LITERATURVERZEICHNIS

[1] K. K. KELLEY & C. T. ANDERSON, Bull. Bur. Mines Nr. 384 (1935).
[2] F. ROSSINI *et al.*, Circ. Bur. Stand. Nr. 500 (1952).
[3] J. E. MOOSE & S. W. PARR, J. Amer. chem. Soc. *46*, 2656 (1924).
[4] I. A. MAKOLKIN, Z. fiz. Chim. *16*, 13 (1942).
[5] G. BECKER & W. A. ROTH, Z. physikal. Chem. *167*, 1 (1933).
[6] C. G. MAIER, J. Amer. chem. Soc. *51*, 194 (1929).
[7] R. W. MILLAR, J. Amer. chem. Soc. *50*, 2653 (1928).
[8] F. SAEGUSA, J. chem. Soc. (Japan) *70*, 127 (1949).
[9] P. SCHINDLER, H. ALTHAUS, F. HOFER & W. MINDER (wird demnächst veröffentlicht).
[10] P. SCHINDLER, Helv. *42*, 577 (1959).
[11] P. SCHINDLER, Helv. *42*, 2736 (1959).
[12] G. BIEDERMANN & P. SCHINDLER, Acta chem. scand. *11*, 731 (1957).
[13] A. LEHRMANN & N. SPEAR, J. physic. Chemistry *36*, 2664 (1932).
[14] M. REINERT, Diss. Bern 1965.
[15] A. S. BROWN, J. Amer. chem. Soc. *56*, 646 (1934).
[16] W. FORSLING, S. HIETANEN & L. G. SILLÉN, Acta chem. scand. *6*, 901 (1952).
[17] G. BIEDERMANN & L. G. SILLÉN, Arkiv Kemi *5*, 425 (1953).
[18] W. M. LATIMER, «Oxidation Potentials», Second edition, Prentice-Hall Inc., New York 1952.
[19] M. FRYDMAN, G. NILSSON, T. RENGEMO & L. G. SILLÉN, Acta chem. scand. *12*, 878 (1958); H. S. HARNED & R. DAVIS jun., J. Amer. chem. Soc. *65*, 2030 (1943); R. NÄSÄNEN, Suomen. Kem. *19B*, 90 (1946).

79. Structure chimique des aspergillomarasmines A et B

par **A. L. Haenni, M. Robert, W. Vetter, L. Roux, M. Barbier** et **E. Lederer**

(10 III 65)

En 1927, MORIZAWA [1] montrait la présence dans le muscle d'*Octopus vulgaris* d'un nouvel amino-acide: *l'octopine* (I), dont la structure a été établie par MOORE & WILSON [2]. Depuis, une série de composés présentant le même caractère structural a pu être identifiée. La *lysopine* fut découverte en 1956 par LIORET [3] dans les tissus de «crown gall», et sa structure chimique (II), établie en 1960 par BIEMANN et coll. [4]. DARLING & LARSEN [5] ont isolé et identifié la *saccharopine* (III) à partir de la levure, en 1961. Cette substance a été synthétisée en 1961 par KJAER & LARSEN [6]. Récemment, TRUPIN & BROQUIST [7] ont isolé la saccharopine de *Neurospora crassa*, et ont montré qu'elle était un intermédiaire de la biosynthèse de la lysine. MÉNAGER & MOREL [8] ont identifié l'octopine dans des tissus de «crown gall».

En 1944, CLAUSON-KAAS, PLATTNER & GÄUMANN [9] publiaient les premiers résultats de leurs recherches sur la *lycomarasmine*, substance isolée de *Fusarium lycopersici Sacc.* et provoquant le flétrissement des feuilles de certaines plantes.

En 1963, HARDEGGER et coll. [10] montraient que la lycomarasmine possède la structure IV. La lycomarasmine (IV) se lactamise avec perte d'ammoniaque en une substance V (acide anhydrolycomarasmique, ou «Substance J») dont la synthèse vient d'être décrite par HARDEGGER et coll. [11].

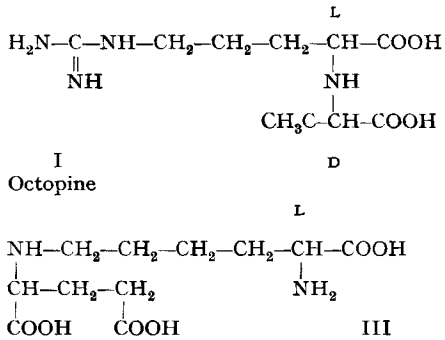
En 1956, la Société d'Etude et d'Applications Biologiques (S.E.A.B., Jouy-en-Josas, S.-et-O.) isolait du milieu de culture d'une souche d'*Aspergillus flavus oryzae* trois substances cristallisées. Nous avons proposé pour ces substances les noms d'as-

pergillomarasmines A et B et d'anhydro-aspergillomarasmine B, ainsi que les structures chimiques respectives VI, VII et V [12] [13]. *L'aspergillomarasmine B (VII) est identique à l'acide lycomarasmique*[1]) préparé par HARDEGGER et coll. [10] à partir de la lycomarasmine. Les aspergillomarasmines A et B sont biologiquement actives dans les essais de flétrissement de feuilles de tomates.

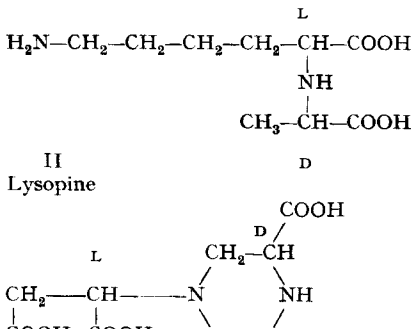
Nous avons récemment décrit la synthèse de l'aspergillomarasmine B racémique (VII) [15], ainsi que celle d'analogues de la lycomarasmine et des aspergillomarasmines (IX, X et XI) [16] [17].

Dans le présent mémoire, nous publions les détails des recherches ayant permis d'établir les structures des aspergillomarasmines, ainsi que les résultats des études de ces composés par spectrométrie de masse.

Aspergillomarasmine A. – L'aspergillomarasmine A (VI) est présente dans les cultures jeunes d'*Aspergillus flavus oryzae* et disparaît dans les cultures âgées, en particulier lorsque le pH devient supérieur à 7.

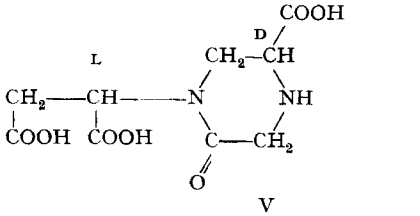


I
Octopine

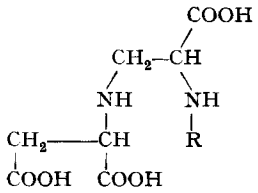


II
Lysopine

III
Saccharopine



V
Anhydro-aspergillomarasmine B

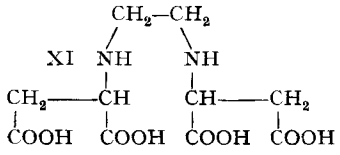


IV R = $-CH_2CONH_2$ Lycomarasmine

VI R = $-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ Aspergillomarasmine A

VII R = $-CH_2-COOH$ Aspergillomarasmine B

VIII R = $-CH(COOH)-CH_2-NH_2$



IX R = H

X R = $-CH(COOH)-CH_2-COOH$

[1]) L'acide lycomarasmique a été décrit pour la première fois par LIECHTI [14] et la structure chimique a été publiée en 1963 [10]. – L'aspergillomarasmine B a été décrite pour la première fois en 1962 [13]. Nous maintenons ce terme pour cette substance, surtout parce qu'elle est un métabolite d'*Aspergillus flavus oryzae* et ne semble pas produite par *Fusarium lycopersici Sacc.*

