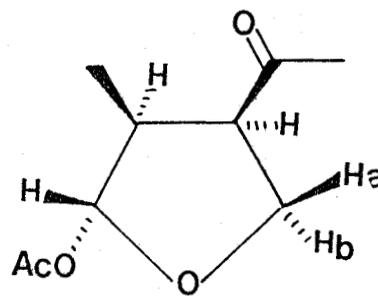
C	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8
<u>11</u>	104,2	41,7	52,8	67,7	12,2	205,4	30,3
<u>2</u>	110,7	42,0	53,3	66,3	12,5	204,3	29,5
<u>10b</u>	88,6	42,4	54,0	67,0	12,9	206,5	30,5
<u>7</u>	88,9	42,1	58,9	67,9	17,6	207,7	29,9
<u>8</u>	89,1	41,6	59,0	67,6	17,0	207,4	29,8
<u>9</u>	87,7	41,8	58,6	68,0	17,6	206,7	29,9
<u>10a</u>	88,4	42,2	59,0	68,0	17,2	207,7	29,9



### a- Stéréochimie des composés 10a, 10b

Il est intéressant d'étudier en premier lieu, les deux isomères 10a et 10b qui se répartissent dans les deux catégories mentionnées.

Nous attribuons à 10a et 10b les stéréochimies suivantes :

10a10b11

Ce sont 2 épimères en 2. Cette attribution repose sur les données suivantes.

- Dans ces deux épimères, les valeurs des couplages des protons H3, H4, H5 sont très voisines. Elles sont gouvernées par les valeurs des divers angles dièdres. Comme le montre la figure ci-dessus, il existe une excellente concordance entre les valeurs de ces diverses constantes chez 10a, 10b et 11, confirmant ainsi l'identité des configurations des carbones 3, 4, 5 pour ces 3 dérivés.

- La différence essentielle entre 10a et 10b réside au niveau des couplages des protons H-2 H-3. La valeur la plus élevée (10a)  $J = 7,3$  Hz indique une configuration cis de ces 2 protons, configuration qui seule peut assurer un angle dièdre proche de  $0^\circ$ .

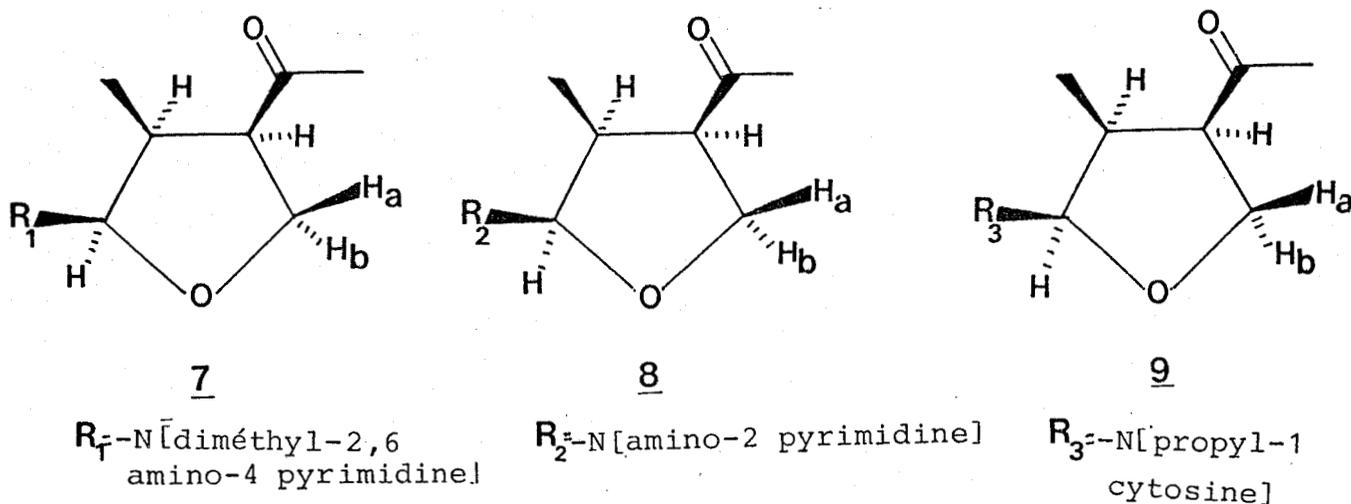
Ceci impose donc une configuration cis à l'ensemble des substituants amine, méthyle et méthyle cétone pour le composé 10a.

Par contre, le composé 10b montre une constante faible de 3,5 Hz qui est compatible avec une configuration trans des protons H-2 H-3, assurant ainsi au dérivé 10b une configuration identique à celle de 11.

### b- Stéréochimie des composés 7, 8, 9

La stéréochimie de ces 3 dérivés est identique à celle de 10a. Ceci repose sur les mêmes arguments que ceux développés précédemment.

On note une concordance remarquable entre les valeurs des couplages H-3, H-4, H-5. La détermination de l'ensemble des constantes de couplage pour 9 est impossible ; en effet, le signal H-3 n'est pas analysable (signal large  $L \frac{1}{2} = 21,5$  Hz) et le proton H-4 sort sous forme de multiplet complexe. Par contre, le système des protons H-5 présente l'allure habituelle.

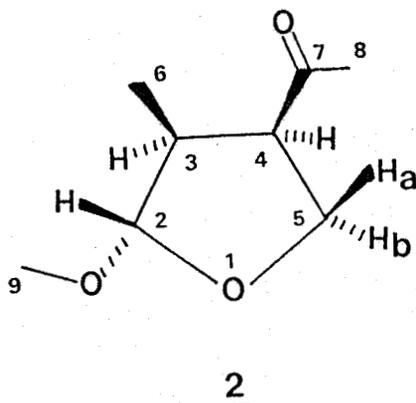


- la constance H-2 H-3 pour ces trois dérivés est celle attendue pour la configuration proposée :  $J \approx 7$  Hz

### c- Stéréochimie du composé 2

Ce composé obtenu par méthylation de la bo-tryodiplodine, possède une stéréochimie identique aux dérivés 11 et 10b. En effet, comme pour l'ensemble des dérivés, le spectre R.M.N. du proton permet de montrer que les couplages H-3, H-4, H-5 sont compatibles avec la configuration proposée au niveau des carbones 3, 4, 5.

Par contre, la constante de couplage H-2 H-3 est nulle, indiquant donc une configuration trans des protons H-2 H-3.



#### d- Discussion

L'analyse présentée ici montre que les 2 catégories de dérivés soulignées par les spectres R.M.N. proton et carbone 13 correspondent donc à 2 séries stéréochimiques.

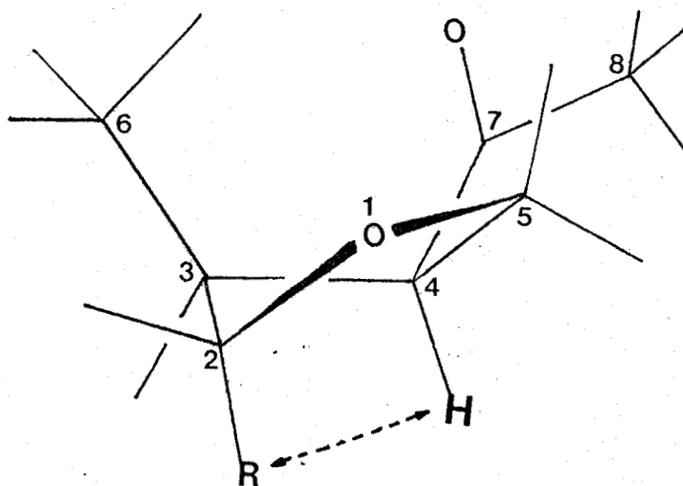
- les composés 7, 8, 9, 10a présentent une stéréochimie entièrement cis des substituants en C-2, C-3, C-4.

- les composés 11, 10b, 2 possèdent une inversion de configuration en position 2.

Il faut souligner que ces propositions sont compatibles avec les effets observés en R.M.N du carbone 13 et du proton.

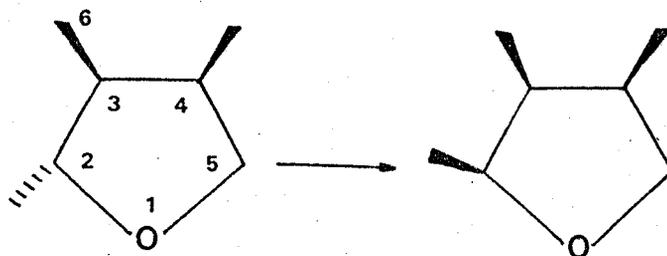
En ce qui concerne les spectres  $^{13}\text{C}$ , les dérivés cis présentent un déblindage des carbones 4 et 6 par rapport aux dérivés trans. Ceci est interprétable par l'intervention de 2 effets différents :

- la configuration des composés 11, 10b et 2 crée une interaction 1,3 cis entre le substituant en 2 et le proton en 4. On observe donc



entre ces substituants un effet  $\gamma$  classique aboutissant à un blindage des carbones concernés (12). Il faut noter également que dans ce type d'interaction, l'effet observé en R.M.N du proton est inverse : on observe un déblindage des protons impliqués (12).

- la configuration inverse de 10a supprime cette interaction 1,3 cis mais crée par contre, une nouvelle interaction 1,2 cis. L'effet de cette interaction sur les déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  en série cyclopentanique, ou tétrahydrofurannique consiste en un blindage des carbones en interaction (13), c'est-à-dire dans notre cas le carbone 6. La somme de ces 2 effets se traduit, lorsque l'on passe de la forme trans à la forme cis par :



- un déblindage au niveau du carbone C-4 (suppression de l'interaction 1,3)
- un déblindage au niveau du carbone C-6 (création de l'interaction 1,2 vicinale)

Il faut ajouter que les effets  $\gamma$  et 1,2 cis s'étendent aux carbones situés entre les groupements interagissants. Ceci est le cas des carbones 2,3. Les effets  $\gamma$  et 1,2 cis étant inverses, on observe une stabilité des déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  observés pour ces carbones lors de l'inversion de la configuration en 2.

En ce qui concerne la R.M.N. du proton, nous avons souligné précédemment l'influence de l'interaction 1,3 sur le proton H-4. Le déblindage de 0,5ppm observé sur les dérivés présentant cette interaction (11, 10b,

2) est compatible avec l'effet attendu (12).

Il est remarquable de constater que seul ce proton H-4 subit un déplacement chimique notable lorsque l'on passe du composé 10a à 10b. Le proton H-2 en particulier, n'est pas affecté.

Nous avons considéré, dans l'ensemble de ce chapitre, que la stéréochimie des carbones 3 et 4 était conservée lors de la réaction de la botryodiplodine avec diverses amines. Il faut souligner ici qu'une inversion de configuration en 4 se traduirait notablement par une modification importante du couplage H-3 H-4 et H-5, et du reste, expliquerait difficilement la variation du couplage H-2 H-3, seule différence notable entre les spectres de 10a et 10b.

#### IV- Conclusion, mode d'action chimique de la botryodiplodine

Les résultats des propriétés biologiques de la botryodiplodine sur des cellules en culture ont montré une inhibition simultanée des trois processus biosynthétiques fondamentaux de la cellule, à savoir la répllication, la transcription et la traduction.

A ce type d'inhibition, viennent s'ajouter un pouvoir mutagène de la mycotoxine dans le test de Ames et une aptitude à la création de pontage DNA-protéines.

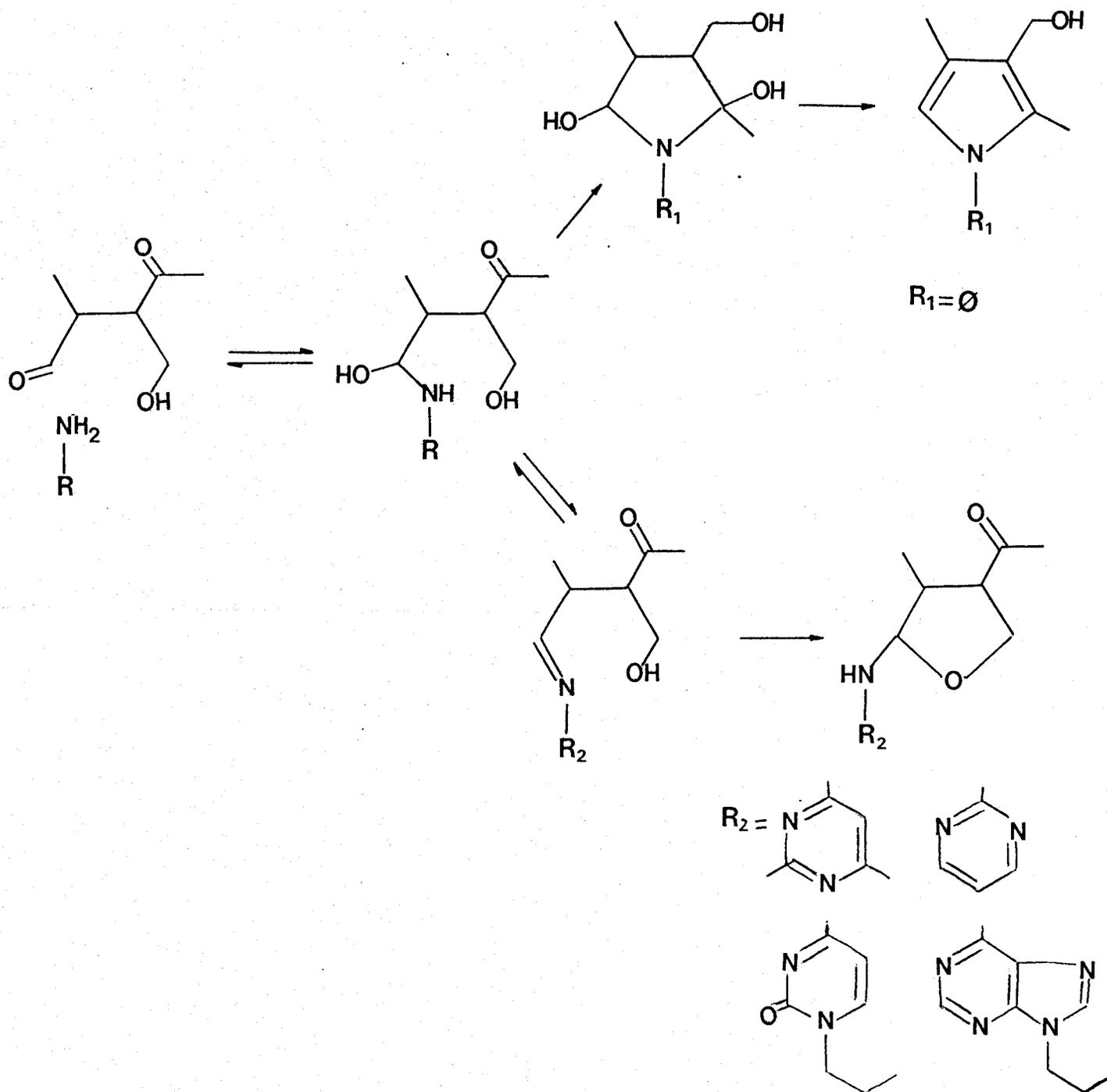
Le composé 2, obtenu par méthylation de l'hydroxyle hémiacétalique, présente des propriétés biologiques fondamentalement différentes de la botryodiplodine :

- Nonactif dans le test de mutagénéicité de Ames
- N'induit aucun pontage DNA-protéines.

Ces résultats montrent le rôle déterminant de la fonction aldéhyde, potentiellement présente sous forme hémiacétalique, au niveau de la toxicité de la botryodiplodine et de son interaction sur le DNA.

Du point de vue chimique, la réaction de la botryodiplodine sur des amines aromatiques conduit à 2 types de composés:

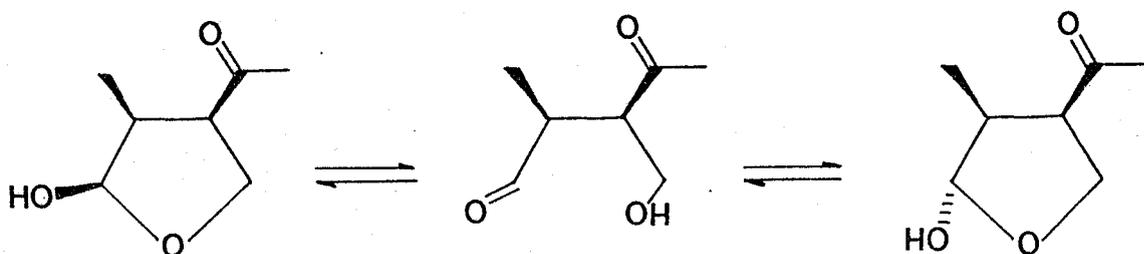
- L'aniline conduit à un dérivé pyrrolique par une double réaction, sur l'aldéhyde et sur la cétone.
- Les dérivés aminopyrimidiques et aminopuriques conduisent à des dérivés de type amino-2 tétrahydrofuranne. Ces produits d'addition résultent d'une attaque nucléophile de l'azote sur l'aldéhyde, suivie d'une cyclisation intramoléculaire de l'alcool sur l'imine intermédiaire.



La formation des dérivés pyrroliques et amino-2-tétrahydrofuranniques résulte d'une réaction de l'amine exocyclique sur la fonction aldéhyde provenant de l'ouverture du cycle hémiacétalique. Il faut souligner ici que la fonction

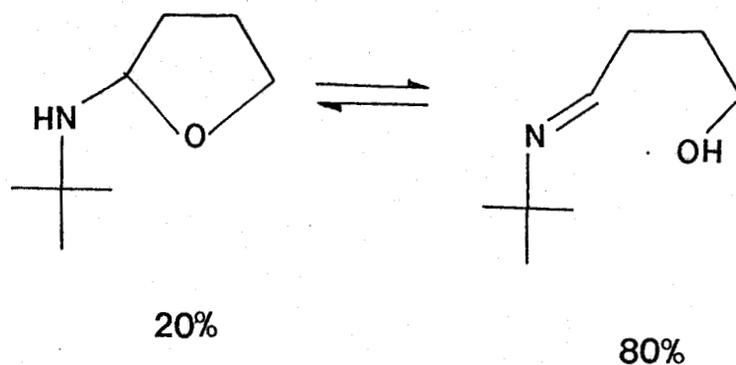


aldéhyde de la botryodiplodine n'est pas visible spectroscopiquement. En effet, le proton aldéhydique n'est pas visible par R.M.N. du proton. En revanche, le spectre proton de la botryodiplodine montre la présence de 2 épimères, au niveau du carbone 2, en équilibre au cours du temps. La présence de ces 2 épimères se traduit sur le spectre proton par une différence de déplacements chimiques des protons en 6 et 8 des 2 formes. De même, par R.M.N. du carbone 13, on peut noter un dédoublement des signaux de la botryodiplodine, montrant les deux épimères en équilibre.



Au niveau des composés amino-2 tétrahydrofuranniques, il faut noter que la réaction intramoléculaire de l'alcool secondaire sur l'imine intermédiaire est irréversible. Les produits d'addition, placés dans les conditions de réaction, n'aboutissent pas à la botryodiplodine.

Il faut noter que les dérivés amino-2 tétrahydrofurannes N-alkylés présentés dans la littérature, existent sous 2 formes en équilibre : imine et cyclique. Cette équilibre varie selon la nature du substituant sur l'azote. Par exemple, on peut citer le N-tert butyl amino-2 tétrahydrofuranne, qui existe, en solution dans le tétrachlorure de carbone, sous 2 formes : imine et cyclique (14).



La stéréochimie des produits d'addition de la botryodiplodine sur les modèles aminopyrimidiques et aminopuriques montre une configuration cis des groupements méthyle, méthyle cétone et amine. Seuls, les dérivés du propyl-9 adénine présentent les 2 isomères.

Au niveau du mécanisme réactionnel, la non participation des groupements méthyle et méthyle cétone permet de conserver la stéréochimie de ces fonctions (celle de la botryodiplodine). La configuration cis des fonctions amine et méthyle est dictée par la dernière étape réactionnelle, c'est-à-dire par la condensation de l'alcool sur l'imine intermédiaire. La géométrie de cet état de transition détermine la stéréochimie des produits d'addition. Il faut considérer que les composés cis obtenus sont les produits cinétiques de la réaction, c'est-à-dire qu'un état de transition favorise la configuration cis malgré l'encombrement stérique.

Sur le plan de la réactivité des bases nucléiques modifiées sur la botryodiplodine, il est remarquable de constater qu'aucun produit d'addition du propyl-9 guanine sur la

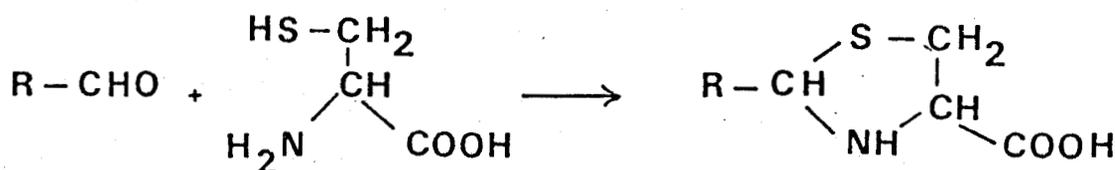
mycotoxine n'a été isolé. Aucune explication satisfaisante sur la non réactivité du propyl-9 guanine ne peut être avancée, mais il faut noter qu'un cas analogue est décrit dans la littérature (15) (16). En effet, la réaction du chloro-2 acétaldéhyde sur les bases nucléiques conduit à des produits d'addition sur les fonctions amines exocycliques de l'adénine et de la cytosine. Aucun produit d'addition sur la guanine n'a pu être mis en évidence.

L'étude du mode d'action moléculaire de la botryodiplodine sur le génôme a été approchée par des modèles aminés. La structure des produits d'addition obtenus traduit le rôle déterminant de la fonction aldéhyde, potentiellement présente sous forme hémiacétalique.

Il existe peu de données dans la littérature sur le mode d'action chimique des aldéhydes sur le matériel cellulaire.

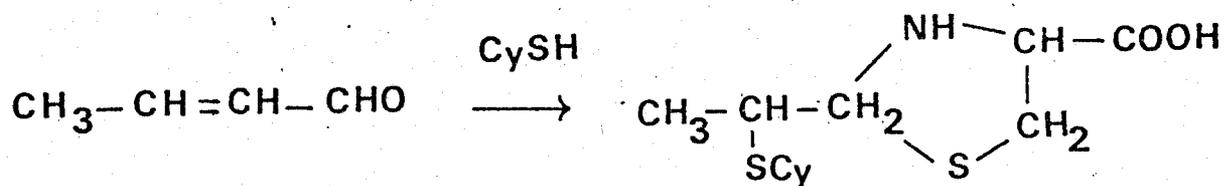
Les aldéhydes réagissent d'une part, avec les groupements thiols des acides aminés libres ou des protéines, et d'autre part sur les groupements aminés d'acides aminés, des protéines et des bases nucléiques.

Par exemple, les aldéhydes saturés réagissent sur la cystéine (17) pour donner des composés du type :



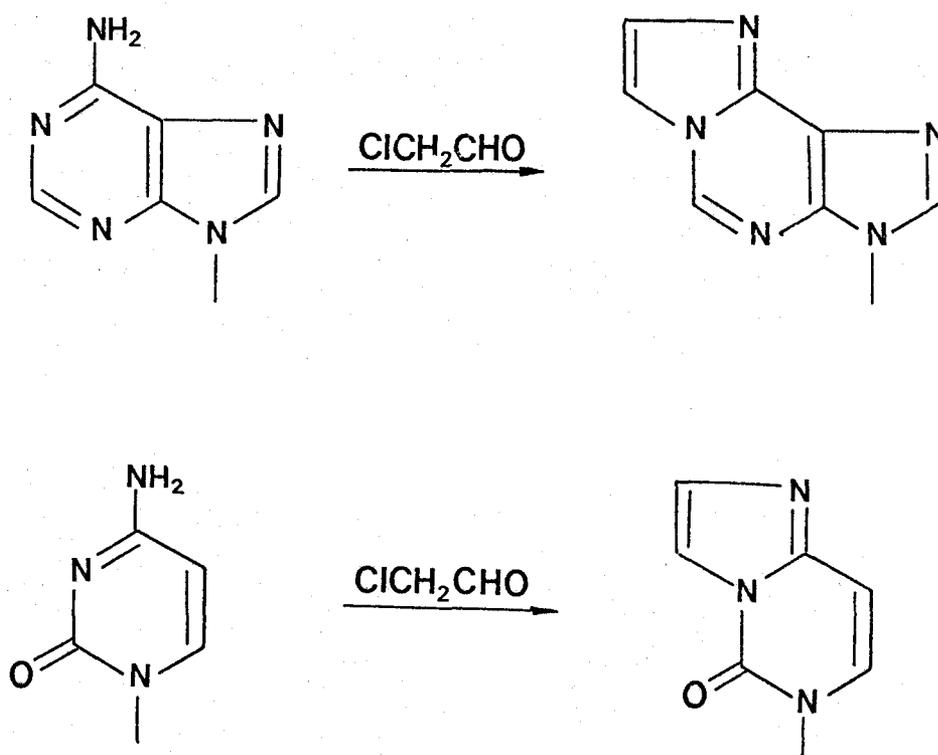
Dans le cas des aldéhydes insaturés, les thiols réagissent plus rapidement que les amines. Dans le cas de la cystéine, l'action de l'acroléine ou du crotonaldéhyde

conduit à une première addition 1-4.

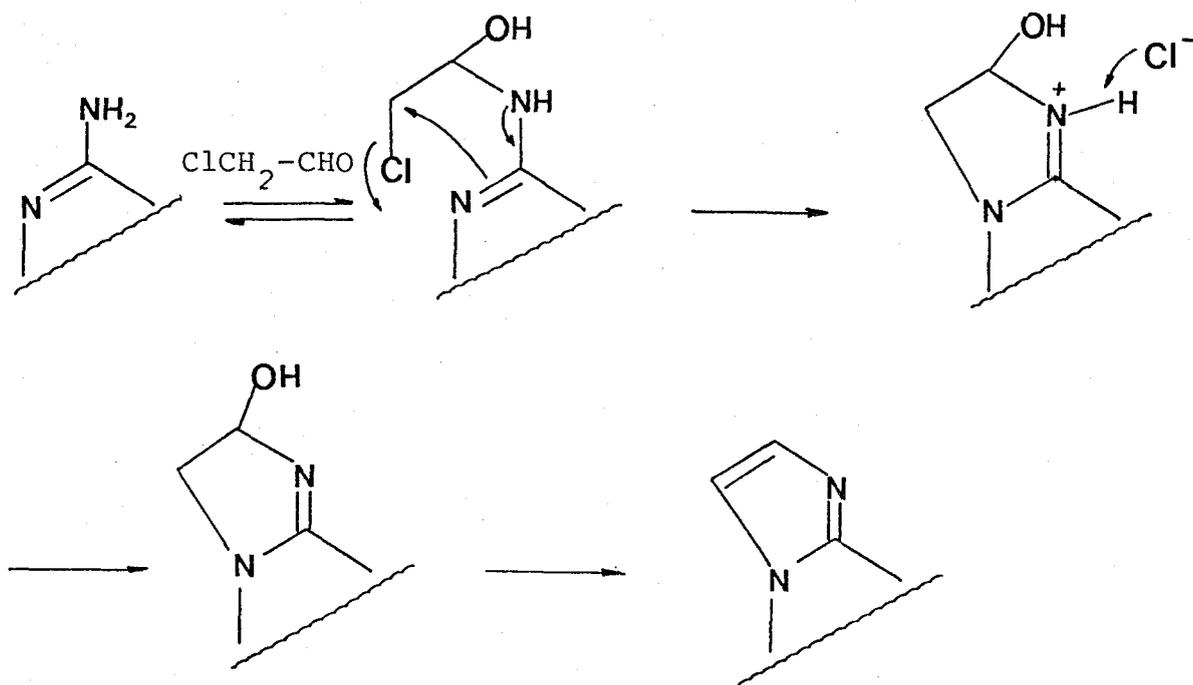


et se poursuit par une seconde addition sur la fonction aldéhyde (18).

Au niveau des bases nucléiques du DNA, il est connu que les aldéhydes se fixent de façon covalente sur les acides nucléiques. Le malonalaldéhyde, le formol, le glyoxal sont des exemples. Par contre, le mécanisme d'addition et la structure des complexes obtenus sont très mal connus. On peut citer l'exemple du chloro-2 acétaldéhyde (15) (16). La réaction du chloro-2 acétaldéhyde sur des bases nucléiques modifiées conduit à des composés du type :



Il faut noter qu'aucun produit d'addition sur la guanine n'a été isolé. Le mécanisme réactionnel conduisant à ces composés a été étudié (16). Il s'agit d'une réaction de la fonction amine exocyclique sur l'aldéhyde, suivi d'une élimination intramoléculaire et d'une déshydratation.



Cette première étude sur la réactivité de la botryodiplodine sur des modèles aminés a permis d'établir clairement la structure de ces produits d'addition et le mécanisme réactionnel de la mycotoxine sur les bases nucléiques modèles.

Par cette approche, il va donc être possible de déterminer la nature exacte des interactions de la botryodiplodine sur le DNA.