Tableau I. *Comparaison des propriétés physiques et chimiques des aspergillomarasmines avec celles de la lycomarasmine et de ses dérivés*

	Aspergillo-marasmine A	Aspergillo-marasmine B	Anhydro-aspergillo-marasmine B	Lyco-marasmine [10]	Substance J [10]	Acide lyco-marasmique [10]
F.	225–236° déc.	221–231° déc.	270–292° déc.	212–238° déc.	272–280° déc.	220–230° déc.
$[\alpha]_D^{20°}$ (c = 1, tampon phosphate pH 7)	−48°	−20°	−103°	−48°	−110°	−21°
Acides aminés produits par hydrolyse	acide aspartique, acide diamino-2,3-propionique	acide aspartique, glycine	acide aspartique, glycine	acide aspartique, glycine	acide aspartique, glycine	acide aspartique, glycine
Activité biologique*	++	++++	0	++	0	++++
Rf (pyridine:acide acétique:eau, 50:35:15)	0,10	0,16	0,28	0,19	0,28	0,16

* Voir partie expérimentale.
0 Pas de flétrissement des feuilles de tomates après 48 h.
++ Feuilles flétries après 48 h.
++++ Feuilles flétries en 24 h, totalement sèches en 48 h.

Nous reportons dans le Tableau I les constantes physiques de l'aspergillomarasmine A, ainsi que celles de l'aspergillomarasmine B et de l'anhydro-aspergillomarasmine B. Ces substances se présentent sous forme de grains incolores; elles sont insolubles dans les solvants organiques usuels, solubles en milieu aqueux en pH acide (HCl 2N) ou alcalin (à partir de pH 7). Les recherches de O–CH_3, C–CH_3, N–CH_3, S, P et halogènes, ont donné des résultats négatifs.

Les courbes de titrage acidimétrique de l'aspergillomarasmine A montrent la présence de deux acidités fortes (pK 3,5 et 4,5); on observe deux fonctions aminées de pK 9,5 et 10. Les titrages complexométriques indiquent qu'un micromole de métal est chélaté par 310 μg de substance (voir Fig. 1). Le dosage de groupes aminés libres selon VAN SLYKE montre que la substance possède au moins un groupe NH_2 libre.

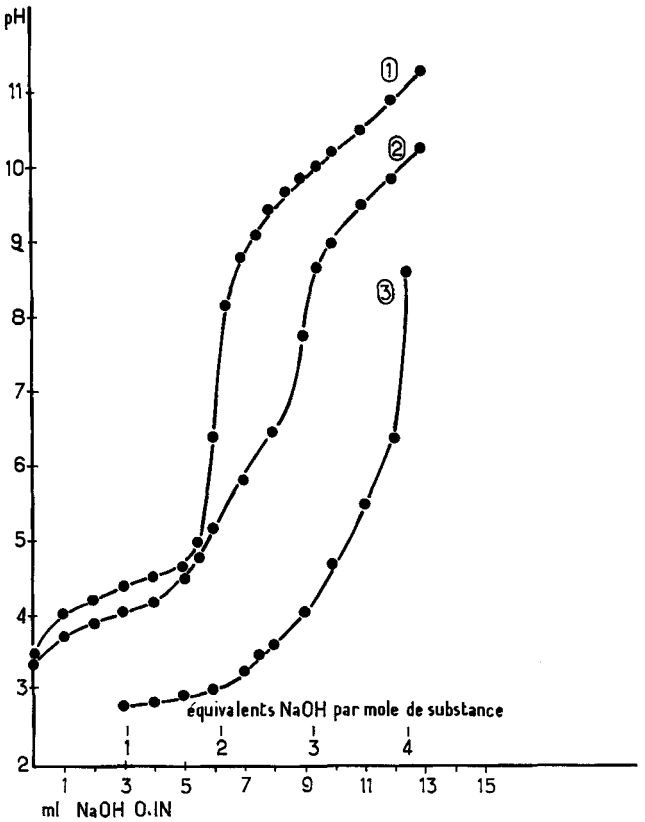


Fig. 1. *Titrage complexométrique de l'aspergillomarasmine A (VI)*
Courbes de titrage de 100 mg d'aspergillomarasmine A:
1° aspergillomarasmine A seule; 2° avec addition de formaldéhyde; 3° avec addition de $CuSO_4$.

Les analyses élémentaires, ainsi que les résultats exposés ci-dessous, sont en accord avec la formule brute $C_{10}H_{17}O_8N_3$. Les spectres infrarouges des aspergillomarasmines ne se prêtent pas à des interprétations convenables (une remarque semblable a déjà été faite pour la lycomarasmine par HARDEGGER et coll. [10]). Il est

Tableau II. *Chromatographie sur papier* (WHATMAN n° 1) *et électrophorèse* (sur papier WHATMAN n° 3 MM) *des aspergillomarasmines et dérivés*

Solvants N°*)	Valeurs de Rf							Electrophorèse pH 6,4; 4 h; 10,5 V/cm Pyridine-acide acétique-eau 100:4:900
	1	2	3	4	5	6	7	
Aspergillomarasmine A	0	0,07	0,10	0		0,06	0,10	+8,1 cm
Anhydro-aspergillomarasmine A	0,04	0,12	0,21			0,08		
Aspergillomarasmine B	0	0,16	0,16	0	0,20	0,06	0,22	+9,7 cm
Anhydro-aspergillomarasmine B	0	0,06	0,28	0	0,30	0,04	0,13	+9,2 cm
Glycine	0,12	0,39				0,33	0,43	
Acide aspartique	0,15	0,15				0,17	0,48	+7,5 cm
Sérine						0,35	0,53	
Isosérine						0,42	0,43	−1,2 cm
Alanine		0,60				0,45		
Acide diamino-2,3-propionique	0,08	0,09				0,32		−5,5 cm

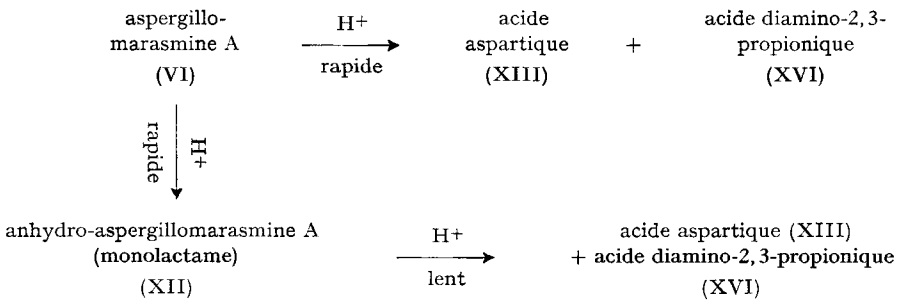
*) Les numéros se rapportent aux systèmes de solvant utilisés et dont les compositions figurent dans la partie expérimentale.

cependant possible d'y noter l'absence des bandes caractéristiques des fonctions OH et CONH.

L'aspergillomarasmine A réagit à la ninhydrine à 60° en donnant une coloration pourpre. Elle se comporte comme une substance homogène au cours des diverses chromatographies et électrophorèses sur papier. Nous reportons dans le Tableau II les valeurs des Rf observées dans différents systèmes de solvants.

Hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine A (v. Tableau III). Une étude cinétique de l'hydrolyse de l'aspergillomarasmine A par HCl 6 N à 120° en tube scellé a conduit aux résultats suivants: dès la première heure on constate, par chromatographie sur papier, la formation de deux substances: de l'acide aspartique (XIII) et une substance se comportant comme un acide dans l'électrophorèse sur papier. Ce produit, appelé d'abord «acide A», a été isolé à l'état amorphe par chromatographie préparative sur papier. Par la suite, nous avons reconnu que «l'acide A» était la monolactame XII de l'aspergillomarasmine A.

Il est possible que l'hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine A procède par deux voies, comme dans le cas de l'aspergillomarasmine B (voir plus loin). En effet, on observe, dès le début de l'hydrolyse, la formation d'acide aspartique, alors qu'après 12 h en tube scellé à 100°, «l'acide A» n'a pas encore totalement disparu.



Si l'on poursuit l'hydrolyse acide pendant plusieurs heures, on observe la disparition progressive de la tache correspondant à l'aspergillomarasmine A, le renforcement de l'intensité des deux taches signalées précédemment et l'apparition d'une troisième tache qui par son Rf et par son déplacement en électrophorèse sur papier, correspond à l'acide diamino-2,3-propionique (XVI)[2]). La chromatographie sur Dowex-50 × 12 selon PIEZ & MORRIS [18] confirme la présence, dans les produits d'hydrolyse acide, de l'acide aspartique, de l'acide diamino-2,3-propionique et de l'«acide A»[3]). On remarque aussi la présence d'ammoniaque. L'acide aspartique et l'acide diamino-2,3-propionique semblent être présents en quantités équimoléculaires.

Une hydrolyse acide plus prolongée provoque la disparition complète des taches correspondant à l'aspergillomarasmine A et à l'«acide A». On observe alors uniquement les taches de l'acide aspartique et de l'acide diamino-2,3-propionique; ces deux amino-acides ont été isolés par chromatographies préparatives sur papier. L'acide

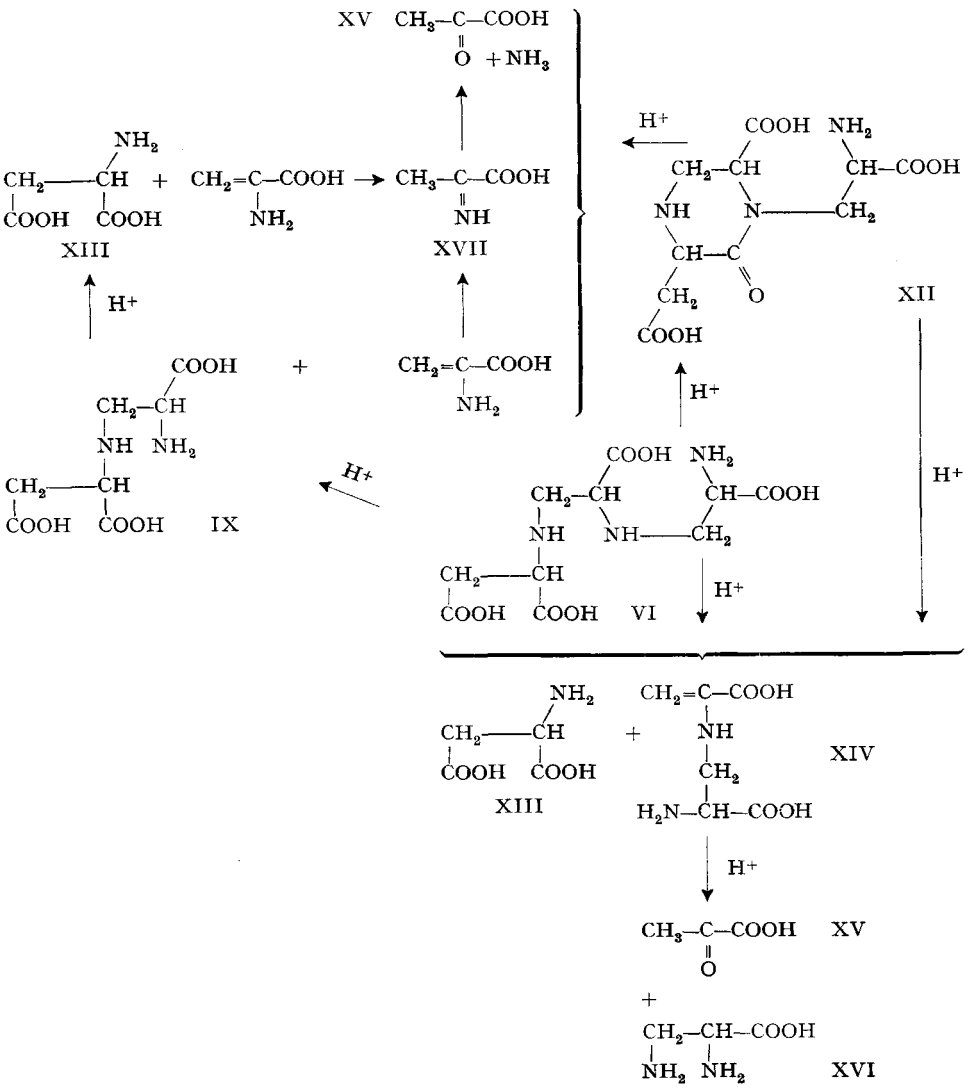
[2]) La réaction colorée de cet amino-acide avec la ninhydrine est peu intense, c'est-à-dire, peu sensible.

[3]) Nous remercions Monsieur P. JOLLÈS d'avoir effectué cette analyse sur un Autoanalyseur TECHNICON.

aspartique est de forme L. L'acide diamino-2,3-propionique est racémique. Il est probable que cette racémisation a eu lieu au cours de l'hydrolyse; la facilité de racémisation de l'acide diamino-2,3-propionique par traitement acide a d'ailleurs déjà été signalée [19].

Les résultats obtenus au cours de cette hydrolyse s'expliquent par un mécanisme de β-élimination [12], représenté sur le Tableau III. Un tel mécanisme a déjà été proposé par HARDEGGER et coll. [10]. Notons que les autres imino-acides décrits ci-dessus (I, II, III), qui n'ont pas de carbonyle en β de l'azote, ne sont pas hydrolysés dans les mêmes conditions.

Tableau III. *Hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine A*



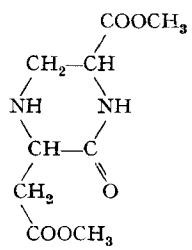
L'ensemble de ces résultats et leur comparaison avec ceux obtenus pour l'aspergillomarasmine B ont permis d'avancer pour l'aspergillomarasmine A les deux hypothèses de structure VI et VIII. Afin de choisir entre ces deux possibilités, nous avons étudié l'action de l'acide nitreux sur le groupe aminé libre de l'aspergillomarasmine A.

Action de l'acide nitreux. La désamination nitreuse de l'aspergillomarasmine A, suivie de l'hydrolyse acide, conduit, non seulement à l'acide aspartique, mais aussi à l'isosérine et non à la sérine. Ce résultat prouve que le groupe aminé en β, de l'acide diamino-2,3-propionique n'est pas libre, contrairement au groupe α-aminé qui est libre (structure VI). Cette structure est d'ailleurs confirmée par les mesures de spectrométrie de masse (voir plus loin).

La désamination nitreuse a été effectuée également sur l'«acide A» (XII, anhydro-aspergillomarasmine A). L'isosérine est toujours observée après hydrolyse, ce qui indique que la lactamisation de l'aspergillomarasmine A ne se fait pas sur le groupe NH_2 libre.

L'oxydation de l'aspergillomarasmine A par l'acide periodique et l'étude de l'hydrogénolyse de son ester benzylique ont permis de confirmer la structure proposée VI.