ISOLATION ET CARACTERISATION  
DES ADDUITS OBTENUS PAR REACTION DE  
LA BOTRYODIPLODINE SUR LE DNA

## ISOLATION ET CARACTERISATION DES ADDUITS OBTENUS PAR REACTION DE LA BOTRYODIPLODINE SUR LE DNA IN VITRO

Les activités biologiques de la botryodiplodine sur le génôme ont montré l'existence d'une interaction entre la mycotoxine et le DNA. Cette interaction, qui se traduit par la formation de cross-links, c'est-à-dire de pontages DNA-botryodiplodine-protéines, montre une réactivité chimique particulière de la mycotoxine. De plus, l'activité biologique de la botryodiplodine in vivo est indissociable à la présence du groupement hémiacétalique (8) et laisse supposer une interaction covalente de la molécule sur le DNA.

Il est effectivement possible d'isoler, après incubation de cellules avec la botryodiplodine marquée au carbone 14, un DNA radioactif. La réactivité chimique de la toxine in vivo se traduit par un taux élevé de bases nucléiques modifiées ; c'est-à-dire qu'une base nucléique du DNA sur 300 a réagi avec la botryodiplodine. (communication personnelle Y. MOULÉ).

De même, l'incubation de botryodiplodine marquée au carbone 14 avec un DNA de thymus de veau, dans un tampon pH 4,5, permet de recueillir un DNA marqué. L'hydrolyse enzymatique de ce DNA marqué permet, après purification, d'obtenir un profil chromatographique en C.L.H.P. de complexes absorbant à 254 nm et marqués au carbone 14 (fig. 1).

Notre but est donc de déterminer la nature chimique de ces complexes radioactifs, résultant d'une interaction covalente entre la botryodiplodine et les bases nucléiques du DNA.

Pour cette étude, nous avons recherché la présence de modèles de synthèse dans le chromatogramme d'éluion des adduits. Ces modèles, utilisés en référence, sont les produits d'addition de la botryodiplodine sur les 4 déoxynucléosides du DNA : 2'déoxyadénosine, 2'déoxycytidine, 2'déoxyguanosine et 2'déoxythymidine.

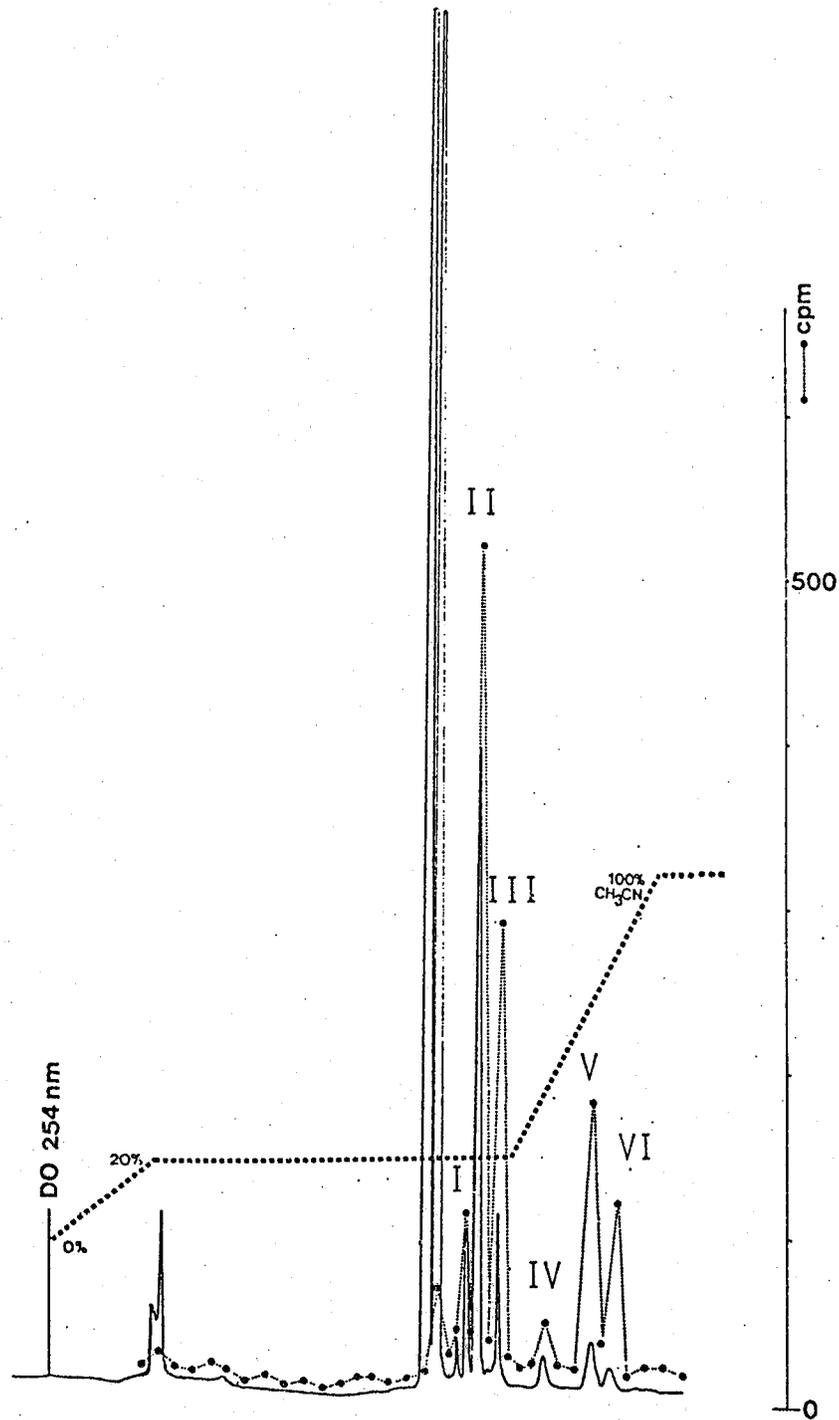
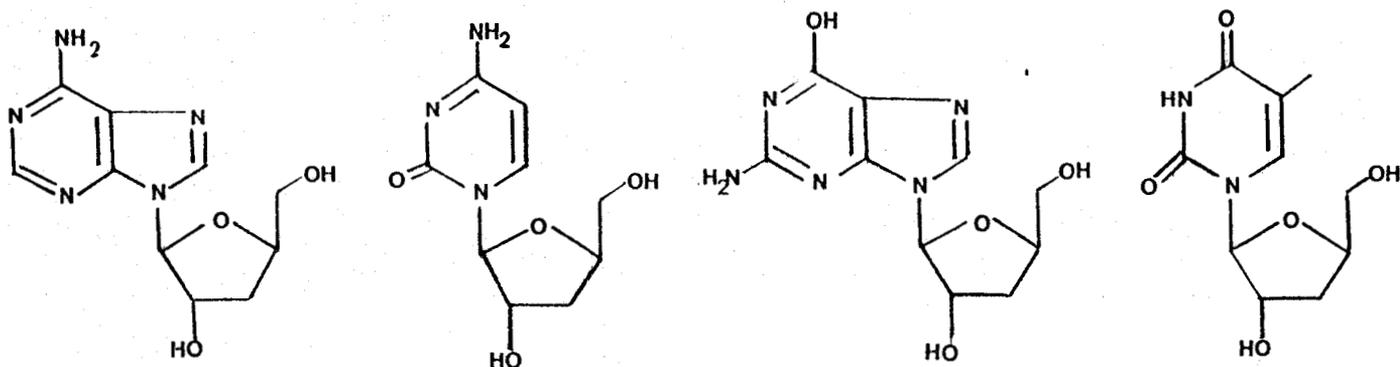


Fig. 1 : Profil C.L.H.P. des complexes obtenus après hydrolyse du DNA.





### I- Isolation des adduits de la botryodiplodine sur le DNA in vitro

Le greffage de la botryodiplodine marquée au carbone 14 est réalisé par réaction de 35 mg de toxine sur 10 mg de DNA de thymus de veau dans un tampon citrate de sodium pH 4,5, pendant 48 heures à 60° c.

L'activité spécifique de la botryodiplodine utilisée est de 3,3  $\mu$ Ci/mmele.

En fin de réaction, le DNA est précipité par l'éthanol et lavé par l'éthanol et le chloroforme afin d'éliminer la botryodiplodine non fixée sur le DNA.

- une première estimation du pourcentage de fixation de la toxine sur le DNA est réalisée. On obtient, en moyenne, environ 5 % de fixation, c'est-à-dire qu'une base nucléique sur 20 est complexée à la botryodiplodine.

#### 1- Hydrolyse enzymatique du DNA

L'hydrolyse de ce DNA complexé à la mycotoxine est réalisée par voie enzymatique, en utilisant successivement une DNase I, une nucléase P1 et une phosphatase alcaline (19).

La DNase I permet une hydrolyse des liaisons phosphodiesteres adjacentes aux bases pyrimidiques, libérant ainsi

de petits polynucléotides à liaison 5' phosphate terminale. La nucléase P 1 hydrolyse les liaisons phosphodiesteres des polynucléotides de 3' en 5'. L'action conjuguée de ces deux enzymes permet d'obtenir les nucléotides qui seront ensuite hydrolysés en nucléosides par une phosphatase alcaline (fig. 2). Il faut noter que le rendement total de cette dégradation par voie enzymatique est proche de 100 %.

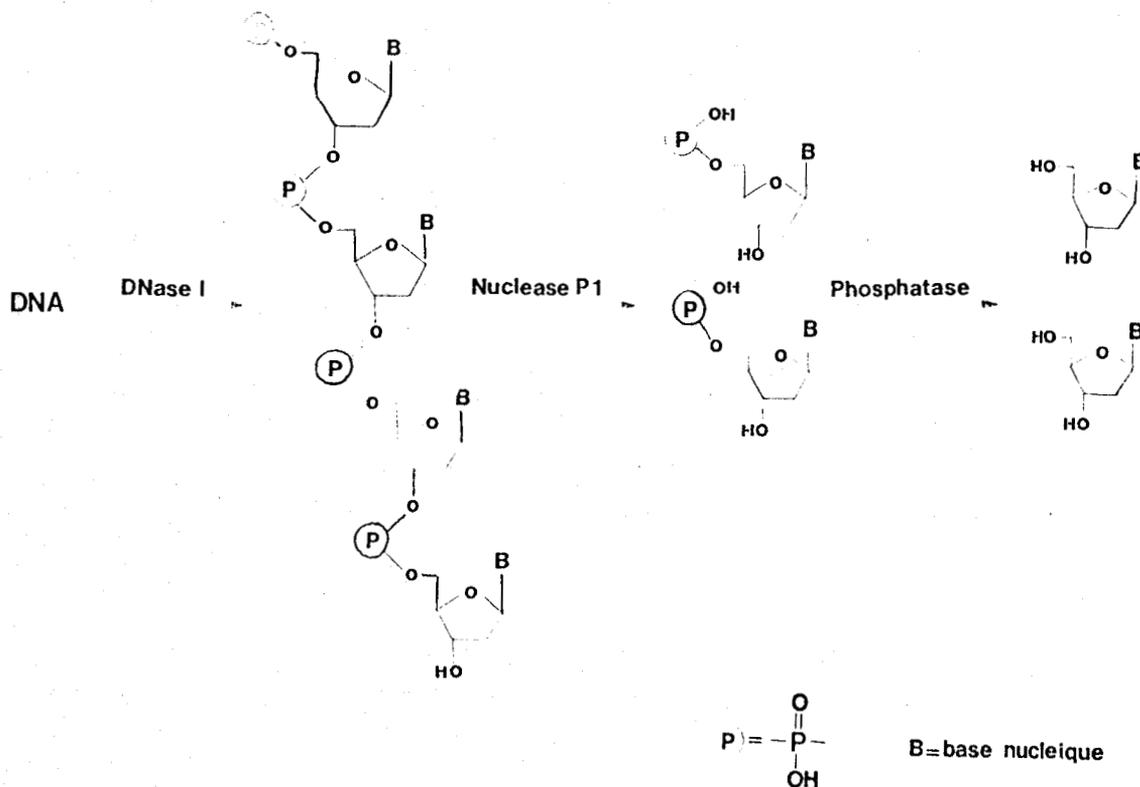


Fig. 2 : Schéma d'hydrolyse enzymatique du DNA.

## 2- Isolation et purification des produits d'addition

Une première purification des produits d'addition est réalisée par gel filtration sur une colonne BioRad P-2. Cette chromatographie, par taille moléculaire, de l'hydrolysat permet de séparer les enzymes d'hydrolyse A, les complexes nucléoside-botryodiplodine B, les nucléosides C et les sels minéraux D indispensables à l'hydrolyse enzymatique (fig. 3). Une double détection, par comptage radiométrique et par absorption à 254 nm permet de localiser la fraction contenant

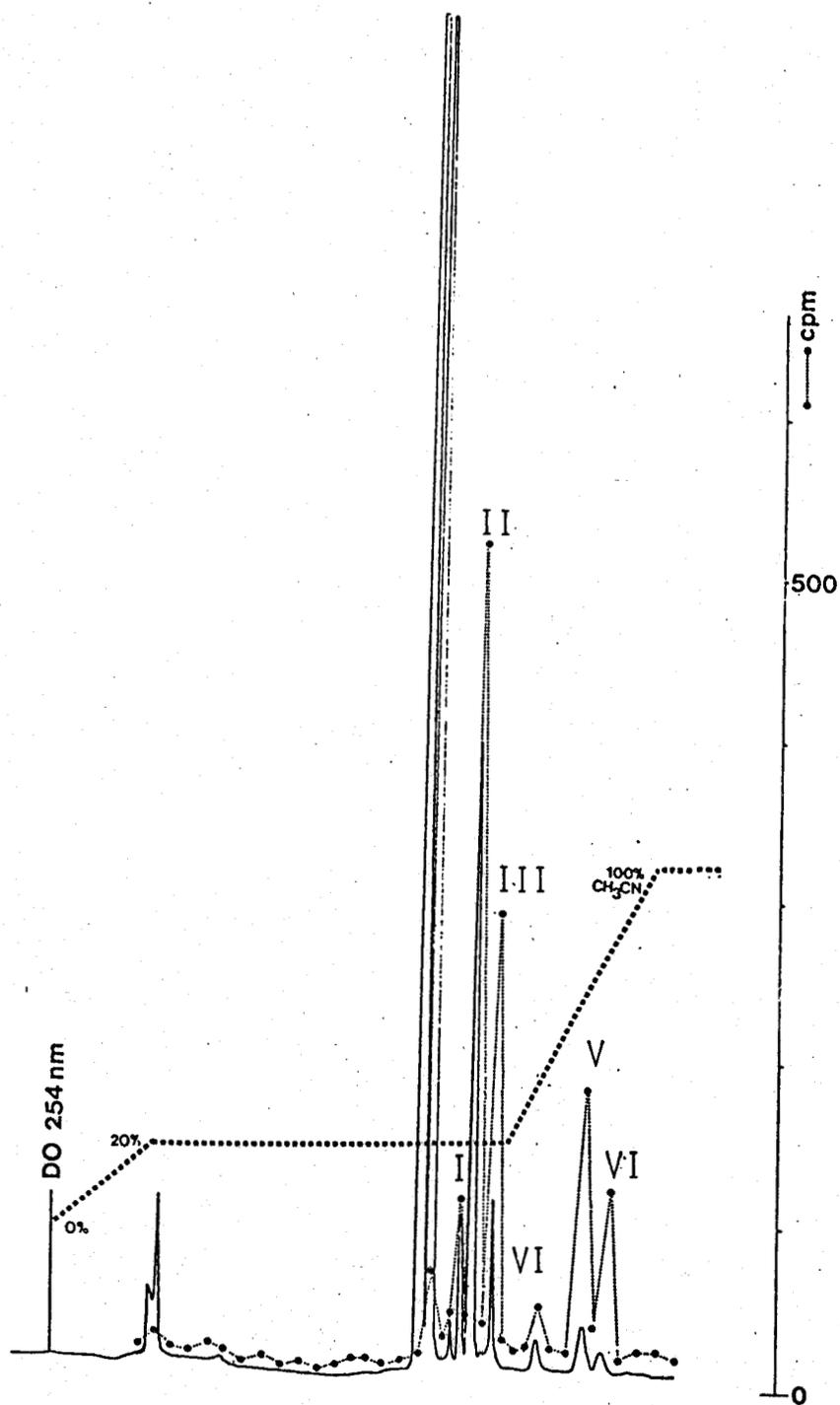


Fig. 4 : Profil C. L. H. P. de la fraction B.



les produits d'addition.

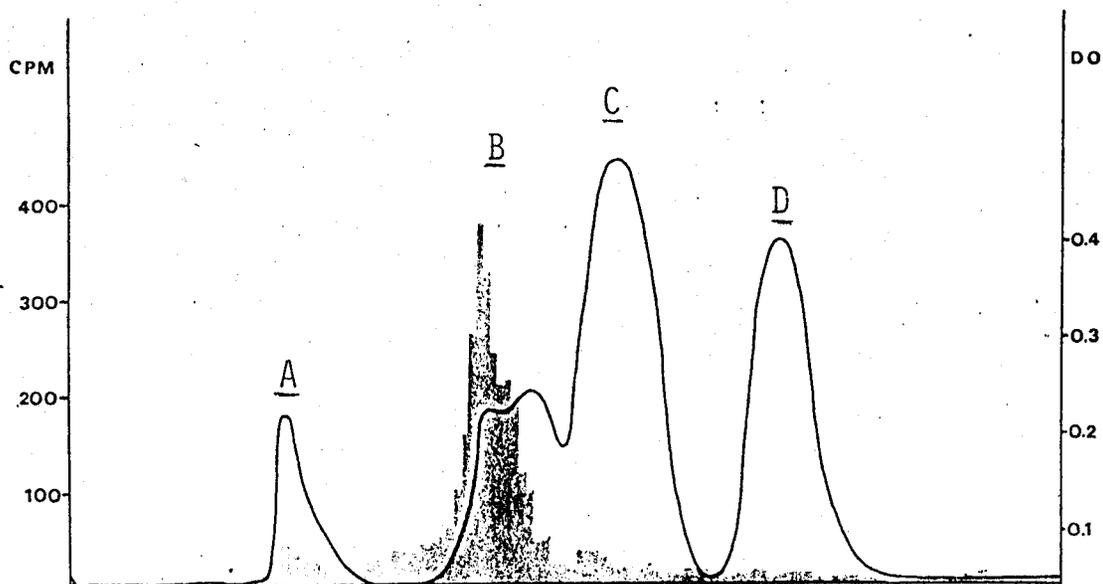


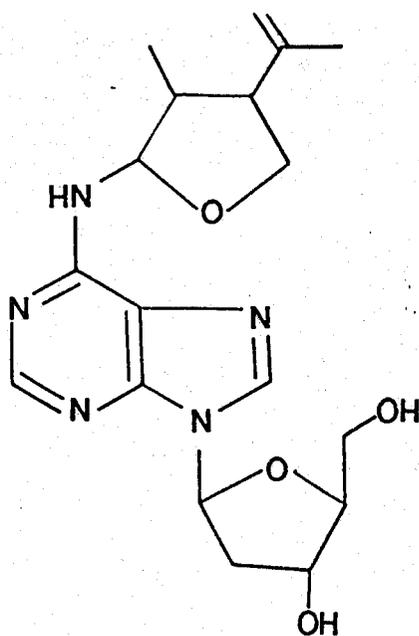
Fig. 3 : Profil d'élution de l'hydrolysate par gel filtration.

Cette fraction B est repurifiée par C.L.H.P. en utilisant une colonne analytique en phase inverse R.P. 18, éluee par un gradient eau-acétonitrile. On recueille ainsi 6 composés marqués au carbone 14 (fig. 4).

## II- Synthèse des modèles 2'déoxynucléosides-botryodiplodine

### 1- Produit d'addition de la botryodiplodine sur le 2'déoxyadénine

La réaction de 1 sur le 2'déoxyadénosine est réalisée dans un tampon citrate de sodium pH 4,5, pendant 48 heures à 60° C et conduit au composé 12 avec un rendement de 5 %.

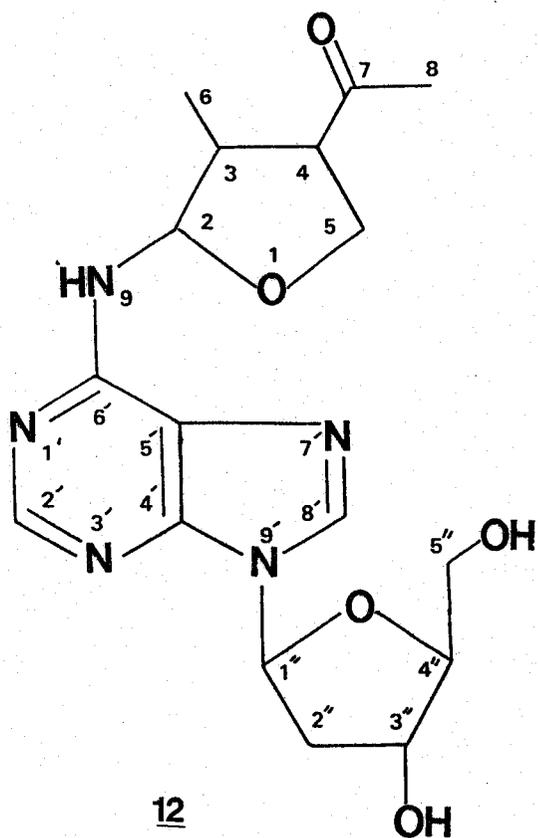


12

L'établissement de la structure de 12 est facilité par les analyses spectroscopiques des composés 10a et 10b. En effet, on observe de nombreuses analogies spectrales entre ces composés.

Le spectre de masse F.A.B. montre un pic à  $m/e$  400  $(M+Na)^+$  et  $m/e$  378  $(M+H)^+$ .

Le spectre R.M.N.<sup>1</sup>H 350 MHz (D<sub>2</sub>O) fig. 5 est assez complexe. Les déplacements chimiques des composés 10a, 10b et du 2'déoxyadénosine permettent l'attribution suivante :



$\delta = 1,28$ ppm	CH <sub>3</sub> -6, d
$\delta = 2,36$ ppm	CH <sub>3</sub> -8, s
$\delta = 2,59$ ppm	CH-3, m
$\delta = 2,59$ ppm	CH-2'', m
$\delta = 2,79$ ppm	CH-2'', m
$\delta = 3,33$ ppm	CH-4, m
$\delta = 3,84$ ppm	CH <sub>2</sub> -5'', m
$\delta = 4,08$ ppm	CHa-5, m
$\delta = 4,26$ ppm	CH-4'', m
$\delta = 4,26$ ppm	CHb-5, m
$\delta = 4,66$ ppm	CH-3'', m
$\delta = 5,71$ ppm	CH-2, s large
$\delta = 6,44$ ppm	CH-1'', t
$\delta = 8,26$ ppm	CH-8', s
$\delta = 8,31$ ppm	CH-2', s

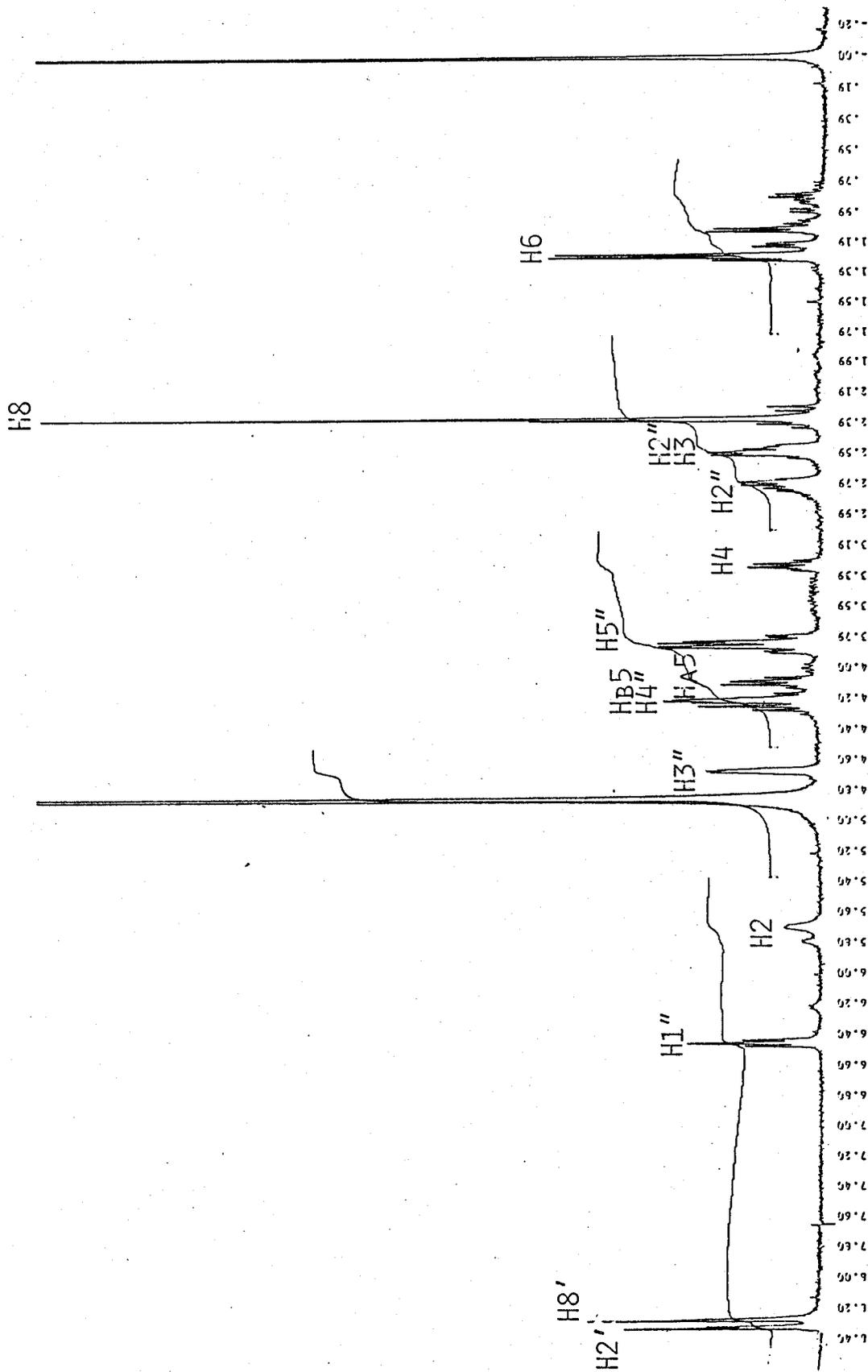


Fig. 5 : Spectre R. M. N. (350 MHz) au produit d'addition 12. Solvant D<sub>2</sub>O.

On observe, entre  $\delta = 0,90$  ppm et  $\delta = 1,30$  ppm, une série de doublets. Ces signaux correspondent aux protons du méthyle en 6 de l'ensemble des isomères en solution.

- l'irradiation du signal à  $\delta = 6,44$  ppm perturbe le multiplet à  $\delta = 2,59$  ppm et  $\delta = 2,79$  ppm (CH<sub>2</sub>-2").

- l'irradiation du multiplet observé à  $\delta = 4,66$  ppm modifie l'allure des signaux aux valeurs  $\delta = 2,59$  ppm et  $2,79$  ppm ainsi que le multiplet à  $\delta = 4,26$  ppm (CH-4").

- l'irradiation à  $\delta = 3,84$  ppm modifie le signal observé à  $\delta = 4,26$  ppm (CH-4").

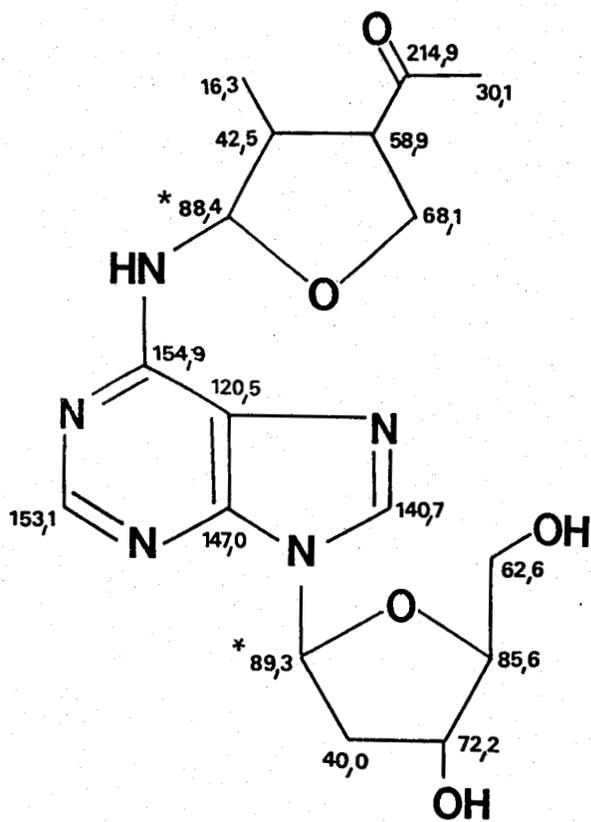
- l'irradiation du multiplet à  $\delta = 3,33$  ppm (CH-4) perturbe l'allure des signaux à  $\delta = 4,08$  ppm et  $\delta = 4,26$  ppm (CH-5), et modifie le multiplet observé à  $\delta = 2,59$  ppm (CH-3).