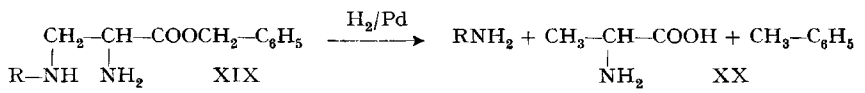
Oxydation par l'acide periodique. L'attaque de la molécule d'aspergillomarasmine A par l'acide periodique conduit à deux produits principaux, que l'on a étudiés par la spectrométrie de masse de leurs esters méthyliques. L'un de ces esters correspond par sa masse (de même d'ailleurs que par ses Rf avant estérification) à l'acide aspartique (XIII); l'autre correspond à l'ester XVIII:



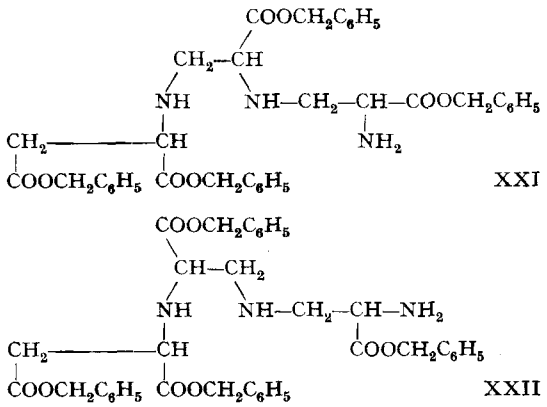
XVIII

Ces résultats sont en accord avec la structure (VI) proposée. Des essais d'isolement des produits d'oxydation periodique par chromatographie sur papier ou en phase gazeuse (esters méthyliques) se sont avérés difficiles et n'ont pas été poursuivis.

Hydrogénolyse des esters benzyliques. Nous avons montré [17] que l'hydrogénation des esters benzyliques d'acides diamino-2,3-propioniques β-substitués (XIX) provoquait l'élimination du groupe $R–NH_2$ avec formation d'α-alanine (XX):



Nous avons appliqué cette réaction à l'aspergillomarasmine A. Après estérification par l'alcool benzylique et hydrogénation en présence de palladium sur charbon, la chromatographie sur papier indique la présence d'acide aspartique et d'α-alanine. L'obtention de ces deux amino-acides est une preuve supplémentaire en faveur de la structure VI; mais elle apporte, en outre, la preuve que le carboxyle central n'est pas situé comme en XXII, mais comme en XXI. En effet, nous n'aurions pas obtenu d'acide aspartique avec la substance XXII.



XXI

XXII

L'α-alanine formée a été isolée par chromatographie préparative sur papier; elle s'est avérée être racémique.

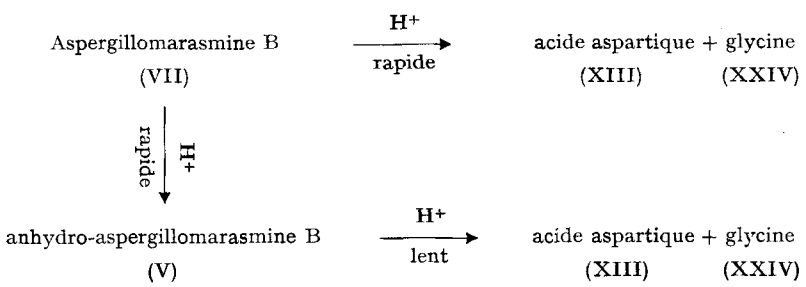
Aspergillomarasmine B (acide lycomarasmique). – Dès que le milieu de culture atteint le pH 7, *Aspergillus flavus oryzae* commence à produire l'aspergillomarasmine B (VII).

Le titrage potentiométrique de cette substance indique la présence de 4 fonctions de pK 2,5; 3,5; 6,6 et 10,2. Le pK 6,6 correspond à un équivalent moléculaire voisin de 280 (voir Fig. 2). Le dosage selon VAN SLYKE ne montre pas de groupe aminé libre.

Les analyses élémentaires conduisent à la formule brute $C_9H_{14}O_8N_2$.

L'aspergillomarasmine B ne réagit pas avec la ninhydrine à froid, mais conduit à une coloration pourpre vers 100°. L'aspergillomarasmine B se comporte comme une substance homogène au cours des chromatographies et électrophorèses sur papier (voir Tableau II).

Hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine B L'étude de l'hydrolyse par HCl 6N en tube scellé à 110° montre l'apparition tout d'abord d'acide aspartique (XIII), de glycine (XXIV) et d'une nouvelle substance: l'anhydro-aspergillomarasmine B (V). Une étude cinétique a montré que l'acide aspartique et la glycine étaient libérés en même temps et en quantités équimoléculaires. L'acide aspartique a pu être isolé par chromatographie sur colonne d'Amberlite IR 45 AG: il s'agit de l'acide L-aspartique. L'acide aspartique et la glycine apparaissent dès le début de l'hydrolyse (pH inférieur à 2,6), alors que la disparition de l'anhydro-aspergillomarasmine B n'est pas totale après 48 h. Il est donc possible qu'il existe deux mécanismes d'hydrolyse:



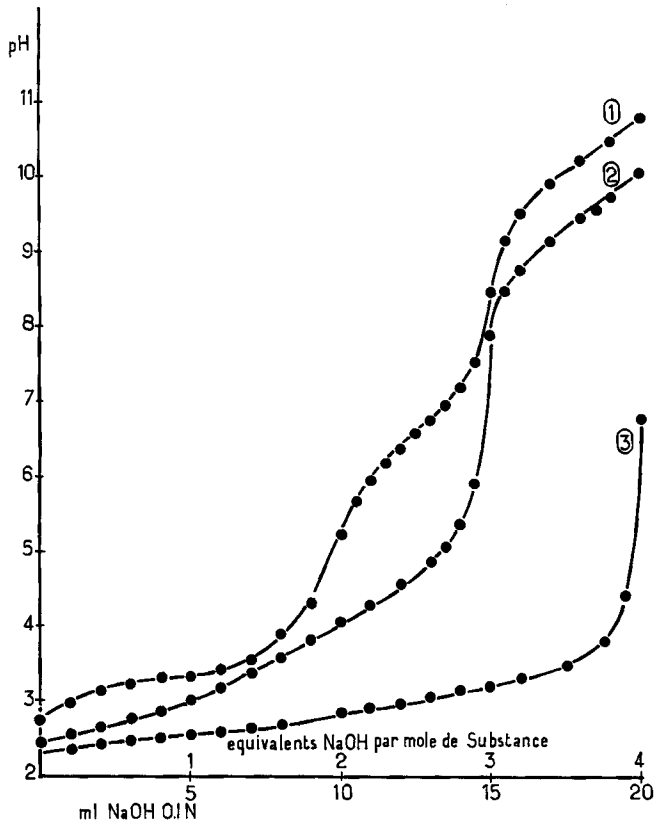
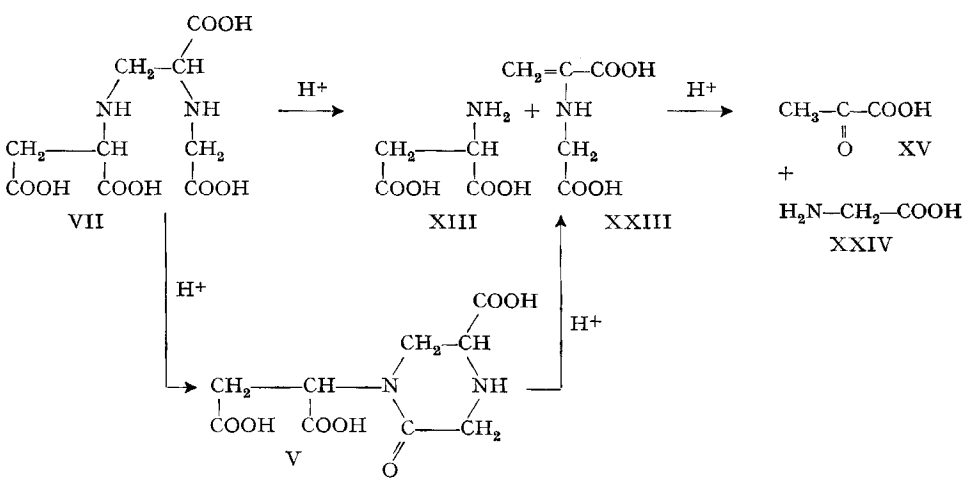


Fig. 2. *Titrage complexométrique de l'aspergillomarasmine B (VII)*

Courbes de titrage de 140 mg d'aspergillomarasmine B:
1° aspergillomarasmine B seule; 2° avec addition de formaldéhyde; 3° avec addition de $CuSO_4$.



L'identification de l'acide aspartique et de la glycine définit la nature de six des neuf atomes de carbone de la molécule, celle de six oxygènes sur huit et celle des deux azotes.

L'ester méthylique de l'aspergillomarasmine B a été préparé par action de courte durée d'une solution éthérée de diazométhane; l'analyse élémentaire correspond à la formule brute $C_{13}H_{22}O_8N_2$. Le dosage de O–CH_3 y décèle 4 fonctions ester. Les deux oxygènes manquants après le bilan ci-dessus appartiennent donc à un carboxyle (situé dans la partie centrale de la molécule).

La spectrométrie de masse de cet ester méthylique conduit à la masse 302 (344 pour l'ester éthylique). L'ensemble de ces résultats et ceux de la spectrométrie de masse exposés plus loin s'accordent avec la structure proposée VII. Les résultats de l'hydrolyse acide s'expliquent par un mécanisme de β-élimination semblable à celui précédemment exposé pour l'aspergillomarasmine A (voir aussi au sujet de ce mécanisme [10] et [12]).

Anhydro-aspergillomarasmine B. – L'anhydro-aspergillomarasmine B (V) apparaît dans les cultures âgées d'*Aspergillus flavus oryzae*, en particulier dès que le pH de la culture atteint 8.

Le titrage potentiométrique de cette substance indique trois pK, de valeurs 3,7; 4,5 et 6,8; la masse moléculaire minimale calculée est de 260. Les résultats des analyses élémentaires conduisent à la formule brute $C_9H_{12}O_7N_2$.

L'anhydro-aspergillomarasmine B donne une tache jaune avec la ninhydrine à 100°; les Rf observés au cours des chromatographies et électrophorèses sur papier sont identiques à ceux du produit de transformation en pH acide de l'aspergillomarasmine B (voir Tableau II).

*L'étude de l'hydrolyse par HCl 6*N *à 120°*, en tube scellé, montre que le produit libère progressivement des quantités équimoléculaires d'acide aspartique et de glycine.

L'ester méthylique préparé par action brève d'une solution éthérée de diazométhane possède, selon l'analyse élémentaire, la formule brute $C_{12}H_{18}O_7N_2$; les dosages de O–CH_3 indiquent la présence de trois fonctions esters. Le spectre UV. de cet ester, mesuré dans l'hexane, présente bien à 190 nm la bande d'absorption caractéristique de la fonction amide ($\varepsilon = 10000$).

L'ensemble de ces résultats, de même que ceux de la spectrométrie de masse, sont en accord avec la structure proposée pour la lactame V.

Le spectre de RMN. de l'anhydro-aspergillomarasmine B, dissoute dans l'eau lourde (avec NaOH), est identique au spectre de RMN. publié par HARDEGGER et coll. [10] pour la «substance J» obtenue par lactamisation de la lycomarasmine (IV). (Par ailleurs, toutes les propriétés de cette «substance J» sont identiques à celles de l'anhydro-aspergillomarasmine B, voir Tableau I.)

Spectrométrie de masse. – Les esters méthyliques et éthyliques des aspergillomarasmines ont été préparés selon la technique de BIEMANN [20]; les spectres ont été mesurés sur un appareil Atlas CH4; température de la source d'ions: 260°; tension d'ionisation: 70 eV; température du réservoir: 150° [4]).

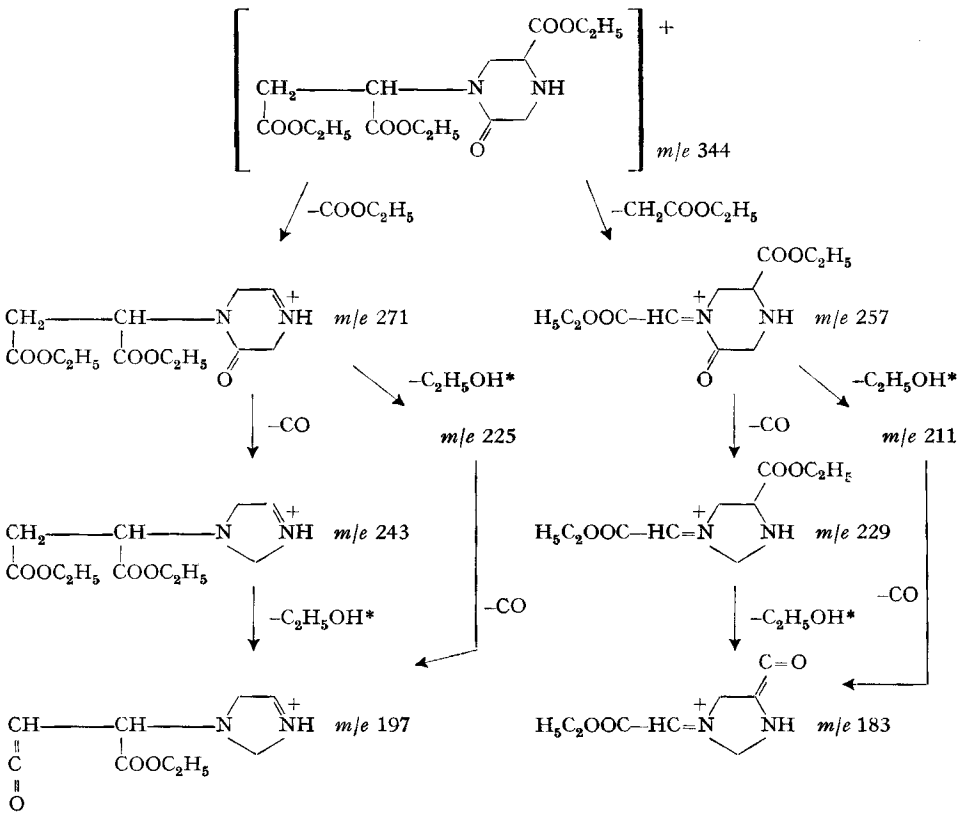
Dans ce qui suit, nous allons d'abord étudier la spectrométrie de masse de l'asper-

[4]) Nous remercions Madame W. VETTER et le Professeur K. BIEMANN de leur aide dans l'interprétation des spectres. Quelques-uns des spectres ont été déterminés au M. I. T., Boston, Mass. sur un appareil CEC 21-103 dans les conditions décrites ci-dessus.

gillomarasmine B (acide lycomarasmique), étant donné que le spectre de cette substance a donné les renseignements les plus précis, permettant l'établissement de la structure; l'aspergillomarasmine A sera étudiée ensuite.

Aspergillomarasmine B et anhydro-aspergillomarasmine B (Fig. 3 et Tableau IV). Par suite d'une légère décomposition thermique des esters étudiés, les spectres de masse ne sont pas reproductibles avec la précision habituelle, de sorte qu'une comparaison exacte des spectres de deux substances est difficile. Avec cette restriction, on peut admettre que les spectres des esters de l'aspergillomarasmine B et de l'anhydro-aspergillomarasmine B sont identiques.

Tableau IV. *Principales fragmentations de l'ester éthylique de l'aspergillomarasmine B en spectrométrie de masse*



*) Une seule des deux possibilités de perte de ce groupe est représentée

On observe l'ion moléculaire attendu à *m/e* 302 pour l'ester méthylique, et 344 pour l'ester éthylique. Ces masses indiquent que les composés correspondent bien aux esters de l'anhydro-aspergillomarasmine B (V). La différence des masses moléculaires 344 – 302 = 42 est égale, en effet, à la différence entre la masse d'un tri-ester éthylique et celle d'un tri-ester méthylique.