Il faut noter que les protons CH<sub>2</sub>-5 ne sont pas équivalents.

Leur attribution est réalisée par analogie avec les dérivés 10a et 10b.

Au niveau du déoxyribose, les protons CH<sub>2</sub>-2" ne sont pas équivalents.

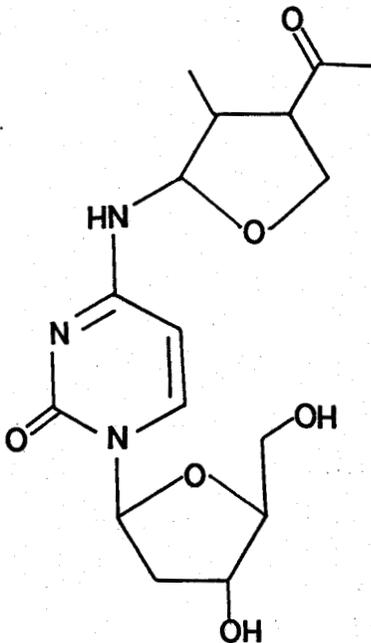
Le spectre R.M.N. <sup>13</sup>C, réalisé dans D<sub>2</sub>O, montre 17 signaux qui, comparés aux composés 10a, 10b et 2'déoxyribose, permettent l'attribution suivante:

12

\* Attribution réversible

2- Produit d'addition de la botryodiplodine  
sur le 2'déoxycytidine

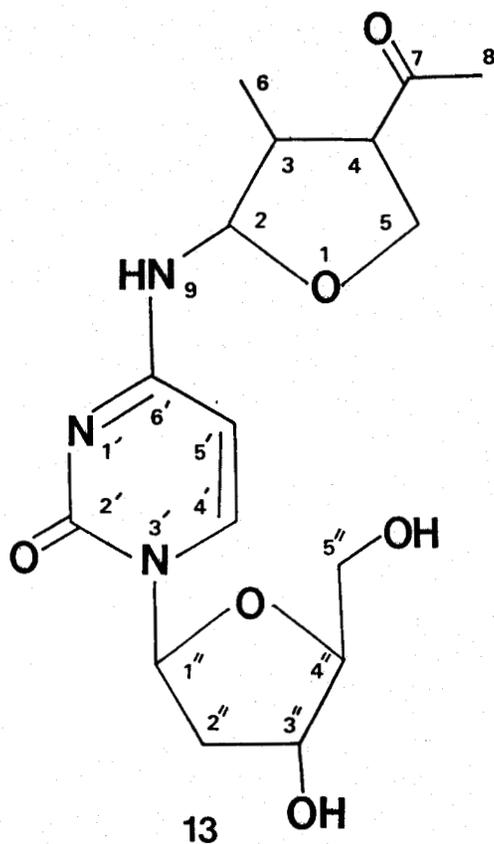
La réaction de 1 sur le 2'déoxycytidine est réalisée dans un tampon citrate de sodium pH 4,5 pendant 48 h à 60°C et conduit au composé 13 avec un rendement de 5 %.

BUS  
LILLE

Les caractéristiques spectrales de 13 sont reportées ci-dessous.

Le spectre de masse F.A.B. montre un pic à  $m/e$  354  $(M+H)^+$ .

Le spectre R.M.N.<sup>1</sup>H 350 MHz (D<sub>2</sub>O) fig. 6 est assez complexe et se décompose comme indiqué ci-dessous.



$\delta = 1,25$ ppm	CH <sub>3</sub> -6, d
$\delta = 2,31$ ppm	CH <sub>3</sub> -8, s
$\delta = 2,45$ ppm	CH-3, m
$\delta = 2,45$ ppm	CH <sub>2</sub> -2'', m
$\delta = 3,37$ ppm	CH-4, m
$\delta = 3,82$ ppm	CH <sub>2</sub> -5'', m
$\delta = 4,07$ ppm	CH-5, m
$\delta = 4,08$ ppm	CH-4'', m
$\delta = 4,18$ ppm	CH-5, m
$\delta = 4,44$ ppm	CH-3'', m
$\delta = 5,45$ ppm	CH-2, s large
$\delta = 6,15$ ppm	CH-5', s
$\delta = 6,26$ ppm	CH-1'', m
$\delta = 7,90$ ppm	CH-4', s

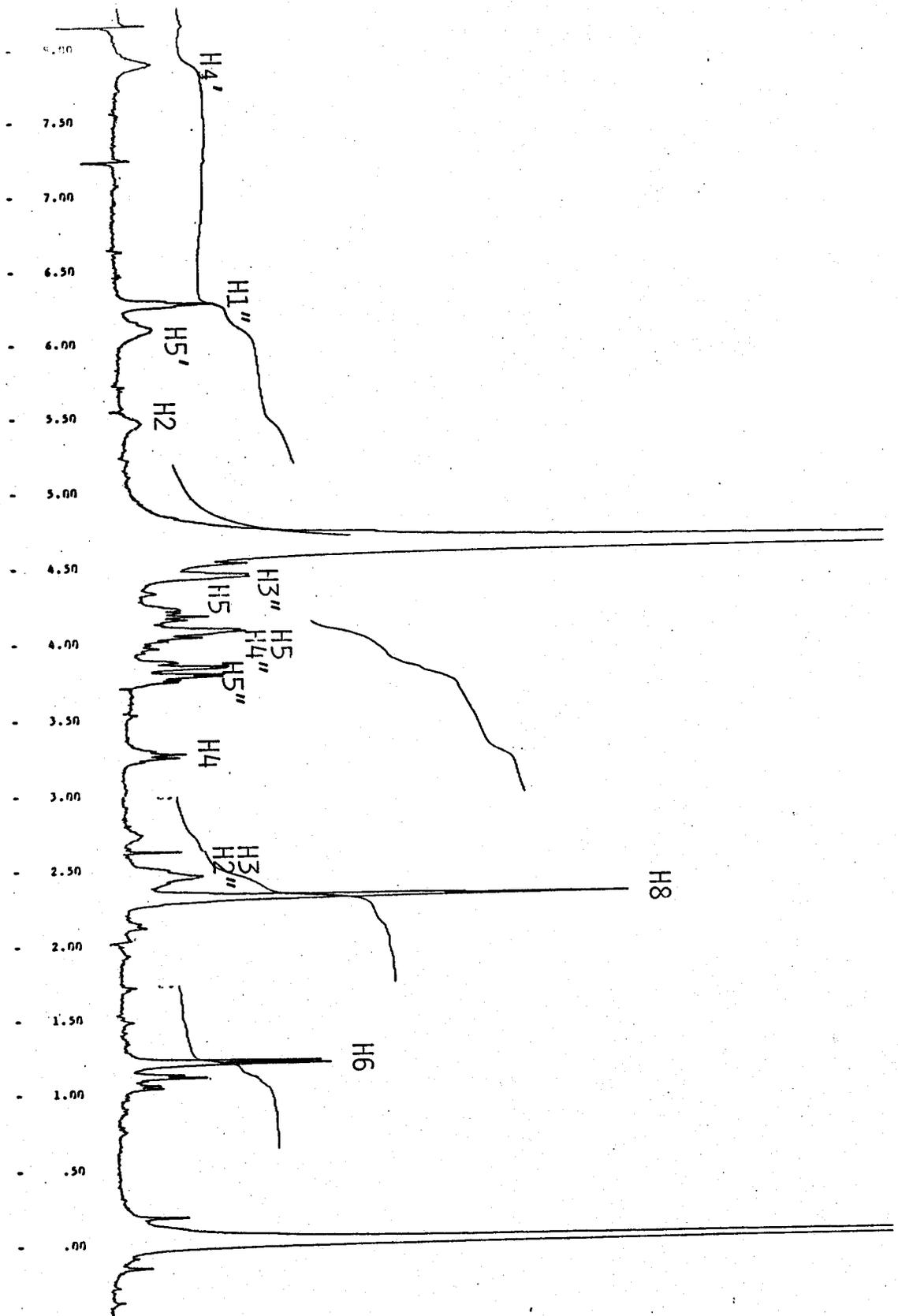
- l'irradiation du multiplet CH<sub>2</sub>-5'' à  $\delta = 3,82$  ppm perturbe les signaux aux valeurs  $\delta = 4,08$  ppm.

- l'irradiation à  $\delta = 3,37$  ppm perturbe les multiplets à  $\delta = 4,07$  ppm,  $\delta = 4,18$  ppm et  $\delta = 2,45$  ppm.

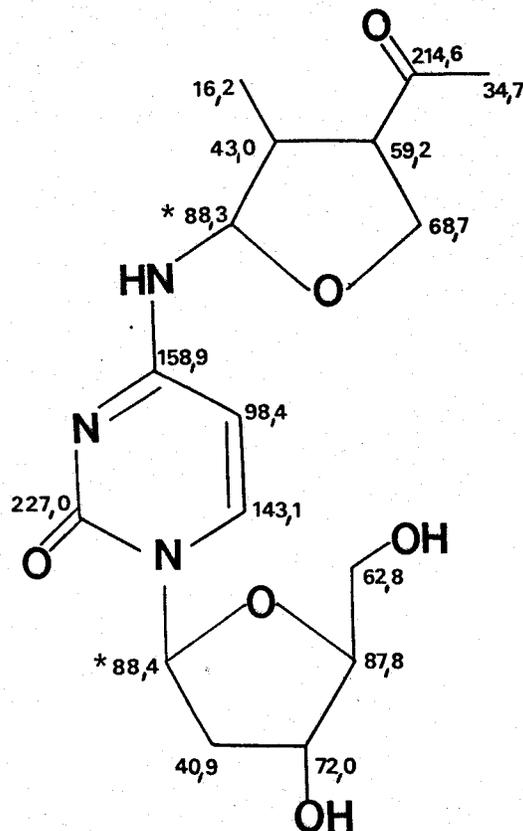
- l'irradiation à  $\delta = 2,45$  ppm transforme le doublet observé à  $\delta = 1,25$  ppm en singulet et modifie l'allure des signaux aux valeurs  $\delta = 5,45$  ppm et  $\delta = 3,37$  ppm.

Le spectre R.M.N.<sup>13</sup>C réalisé dans D<sub>2</sub>O montre 16 pics dont l'attribution est proposée comme suit

Fig. 6 : Spectre R.M.N. (350 MHz) du produit d'addition 13. Solvant D<sub>2</sub>O.



BUS  
LILLE



\* Attribution réversible 13

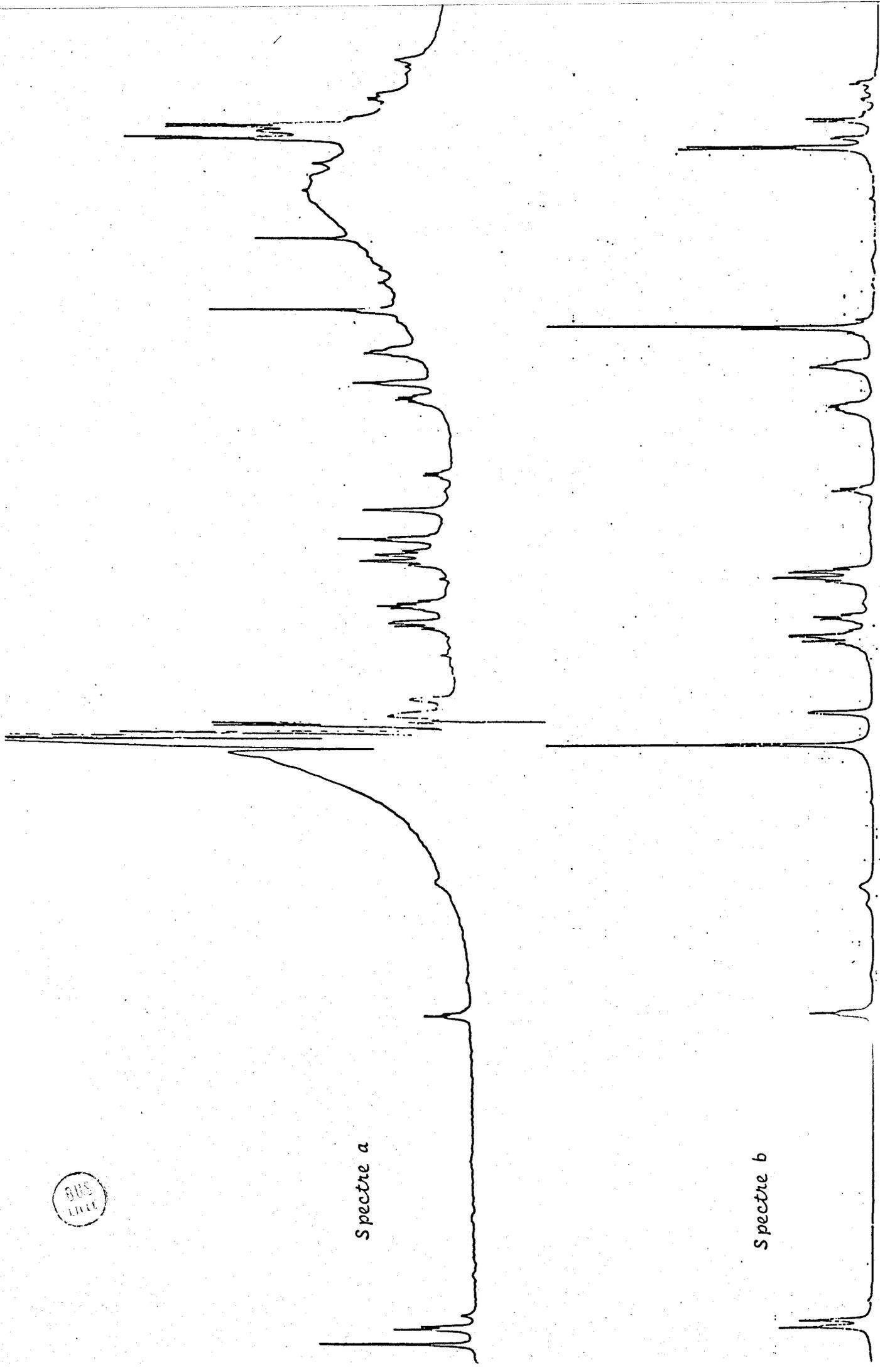
3°) Produit d'addition de la botryodiplodine sur  
 -----  
le 2'déoxyguanosine et 2'déoxythymidine.  
 -----

La réaction de 1 sur le 2'déoxyguanosine et 2'déoxythymidine est conduite comme précédemment. Aucun produit d'addition sur ces 2 composés n'a pu être détecté par C.C.M.. Ces résultats rappellent la non réactivité du propyl-9 guanine sur la botryodiplodine.

### III- Etude de la structure des produits d'addition sur le DNA

Dans un premier temps, nous avons recherché la présence des composés modèles 12 et 13 dans le chromatogramme d'élution des adduits. Les temps de rétention des composés 12 et 13 en C.L.H.P correspondent respectivement aux temps de rétention des pics VI et II.

BUS  
LILLE



Spectre a

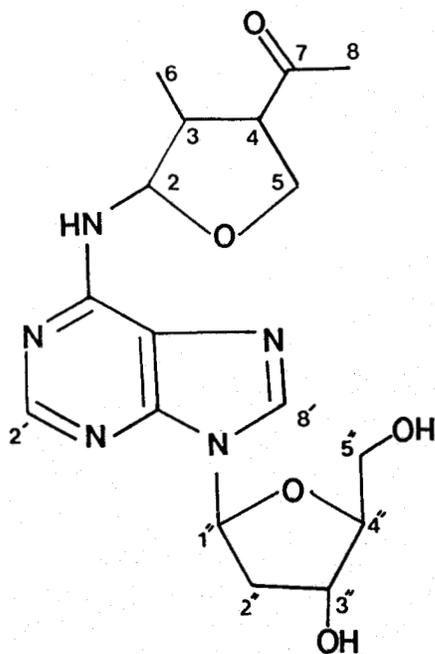
Spectre b

Fig. 7 : Spectre N. (500 MHz) du composé VI (a) et du modèle de synthèse 12. Solvant D<sub>2</sub>O .

### 1- Structure du composé VI

Le spectre R.M.N. proton 500 MHz de VI (fig. 7) est assez complexe et montre la présence d'impuretés. Cependant, les valeurs des déplacements chimiques observés sur ce spectre montrent la présence du composé de référence 12. En effet, on note particulièrement la présence des groupements méthyle et méthyle cétone aux valeurs respectives de  $\delta = 1,32$  ppm et  $\delta = 2,32$  ppm. De même, le proton H-4 sort sous forme d'un multiplet à  $\delta = 3,30$  ppm. Les valeurs des déplacements chimiques des protons du déoxyribose sont en total accord avec le composé de référence 12.

L'ensemble des déplacements chimiques observés des composés VI et 12 est donné ci-dessous.



12

Protons	2	3	4	5a	5b	6	8
.....							
<u>12</u>	5,71	2,59	3,33	4,08	4,26	1,28	2,36
.....							
VI	SOUS HOD	2,60	3,30	4,10	4,25	1,32	2,32
.....							
Protons	2'	8'					
.....							
<u>12</u>	8,31	8,26					
.....							
VI	8,42	8,26					
.....							
Protons	1''	2''	2''	3''	4''	5''	
.....							
<u>12</u>	6,44	2,59	2,79	4,66	4,26	3,84	
.....							
VI	6,48	2,60	2,78	4,63	4,26	3,84	
.....							

L'analyse du spectre de masse F.A.B. de l'adduit VI confirme les résultats obtenus par R.M.N. du proton. En effet, on observe un pic à  $m/e$  400  $(M+Na)^+$  et  $m/e$  378  $(M+H)^+$ , en

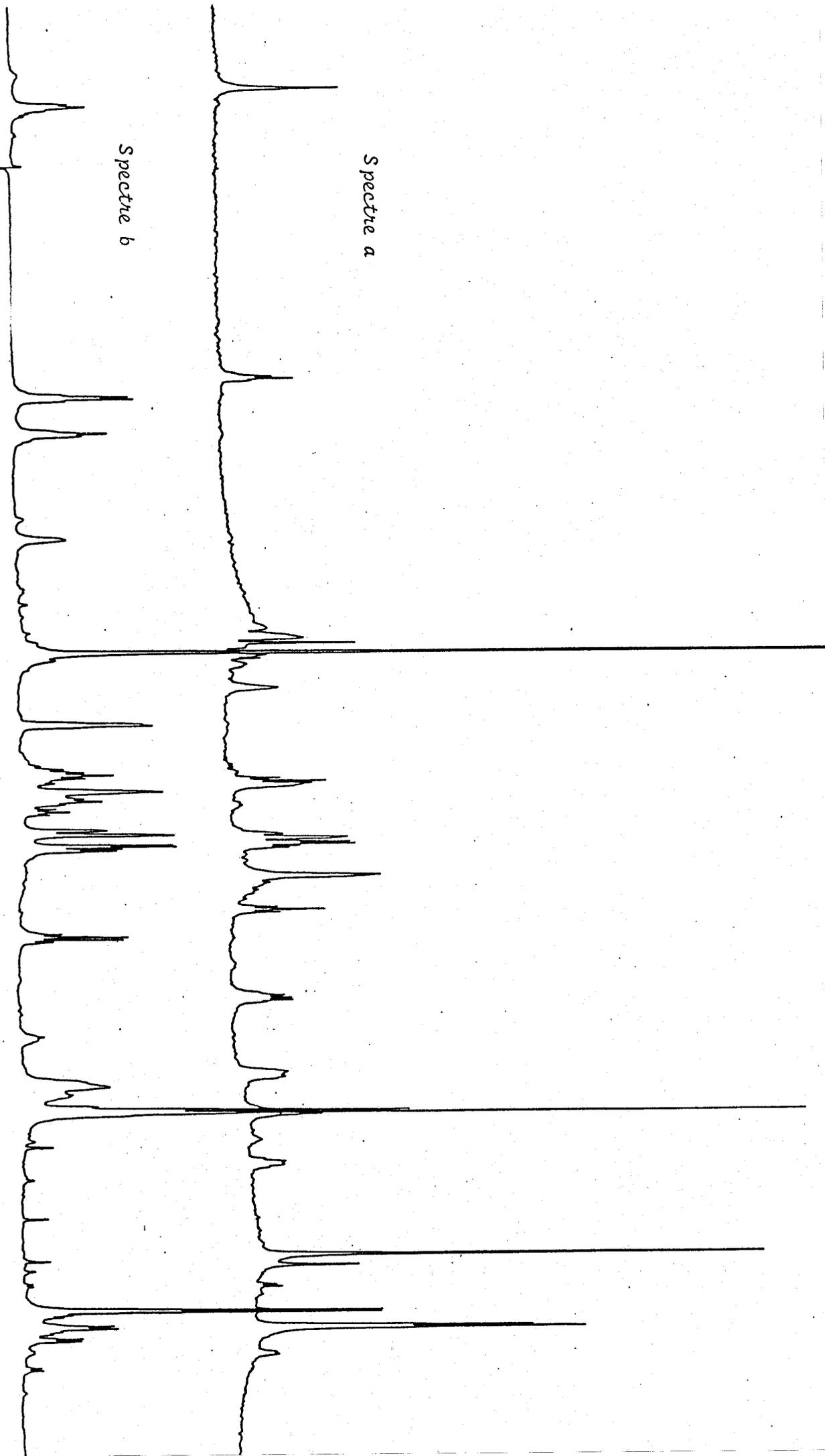


Fig. 8 : Spectres R.M.N. (500 MHz) du composé 11 (a) et du modèle de synthèse 13. Solvant D<sub>2</sub>O.

accord avec le spectre de masse du composé de référence 12.

On peut donc conclure à une structure identique des composés VI et 12, c'est-à-dire un produit d'addition de la botryodiplodine sur le 2'déoxyadénosine, de structure amino-2 tétrahydrofuranne.

## 2- Structure du composé II

La comparaison des spectres R.M.N. du proton de l'adduit II et du composé 13 montre une structure différente de ces deux produits (fig. 8). Le spectre R.M.N. de II montre la présence d'un nucléoside, qui se traduit par la présence d'un proton aromatique à  $\delta = 7,97$  ppm et de signaux dont les déplacements chimiques sont en accord avec la structure du 2'déoxyribose.

Cependant, on note l'absence du groupement méthyle cétone et du proton H-4 de la botryodiplodine. L'analyse complète du spectre proton de II montre une structure incompatible avec les dérivés amino-2 tétrahydrofurannes et ne permet pas de conclure sur la structure chimique de II.

## 3- Structure des composés I, III, IV, V

L'analyse des divers autres adduits radioactifs par R.M.N. du proton, ne permet pas de déceler des dérivés de structure amino-2 tétrahydrofuranne. Néanmoins, tous ces adduits sont des nucléosides modifiés ; on note effectivement la présence de protons aromatiques et des protons du 2'déoxyribose. La nature de la liaison covalente entre botryodiplodine et nucléosides n'a pu être établie et aucune structure pour les composés I, III, IV, V ne peut être proposée.

## IV- Conclusion

L'hydrolyse enzymatique d'un DNA de thymus de veau ayant réagi avec la botryodiplodine, a permis d'isoler 6 nucléosides marqués par la mycotoxine. L'analyse structurale de ces adduits est réalisée par l'intermédiaire de modèles

de synthèse. Ces modèles, qui sont les produits d'addition de la botryodiplodine sur le 2' déoxyadénosine et 2' déoxycytidine, ont permis l'identification d'un seul des adduits isolés.

Les difficultés rencontrées ici posent un problème sur la structure chimique des adduits non identifiés et plus particulièrement sur leurs origines: sont ils des produits d'addition résultant d'une réaction chimique botryodiplodine-DNA différente de tout les modèles amino pyrimidiques et puriques rencontrés jusqu'ici, ou des produits de dégradation des composés 12 et 13, obtenus sur le DNA, résultant de l'hydrolyse enzymatique.

Une étude de la stabilité des composés modèles 12 et 13, placés dans les conditions d'hydrolyse est en cours et permettra probablement de répondre à cette question.

--oooOooo--

## REACTIVITE CHIMIQUE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE

### CONCLUSION

Au niveau des activités biologiques engendrées par la botryodiplodine, nous avons vu que la fonction aldéhyde était indispensable pour traduire les propriétés biologiques de la toxine sur des cellules en culture. La méthylation de l'hémiacétal permet d'obtenir un composé possédant des propriétés biologiques fondamentalement différentes de la mycotoxine.

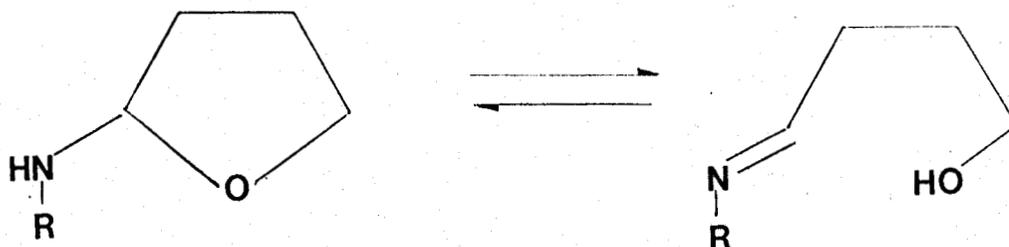
L'étude de la réactivité chimique de la botryodiplodine sur des modèles aminopyrimidiques et aminopuriques, a permis d'isoler un certain nombre de complexes de structure amino-2 tétrahydrofuranne. La structure de ces complexes montre l'importance du mécanisme réactionnel de la toxine au niveau des fonctions amines exocycliques des bases nucléiques.

L'extension de cette étude sur le DNA a permis d'isoler 6 adduits résultant d'un greffage botryodiplodine - bases nucléiques. La synthèse de modèles botryodiplodine - 2' déoxynucléosides, de structure amino-2 tétrahydrofuranne, a permis l'identification d'un seul adduit. L'étude structurale des autres adduits isolés est actuellement en cours.

Néanmoins, la réactivité chimique de la botryodiplodine sur des modèles amino pyrimidiques, amino puriques et sur les nucléosides montre que seules les fonctions aldéhyde et alcool sont impliquées. Les fonctions méthyle et méthyle cétone ne participent pas à la réactivité chimique de la mycotoxine sur ces modèles.

La structure essentielle de la mycotoxine dans sa réactivité se résume en un cycle hydroxy-2 tétrahydrofuranne.

Il est intéressant de noter que la réactivité de l'hydroxy-2 THF sur des amines a été largement étudiée (14, 20). Les composés d'addition obtenus sont de type amino-2 THF en équilibre avec la forme imino-alcool.

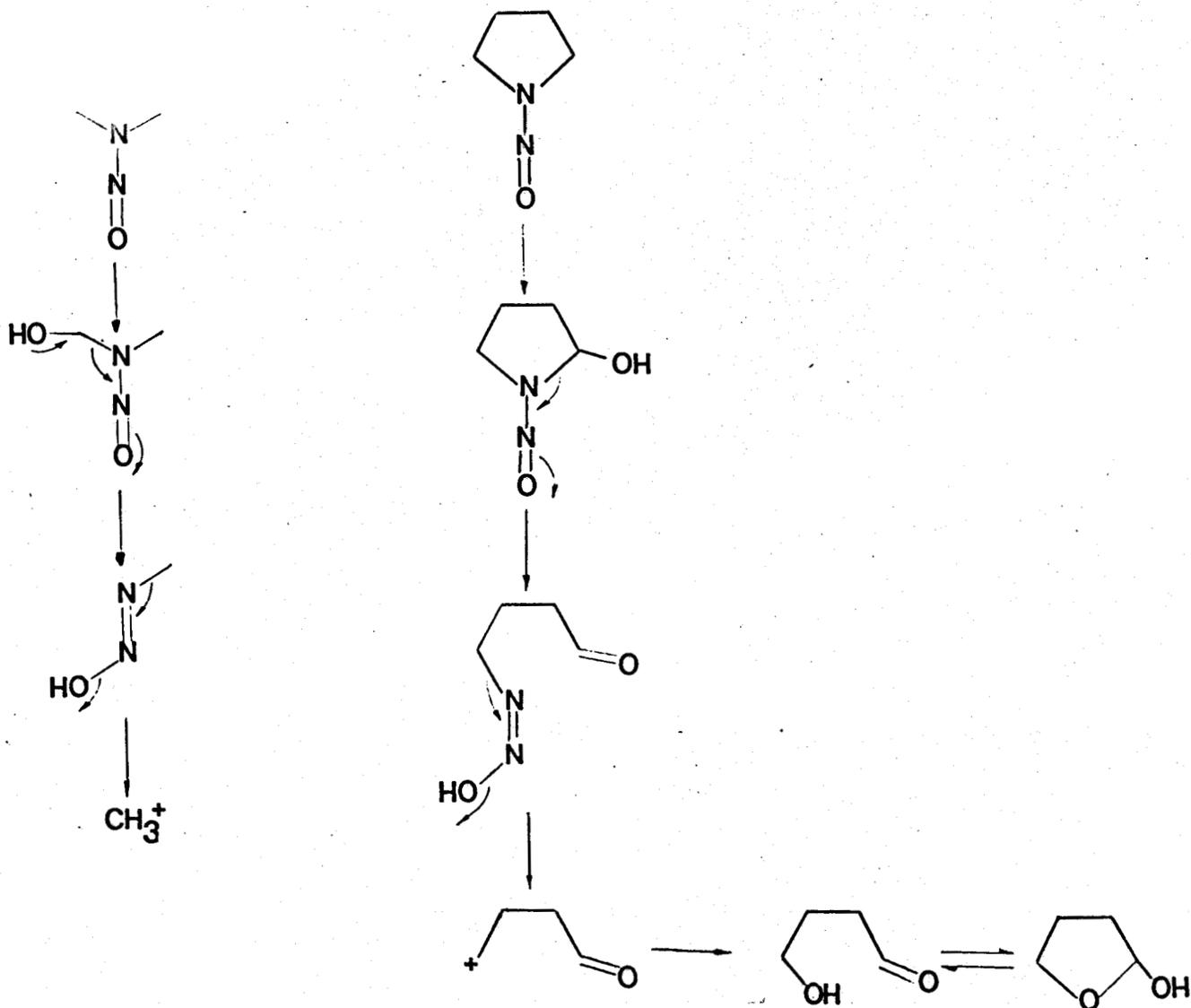


Outre l'utilisation de l'hydroxy-2 THF comme synthon de dérivés amino-2 THF, il faut souligner que ce composé est l'un des métabolites obtenus lors de la métabolisation d'un puissant cancérigène ; le N-nitrosopyrrolidine, par les systèmes microsomaux (21).