Comme on pouvait s'y attendre, les esters d'un échantillon de lycomarasmine (IV) (aimablement fourni par le Professeur E. HARDEGGER, E.T.H., Zurich) ont montré le

même spectre de masse que les esters de l'aspergillomarasmine B ou de l'anhydro-aspergillomarasmine B.

La fragmentation de ces composés est en accord avec la structure proposée pour l'anhydro-aspergillomarasmine B.

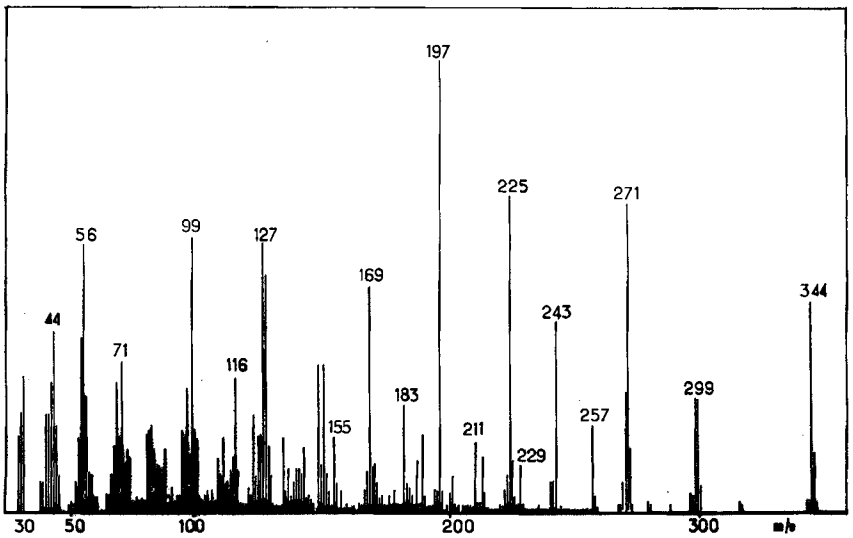


Fig. 3. *Spectre de masse de l'ester éthylique de l'aspergillomarasmine B*

Le spectre de l'ester éthylique montre une paire de pics à *m/e* 298 et *m/e* 299, apparemment dus à la perte de C_2H_5OH (pic métastable trouvé à 258,4, calc. 258,2) et de C_2H_5O, respectivement, à partir d'un groupe ester.

Le pic intense à *m/e* 271 représente la perte d'un des deux groupements $-CO_2C_2H_5$ fixés sur un atome de carbone portant un atome d'azote et correspond aux «pics d'amines» qui sont généralement intenses pour des dérivés d'acides aminés [20] [21].

Le pic à *m/e* 270 (*M*-74) est dû soit à la perte d'un groupe $-CO_2C_2H_5$ (avec un H supplémentaire provenant de l'ion moléculaire) ou à la perte de CO du fragment à *m/e* 298. Cependant, aucune de ces deux fragmentations ne se trouve dans les spectres de masse des esters des acides aminés habituels.

Le pic à *m/e* 257 résulte de la perte de $-CH_2CO_2C_2H_5$ à partir de l'ion moléculaire, en analogie avec le «pic ester» dans l'ester diéthylique de l'acide aspartique [20].

Deux séries parallèles de pics peuvent être dérivées des fragments à *m/e* 271 et 257, par perte de CO et/ou de C_2H_5OH: à partir de *m/e* 271 est dérivé le pic à *m/e* 243 par expulsion de CO (probablement à partir de la fonction lactame); le pic à *m/e* 225, par élimination de C_2H_5OH (pic métastable trouvé à 187,0, calculé: 186,8), et le pic à *m/e* 197, par perte de CO et C_2H_5OH (ou $-COOC_2H_5 + H$).

En partant de *m/e* 257, les pics à *m/e* 229, 211 (pic métastable trouvé à 273,0; calc. 273,2) et 183 peuvent être expliqués de la même façon.

Les pics relativement intenses à *m/e* 169 et 155 sont probablement aussi des membres de ces deux séries, formés par la perte (formellement au moins) de 2 CO et C_2H_5OH à partir des pics à *m/e* 271 et 257, respectivement.

Nous n'avons pas essayé d'expliquer les pics dans la région inférieure du spectre, car leur interprétation semblait trop aléatoire, sans haute résolution, ou sans marquage isotopique.

Aucun pic n'a pu être décelé permettant la détermination de la position du carboxyle de la partie centrale de la molécule.

Les pics non interprétés dans la partie des masses élevées sont le plus souvent de faible intensité et sont probablement dus à des impuretés.

Le spectre de l'ester méthylique de l'aspergillomarasmine B contient tous les pics mentionnés ci-dessus, déplacés vers les masses inférieures théoriquement prévisibles, confirmant ainsi l'interprétation donnée. Ceci est particulièrement important en ce qui concerne la perte de 28 unités de masse qui, dans l'ester éthylique, aurait pu être due à la perte de CO ou de C_2H_4 ; puisque cette même perte est observée dans le spectre de l'ester méthylique, on peut conclure qu'il s'agit essentiellement de CO.

Aspergillomarasmine A et anhydro-aspergillomarasmine A (Fig. 4 et Tableau V). Les spectres de masse des esters éthyliques de l'aspergillomarasmine A et de l'anhydro-aspergillomarasmine A sont identiques (en tenant compte de la difficulté de reproduire les spectres de façon rigoureuse – voir ci-dessus). Le pic moléculaire est à *m/e* 327, c'est-à-dire à *M*-46 pour le triester éthylique de l'anhydro-aspergillomarasmine A et à 2×46 unités de masse de moins que le poids moléculaire du tétra-ester éthylique de l'aspergillomarasmine A. Ceci suggère que pendant la préparation les esters ont perdu respectivement une et deux molécules d'éthanol. Le spectre de l'éthanol (pic de base à *m/e* 31) est en fait présent, superposé à celui des deux substances.

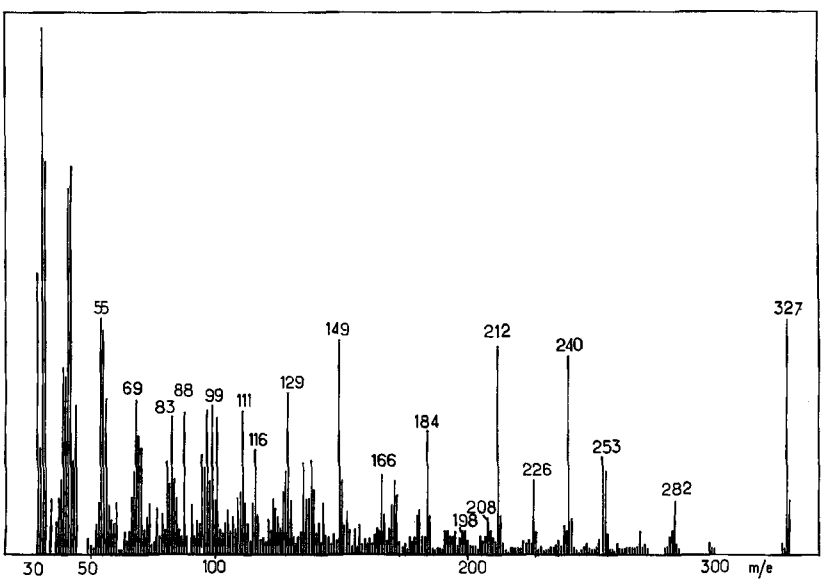
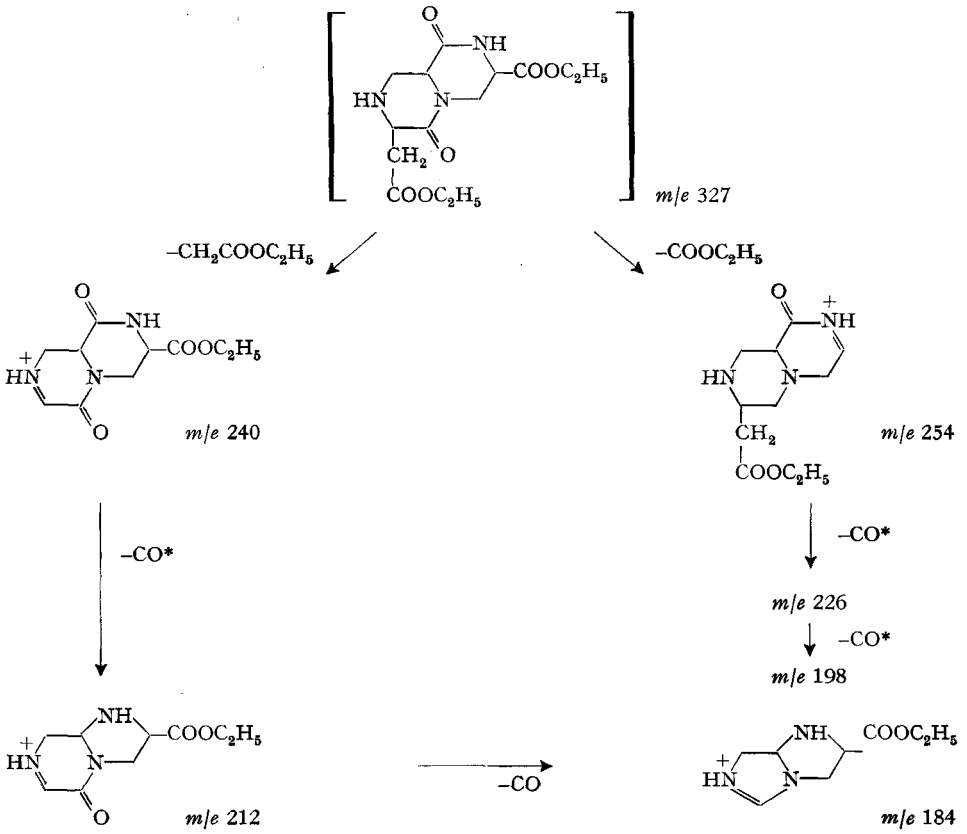


Fig. 4. *Spectre de masse de l'ester éthylique de l'aspergillomarasmine A*

Le fait que le spectre observé est vraiment celui de l'éthanol superposé à celui de la substance et n'est pas dû à une fragmentation particulière de l'ester lui-même, a été prouvé par l'étude des spectres des esters éthyliques d'acides aminés banaux, [20] ainsi

Tableau V. *Principales fragmentations de l'ester éthylique de l'aspergillomarasmine A en spectrométrie de masse*



* Une des deux possibilités de perte de ce groupe est représentée

que de ceux de l'anhydrolycomarasmine B et de l'acide éthylène-N,N'-diaspartique (XI) [16]. Dans tous ces spectres les pics en question (à *m/e* 31, 45 et 46) sont très faibles ou absents. Ainsi, la présence d'éthanol dans les échantillons d'aspergillomarasmine A étudiés est certaine: nous n'avons pas essayé d'en déterminer la quantité.

Ces observations s'expliquent le mieux par l'hypothèse que le tétraester de départ subit une double lactamisation (voir Tableau V).

En analogie avec le cas de l'ester de l'aspergillomarasmine B, de l'ester de l'acide N,N'-éthylène-diaspartique [16] et de l'ester éthylique de l'ornithine, on peut penser qu'une lactame est formée au cours de la libération de la base, pendant la préparation de l'ester libre. Après cette lactamisation, on n'observe pas d'éthanol dans le spectre de masse, puisque l'éthanol est évaporé avec le solvant (CH_2Cl_2) avant l'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse.

La deuxième lactamisation doit cependant, au moins en partie, avoir lieu pendant ou après l'évaporation de l'échantillon dans le système d'introduction, seule explication valable pour la présence du spectre de l'éthanol.

Le mode de fragmentation de l'amino-ester est en accord avec l'hypothèse d'une bilactame comme molécule-mère. La fragmentation suit les mêmes lignes que celle de l'anhydro-aspergillomarasmine B, mais elle diffère considérablement dans les détails. Le premier groupe de pics en dessous de l'ion moléculaire est à *m/e* 282, 281 et 280. Les deux premiers sont dus aux pertes de C_2H_5O et C_2H_5OH, respectivement, comme il fallait s'y attendre, mais le troisième n'a pas pu être interprété.

Le pic à *m/e* 254 est formé par la perte du groupe $-CO_2C_2H_5$ à partir de la moitié diaminopropionique; le pic à *m/e* 253 est formé par la perte d'un groupe $-CO_2C_2H_5$ avec un atome d'hydrogène supplémentaire; le pic à *m/e* 240 est dû à la perte de $-CH_2CO_2C_2H_5$ à partir de la partie aspartique. Dans le pic à *m/e* 240 la charge est stabilisée par la fonction amine, tandis que dans le pic à *m/e* 254 l'azote avoisinant est acylé et de ce fait beaucoup moins apte à stabiliser la charge positive. Cette différence de stabilisation de charge peut être responsable de la grande différence d'intensité des pics, différence qui devient même encore plus prononcée au cours des deux fragmentations suivantes.

A partir de *m/e* 240 peuvent être dérivés: *m/e* 212 par perte de CO, *m/e* 184 par perte de 2 CO (probablement un CO de chacun des noyaux lactames) et finalement *m/e* 166 par perte de CO et C_2H_5OH.

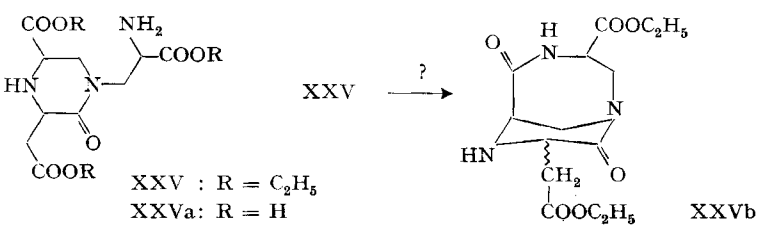
En partant de *m/e* 254 on trouve seulement des pics peu intenses: *m/e* 226 (–CO), *m/e* 208 ($-C_2H_5OH$) et *m/e* 198 (–2 CO).

Encore une fois, nous n'avons pas essayé d'interpréter les pics dans la partie inférieure du spectre (sauf pour *m/e* 116, pic d'amine [20] [21] dérivée probablement d'une certaine quantité d'ester diéthylique de l'acide aspartique formé au cours de la préparation de l'échantillon). La plupart des pics dans la partie supérieure du spectre non mentionnés ci-dessus, notamment celui à *m/e* 280, peuvent être attribués à des impuretés ou à des produits de décomposition thermique.

Le spectre de l'ester méthylique confirme les interprétations données ci-dessus (en particulier de nouveau la perte de deux CO, voir ci-dessus).

Les fragmentations étudiées ne permettent pas de distinguer entre les deux formules VI et XXVa, qui diffèrent par la position du carboxyle de la partie centrale.

La facilité de la lactamisation observée semble rendre la formule XXV peu probable, en particulier si l'on tient compte, du fait que les esters éthyliques de la lysine [20] et de la lysopine [4], qui – tous les deux – pourraient former une lactame à 7 chaînons, ne se lactamisent pas dans ces conditions.



XXV : R = C_2H_5
XXVa: R = H

XXVb

Configuration de l'aspergillomarasmine A. – Ayant ainsi établi les structures des aspergillomarasmines et de leurs dérivés, nous avons voulu préciser leur stéréochimie. L'aspergillomarasmine A contient trois centres asymétriques, l'aspergillomarasmine B

(acide lycomarasmique) en a deux. L'un de ces centres, celui qui se retrouve après hydrolyse acide dans l'acide aspartique, est de configuration L (*S*).