Il est connu que les dérivés de type N-nitroso sont de puissants cancérigènes. On peut citer en particulier le N-diméthylnitroso dont l'action sur le génôme *in vivo* se traduit par une alkylation des sites nucléophiles des bases nucléiques (22). L'alkylation des bases nucléiques par le N-diméthylnitroso résulte de la métabolisation de ce composé par les systèmes microsomaux. Cette métabolisation en cancérigène ultime est réalisée par une  $\alpha$  hydroxylation.

. L' $\alpha$  hydroxylation conduit à un composé instable libérant d'une part du formol et du méthyl diazohydroxide générateur d'ion méthyle.

La métabolisation du N-nitrosopyrrolidine a été étudiée et montre un même mécanisme de métabolisation, c'est-à-dire  $\alpha$  hydroxylation conduisant à l'hydroxy-2 THF par l'intermédiaire d'un ion carbonium.



Il faut souligner qu'une étude très récente sur la structure des produits d'addition du N-nitrosopyrrolidine sur le DNA in vivo a été réalisée (23), mais aucune structure d'adduit n'a été proposée.

En corrélation avec la structure de la botryodiplo-dine, nous avons déterminé si les pouvoirs biologiques de l'hydroxy-2 THF sont comparables aux activités biologiques de la mycotoxine.

Les tests de mutagénéicité ont été réalisés par le groupe de Y. MOULÉ et ne montrent aucune activité de l'hydroxy-2 THF.

Mais il faut souligner une différence de réactivité de l'hydroxy-2 THF et de la botryodiplodine. L'hydroxy-2 THF est en équilibre avec la forme aldéhyde-alcool dans des proportions de 89/11 (24) qui se traduit par une réactivité plus importante de la fonction aldéhyde comparée à la botryodiplodine. En d'autres termes, l'hydroxy-2 THF, au niveau cellulaire, est rapidement piégé par les différents constituants cellulaires, qui ne lui permettent donc pas de pénétrer jusqu'au génôme et de réagir avec le DNA.

Ces observations montrent un nouvel aspect sur le caractère cancérigène et mutagène de certains N-nitroso cycliques et tout particulièrement sur le rôle des métabolites de structure hydroxy-2 époxy cyclique.

--oooOooo--

BIOSYNTHESE DE LA BOTRYODIPLODINE

## BIOSYNTHESE DE LA BOTRYODIPLODINE

—oooOooo—

I - METABOLISME SECONDAIRE -a) Définition :

Le métabolisme primaire d'un organisme est constitué par l'ensemble des réactions chimiques catalysées par des enzymes qui fournissent à cet organisme son énergie et ses constituants essentiels : protéines, acides aminés, acides nucléiques, lipides, phospholipides, polysaccharides. Ce métabolisme est essentiellement identique pour tous les êtres vivants.

En dehors de ces produits du métabolisme primaire, les plantes et, dans une moindre mesure, le règne animal produisent une infinie variété de substances dont la présence est révélée par leur couleur, goût, odeur ou leur action physiologique. Un grand nombre de ces substances fait partie de la "matière médicale", par exemples : alcaloïdes, antibiotiques, terpènes, hétérosides, etc...

Ces substances ne paraissent jouer, en général, aucun rôle dans la biologie de l'organisme qui les synthétise, elles sont couramment désignées sous le terme : métabolites secondaires. Les réactions qui engendrent ces métabolites sont regroupées sous le terme de métabolisme secondaire.

Toutes les études réalisées à ce jour montrent que ces métabolismes primaires et secondaires sont très interdépendants. Une frontière ne peut pas être clairement définie entre ces deux domaines. Le métabolisme secondaire utilise des intermédiaires du métabolisme primaire. Certains métabolites secondaires, contrairement à la règle, ont un rôle biologique bénéfique pour l'organisme producteur.

33

Citons : Le rôle bien connu des pigments floraux, phénomène qui attire sélectivement certains insectes, provoquant la pollinisation(26).

Citons le remarquable moyen de défense d'une espèce de scarabé européen, le *brachynus* : lorsqu'il est menacé, cet animal secrète un nuage toxique de benzoquinone porté à 100°C en direction de son agresseur. Ce système de défense, unique en son genre, est le résultat d'une réaction exothermique entre un substrat de type phénolique, d'hydroquinone, d'eau oxygénée et d'une catalase. Cette réaction est accompagnée d'une explosion propulsant des vapeurs toxiques et brûlantes de benzoquinone.

Du point de vue enzymatique, le métabolisme secondaire possède la plupart du temps son propre pool d'enzymes, codé donc génétiquement. Néanmoins, certains systèmes enzymatiques du métabolisme primaire, qui présentent peu de spécificité pour leurs substrats, peuvent aussi réagir avec les intermédiaires du métabolisme secondaire. Tel serait le cas de certaines alcools déshydrogénases(27).

Le métabolisme secondaire pourrait être en définitive la marque d'une adaptation ou d'une évolution biochimique des espèces face à l'environnement. Parmi les nombreuses molécules synthétisées, seules quelques unes présentent un avantage biologique évident et deviennent un caractère permanent de l'espèce.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires. Ces toxines ne semblent pas assurer aux champignons qui les élaborent, une suprématie particulière. Les souches toxigènes d'une espèce déterminée ne s'assurent pas en effet sur les souches non toxigènes un avantage décisif. Par exemple, une souche sur quatre seulement de *Aspergillus flavus* est capable d'élaborer l'Aflatoxine(28).

#### b) Principales voies de biosynthèse :

Les voies du métabolisme secondaire ont été classées à partir du précurseur du métabolisme primaire qu'elles utilisent.

L'acide acétique, sous forme activée d'acétyl-CoA, est un précurseur de nombreux composés secondaires. Il peut se condenser avec le malonyl-CoA pour donner l'acétoacétyl-CoA  $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{-CO-S-CoA}$  qui intervient dans la synthèse des acides gras. Par continuation de ce processus, on obtient de longues chaînes linéaires  $\beta$ -polycétoniques. Par des cyclisations de type aldolique, ces dernières peuvent produire une grande variété de

produits naturels. Les substances dérivant de l'acide acétique par ce processus sont appelées Acétogénines. Cette voie est celle utilisée pour la synthèse des pigments floraux (flavone) ou d'antibiotiques (tétracyclines) ou de mycotoxines (aflatoxines). Nous détaillerons cette voie dans le chapitre suivant.

Lorsque l'acide acétique se condense pour donner naissance à l'acide mévalonique, il conduit alors à une voie de synthèse très générale, celle des stérols.

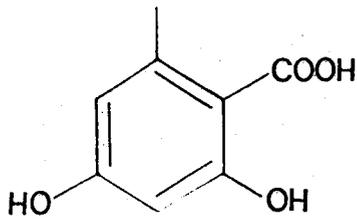
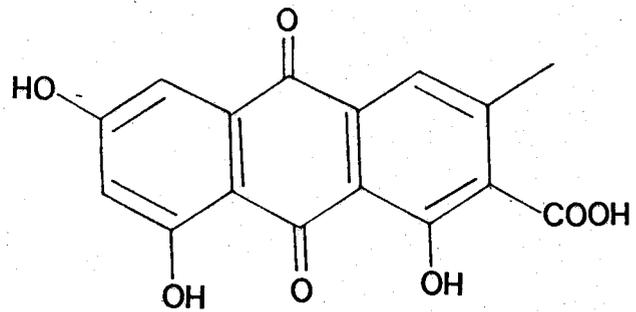
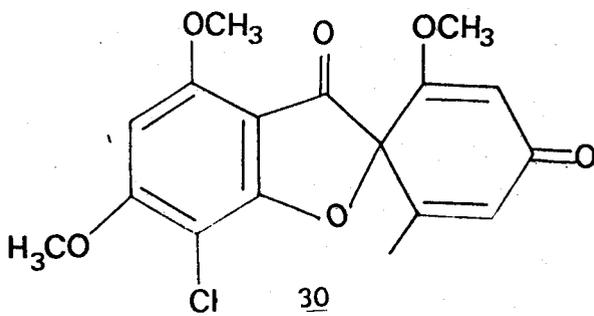
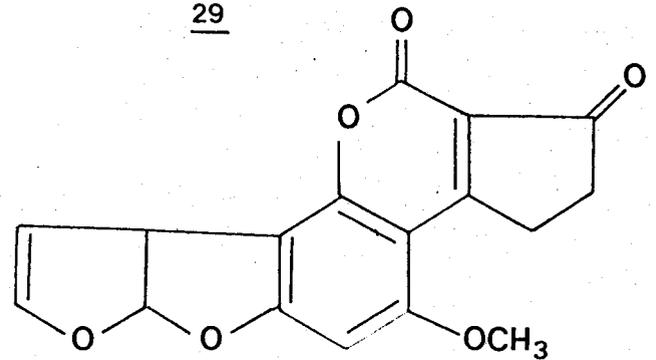
De même, les sucres, quelques amino-acides servent de précurseurs à certains métabolites secondaires : le tryptophane, la phénylalanine ou la tyrosine se retrouvent dans le squelette de nombreux alcaloïdes.

## II - BIOSYNTHESE DES POLYCETOACIDES -

L'acide acétique (sous forme activée d'acétyl-CoA et malonyl-CoA) est la source de carbone la plus importante dans la synthèse de molécules par les organismes vivants. L'acide acétique intervient comme précurseur de deux grandes classes de produits naturels : les terpènes et les polycétoacides (polyketides).

La biosynthèse des polycétoacides est peu prédominante chez les végétaux supérieurs, mais particulièrement présente dans le métabolisme des bactéries, des lichens et des champignons.

Une grande variété de métabolites secondaires dérivent de la voie des polycétoacides : l'acide orsellinique 28 (métabolite fréquent de champignons et lichens), l'endocrocine 29 (pigment de structure anthraquinone produit par certains lichens), la griséofulvine 30 (puissant antibiotique synthétisé par certains Penicillium), les aflatoxines (métabolites secondaires responsables de la Turkey X disease).

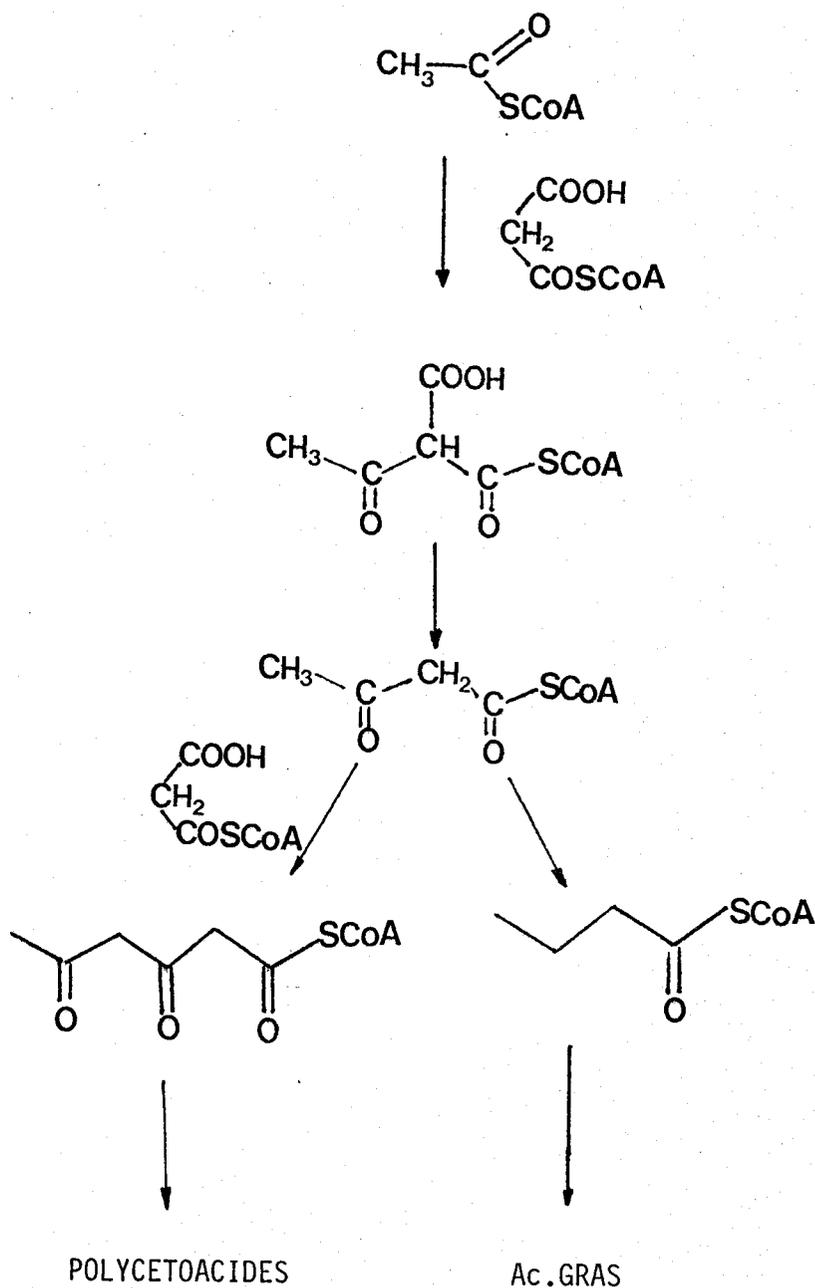
282930

Aflatoxine B1

Les polyacétoacides dérivent de chaînes polycétométhyléniques  $[-(\text{CH}_2\text{-CO})_n\text{-}]$ . La biosynthèse de ces chaînes poly  $\beta$  carbonylées est réalisée, identiquement à la voie des acides gras, par une condensation d'acétyl CoA et de malonyl CoA, suivie d'une décarboxylation.

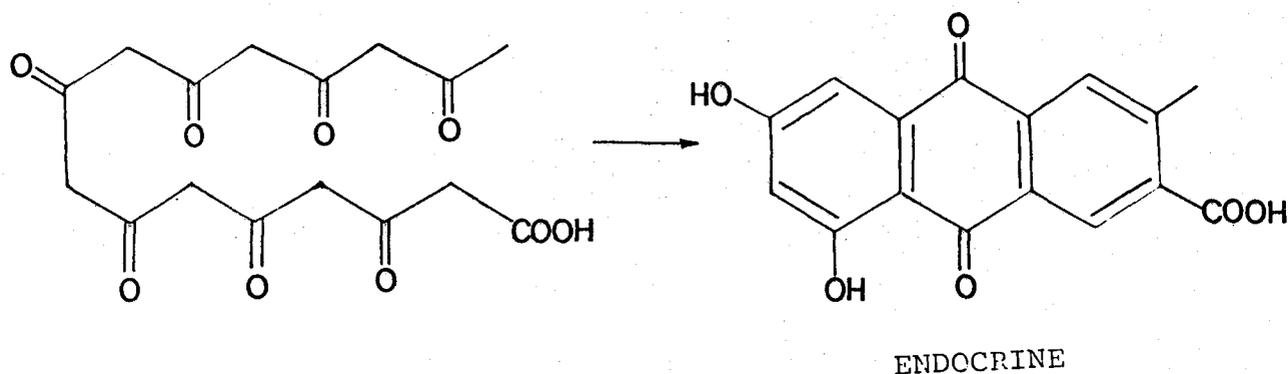
La réduction de l'intermédiaire  $\beta$ dicarbonyl conduit à la voie des acides gras.

L'addition répétée de malonyl CoA conduit à des chaînes poly  $\beta$  céto-méthyléniques précurseurs des polyacétoacides :



La chaîne poly  $\beta$  cétométhylénique formée possède des groupements méthyléniques activés où des réactions d'aldolisation intramoléculaires sont favorisées.

On obtient ainsi des composés cycliques générateurs de dérivés aromatiques :



A ce type de cyclisation vient s'ajouter une multitude d'autres réactions (alkylation, carboxylation, décarboxylation, oxydation, réduction....) catalysées par voie enzymatique, offrant ainsi une infinie variété de produits naturels.

### III - BIOSYNTHESE DE LA BOTRYODIPLODINE - ETUDE PAR INCORPORATION DE CARBONE 13 -

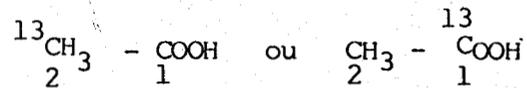
a) Application de la R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  à l'élucidation des voies de biosynthèse :

La principale technique utilisée pour l'étude des chemins biosynthétiques de divers composés était l'incorporation de précurseurs radioactifs  $^{14}\text{C}$  ou  $^3\text{H}$ . Cette technique laborieuse nécessitait une dégradation chimique pour localiser sur une molécule les atomes marqués.

La R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  permet de suivre l'incorporation d'atome de  $^{13}\text{C}$  d'un précurseur dans une molécule en évitant une dégradation chimique.

Le carbone 13 présente une abondance naturelle de 1,1% qui est suffisante pour observer un spectre de R.M.N. du  $^{13}\text{C}$  de tout composé. Ce spectre se traduit par des raies d'absorption caractéristiques des différents carbones. Chaque carbone se présente sous forme d'une raie si l'on supprime simultanément les couplages dus aux protons, par irradiation.

Dans ces conditions, un enrichissement en carbone 13 de certains carbones d'un composé à partir d'un précurseur enrichi en  $^{13}\text{C}$  se révèle dans le spectre de R.M.N. par une augmentation de l'intensité des raies concernées. Cette propriété a donc été utilisée pour suivre, dans divers squelettes carbonés, le devenir des carbones 1 ou 2 de l'acétate utilisé comme précurseur, par exemple :

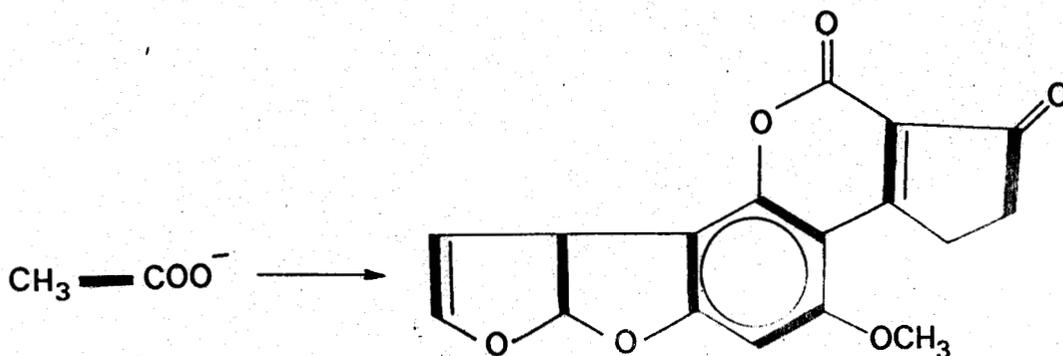


Mais cette technique fut particulièrement riche de renseignements lorsque l'on a disposé d'acétate de sodium dont les deux carbones sont enrichis en  $^{13}\text{C}$ .

En effet, deux carbones 13 voisins dans une même molécule présentent un spectre de R.M.N.  $^{13}\text{C}$  caractéristique résultant du couplage entre ces deux carbones. Ces deux carbones se présentent sous la forme d'un doublet repérable grâce à une constante de couplage identique.

Un composé enrichi en acétate doublement marqué au  $^{13}\text{C}$  présente un spectre R.M.N. où certains pics d'abondance naturelle sont entourés par deux bandes latérales du doublet donnant au signal une allure de triplet.

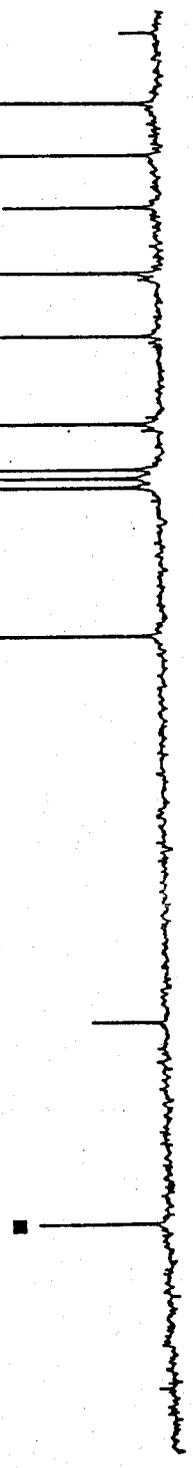
Comme il est très peu probable (avec un pourcentage d'incorporation du précurseur faible) (29) que dans une même molécule, deux unités d'acétate soient voisines, les couplages que l'on observe sont donc uniquement dus aux carbones provenant d'une molécule d'acétate  $^{13}\text{C}$  incorporée. On peut donc, dans une molécule enrichie, suivre ainsi les enchaînements des molécules d'acétate, sur un squelette déterminé. Dans le cas des mycotoxines, de très nombreux travaux concernent la biosynthèse de l'Aflatoxine. Ci-dessous est indiqué l'enchaînement des molécules d'acétate dans le squelette de l'Aflatoxine obtenu par STEYN et coll.(30) :



ABS  
1447



Spectre b



Spectre a

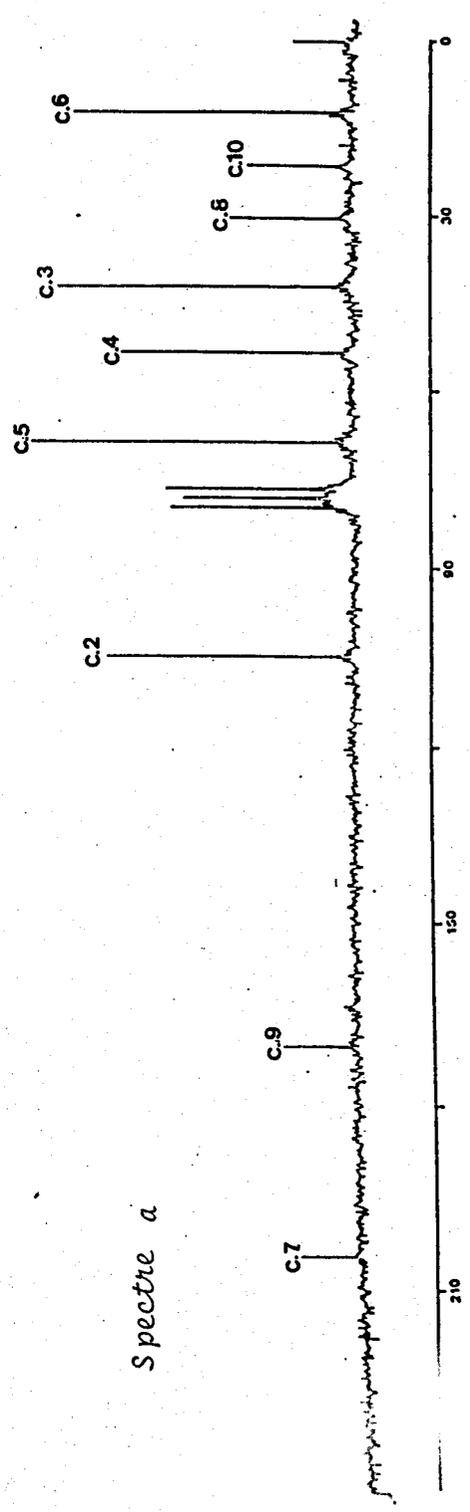


Fig. 1 : Déplacements chimiques des carbones de l'acétyle botryodiplodine à abondance naturelle (a) et résultant de l'incorporation d'acétate (<sup>13</sup>C) (b)

Cette méthode est encore susceptible d'apporter des renseignements complémentaires tout aussi précieux que l'enchaînement des unités acétate.

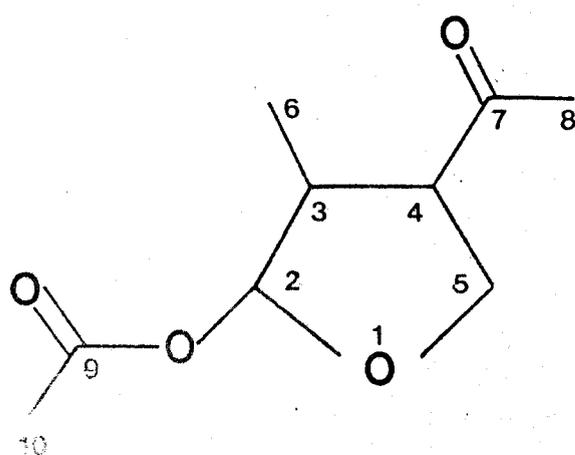
En effet, toute unité acétate qui sera, au cours d'un processus biosynthétique, l'objet d'une coupure, se remarquera dans le spectre du composé examiné par l'absence des couplages, donc de bandes latérales.

b) Etude par incorporation d'acétate de sodium  $\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{COO}^-$  (90%),  $^{13}\text{CH}_3\text{-COO}^-$  (90%),  $^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{COO}^-$  (90%) :

Nous avons, dans un premier temps, entrepris cette étude pour mettre au point une méthode d'incorporation avec un précurseur peu onéreux.

L'incorporation d'acétate de sodium [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] a été réalisée en ajoutant stérilement, dans le milieu de culture, 250 mg d'acétate [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] au 4ème, 5ème, 6ème jour de culture. Une extraction chloroformique du milieu de culture et une purification permettent de recueillir la botryodiplodine.

Les spectres R.M.N.  $^{13}\text{C}$  de la botryodiplodine à abondance naturelle et résultant de l'incorporation, ont été effectués sur les produits d'acétylation et sont enregistrés dans les mêmes conditions (figure 1). L'attribution des valeurs a été obtenue par la multiplicité des signaux observés en off résonance :



$\delta = 12,2$ ppm	$\text{CH}_3\text{-6}$
$\delta = 21,5$ ppm	$\text{CH}_3\text{-10}$
$\delta = 30,3$ ppm	$\text{CH}_3\text{-8}$
$\delta = 41,7$ ppm	CH-3
$\delta = 52,8$ ppm	CH-4
$\delta = 67,7$ ppm	$\text{CH}_2\text{-5}$
$\delta = 104,2$ ppm	CH-2
$\delta = 170,3$ ppm	C-9
$\delta = 205,4$ ppm	C-7

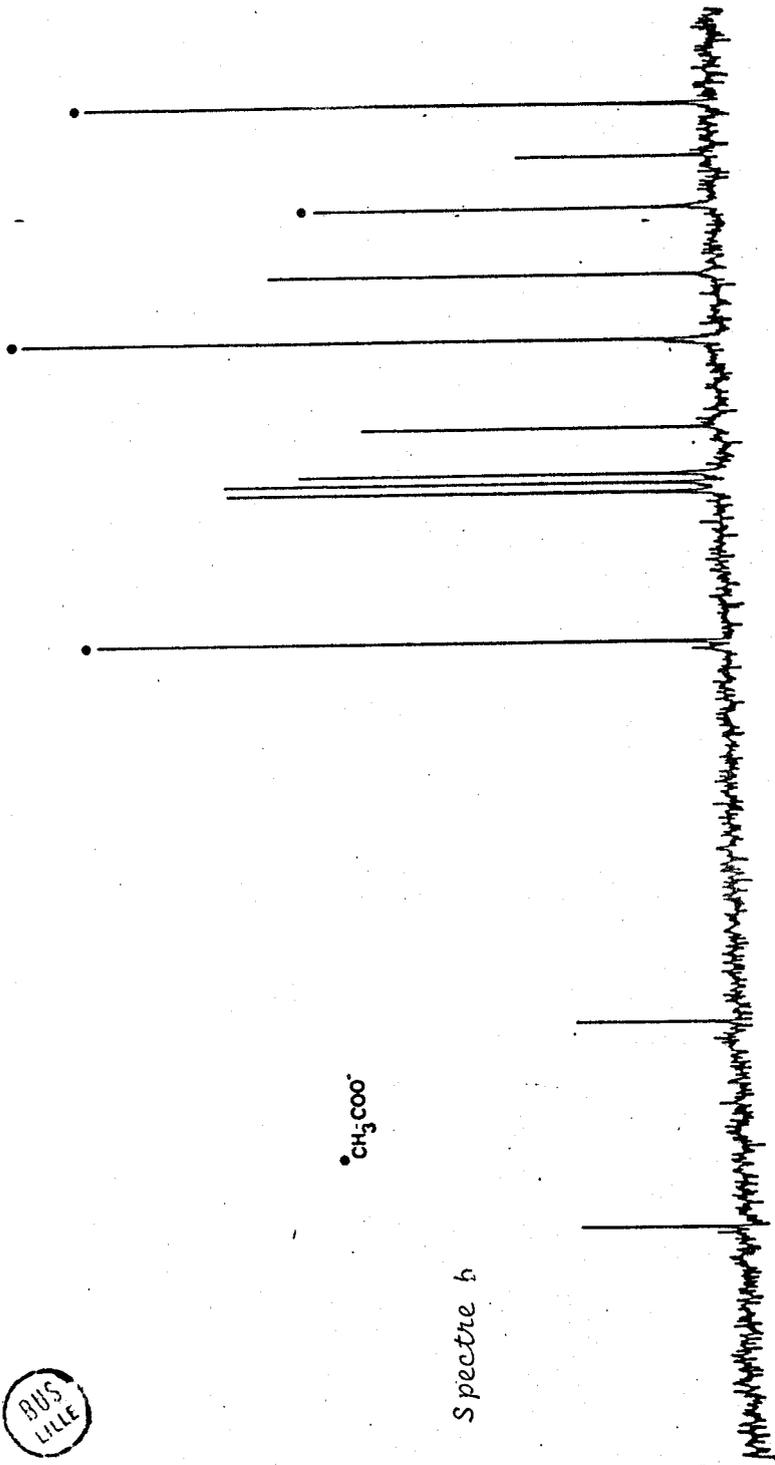
Le résultat le plus caractéristique est l'augmentation des signaux aux valeurs :

$\delta = 41,7$ ppm	C-3
$\delta = 67,7$ ppm	C-5
$\delta = 205,4$ ppm	C-7



• CH<sub>3</sub>COO•

Spectre b



Spectre a

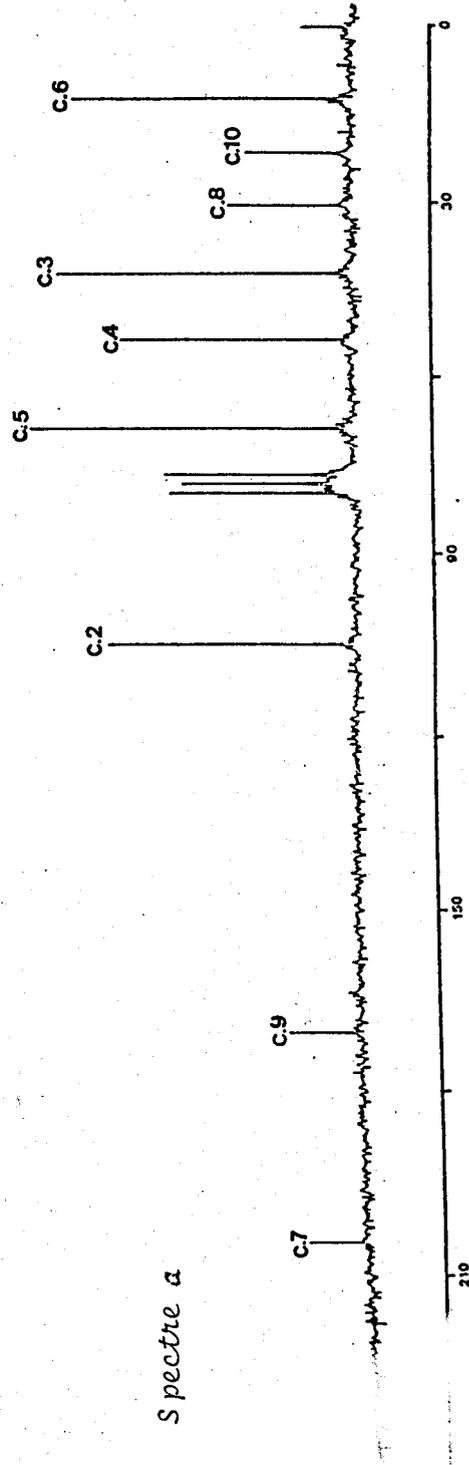
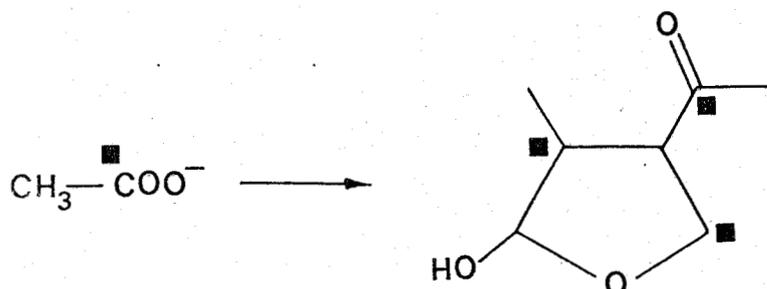


Fig. 2 : Déplacements chimiques des carbones de l'acétyle botryodiplodine à abondance naturelle (a) et résultant de l'incorporation d'acétate (2-<sup>13</sup>C) (b)

Le schéma suivant indique la localisation des enrichissements obtenus par incorporation d'acétate [ $1-^{13}\text{C}$ ] au niveau de la botryodiplodine :



De même, l'incorporation d'acétate de sodium [ $2-^{13}\text{C}$ ] a été réalisée. Le spectre R.M.N.  $^{13}\text{C}$ , résultant de l'incorporation, est représenté (figure 2).

On observe une augmentation de l'intensité des signaux correspondant aux valeurs :

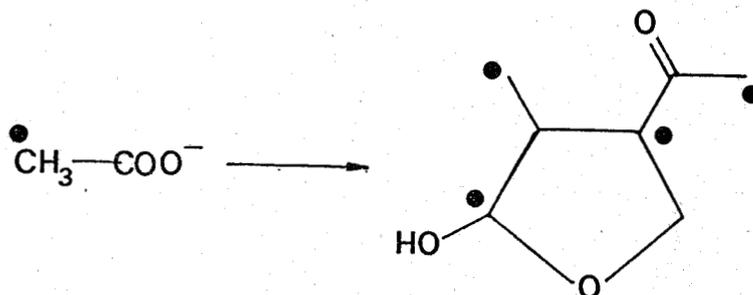
$$\delta = 12,2 \text{ ppm} \quad \text{C-6}$$

$$\delta = 30,3 \text{ ppm} \quad \text{C-8}$$

$$\delta = 52,8 \text{ ppm} \quad \text{C-4}$$

$$\delta = 104,2 \text{ ppm} \quad \text{C-2}$$

Le schéma suivant indique la localisation des marquages obtenus par incorporation d'acétate [ $2-^{13}\text{C}$ ] dans le squelette de la botryodiplodine :



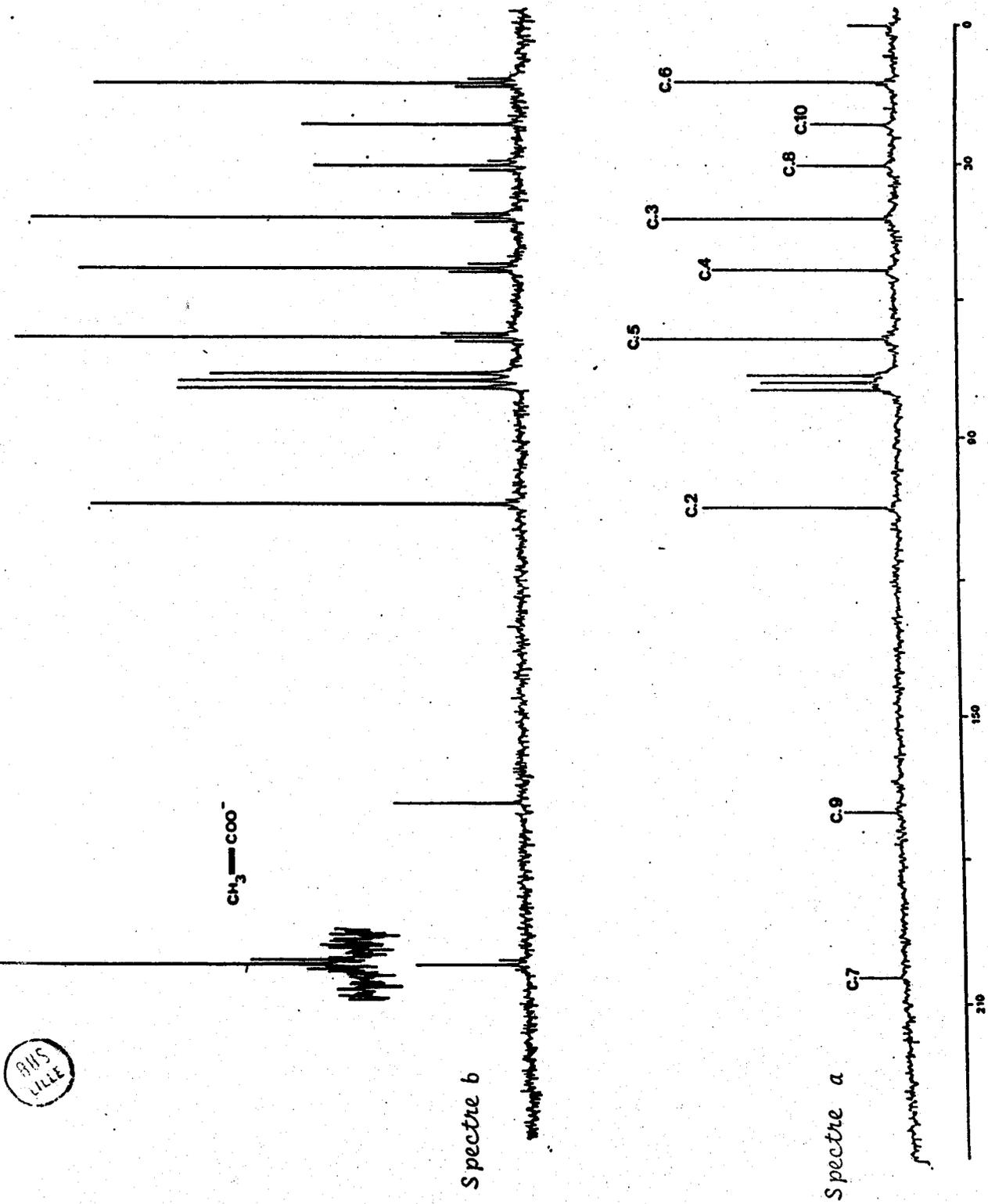


Fig. 3 : Déplacements chimiques des carbones de l'acétyle botryodiplodine à abondance naturelle (a) et résultant de l'incorporation d'acétate ( $1-2^{13}\text{C}$ ) (b)

AMS  
LILLE

Ces premiers résultats indiquent le positionnement des carbones 1 et 2 de l'acétate dans le squelette de la botryodiplodine. L'enchaînement des unités acétate est déterminé par incorporation d'acétate de sodium doublement marqué [1-2<sup>13</sup>C], dans le milieu de culture de *Penicillium Roqueforti*.

Le spectre R.M.N. <sup>13</sup>C ( Fig. 3 ) , résultant de l'incorporation d'acétate [1-2<sup>13</sup>C], montre la présence de 6 triplets et 3 singulets correspondant aux carbones C-2, C-9 et C-10.

L'enchaînement des unités acétate, basé sur la mesure des constantes de couplage, est reporté ci-dessous :

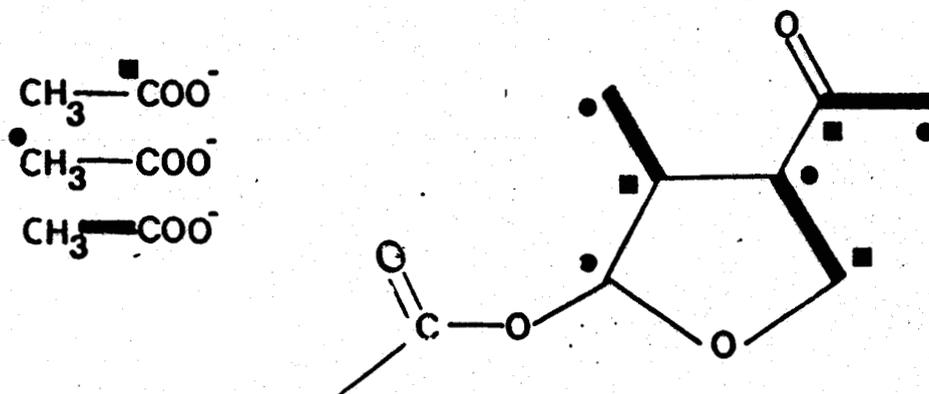
$$J_{C-3,C-6} = 34,2 \text{ Hz}$$

$$J_{C-4,C-5} = 35,0 \text{ Hz}$$

$$J_{C-7,C-8} = 40,8 \text{ Hz}$$

Le singulet observé C-2, provenant du méthyle d'une unité acétate, n'est couplé avec aucun carbone. Le carboxyle d'une unité acétate, impliqué dans la biosynthèse, a été éliminé par un processus biologique.

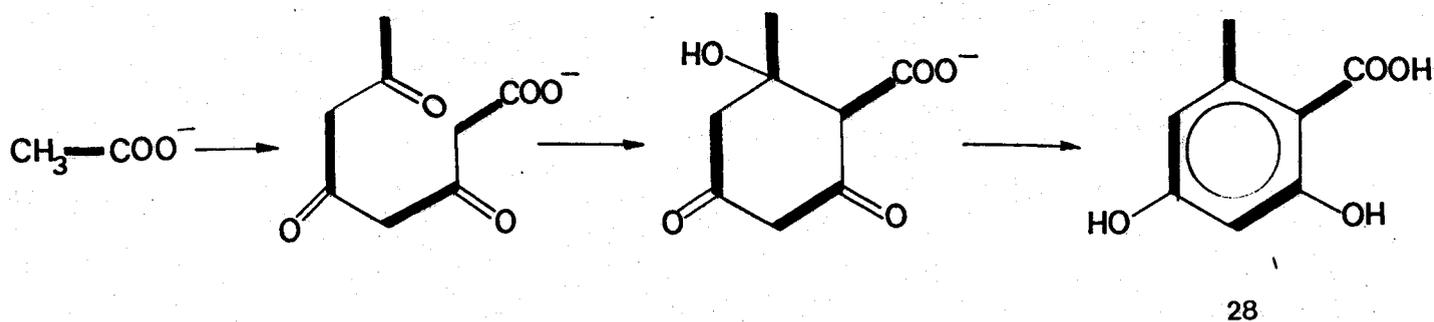
Le schéma suivant résume l'ensemble des incorporations réalisées dans le squelette de la botryodiplodine :



La botryodiplodine dérive donc d'un tétracétoacide dont le carboxyle d'une unité acétate a été éliminé lors de la biosynthèse.

La complexité de l'enchaînement des unités acétate, non linéaire, et la distribution des groupements méthyle et carboxyle ne nous ont par permis de proposer, à ce niveau, un mécanisme de biosynthèse.

L'examen de la littérature montre que l'acide orsellinique 28, métabolite de nombreux champignons et lichens et isolé pour la première fois de *Chaetomium cochliodes*(31) est un poly cétoacide aromatique résultant de la polycondensation de 4 unités acétate (32).



L'acide orsellinique a été impliqué dans la biosynthèse de nombreux métabolites tels que la fumigatine(33), l'acide pénicillique(34), l'acide stipitacique(31). Il faut souligner qu'une souche de *Penicillium roqueforti* s'est avérée capable d'élaborer conjointement la patuline et l'acide pénicillique(35). L'acide orsellinique est le précurseur présumé d'une dizaine de métabolites secondaires.

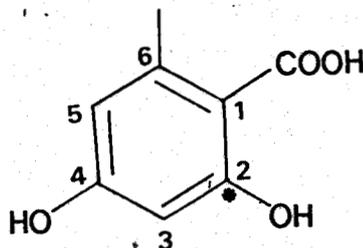
En considérant ces divers aspects, nous avons cherché à déterminer si l'acide orsellinique pouvait être également un précurseur dans la voie de biosynthèse de la botryodiplodine.

Une première approche a été réalisée par une incorporation d'acide orsellinique marqué au carbone 14.

### c) Etude par incorporation d'acide orsellinique [2-<sup>14</sup>C]

L'incorporation d'acide orsellinique [2-<sup>14</sup>C] 14, possédant une activité spécifique de 5  $\mu$ ci/mmole, dans le milieu de culture de *Penicillium roqueforti* est réalisée au 7<sup>ème</sup> jour de culture.

La synthèse du précurseur 14 est décrite au § IV.



14

L'extraction, la purification et l'acétylation de la botryodiplodine, effectuées de manière habituelle, ont permis d'obtenir l'acétyle botryodiplodine possédant une activité spécifique de 0,23  $\mu\text{ci}/\text{mmole}$ .

Le pourcentage d'incorporation spécifique (activité spécifique du produit final/activité spécifique du précurseur) est de 4,6%.

Cette première approche montre, par un pourcentage d'incorporation élevé, que l'acide orsellinique est un précurseur probable dans la voie de biosynthèse de la botryodiplodine.

A ce niveau, il est possible de proposer un chemin de biosynthèse de la botryodiplodine à partir de l'acide orsellinique (schéma 1) et faisant intervenir des réactions fréquemment rencontrées dans les voies biosynthétiques (réduction, coupure oxydative, époxydation, décarboxylation).

Le positionnement des carbones et l'enchaînement des unités acétate provenant de l'acide orsellinique correspondent aux résultats obtenus par incorporations d'acétate [ $1-^{13}\text{C}$ ], [ $2-^{13}\text{C}$ ], [ $1-2^{13}\text{C}$ ] dans le squelette de la botryodiplodine.

Nous avons donc cherché à vérifier ce schéma hypothétique par synthèses et incorporations d'acide orsellinique enrichi au  $^{13}\text{C}$ .

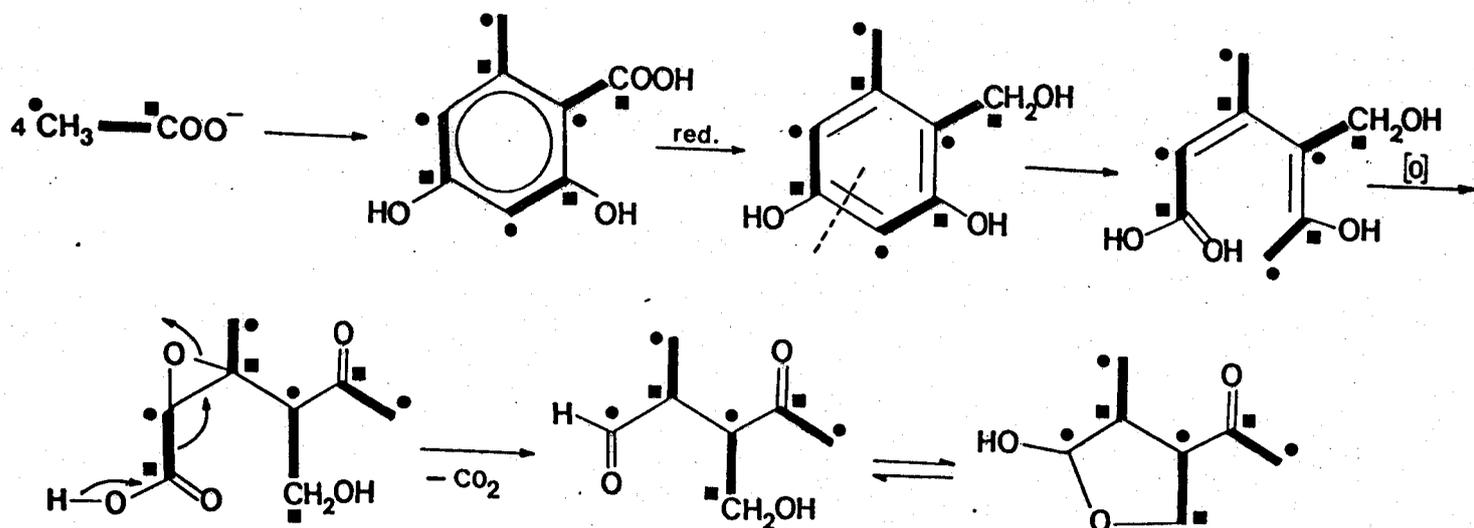


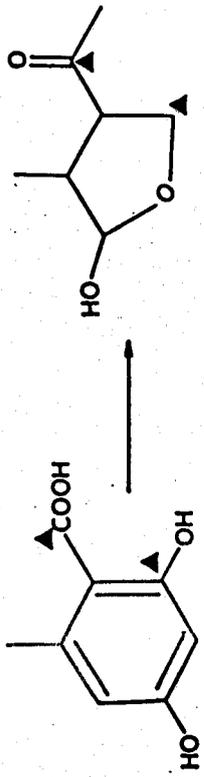
Schéma 1: Voie de biosynthèse de la botryodiplodine à partir de l'acide orsellinique comme précurseur.

d) Etude par incorporation d'acide orsellinique [2-<sup>13</sup>C, carboxyle <sup>13</sup>C], [3-4 <sup>13</sup>C]

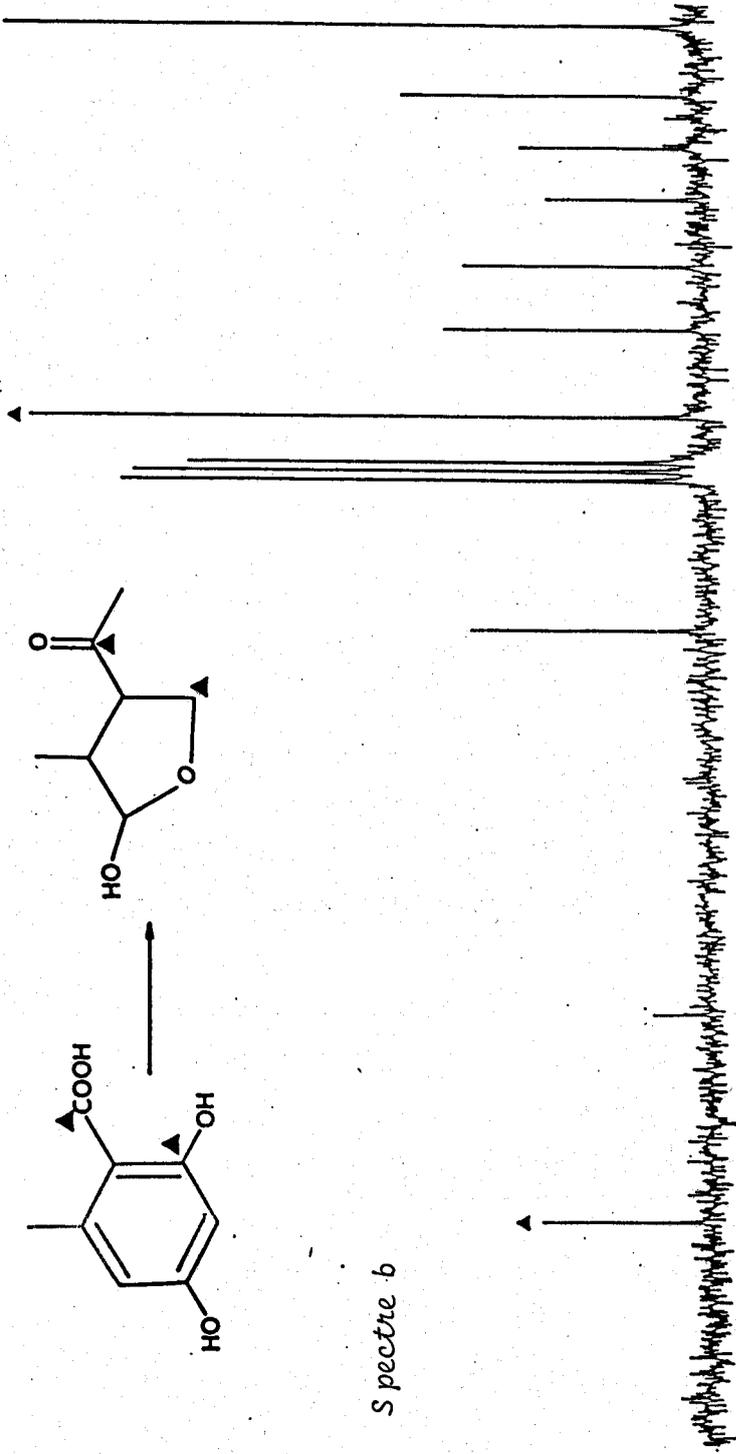
Une première localisation de la distribution de certains carbones enrichis au carbone 13 de l'acide orsellinique dans la botryodiplodine a été réalisée.

L'incorporation de 20 mg d'acide orsellinique [2-<sup>13</sup>C, carboxyle <sup>13</sup>C]<sub>15</sub> est effectuée stérilement aux 6ème et 7ème jour de culture. L'extraction, la purification et l'acétylation de la botryodiplodine sont réalisées de manière habituelle.

La synthèse du composé 15 est décrite au § IV.



Spectre b



Spectre a

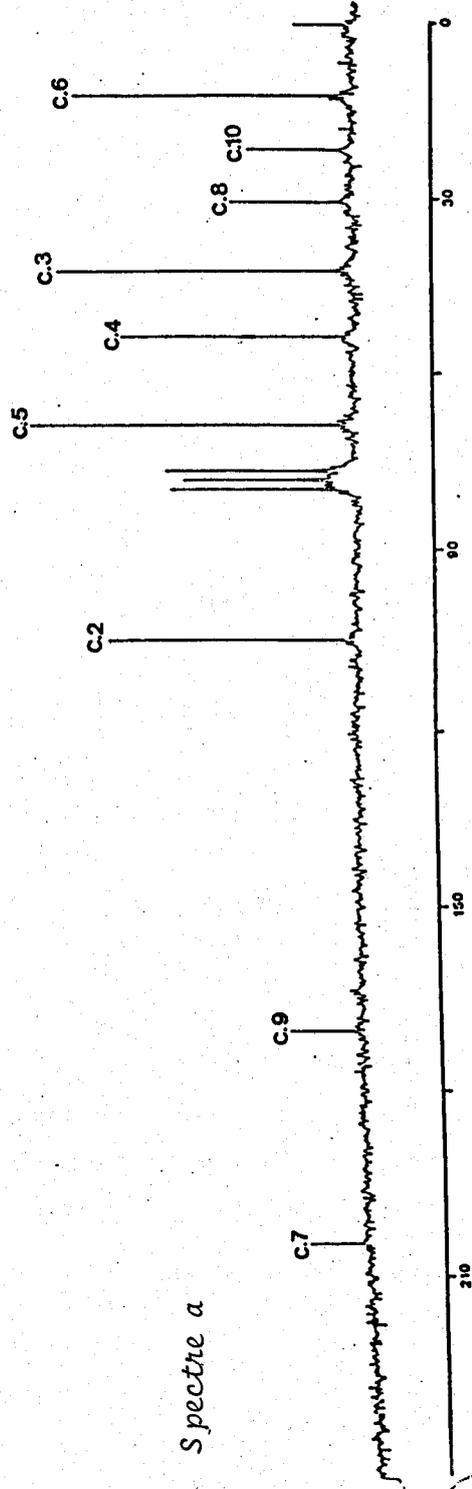
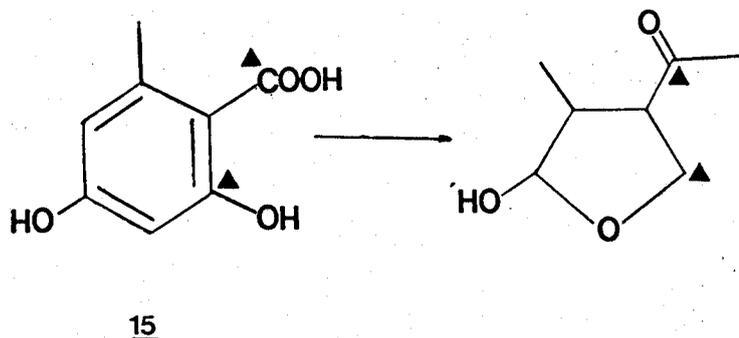


Fig. 4 : Déplacements chimiques des carbones de l'acétyle botryodiplodine à abondance naturelle (a) et résultant de l'incorporation d'acide onsellinique (2  $^{13}\text{C}$ , carboxyl  $^{13}\text{C}$ ) (b)



Les spectres R.M.N.  $^{13}\text{C}$  d'un échantillon d'acétyle botryodiplodine à abondance naturelle et résultant de l'incorporation sont représentés figure 4.

L'examen de ces spectres montre que les carbones C-5 et C-7 de la botryodiplodine sont enrichis. La représentation schématique résultant de l'incorporation est donnée ci-dessous.



Aucune redistribution d'acétate, pouvant résulter d'une dégradation biologique de l'acide orsellinique, n'est observée. Seuls deux carbones sont marqués.

Ce premier marquage au carbone 13 établit clairement l'intervention de l'acide orsellinique comme précurseur dans la biosynthèse de la botryodiplodine. La distribution des enrichissements obtenus par incorporation d'acide orsellinique [2- $^{13}\text{C}$ , carboxyle  $^{13}\text{C}$ ] correspond au schéma biosynthétique proposé dans le schéma 1.

Dans le but de confirmer l'ouverture du cycle de l'acide orsellinique, qui s'effectue entre le C-3 et C-4 et la position du carbone éliminé (que nous supposons C-4 dans le schéma de biosynthèse), nous avons synthétisé et incorporé de l'acide orsellinique [3-4 $^{13}\text{C}$ ] :

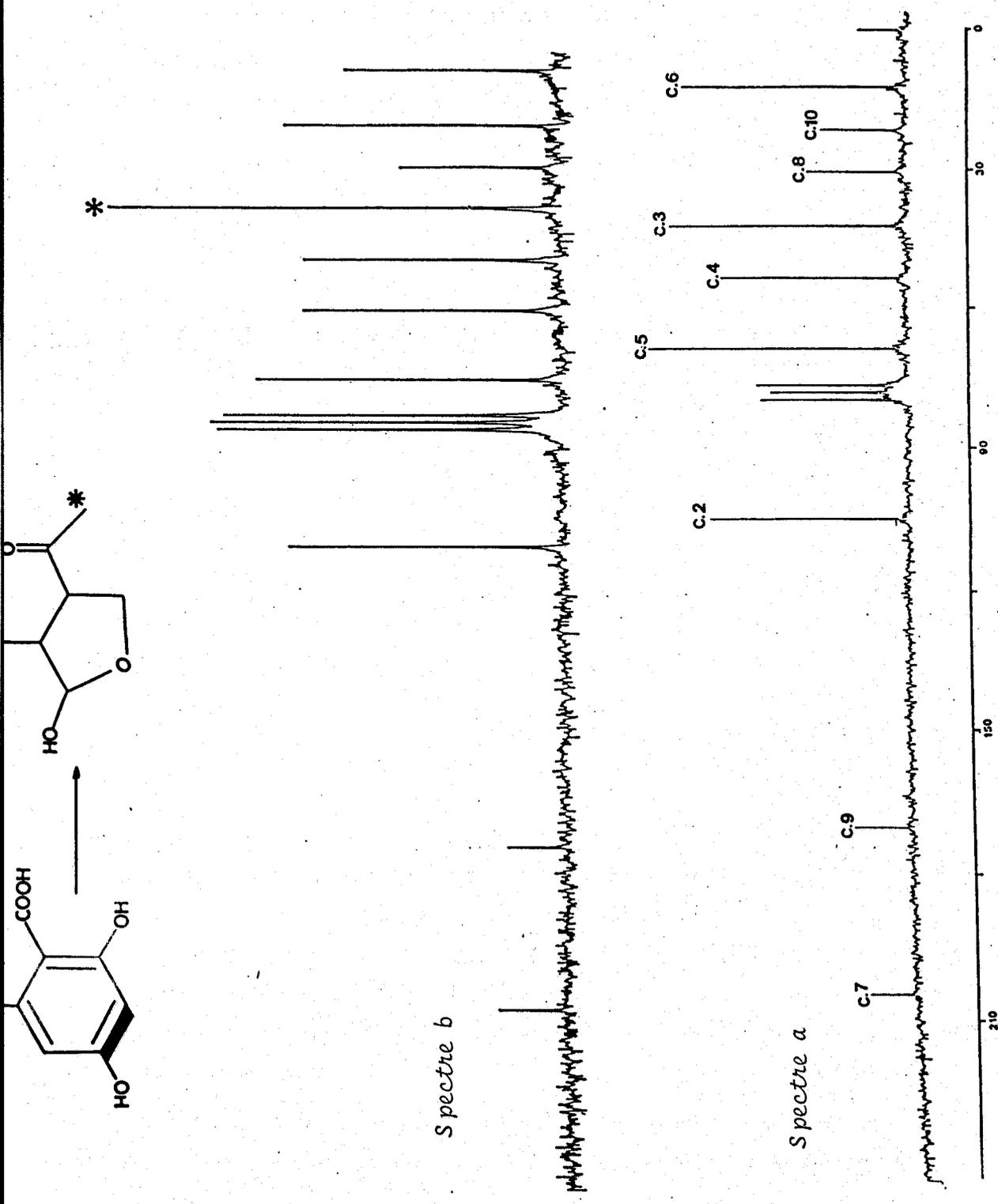


Fig. 5 : Déplacements chimiques des carbones de l'acétyle botryodiplodine à abondance naturelle (a) et résultant de l'incorporation d'acide orsellinique (3-4  $^{13}\text{C}$ ) (b)

20 mg d'acide orsellinique [ $3-4^{13}\text{C}$ ] 16, dont la synthèse est décrite au § IV, sont incorporés stérilement au 7ème jour dans le milieu de culture de *Penicillium roqueforti*.

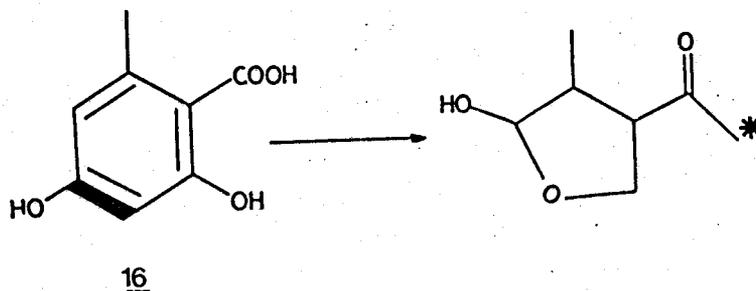
L'extraction, la purification et l'acétylation de la botryodiplodine sont réalisées de manière habituelle.

Les spectres R.M.N.  $^{13}\text{C}$  d'un échantillon d'acétyle botryodiplodine à abondance naturelle et résultant de l'incorporation sont représentés (Fig.5)

On observe une augmentation de l'intensité d'un seul signal à la valeur :

$$\delta = 30,3 \text{ ppm} \quad \text{C-8}$$

Aucun couplage carbone-carbone n'est visible. La représentation schématique résultant de l'incorporation dans le squelette de la botryodiplodine est donnée ci-dessous :



L'un des carbones enrichis de l'acide orsellinique [ $3-4^{13}\text{C}$ ] est éliminé lors de la biosynthèse de la botryodiplodine. Ce carbone correspond au C-4 de l'acide orsellinique. En effet, l'enchaînement des unités acétate dans l'acide orsellinique montre que le carbone 4 provient d'une fonction carboxyle d'une unité acétate. D'autre part, les études par incorporations d'acétate [ $1-^{13}\text{C}$ ], [ $2-^{13}\text{C}$ ], [ $1-2^{13}\text{C}$ ] ont montré qu'il y a coupure d'une unité acétate et perte d'un carboxyle d'une unité acétate.

Toutes ces observations expérimentales sont en accord avec le chemin biosynthétique proposé schéma 1.

L'étape clé de cette voie de biosynthèse est une ouverture du cycle aromatique entre le C-3 et le C-4 de l'acide orsellinique. Une telle coupure oxydative a déjà été proposée dans une position analogue pour la biosynthèse de la sclérine(36).

e) Conclusion :

La botryodiplodine est donc un métabolite secondaire biosynthétisé à partir d'un tétracétoacide aromatique : l'acide orsellinique.

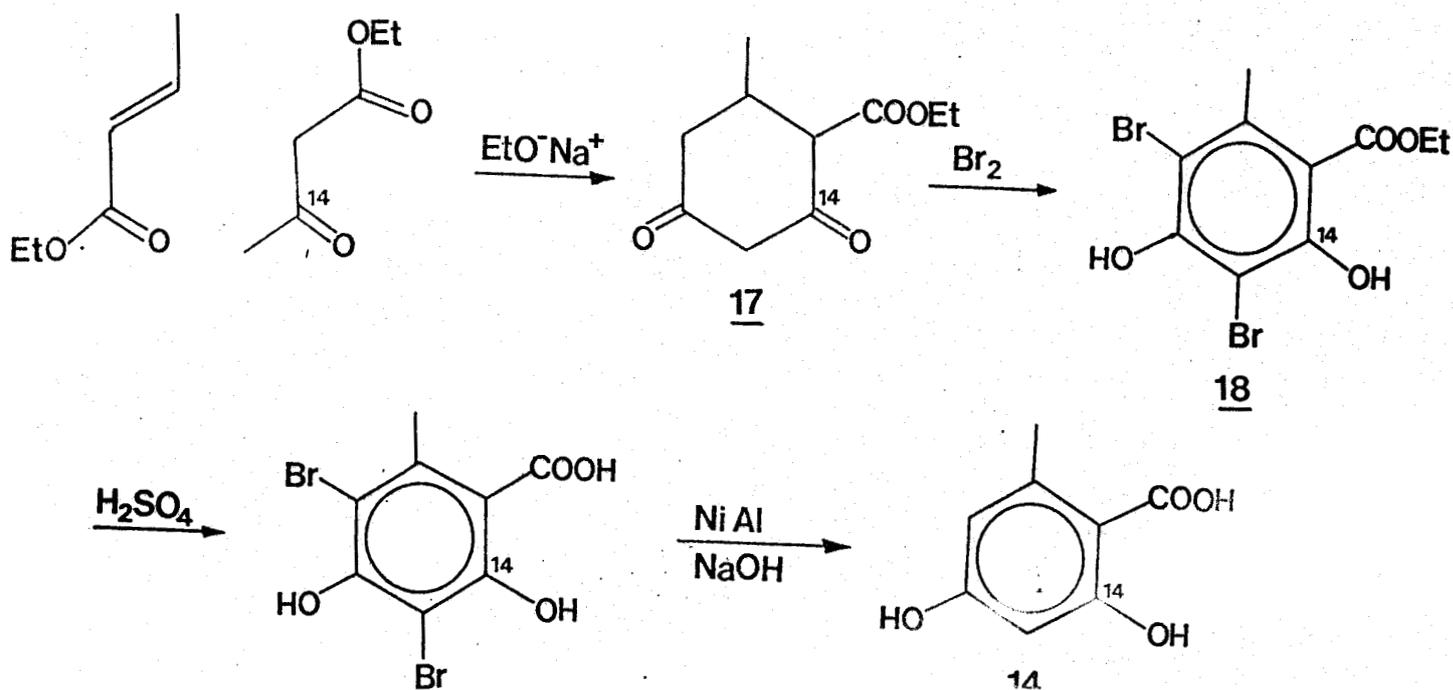
La voie de biosynthèse que nous proposons est hypothétique, elle correspond absolument aux marquages  $^{13}\text{C}$  effectués et fait appel à des réactions enzymatiques fréquemment rencontrées.

La botryodiplodine s'ajoute donc à la liste des métabolites biosynthétisés à partir de l'acide orsellinique. Il est remarquable de constater que l'acide orsellinique est un composé clé dans la biosynthèse de nombreux métabolites synthétisés par différentes classes de végétaux.

IV - SYNTHÈSE DES PRECURSEURS ENRICHIS AU CARBONE 14 ET AU CARBONE 13 -

a) Synthèse de l'acide orsellinique [ $2^{14}\text{C}$ ] 14

Nous avons réalisé cette synthèse comme décrit dans la littérature(37), à partir de crotonate d'éthyle et d'acétoacétate d'éthyle [ $3^{14}\text{C}$ ] :



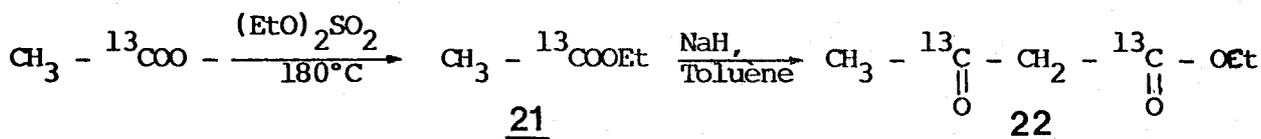
La condensation de l'acétoacétate d'éthyle [ $3-^{14}\text{C}$ ] sur le crotonate d'éthyle en milieu éthanolate de sodium permet d'obtenir le dérivé cyclique 17. Ce dérivé est alors bromé dans l'acide acétique glacial. Le composé 18 est obtenu dans d'excellents rendements. Une hydrolyse acide, suivie d'une déshalogénéation, permet d'obtenir 14 que l'on cristallise dans un mélange eau-acétone.

La déshalogénéation, décrite dans la littérature par réaction de 19 sur l'hydrogène en présence de palladium, a été remplacée par réaction de 19 sur nickel en présence d'hydrogène naissant (38).

b) Synthèse de l'acide orsellinique [ $2-^{13}\text{C}$ , carboxyle  $^{13}\text{C}$ ] 15

Nous avons repris la suite réactionnelle décrite précédemment, pour la synthèse de 15, à partir de crotonate d'éthyle et d'acétoacétate d'éthyle [ $1-3^{13}\text{C}$ ].

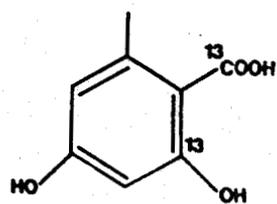
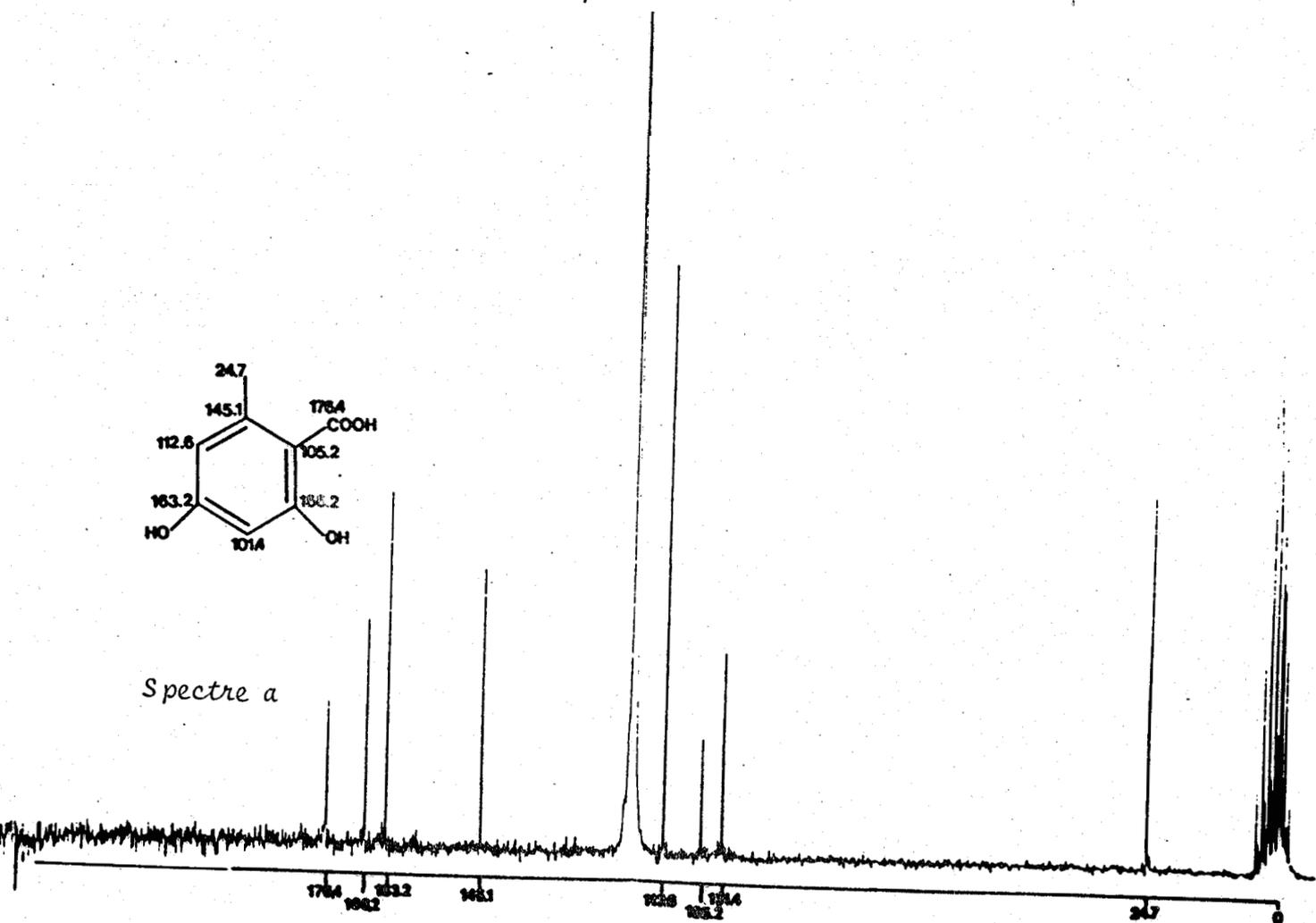
La synthèse d'acétoacétate d'éthyle [ $1-3^{13}\text{C}$ ] est réalisée à partir d'acétate de sodium [ $1-^{13}\text{C}$ ] commercial comme décrit ci-dessous :



La synthèse d'acétate d'éthyle [ $1-^{13}\text{C}$ ] est réalisée par réaction d'acétate de sodium [ $1-^{13}\text{C}$ ] sur le sulfate d'éthyle, avec distillation de 21 au-fur-et-à-mesure de sa synthèse.

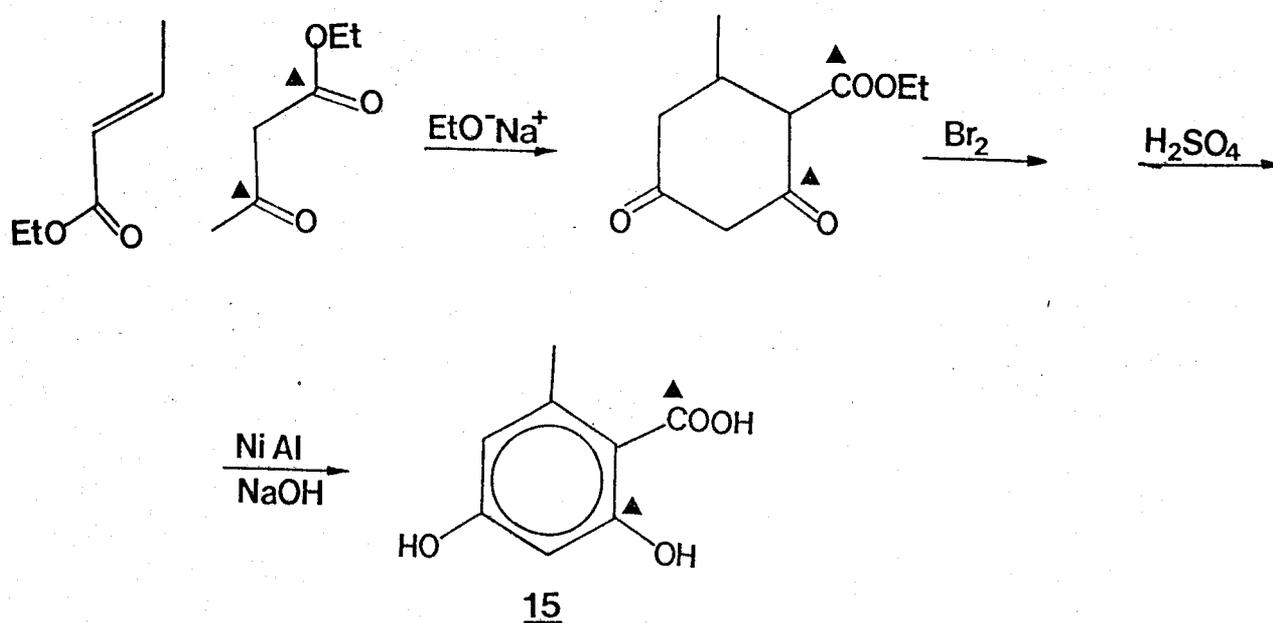
L'acétoacétate d'éthyle [ $1-3^{13}\text{C}$ ] est synthétisé par condensation de 21 dans une suspension d'hydrure de sodium dans le toluène (39).

Après acidification et extraction, 22 est condensé sur le crotonate d'éthyle dans une solution d'éthanolate de sodium, suivi d'une bromation, hydrolyse et déshalogénéation.



Spectre b

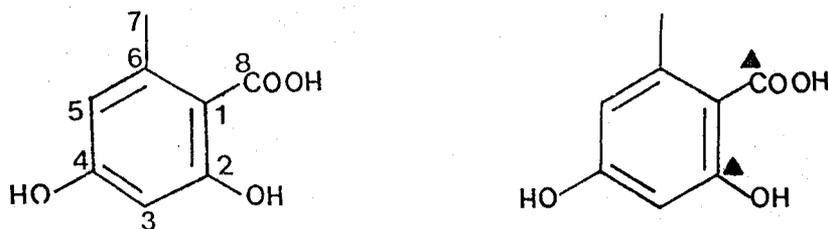
Fig. 6 : Déplacements chimiques des carbones de l'acide urséllinique à abondance naturelle (a) et enrichi sur les carbones 2 et carboxyle (b). Solvant  $CD_3CN$ .



Les spectres R.M.N.  $^{13}\text{C}$  d'un échantillon d'acide orsellinique à abondance naturelle et résultant de l'enrichissement sont comparés afin de confirmer le positionnement du marquage (Figure 6).

L'attribution des déplacements chimiques des carbones de l'acide orsellinique, basée sur les couplages observés en off-resonance et la littérature (40) est reportée tableau 1.

Tableau 1



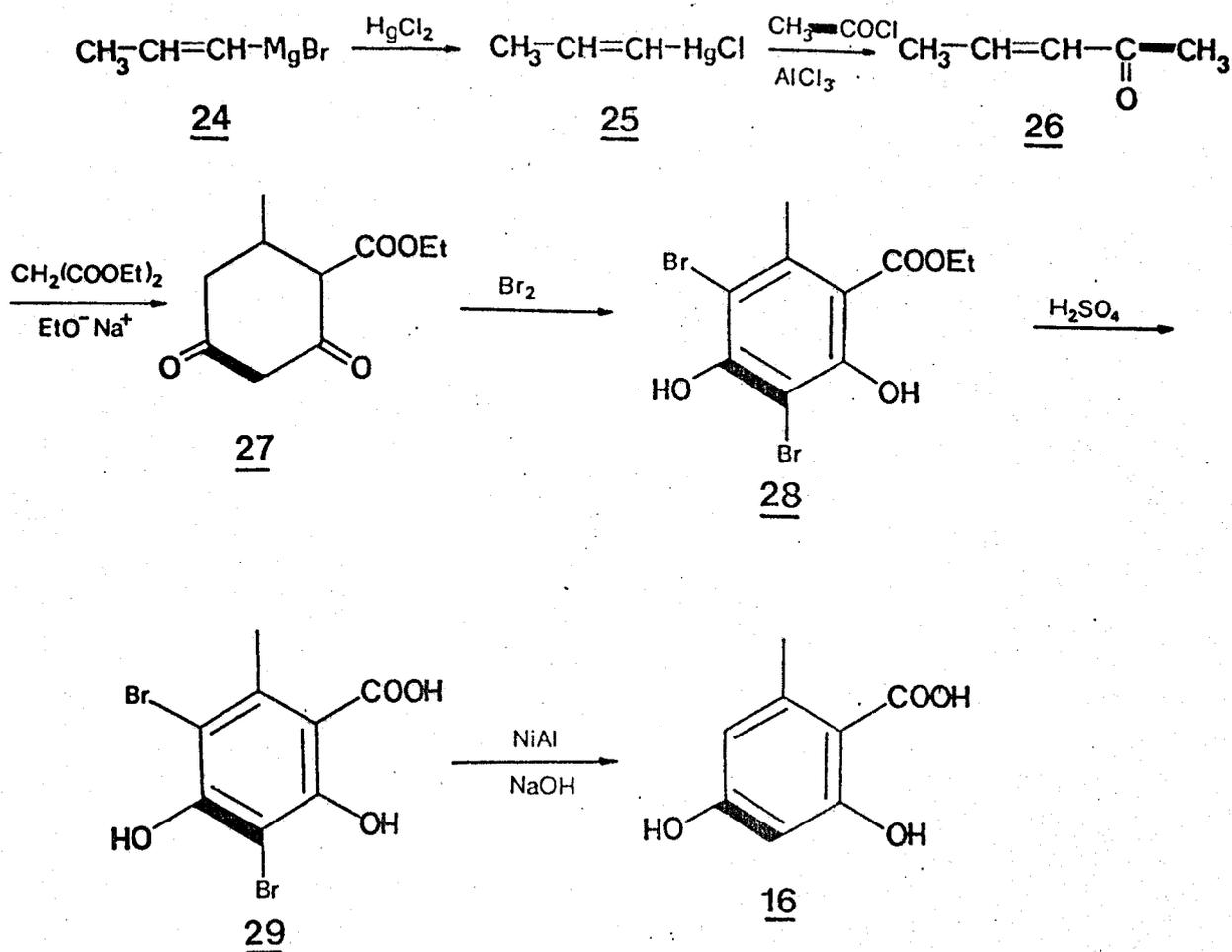
Carbone

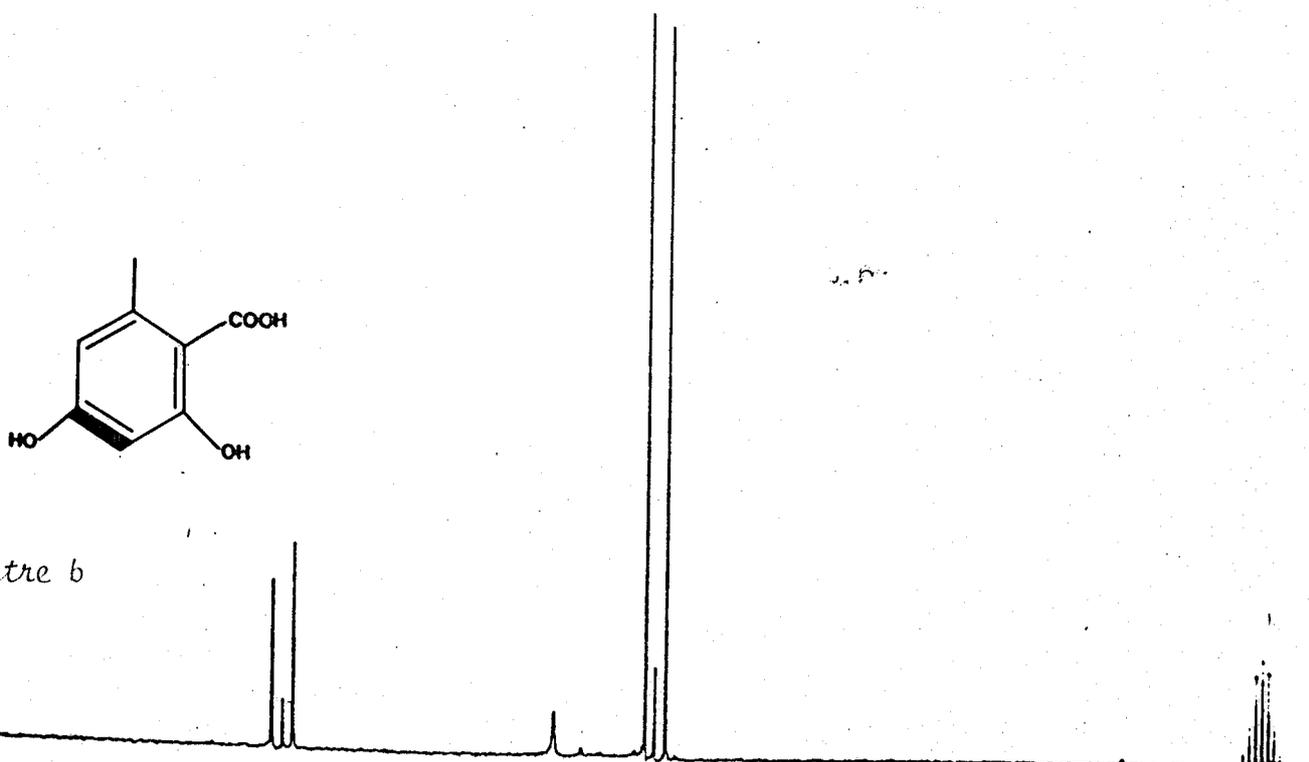
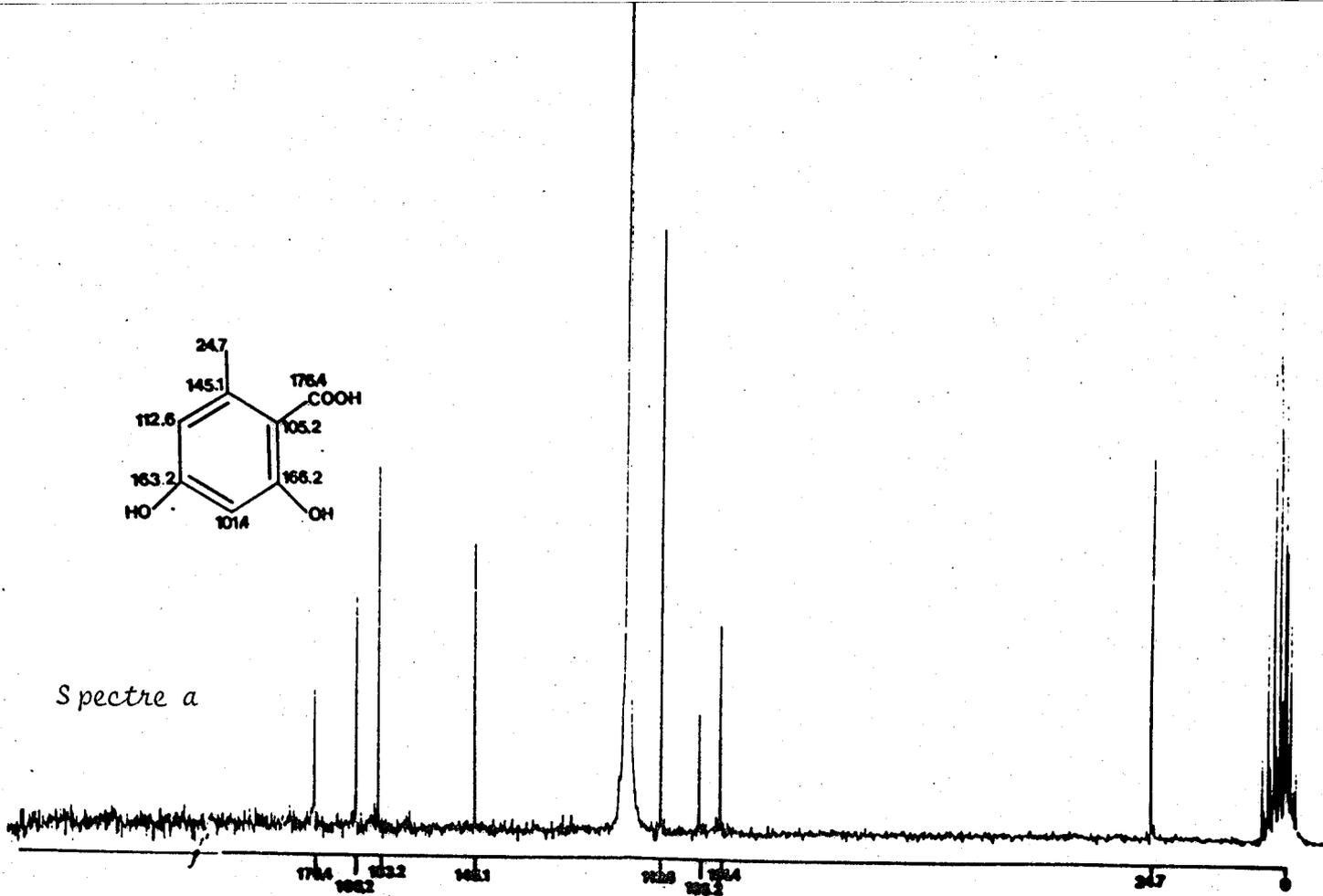
1  $\delta = 105,2$  ppm2  $\delta = 166,2$  ppm3  $\delta = 101,4$  ppm4  $\delta = 163,2$  ppm5  $\delta = 112,6$  ppm6  $\delta = 145,1$  ppm7  $\delta = 24,7$  ppm8  $\delta = 176,4$  ppm $\delta = 166,2$  ppm $\delta = 176,4$  ppm

c) Synthèse de l'acide orsellinique [3-4<sup>13</sup>C] 16 :

Le matériel doublement enrichi au carbone 13 disponible commercialement est assez limité. L'acétate de sodium [1-2<sup>13</sup>C] est le seul composé disponible et exploitable.

La synthèse de 16 est décrite ci-dessous :





BUS  
LILLE

Fig. 7 : Déplacements chimiques des carbones de l'acide urséllinique à abondance naturelle (a) et enrichi sur les carbones 3 et Solvant  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

La condensation du pentène-3 one-2 [ $1-2^{13}\text{C}$ ] 26 sur le malonate d'éthyle en milieu éthanolate, permet d'obtenir le dihydro orsellinate d'éthyle [ $3-4^{13}\text{C}$ ] 27. Une bromation, suivie d'une hydrolyse acide et une déshalogénéation conduisent au composé 16.

La synthèse du pentène-3 one-2 [ $1-2^{13}\text{C}$ ] 26 est réalisée par réaction du chlorure d'acétyle [ $1-2^{13}\text{C}$ ] sur le chloro-1 propène 1 mercure 25 en présence de chlorure d'aluminium(41). Il est à noter que la réaction du chlorure d'acétyle sur des organo magnésiens vinyliques ne permet pas d'obtenir des cétones  $\alpha$ - $\beta$  insaturées dans des rendements satisfaisants.

Le chlorure d'acétyle [ $1-2^{13}\text{C}$ ] est obtenu par réaction d'acétate de sodium [ $1-2^{13}\text{C}$ ] sur l'oxytrichlorure de phosphore.

La synthèse du chloro-1 propène-1 mercure 25 est réalisée par réaction du bromo 1 propène sur le magnésium dans le THF à reflux(42) et par déplacement du métal par le chlorure de mercure dans le THF(43).

Les spectres R.M.N. $^{13}\text{C}$  d'un échantillon d'acide orsellinique à abondance naturelle et résultant de l'enrichissement 16 sont comparés afin de confirmer le positionnement du marquage (Figure 7).

On observe deux doublets intenses aux valeurs :

$\delta = 101,4$ ppm	$J = 67,1$ Hz	C-3
$\delta = 163,2$ ppm	$J = 67,1$ Hz	C-4

Il est à noter que le signal observé entre chaque doublet provient d'un monoenrichissement des carbones 3 et 4 de l'acide orsellinique. L'acétate de sodium utilisé est enrichi à 90% en carbone 13, c'est-à-dire que l'on a statistiquement :

81% de molécules	$^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$
18% de molécules	$^{13}\text{C}-^{12}\text{C}$ ou $^{12}\text{C}-^{13}\text{C}$
1% de molécules	$^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$

On a donc une contribution non négligeable de molécules mono marquées (18%) qui se traduit sur le spectre de R.M.N.  $^{13}\text{C}$  par l'apparition d'un petit signal central.

C O N C L U S I O N

L'étude des activités biologiques de la botryodiplodine a montré le caractère génotoxique de la molécule. Cette mycotoxine s'est avérée mutagène dans le test de Ames et présente une aptitude à la création de pontages DNA-protéines.

Le pouvoir toxique de cette molécule est directement lié à la présence de la fonction hémiacétalique. En effet, la méthylation de l'hydroxyle hémiacétalique permet d'obtenir un dérivé dont les activités biologiques sont fondamentalement différentes de la botryodiplodine. En particulier, ce composé est inactif dans le test de Ames et n'induit aucun pontage DNA-protéines.

Ces résultats montrent l'importance de la réactivité chimique de l'hémiacétal au niveau de la toxicité de la mycotoxine et de son interaction sur le DNA in vivo.

La compréhension de la génotoxicité de la botryodiplodine est approchée par une étude de la réactivité chimique de la toxine sur des modèles.

La réaction de la botryodiplodine sur des amines aromatiques de type aminopyrimidine et aminopurique permet d'isoler des produits d'addition de structure amino-2 tétrahydrofuranne. Ces composés résultent d'une attaque nucléophile de l'amine exocyclique, suivi d'une cyclisation intramoléculaire de l'alcool sur l'imine intermédiaire formée. Il a été ainsi possible d'isoler de tels produits d'addition sur des modèles adénine et cytosine.

La stéréochimie des produits d'addition, réalisée par R.M.N. du proton et du carbone 13, montre une configuration cis des groupements méthyle, méthyle cétone et amine.

La structure des produits d'addition traduit le rôle déterminant de la fonction aldéhyde.

Généralement, les aldéhydes tels que le formol, l'acétaldéhyde, réagissent sur les bases nucléiques et produisent des dérivés imines instables. La particularité de la réactivité chimique de la botryodiplodine sur des amines

aromatiques réside au niveau de la cyclisation intramoléculaire de l'alcool sur l'imine intermédiaire. Les produits d'addition présentent ainsi une bonne stabilité.

Cette approche traduit les potentialités chimiques de la mycotoxine sur le matériel cellulaire et permet la compréhension des interactions observées entre la botryodiplodine et le DNA in vivo. En effet, un tel greffage de la botryodiplodine sur les fonctions amines des bases nucléiques modifie profondément la structure en double hélice du génôme. Les liaisons hydrogènes existant entre bases nucléiques du DNA et maintenant une structure cohérente en double hélice, se voient détruites. Une structure du DNA ainsi modifiée, se traduit par un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire.

Mais il reste certain que la réactivité chimique de la botryodiplodine ne se limite pas exclusivement aux bases nucléiques du DNA. Ainsi, les RNA et les protéines sont susceptibles d'interagir avec la mycotoxine.

La formation des cross links entre DNA et protéines est une altération cellulaire provoquée par de nombreux aldéhydes et par la botryodiplodine. Il est possible de proposer un mécanisme de formation de ces pontages. Ces pontages résultent de la réaction chimique d'une fonction amine d'une base nucléique ou d'un acide aminé sur la botryodiplodine. L'imine ainsi formée réagit avec une autre fonction amine.

La réactivité chimique de la botryodiplodine sur le DNA in vitro permet d'isoler, après hydrolyse enzymatique du DNA, 6 nucléosides greffés à la mycotoxine. L'étude structurale de ces adduits a été réalisée par la synthèse de modèles de référence. Ces modèles, qui sont les produits d'addition de la toxine sur le 2'déoxyadénosine et 2'déoxycytidine, ont permis l'identification d'un seul adduit.

Les difficultés rencontrées sur l'identification des autres adduits posent un problème sur leurs origines et plus particulièrement sur la stabilité des adduits lors de l'hydrolyse enzymatique du DNA.

Cette étude montre que l'approche par des modèles pyrimidiques et puriques est primordiale à la compréhension de la toxicité de la botryodiplodine. La nature des adduits obtenus sur le DNA, s'ils sont des artéfacts d'hydrolyse, ne permettent pas de conclure directement sur le mécanisme de réaction chimique de la botryodiplodine.

De part sa faible action létale au niveau cellulaire et sa simplicité structurale, la botryodiplodine s'avère un excellent modèle d'étude, tant au niveau biologique que chimique, pour la compréhension des interactions drogue-DNA.

L'intérêt biologique que présente la botryodiplodine nous a incité à déterminer la voie de biosynthèse de ce métabolite par R.M.N. du carbone 13.

Les incorporations d'acétate de sodium enrichi au carbone 13 ont montré que la botryodiplodine est biosynthétisée à partir d'un tétracétoacide.

Un chemin de biosynthèse de la mycotoxine à partir de l'acide orsellinique a été proposé. L'incorporation d'acide orsellinique [ $2^{13}\text{C}$ , carboxyle  $^{13}\text{C}$ ] et [ $3-4^{13}\text{C}$ ] a permis de confirmer la voie biosynthétique proposée.

Il est remarquable de noter que l'acide orsellinique, composé naturel de diverses classes de végétaux, est un intermédiaire fréquemment rencontré dans les voies de biosynthèse de métabolites secondaires.

L'intérêt croissant accordé à la toxicité des métabolites secondaires de champignons, montre le risque posé par les contaminations alimentaires. En effet, depuis la découverte des aflatoxines et de leurs pouvoirs génotoxiques, de nombreuses études ont mis en évidence les propriétés biologiques importantes des mycotoxines.

Le risque posé par une contamination alimentaire de la botryodiplodine est très limitée. En effet, il s'est avéré que peu de souches de Penicillium roqueforti sont capables d'élaborer la toxine.

--=0000000=-

PARTIE EXPERIMENTALE

### GENERALITES

Les spectres infra-rouge (I.R.) ont été enregistrés sur un spectrophotomètre PERKIN ELMER 157 G. Les fréquences sont données en  $\text{cm}^{-1}$ .

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton R.M.N<sup>1</sup>H ont été enregistrés sur les appareils suivants :

- BRUCKER WP 60 (60 MHz)
- BRUCKER WP 80 (80 MHz)
- CAMECA 250 (250 MHz) C.E.A.
- CAMECA 350 (350 MHz) C.N.R.S. Lyon
- BRUCKER WM 500 (500MHz) C.E.A.

Les déplacements chimiques sont exprimés en  $\delta$ ppm à partir du triméthylsilane (TMS) pris comme référence interne dans les solvants organiques et le triméthyl silyl<sup>13</sup> propionique pris comme référence interne dans l'eau lourde. Les couplages sont donnés en Hertz (Hz). Les lettres s, d, t, q, m, ont été utilisées pour désigner la nature des signaux, respectivement singulet, doublet, triplet, quadruplet et multiplet. De même, les abréviations quint, sext ont été utilisées pour désigner respectivement quintuplet, sextuplet.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du carbone 13 ont été enregistrés sur un appareil BRUCKER WP 80.

Les spectres de masse (S.M) ont été enregistrés sur les appareils :

- RIBERMAG 10-10, associé à un système SIDAR 121 par introduction directe
- VARIAN MAT 311 RENNES. Pour les spectres haute résolution.
- ZAB HF , avec une matrice au glycérol pour les spectres en Fast Atom Bombardment (C.N.R.S. Lyon).

Les spectres ultra-violet (U.V.) ont été enregistrés sur un appareil BECKMAN modèle 24

Les points de fusion (F) ont été pris au banc KOFLER et ne sont pas corrigés.

Les pouvoirs rotatoires ( $[\alpha]_D$ ) ont été mesurés à 589 nm sur un polarimètre PERKIN ELMER 141.

Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Service Central de Microanalyses du C.N.R.S.

Les chromatographies sur colonnes ont été faites sur gel de silice MERCK (0,06-0,2 mm). Les chromatographies sur couches minces (CCM) sont réalisées avec de la silice MERCK G.

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est réalisée avec l'appareillage suivant : une pompe WATERS 6000 A, un injecteur universel U 6 K, un détecteur UV M-440 à filtres interférentiels et un détecteur à indice de réfraction R 401.

Une "extraction de la manière habituelle" signifie : évaporation des solvants de la réaction non miscibles à l'eau, extraction à l'éther éthylique du résidu ou du mélange réactionnel additionné d'eau, lavage de la phase organique avec une solution aqueuse acide ou basique, puis avec une solution saturée de NaCl jusqu'à neutralité, séchage sur sulfate de sodium et évaporation du solvant à sec.

#### Production de la botryodiplodine.

##### Microbiologie

La souche B.26 a été isolée d'un ensilage de maïs par Monsieur le Professeur PELHATE ; elle a fait l'objet d'une détermination par le Centralbureau Voor Schimmelcultures à Baarn (Pays-Bas).

Avant toute utilisation, chaque souche est clonée au micromanipulateur ce qui permet de vérifier de l'homogénéité génétique du matériel utilisé.

Les spores isolées sont ensemencées en tubes inclinés sur milieu "Potatoes Dextrose Agar" (P.D.A.) DIFCO. Une suspension de spores est réalisée à partir de ces tubes et on ensemence environ  $10^6$  à  $10^8$  spores par fiole de culture. Le milieu de culture utilisé est le suivant pour un litre d'eau permutée : 150 g de saccharose, 20 g d'extrait de levure DIFCO, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ . Ce milieu est filtré sur membrane millipore 0,22  $\mu\text{m}$  ou stérilisé à l'autoclave à  $110^\circ$  pendant 20' en fioles de Roux (150 ml de milieu par fiole). Les fioles sont incubées en cultures stationnaires pendant 8 à 14 jours à  $25^\circ\text{C}$  à l'obscurité. Après cette culture, le milieu de culture est séparé de la masse mycélium par filtration.

#### EXTRACTION, PURIFICATION

Le milieu de culture filtré est extrait au chloroforme dans une ampoule à décanter : l'extrait est concentré à l'évaporateur rotatif à  $50^\circ$ .

L'extraction chloroformique du milieu de culture de 50 fioles permet de récupérer un extrait brut huileux (2,2 g). Cet extrait est chromatographié sur une colonne de silice (200 g). La colonne est éluée par un gradient de  $\text{CH}_3\text{OH}$  dans  $\text{CHCl}_3$ . Un mélange à 2 % en  $\text{CH}_3\text{OH}$  élue 850 mg d'un composé qui est révélé en C.C.M. par pulvérisation à l'acide sulfurique pur et chauffage à  $110^\circ$  pendant 10 minutes (tache rouge-violet).

Cette fraction est soumise à une C.L.H.P. préparative colonne 30 cm x 2 cm ; silice 5-20  $\mu\text{m}$  ; solvant hexane/acétate d'éthyle (30/70, V/V) ; débit 9,9 ml/minute, détection par réfractomètre différentiel. La fraction correspondant à la tache rouge-violet est éluée au bout de 20 minutes (60 mg). La cristallisation dans l'éther éthylique ( $-20^\circ$ ) donne

des cristaux blancs (10 mg)

- Botryodiplodine 1 : cristaux blancs

F 50°-52°C,  $[\alpha]_D - 85,5^\circ$ ,  $t = 0$  et  $-70,5^\circ$ ,

$t = 45$  minutes (C = 0,1,  $\text{CHCl}_3$ ) ; S.M., m/e 126

( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ), 98,87, 85, 83, 71

S.M. haute résolution  $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$  126,0688. (calculé pour  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2$  126,06807)

U.V. ( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda_{\text{max}}$  278 nm ( $\epsilon = 25$ ) ; I.R. 3600, 3400, 1720  $\text{cm}^{-1}$

R.M.N.  $^1\text{H}$  (90 MHz)  $\delta$  ppm 0,80 ; 0,90 ; 1 ; 1,05 (3H) ; 2,2 ; 2,7 (3H) ; 2,6 (1H, m) ; entre 3,3 et 4,4 (4H m complexe) ; 5,2 ( $\sim 1\text{H}$ , s).

#### Relation structure-activité

- Métoxy-2 méthyle-3 acétyle-4 tétrahydrof uranne ?

Dans un ballon de 50 ml sont introduits 100 mg de Botryodiplodine cristallisée, 300 mg d'oxyde d'argent, 700  $\mu\text{l}$  de diméthylformamide et 250  $\mu\text{l}$  d'iodure de méthyle. La réaction se fera à 20°C et sous agitation magnétique pendant une heure.

Le contrôle de la réaction se fait par chromatographie sur couche mince de silice. En fin de réaction, le mélange hétérogène est passé sur une colonne de silice de 20 cm de hauteur et de 1 cm de diamètre. L'élution se fait par un mélange acétate d'éthyle-hexane (30-70)

On récupère une fraction de 115 mg, exempt de DMF, d'oxyde d'argent et d'iodure de méthyle. Cette fraction est purifiée en H.P.L.C. sur une colonne Lichroprep 5.20  $\mu\text{m}$ , en utilisant un mélange acétate d'éthyle hexane 30/70. La détection est faite par indice de réfraction. On récupère une fraction de 70 mg correspondant au produit de méthylation de la Botryodiplodine, contenant un mélange d'isomères dans des proportions de 95-5.

La séparation des isomères a été obtenue en H.P.L.C. par recyclage en utilisant un mélange acétate d'éthyle-hexane (15/85). Seules les caractéristiques du plus abondant ont été reportées

S.M. : m/e 127 ( $M^+ - CH_3 - 0$ ) ; 98 ; 85 ; 83 ; 71

U.V. ( $CHCl_3$ ) :  $\lambda_{max} = 278$  nm ( $\epsilon = 45$ )

I.R. :  $1710$   $cm^{-1}$

R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ ppm 0,86

(d, J = 7,3 Hz) ;

2,19 (s) ; 2,58 (quint, J = 7,3 Hz) ; 3,33 (s) ;

3,57 (q, J = 7,3 Hz) ; 3,93 (t, J = 7,3 Hz) ; 4,29

(t, J = 7,3 Hz) ; 4,66 (s).

R.M.N<sup>13</sup>C ( $CDCl_3$ ),  $\delta$ ppm 12,5 (q) ; 29,5 (q) ; 42,0 (d) ;

53,3 (d) ; 54,0 (q) ; 66,3 (t) ; 110,7 (d) ; 204,3 (s).

- Produits d'addition de 1 sur les modèles.

- Aniline-botryodiplodine 6.

50 mg de Botryodiplodine sont additionnés à 33  $\mu$ l d'aniline dans 1 ml de méthanol anhydre. La réaction est faite à 20°C pendant 1 heure.

En fin de réaction, le méthanol est évaporé sous azote et l'ensemble est repris par du chloroforme et purifié en H.P.L.C. sur une colonne Lichroprep 5-20  $\mu$ m, en utilisant un mélange acétate d'éthyle-Hexane (20/80). La détection est faite à 254 nm.

On récupère une fraction dont on évaporera le solvant délicatement. L'évaporation totale du solvant conduit à la dégradation totale du produit.

S.M. : m/e 201 ( $M^+$ , 85,7) ; 184 (100), 149 (22,5)

I.R. ( $CHCl_3$ ) : 3600, 2900-3000

U.V. ( $CHCl_3$ )  $\lambda_{max}$  254 nm

R.M.N.  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ppm 1,13 (1H, s, -OH) ; 2,15 (3H, d,  $\text{CH}_3$ -12) ; 2,20 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -10) ; 4,65 (2H, s,  $\text{CH}_2$ -11) ; 6,65 (1H, s, CH-5) ; 7,35 (5H, m, CH-7-8-9).

R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ ppm 9,8 (q) ; 10,6 (q) ; 56,2(t) ; 118,3 (s) ; 118,5 (s) ; 118,9 (d) ; 120,2 (s) ; 125,7 (d) ; 126,7 (d) ; 127,5 (s) ; 129,0 (s).

- Diméthyl-2,6 amino-4 pyrimidine - botryodiplodine 7

Dans un ballon de 5ml, on introduit 144 mg (1mmole) de 1, 123 mg (1mmole) de diméthyl-2,6 amino-4 pyrimidine et 1ml de méthanol. L'ensemble est porté à 60°C pendant 48 h sous lente agitation. En fin de réaction, le méthanol est évaporé et le brut réactionnel est passé par une colonne de silice (10 g) éluée par un mélange acétate d'éthyle-méthanol (0 %, 1 %, 2 %, 4 %, 7 %, 10 % en méthanol).

L'élué à 7 % de méthanol permet de recueillir une huile jaune (95 mg) correspondant à 7, que l'on repurifie par C.L.H.P. sur une colonne de silice semi préparative et éluée par de l'acétate d'éthyle.

On recueille une fraction contenant 7 que l'on cristallise dans un mélange éther éthylique-méthanol. On obtient 45 mg de 7. Rendement 17 %.

F : 110 - 112°C

Analyse élémentaire :  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$  ; C : 62,39 ; H : 7,70, N : 16,92 (calc : C : 62,62 ; H : 7,68 ; N : 16,84)

$[\alpha]_D - 133$  (C = 4,15 mg/ml,  $\text{CHCl}_3$ )

S.M. haute résolution : m/e 249, 1494 ( $\text{M}^+$ , Calc : 249,147717)

206 (59,2), 179 (72,9) , 152 (39,0) , 124 (63,9) , 123 (100), 83 (85,4)

I.R. ( $\text{CHCl}_3$ ) : 1710, 3300 - 3500  $\text{cm}^{-1}$ .

U.V. ( $\text{CHCl}_3$ ) :  $\lambda_{\text{max}}$  : 242 nm ( $\epsilon$  : 5130), 268 nm ( $\epsilon$  : 4500)

R.M.N.  $^1\text{H}$  350 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) ,  $\delta$ ppm : 1,21 (d, J = 7,3 Hz) ; 2,24 (s) ; 2,33 (s) ; 2,40 (m) ; 2,50 (s) ; 3,01 (m) ; 3,94 (d.d, J = 8,5 Hz J = 7,3 Hz) ; 4,22 (t, J = 8,5 Hz) ; 5,36 (s large) ; 5,90 (d large) 6,21 (s)

R.M.N.  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) ,  $\delta$ ppm : 17,6 (q) ; 24,0 (q) ; 25,9 (q) ; 29,9 (q) ; 42,1 (d) ; 58,9 (d) ; 67,9 (t) ; 88,9 (d) ; 100,3 (d) ;

162,1 (s) ; 165,8 (s) ; 167,3 (s) ; 207,7 (s)

Amino-2 pyrimidine-botryodiplodine 8

La réaction est effectuée en 48 h à 60°C avec 144 mg (1 mmole) de 1, 95 mg (1mmole) de amino-2 pyrimidine et 1ml de méthanol.

La purification de 8 est menée comme précédemment et permet d'obtenir une huile contenant 8 que l'on cristallise dans un mélange éther éthylique-méthanol. Rendement 13 %.

F : 81-83°C

$[\alpha]_D = -25,1$  (C = 7,65 mg/ml  $\text{CHCl}_3$ )

S.M. haute résolution m/e 221,1163 ( $M^+$ , calc 221,1164) ; 178 (19,3) ; 124(47,5) ; 96 (100) ; 95 (36,8) ; 83 (70,0)

I.R. ( $\text{CHCl}_3$ ) : 1710 ; 3300 - 3500  $\text{cm}^{-1}$ .

U.V. ( $\text{CHCl}_3$ ) :  $\lambda_{\text{max}}$  : 241 nm ( $\epsilon=5800$ ) ; 288 nm.

R.M.N. $^1\text{H}$  350 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{ppm}}$  1,22 (d, J = 7,3 Hz) ; 2,24 (s) ; 2,44 (sext, J = 7,3 Hz) ; 3,01 (q, J = 7,3Hz) ; 3,98 (d.d, J<sub>1</sub> = 7,3 Hz, J<sub>2</sub> = 8,6 Hz) ; 4,21 (t, J = 8,6 Hz) ; 5,59 (d.d, J<sub>1</sub> = 9 Hz, J<sub>2</sub> = 7,3 Hz) ; 6,08 (d large, J = 9 Hz) ; 6,66 (t, J = 4,7 Hz) ; 8,36 (d, J = 4,7 Hz)

R.M.N. $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{\text{ppm}}$  17,0 (q) ; 29,8(s) ; 41,6 (d) ; 59,0(d) ; 67,6 (t) ; 89,1 (d) ; 112,3 (d) ; 158,1 (d) ; 161,7 (s) ; 207,4 (s)

propyl-1 cytosine-botryodiplodine 9

La réaction est effectuée en 48 h à 60°C avec 144 mg (1mmole) de 1 , 153 mg (1mmole) de propyl-1 cytosine 3 et 1 ml deméthanol.

La purification de 9 est menée comme précédemment et permet de récupérer une huile que l'on cristallise dans un mélange éther éthylique-méthanol.

Rendement 12%

F = 132 - 134°C

$[\alpha]_D = -41,6$  (C = 3,15 mg/ml,  $\text{CHCl}_3$ )

S.M. haute résolution m/e 279,1581 ( $M^+$ , calc = 279,15828) ; 236 (23,9) ; 209 (57,2) ; 182 (46,1) ; 154 (62,8) ; 102 (23,1) ; 83 (100)

I.R. ( $\text{CHCl}_3$ ) : 1710 , 3300 - 3500  $\text{cm}^{-1}$ .

U.V. ( $\text{CHCl}_3$ ) :  $\lambda_{\text{max}}$  285 nm, 248 nm

R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (CDCl<sub>3</sub>), δppm 0,92 (t, J = 7,3 Hz)  
 1,19 (d, J = 7,0 Hz) ; 1,76 (m, J = 7,3 Hz) ; 2,25 (s) ;  
 2,46 (m large) ; 2,99 (m) ; 3,75 (m, J = 7,3 Hz) ; 3,95  
 (d.d, J = 5,6 Hz, J = 8,6 Hz) ; 4,18 (t, J = 8,6 Hz) ;  
 5,62 (dd large) ; 6,26 (s large) ; 7,22 (s large) ; 5,89 (s)

R.M.N<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>), δppm 11,0 (q) ; 17,6 (q) ;  
 22,3 (t) ; 29,9 (q) ; 41,8 (d) ; 51,9 (t) ; 58,6 (d) ; 68,0 (t) ;  
 87,7 (d) ; 93,6 (d) ; 156,4 (d) ; 164,0 (s) ; 206,7 (s) ;  
 209,2 (s)

propyl-9 adénine-botryodiplodine 10a 10b

La réaction est effectuée à 60°C en 48 h avec  
 144 mg (1mmole) de 1, 177 mg (1mmole) de propyl-9 adénine 4  
 et 1 ml de méthanol. La purification des produits d'addition  
 est menée comme précédemment et permet de récupérer une  
 huile contenant 10a et 10b. Rendement 21 %.

La séparation de 10a et 10b est réalisée par  
 C.L.H.P. par une colonne de silice semi préparative par  
 recyclage et récupération des fractions les plus pures.

Une cristallisation de 10a dans l'éther éthylique permet  
 de récupérer 17 mg de cristaux blancs. 10b n'a pu être cris-  
 tallisé.

10a : F = 140 - 142°C

Analyse élémentaire : C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> ; C : 59,61 ;  
 H : 7,03 ; N : 22,89 (calc : C : 59,38 ; H : 6,98 ; N : 23,09)

S.M. haute résolution : m/e 303,1694 (M<sup>+</sup>, calc 303,16951)  
 260 (26,9) ; 233 (40,7) ; 218 (20,6) ; 178 (100) ; 177 (71,1) ;  
 135 (31,5) ; 83(53,4).

I.R. (CHCl<sub>3</sub>) : 1710, 3300 - 3500 cm<sup>-1</sup>

U.V. (CHCl<sub>3</sub>) λ<sub>max</sub> 268 nm (ε = 15200)

R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (CDCl<sub>3</sub>), δppm 0,93 (t, J = 7,3 Hz) ;  
 1,23 (d, J = 7,3 Hz) ; 1,90 (sext, J = 7,3 Hz) ; 2,24 (s) ;  
 2,54 (sext, J = 7,3 Hz) ; 3,03 (t.d, J = 7,3 Hz, J = 8,5 Hz) ;  
 4,00 (d.d, J = 7,3 Hz, J = 8,5 Hz) ; 4,14 (t, J = 7,3 Hz) ;  
 4,24 (t, J = 8,5 Hz) ; 5,95 (dd large) ; 6,86 (d large) ; 7,81 (s) ;  
 8,44 (s)

R.M.N<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>), δppm 11,1 (q) ; 17,2 (q) ; 24,3 (t) ;  
29,9 (q) ; 42,2 (d) ; 45,4 (t) ; 59,0 (d) ; 68,0 (t) ;  
88,4 (d) ; 120,2 (s) ; 140,7 (d) ; 149,2 (s) ; 152,8 (d) ;  
154,2 (s) ; 207,7 (s)

10b : S.M. haute résolution m/e 303,1694 (M<sup>+</sup>, calc : 303,16951) ;  
260(29,1) ; 233 (43,0) ; 218(20,1) ; 178(100) ; 177(70,5) ;  
135 (25,1) ; 83 (47,8)

I.R. (CHCl<sub>3</sub>) : 1710, 3300 - 3500 cm<sup>-1</sup>

U.V. (CHCl<sub>3</sub>) : λmax 268 nm (ε = 15100)

R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (CDCl<sub>3</sub>), δppm 0,96 (t, J = 7,5 Hz) ;  
1,12 (d, J = 7,5 Hz) ; 1,93 (sext, J = 7,5 Hz) ; 2,24 (s) ;  
2,68 (quint.d, J = 7,5 Hz, J = 3,5 Hz) ; 3,55 (q, J = 7,5 Hz) ;  
4,10 (d.d, J = 7,5 Hz, J = 9 Hz) ; 4,19 (t, J = 7,5 Hz) ;  
4,26 (d.d, J = 7,5 Hz, J = 9 Hz) ; 5,95 (dd large) ; 6,36 (d large,  
J = 8 Hz) ; 7,80 (s) ; 8,46 (s).

R.M.N<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>), δppm 11,1 (q) ; 12,9 (q) ; 23,4 (t) ;  
30,5 (q) ; 42,4 (d) ; 45,5 (t) ; 54,0 (d) ; 67,0 (t) ; 88,6 (d) ;  
119,8 (s) ; 140,4 (d) ; 149,0 (s) ; 152,9 (d) ; 153,8 (s) ;  
206,5 (s)

Synthèse des modèles propyl-1 cytosine 3, propyl-9 adémine 4

#### Propyl-1 cytosine 3

Dans un ballon de 1 litre; on place 5 g (32,6 mmoles)  
de N-4 acétylcytosine, 800 ml de diméthyl sulfoxyde.  
4,95 g (35,8 mmoles) de carbonate de potassium et 4,01 g  
(32,6 mmoles) de bromo-1 propane sont additionnés (25). La  
solution est laissée 24 h sous agitation, filtrée et évaporée  
sous vide. On récupère une huile jaunâtre et on extrait par le  
chloroforme. La phase chloroformique est séchée, évaporée  
et chromatographiée sur une colonne de silice (300 g) éluée  
par un mélange acétate d'éthyle-méthanol (100 %, 98/2, 95/5,  
90/10). On récupère une fraction correspondant à 3 que l'on  
cristallise deux fois dans l'éthanol. Rendement : 41 %.

F = 255 - 257°C (Litt: 256,5 - 259,5°C)

S.M. : m/e 153 (M<sup>+</sup>), 138, 125, 111, 81.

R.M.N<sup>1</sup>H 60 MHz (CD<sub>3</sub>OD), δppm 0,95 (3H,t) ;  
1,78 (2H, sext) ; 3,78 (2H,m) ; 6,25 (1 H, s large) ; 7,29  
(1H, s large).

- propyl-9 adénine 4

Dans un ballon de 100 ml, on introduit 635 mg (5mmoles) d'adénine; 50 ml de DMF anhydre et 120 mg d'hydrure de sodium. L'ensemble est laissé pendant 2 h à température ambiante. 20 mmoles de bromo-1 propane sont additionnées en 10 min et la solution est laissée 24 h à 20°C (25). En fin de réaction, le DMF est évaporé et une extraction par le chloroforme permet de récupérer 1,1 g de cristaux jaune que l'on recristallise dans l'isopropanol. 4 est obtenu avec un rendement de 91 %.

F = 176-178°C ( Litt= 178-179°C, 175°C)

S.M. = m/e 177 (M<sup>+</sup>) ; 148 ; 135 (100).

R.M.N<sup>1</sup>H 60 MHz (CDCl<sub>3</sub>), δppm 0,95 (t) ; 1,95 (sext) ; 4,05 (t) ; 6,25 (s) ; 7,90 (s) ; 8,40 (s).

- Acétyle botryodiplodine 11

A 90 mg de botryodiplodine, sont additionnés 700 µl d'anhydride acétique et 1ml de pyridine. L'ensemble est laissé pendant 12 h à 20°C. En fin de réaction, une extraction permet de recueillir une fraction de 120 mg contenant 11, qui est purifiée ensuite par C.L.H.P. en utilisant un mélange acétate d'éthyle-nhexane (30-70) sur une colonne de silice. On récupère 100 mg d'une huile que l'on cristallise dans l'éther éthylique.

F = 45 - 47°C

S.M. m/e 126 (M<sup>+</sup>-ACOH) ; 98 ; 87 ; 83 ; 71.

I.R. (KBr) : 1735, 1720 cm<sup>-1</sup>

U.V. (CHCl<sub>3</sub>) : λ<sub>max</sub> 277 nm (ε=29)

R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (CDCl<sub>3</sub>), δppm 0,92 (d, J = 7,5 Hz) ; 2,06 (s) ; 2,22 (s) ; 2,69 (quint, J = 7,5 Hz) ; 3,58 (t.d, J = 7,5 Hz, J = 9 Hz) ; 4,09 (t, J = 9 Hz) ; 4,35 (t, J = 9 Hz) ; 5,98 (s).

R.M.N<sup>13</sup> (CDCl<sub>3</sub>), δppm 12,2 (q) ; 21,5 (q) ; 30,3 (q) ; 41,7 (d) ; 52,8 (d) ; 67,7 (t) ; 104,2 (d) ; 170,3 (s) ; 205,4 (s).

Synthèse des modèles 2'déoxynucléosides-botryodiplodine.

- 2'déoxyadénosine-botryodiplodine 12

Dans un ballon de 5 ml, on introduit 144 mg (1mmole) de 1, 269 mg (1mmole) de 2'déoxyadénosine monohydrate et 1 ml de tampon citrate de sodium 2 M pH 4,5. L'ensemble est porté à 60°C pendant 48 h sous lente agitation. En fin de réaction, le milieu est ramené à pH 7 et lyophilisé. On récupère une huile que l'on chromatographie en C.L.H.P. sur une colonne semi préparative en phase inverse R.P.8. L'élution par un mélange eau-acétonitrile (80-20) permet de recueillir une fraction contenant 12. Cette fraction est lyophilisée et laisse 28 mg d'une poudre blanche de 12. Rendement 9 %.

De nombreux solvants de cristallisation ont été essayés, 12 n'a pu être cristallisé.

S.M : F.A.B Positif m/e 400 (M + Na)<sup>+</sup> (24,8) ; 378 (M + H)<sup>+</sup>, (65,5) ; 262 (67,8) ; 217 (44,6) ; 207 (43,7) ; 185 (56,8) ; 136 (92,8).

I.R(KBr) 3300-3500, 1710 cm<sup>-1</sup>

U.V (H<sub>2</sub>O pH7) λ<sub>max</sub> 211nm (ε = 13550), 267 nm

(ε=11550)

R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (D<sub>2</sub>O) ; δ<sub>ppm</sub> 1,28(d) 2,36(s) ; 2,59(s) ; 2,79(m) ; 3,33(m) ; 3,84(m) ; 4,08(m) ; 4,26(m) ; 4,66(m) ; 5,71(m) ; 6,44(m) ; 8,26(s) ; 8,31(s)

R.M.N<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O), δ<sub>ppm</sub> 16,3 ; 30,1 ; 40,0 ; 42,5 ; 58,9 ; 62,6 ; 68,1 ; 72,2 ; 85,6 ; 88,4 ; 89,3 ; 120,5 ; 140,7 ; 153,1 ; 154,9 ; 147,0

2'déoxycytidine-botryodiplodine 13

La réaction est menée comme précédemment avec 245 mg (1 mmole) de 2'déoxycytidine monohydrate et 1 ml de tampon citrate de sodium 2M pH4,5. 13 est purifié par gel filtration sur une colonne de 50 cm de hauteur et 1 cm de diamètre; garnie d'un gel Biorad P-2 200-400 Mesh. L'élution par un mélange eau-méthanol (90-10) permet de recueillir 18 mg d'une huile contenant 13. Une purification par C.L.H.P. sur une colonne semi préparative en phase inverse R.P.8 et éluée par un mélange eau-acétonitrile (85/15) permet de recueillir 15 mg de 13. Rendement 5 %. De nombreux solvants ont été essayés, 13 n'a pu être cristallisé.

S.M : F.A.B positif m/e 354 ((M + H)<sup>+</sup>, (23,0)

I.R (KBr) : 3000-3500, 1710cm<sup>-1</sup>

U.V (H<sub>2</sub>O, pH7) ; λ<sub>max</sub> 276 nm (ε = 16000) ;

238 nm (ε = 13450)

R.M.N<sup>1</sup>H 350 MHz (D<sub>2</sub>O), δ<sub>ppm</sub> 1,25(d) ; 2,31(s) ; 2,45(m) ; 3,37(m) ; 3,82(m) ; 4,07(m) ; 4,18(m) ; 4,44(m) ; 5,45(m) ; 6,15(d) ; 6,26(m) ; 7,90(m).

R.M.N<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O), δ<sub>ppm</sub> 16,2 ; 34,7 ; 40,9 ; 43,0 ; 59,2 ; 62,8 ; 68,7 ; 72,0 ; 87,8 ; 88,3 ; 88,4 ; 98,4 ; 143,1 ; 158,9 ; 214,6 ; 227,0.

Isolation des adduits sur le DNA.

Dans un ballon de 5 ml, sont introduits 10 mg de DNA de thymus de veau et 1 ml de tampon de citrate de sodium 2M ajusté à pH 4,5. Le DNA est dissous et l'on ajoute 35 mg de botryodiplodine marquée au carbone 14 (activité spécifique 3,3 µci/mmole). L'ensemble est porté à 60°C, sous lente agitation pendant 48 heures. En fin de réaction, le DNA est précipité par l'éthanol absolu froid et centrifugé. Le DNA est ensuite récupéré et lavé 3 fois par 2 ml d'éthanol absolu, par 2 ml de chloroforme et séché sous azote.

Hydrolyse du DNA modifié

Le DNA précipité est dissous dans 10 ml d'une solution Tris HCl 10mM, 0,1 mM EDTA et 4mM MgCl<sub>2</sub>, ajustée à pH 7,02. A cette solution, 1 000 unités de DNase I sont

ajoutées. L'ensemble est laissé 24 heures à 37°C sous lente agitation.

A la solution précédente, on additionne 20 ml d'une solution 30mM d'acétate de sodium ajustée à pH 5,2, 3,4 mg de sulfate de zinc, et 100 unités de nucléase P-1. L'ensemble est laissé 38 heures à 37°C sous lente agitation.

Ensuite, 10 mg de phosphatase alcaline sont ajoutés au milieu d'hydrolyse et la solution est laissée 24 heures à 37°C sous lente agitation. En fin d'hydrolyse, le milieu réactionnel est lyophilisé.

#### Séparation des adduits de la botryodiplodine sur le DNA

L'hydrolysate obtenu est chromatographié sur une colonne de 50 cm de hauteur et de 1 cm de diamètre garnie de gel Biorad P2. L'élution est réalisée par une solution eau-méthanol (90-10). Le débit imposé pour la colonne est de 4 ml/heure et on collecte des fractions de 0,5 ml dans des tubes à hémolyse.

Les fractions radioactives sont regroupées et lyophilisées.

La purification par C.L.H.P. est réalisée sur une colonne analytique R.P. 18 en utilisant le système d'élution suivant : gradient eau-eau/acétonitrile (80/20) en 5 min, élution isocratique eau/acétonitrile (80/20) pendant 15 min et gradient eau/acétonitrile (80/20) - acétonitrile (100) en 5 min. Le débit imposé est de 0,7 ml/min.

Les fractions absorbant à 254 nm sont récupérées lyophilisées et conservées à -80°C pour analyses ultérieures.

BiosynthèseIncorporations- Incorporation d'acétate de sodium [1-<sup>13</sup>C] 90 %

On utilise 10 fioles de culture. L'acétate de sodium [1-<sup>13</sup>C] (500 mg) est additionné stérilement en solution aqueuse aux 6<sup>e</sup>, 7<sup>e</sup>, 8<sup>e</sup>, 9<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> jours de culture; à raison de 10 mg par fiole et par jour. La culture est extraite et la botryodiplodine purifiée comme précédemment.

- Incorporation d'acétate de sodium [2-<sup>13</sup>C] 90 %  
acétate de sodium [1-2<sup>13</sup>C] 90 %

Les incorporations d'acétate de sodium [2-<sup>13</sup>C] et [1-2<sup>13</sup>C] ont été effectuées comme précédemment en utilisant 500 mg d'acétate de sodium [2-<sup>13</sup>C] 90 % et 250 mg d'acétate de sodium [1-2<sup>13</sup>C].

- Incorporation d'acide [2-<sup>14</sup>C], orsellinique  
(5 µCi/mmole)

On utilise 2 fioles de culture. L'acide 2<sup>14</sup>C orsellinique (10<sup>6</sup>cpm) est additionné stérilement en solution sodique aux 9<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> jours de culture; à raison de 2,5.10<sup>5</sup> cpm par jour et par fiole. La culture est extraite et la botryodiplodine purifiée.

- Incorporation d'acide [2-<sup>13</sup>C, carboxyle<sup>13</sup>C]  
orsellinique

On utilise 5 fioles de culture; 20 mg d'acide [2-<sup>13</sup>C, carboxyle<sup>13</sup>C] (90%) sont additionnés stérilement de la même manière que précédemment. La botryodiplodine est extraite et purifiée.

- Incorporation d'acide [3-4<sup>13</sup>C] orsellinique

L'incorporation d'acide [3-4<sup>13</sup>C] orsellinique a été effectuée comme précédemment en utilisant 20 mg d'acide [3-4<sup>13</sup>C] orsellinique.

Synthèse des précurseurs <sup>14</sup>C et <sup>13</sup>C- Acide orsellinique [2-<sup>14</sup>C] 14

Dans un ballon de 200 ml, 300 mg de sodium sont dissous dans 10 ml d'éthanol absolu. 1,10 g (8,5mmole) d'acétoacétate d'éthyle et 42,5 µCi d'acétoacétate d'éthyle [3-<sup>14</sup>C] (8,5 mCi/mmole) sont ajoutés. A cette solution, 970 mg (8,5 mmoles) de crotonate d'éthyle sont additionnés en 5 min. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 1h à 20°C

et porté à reflux pendant 3 h. En fin de réaction, on acidifie le milieu et une extraction de manière habituelle permet de recueillir 1g de 17, que l'on cristallise dans l'éthanol absolu. Rendement 43 %.

F = 70 - 72°C

S.M. : m/e 198 ( $M^+$ , 24,5) ; 178 (26,6) ; 148 (26,0) ; 137 (39,7) ; 128 (75,5) ; 126 (26,7) ; 115 (88,9) ; 69(100).

R.M.N<sup>1</sup>H 60 MHz (DMSO D<sub>6</sub>), δppm 0,95 (t) ; 1,25 (d) ; 2,35 (d) ; 3,50 (m) ; 4,20 (q) ; 5,30 (s) ; 6,60 (s large)

Dibromoorséllinate d'éthyle [2-<sup>14</sup>C] 18

1 g de 17 est dissous dans 10 ml d'acide acétique glacial. A cette solution, on additionne 240 g (15 mmoles) de brome en solution dans 10 ml d'acide acétique. L'ensemble est laissé 12 h à 20°C sous lente agitation. Le précipité 18 formé est filtré. On récupère 1,6 g de cristaux blancs 18. Rendement : 90 %.

F = 143 - 145°C

S.M. : m/e 354 ( $M^+$ , 14,6) ; 352 (6,4) ; 308(100) 306(52,9).

R.M.N<sup>1</sup>H 60 MHz (DMSOD<sub>6</sub>), δppm 1,35 (s) ; 2,35(s) ; 4,40 (q), 10,65 (large).

Acide dibromoorséllinique [2-<sup>14</sup>C] 19

1,6 g de 16 sont dissous dans 10 ml d'acide sulfurique à 98 % et laissés 30 mn à 20°C. L'ensemble est ensuite jeté sur un mélange eau-glace et 16 est filtré. On récupère 1,35 g de 19. Rendement 92 %.

F = 210 - 212°C

S.M : m/e 326 ( $M^+$ , 20,4) ; 308 (30,6) ; 230 (28,9) ; 82 (87,2) ; 80(100)

R.M.N<sup>1</sup>H 60 MHz (DMSOD<sub>6</sub>), δppm 2,40 (s) ; 11,00 (large)

Acide orséllinique [2-<sup>14</sup>C] 14

1,35 g de 19 sont dissous dans 100 ml de soude 2N à 0°C. 1 g d'alliage de nickel-aluminium est ajouté en 20 min et l'ensemble est laissé 2 h à 0°C. Le mélange réactionnel est filtré, acidifié et extrait de manière habituelle. On récupère 530 mg de 14 que l'on cristallise dans un mélange eau-acétone. Rendement 77 %.

F = 173-175°C (Litt: 172-174°C, 176°C)

S.M : m/e 168 ( $M^+$ , 55,1) ; 150 (100) ; 124 (55,6) ;  
122 (59,6) ; 94 (27,9) ; 69 (17,8)

R.M.N<sup>1</sup>H 60MHz (DMSO-d<sub>6</sub>), δppm 2,10 (3H,s) ; 5,55  
(2H,s) ; 9,10 (2H,s)

R.M.N<sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>CN), δppm 24,7 (q) ; 101,4 (d) ;  
105,2 (s) ; 112,6 (d) ; 145,1 (d) ; 163,2 (s).

Activité spécifique 5 $\mu$ Ci/nmole.

Acide orsellinique [2-<sup>13</sup>C, carboxyle<sup>13</sup>C] 15

La synthèse de 15 est réalisée comme pour le composé 14, à partir d'acéto-acétate d'éthyle [1-3<sup>13</sup>C] que l'on prépare à partir d'acétate de sodium [1<sup>13</sup>C] (90 %).

Acétate d'éthyle [1<sup>13</sup>C] 21

3 g d'acétate de sodium [1<sup>13</sup>C] (90 %) et 4,9 g de sulfate d'éthyle sont introduits dans un ballon de 10 ml, muni d'une courte colonne à distiller et d'un réfrigérant descendant. L'ensemble est porté à 180°C et on distille 21 au fur et à mesure de sa synthèse. On récupère 3 g de 21 pur. Rendement 93 %.

Acétoacétate d'éthyle [1-3<sup>13</sup>C] 22

Dans un ballon de 50 ml, on introduit 3 g de 21, 15 ml de toluène et 720 mg d'hydruure de sodium. L'ensemble est porté à reflux pendant 3 h. En fin de réaction, on neutralise par de l'acide acétique à 50 % et on extrait de manière habituelle. On récupère 1 g d'une huile jaune que l'on chromatographie sur une colonne de silice éluée par un mélange acétate d'éthyle-nhexane (30/70). 750 mg de 22 sont obtenus.

Acide orsellinique [2<sup>13</sup>C, carboxyle<sup>13</sup>C] 15

S.M : m/e 170 ( $M^+$ , 48,9) ; 152 (100) ; 123 (75,1) ;  
94 (31) ; 70 (29,1).

R.M.N<sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>CN) : δppm 166,2 ; 176,4.

Acide orsellinique [3-4<sup>13</sup>C] 16

Chlorure d'acétylène [1-2<sup>13</sup>C] 23

Dans un ballon de 10 ml refroidi à -10°C, on introduit 2 g d'acétate de sodium [1-2<sup>13</sup>C] (90 %) et 6 g d'oxy-

chlorure de phosphore. L'ensemble est ramené à 20°C en 30 min et laissé 2 h à température ambiante. Une distillation permet de recueillir 1,5 g de 23 pur. Rendement : 80 %.

Bromo-1 propène magnésium 24

Dans un ballon de 100 ml équipé d'une ampoule à brome et d'un réfrigérant ascendant, on introduit 20 ml de THF anhydre et 730 mg (30 m At/g) de magnésium. On additionne 30 mmoles de bromo-1 propène en 20 min en maintenant une température de 40°C. En fin d'addition, on porte l'ensemble à reflux pendant 1 h et on obtient 24 en solution dans THF.

Chloro-1 propène mercure 25

A la solution précédente, refroidie à 0°C, on ajoute 8,1 g de chlorure de mercure dissous dans 250 ml de THF anhydre. L'ensemble réactionnel est laissé 2 h à 0°C sous vive agitation. En fin de réaction, le THF est évaporé et une extraction à l'éther éthylique permet de recueillir 6,9 g de cristaux blancs de 25 que l'on cristallise dans le méthanol.

F = 78 - 84°C

R.M.N<sup>1</sup>H 60 MHz (DMSO<sub>D6</sub>), δppm 2,0 (3H, m) ;  
5,90 (2H, m) ;

Pentene-3 one-2 [1-2<sup>13</sup>C] 26

2,61 (20 mmoles) de chlorure d'aluminium et 1,5 g (20 mmoles) de 23 sont dissous dans 50 ml de dichlorométhane. La solution est refroidie à -10°C et on ajoute en 5 min, 5,5 g (20 mmoles) de 25 dissous dans 50 ml de dichlorométhane. Le mélange réactionnel est laissé 5 min. sous vive agitation, jeté sur l'eau et extrait au dichlorométhane. On récupère 1,5 g de 26 pur. Rendement 89 %.

Dihydro orsellinate d'éthyle [3-4<sup>13</sup>C] 27

410 mg (18. mmoles) de sodium sont dissous dans 100 ml d'éthanol absolu. A cette solution, sont ajoutés 2,9 g (18 mmoles) de malonate d'éthyle et 1,5 g (18 mmoles) de 26. L'ensemble est laissé 2 h à 20°C et extrait de manière habituelle. On obtient 3,3 g d'une huile que l'on



crystallise dans l'éthanol. Rendement 92 %.

Acide orsellinique [3-4<sup>13</sup>C] 16

La synthèse de 16 est réalisée à partir de 27  
comme décrit pour le composé 14.

S.M : m/e 170 (M<sup>+</sup>, 47,3) ; 152 (96,4) ; 124(100) ;  
96(70) ; 79(10,3) ; 71(43,0)

R.M.N<sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>CN), δppm 101,4 (d, J = 67,1 Hz) ;  
163,2 (d, J = 67,1 Hz).

--=00000000=--

B I B L I O G R A P H I E

- 1- MAYER C.F, Endemic panmyelotoxicosis in the Russian grain belt  
Part 1 Military Surgeon 113, 173 (1953)  
Part 2 Military Surgeon 113, 259 (1953)
- JOFFE A.Z, Alimentary toxic aluika in "Microbial toxin",  
Vol. VII, Kadis S. Ciegler A et Ajls.  
Acad. Press 1971.
- 2- CHAIN E, FLOREY H.W, JENNINGS M.A. Birt. J. Exp. Pathol.  
29, 202, (1942)
- 3- MOREAU S, LABLACHE COMBIER A, BIGUET J, FOULON C, DELFOSSE  
J. Org. Chem. 47,2358, (1982)
- 4- SEN GUPTA R, CHANDRAN R.R, DIVEKAR P.V. Ind. J. Exp. Biol.  
4, 152, (1966)
- 5- MOULÉ Y, DOUCE C, MOREAU S, DARRACQ N. Chem. Biol. Interactions  
37, 155, (1981)
- 6- MOULÉ Y, DECLOITRE F, HAMON G. Env. Mutagenesis 3, 287, (1981)
- 7- DOUCE C. Thèse 3<sup>ème</sup> Cycle.Option Nutrition. Paris 6 (1982)
- 8- MOULÉ Y, RENAULD F, DARRACQ N,DOUCE C. Carcinogenesis  
2, 211, (1982)
- 9- DOUCE C, MOREAU S, DECLOITRE F,MOULÉ Y. Carcinogenesis 3, 587,
- 10- WALKER H.G, GEE M, McCREADY R.M. J.Org.Chem. 27, 2100  
(1962)
- 11- McCURRY P.M, KYO ABE Jr. J. Amer. Chem. Soc. 95, 5825,  
(1973)
- 12- BUNCEL E, LEE C.C, Isotopes in organic chemistry.  
Elsevier North-Holland Inc. Vol 3, 175, (1977)
- 13- BUNCEL E, LEE C.C, Isotopes in organic chemistry.  
Elsevier North-Holland Inc. Vol 3, 186, (1977)
- 14- POTEKHINE A.A, JDANOV S.L. Dokl. Akad. Nauk. SSSR.  
10, 1317, (1977)
- 15- KOCHETKOV N.K, SHIBAEV V.N, KOST A.A. Tet. Lett.  
22, 1993, (1971)
- 16- KRZYZOSIAK W, BIERNAT J, CIESIOLKA J, GORNICKI P,  
WIEWIOROWSKI M. Polish Journal of Chemistry. 53, 243,  
(1979)
- 17- RATNER S, CLARKE H.T. J. Amer. Chem. Soc. 59, 200, (1937)
- 18- CIARANFI E, LORETI L, BORGHETTI A, GUIDOTTI G.G.  
Eur. J. Cancer. 1, 147, (1965)
- 19- KUO K.C, McCUNE A, GEHRKE C.W. Nucl. Acids Res. 8,  
4763, (1980)

- 20- GLACET C. Bull. Soc. Chim. France 575 (1954)  
COUTURIER J.C. Thèse Université Lille (1962)
- 21- HECHT S, CHI-HONG B, HOFFMANN D. Cancer Research.  
38, 215, (1978)  
HECHT S. Chem. Biol. Interactions 30, 57, (1980)  
GILBERT P.J, ROLLMANN B, BIDOCHON R, MERCIER M, PONCELET F.  
Toxicology. 22, 345, (1982)
- 22- MCBRIEN D.C.H, SLATER T.F. Free Radicals, Lipid Peroxidation  
and Cancer. Acad. Press 353, (1982)
- 23- ROSS A.E, LAWSON T.A. Cancer Letters. 15, 329, (1982)
- 24- PATAI S. The Chemistry of Ether Linkage. Interscience Publ.  
314, (1967)
- 25- BROWNE D.T, EISINGER J, LEONARD N.J. J. Amer.Chem. Soc  
26, 7302, (1968)
- 26- FREGRI K, VAN DER PIJL L. Principles of Pollination Ecology.  
Pergamon Press, Oxford 1971
- 27- LUCKNER M. Secondary Metabolism in Plants and Animals.  
Chapman and Hall, 1972.
- 28- CIEGLER A, KADIS S, AJL S. Microbial Toxins. Vol. VI. Fungal  
Toxins. Acad. Press, N.Y, London, 1971
- 29- LONDON R.E, KOLLMAN W.H, MATWIYOFF N.A. J.Amer. Chem. Soc.  
97, 3565
- 30- STEYN P.S, VLEGGAR R, WESSELS P.L. J. Chem. Soc. Perkin I,  
460, (1979)
- 31- MANITTO P. Biosynthesis of Natural Products. Ellis Horwood  
Lim. N.Y, Chichester, Toronto, 1981
- 32- GATENBECK S, MOSBACH K. Acta. Chem. Scand. 13, 1561, (1959)  
MOSBACH K. Acta. Chem. Scand. 14, 457, (1960)
- 33- PETERSON G. Acta. Chem. Scand. 17, 1323, (1963)
- 34- AL-RAWI J.M.A, ELVIDGE J.A, JAIWAL DK, JONES J.R, THOMAS R.  
J. Chem. Soc. Chem. Commun. 220, (1974)
- 35- OLIVIGNI F.J, BULLERMAN L.B. Appl. Environ. Biol.  
35, 435, (1978)
- 36- COX R.E, HOLKER J.S.E. J. Chem. Soc. Perkin I. 2077, (1976)  
STAUTON J, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 928, (1976)
- 37- SANTESSON J. Acta. Chem. Scand. 24, 3373, (1970)

- 38- PAPA D, SCHWEK E, WHITMAN B. J. Org. Chem. 7, 587, (1942)
- 39- HINCKY A.A. Sodium Hydride Dispersions. Metal Hydrides, Inc, July 1964
- 40- YAMAZAKI M, USAMI T, TAKEUCHI T. Nippon Kagaku Kaishi 11, 2135, (1973)
- GUILLEME J, PONS J, DIEZ E, PASCUAL C. Anal. Quimica 93, (1976)
- 41- LAROCK R.C, BERNARDT J.C. Tet. Lett. 36, 3097, (1976)
- 42- NORMANT H. Bull. Soc. Chim. France 728, (1957)
- 43- STAUB H, ZELLER K.H. Houben-Weyl. Methoden der Organischen Chemie 13,