La configuration L de ce «fragment aspartique» était déjà connue pour l'acide lycomarasmique [10] (identique à l'aspergillomarasmine B (VII)).

Il restait encore à déterminer la configuration des deux autres centres d'asymétrie pour l'aspergillomarasmine A et d'un des centres pour l'aspergillomarasmine B.

L'acide diamino-2,3-propionique obtenu par hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine A est dépourvu de pouvoir rotatoire; il semble donc qu'il a été racémisé au cours de l'hydrolyse.

D'autre part, l'hydrogénolyse de l'ester benzylique de l'aspergillomarasmine A (voir précédemment) donne de l'alanine; toutefois, son pouvoir rotatoire étant nul, cette méthode s'est révélée inutilisable pour la détermination des centres d'asymétrie de l'aspergillomarasmine A.

Les méthodes chimiques ne nous ayant pas permis de résoudre ce problème, nous avons fait appel à l'oxydation par une amino-acide-oxydase.

Le présent travail permet d'attribuer la configuration D à l'un et probablement aux deux centres d'asymétrie encore indéterminés de l'aspergillomarasmine A, et par analogie au centre asymétrique encore indéterminé de l'aspergillomarasmine B (= acide lycomarasmique).

Oxydation de l'aspergillomarasmine A par une D-*amino-acide-oxydase.* Après plusieurs essais infructueux d'oxydation, mettant en œuvre des D-amino-acide-oxydases de rein de mouton[5]) et de *Trigonopsis variabilis*, ainsi que de la L-amino-acide-oxydase de *Crotalus adamanteus*[5]), nous nous sommes adressés à un enzyme

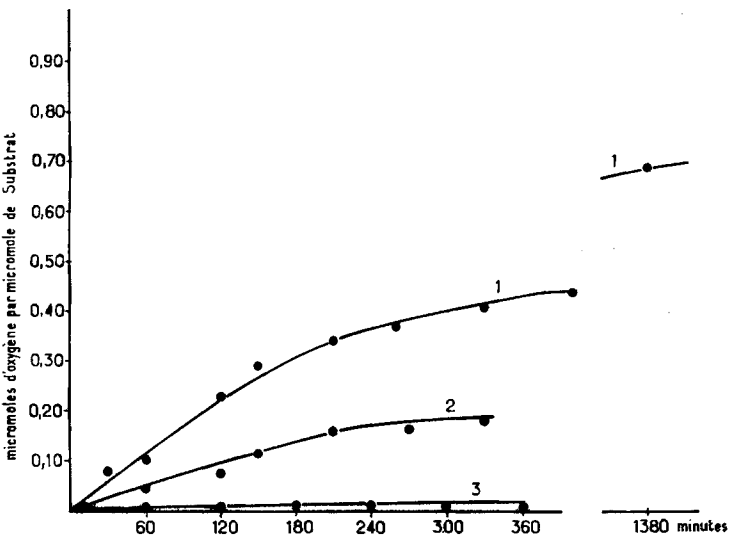


Fig. 5. *Oxydation enzymatique de l'aspergillomarasmine A par une D-amino-acide-oxydase* d'Aspergillus ustus

Courbe 1: aspergillomarasmine A; courbe 2: acide D-aspartique; courbe 3: acide L-aspartique.

[5]) Nous remercions le Dr Miyoshi Ikawa (Université de Californie, Berkeley, U.S.A.), qui a effectué ces essais.

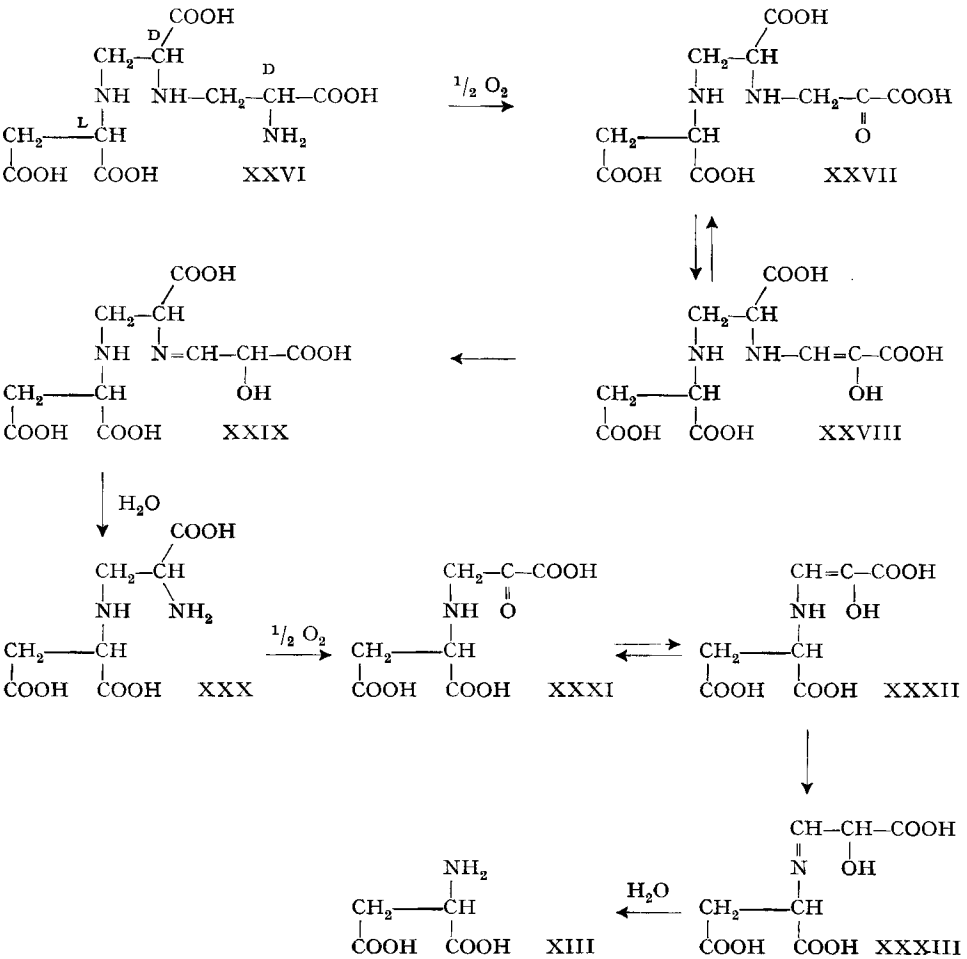
produit par un *Aspergillus*, et avons préparé un extrait contenant la D-amino-acide-oxydase d'*Aspergillus ustus* décrite par SAKAGUCHI et coll. [22].

L'extrait brut est utilisé en fiole de WARBURG pour l'étude de l'oxydation de l'aspergillomarasmine A; des quantités équimoléculaires d'aspergillomarasmine A et des acides D- et L-aspartique sont incubées. La Figure 5 montre que, comparée à l'acide D-aspartique, l'aspergillomarasmine A (XXVI) consomme deux fois plus d'oxygène.

L'étude des produits d'oxydation, par chromatographie sur papier, nous a montré la présence d'acide aspartique.

La consommation d'oxygène double de celle de l'acide D-aspartique et la formation d'acide aspartique peuvent être expliquées de la manière suivante (Tableau VI): une première oxydation conduit au céto-acide XXVII, qui s'énolise en XXVIII; l'énol s'isomérise en base de SCHIFF XXIX, dont l'hydrolyse conduit à XXX; cet amino-acide est oxydé par l'enzyme avec une nouvelle consommation d'oxygène en céto-acide

Tableau VI. *Oxydation enzymatique de l'aspergillomarasmine A*



XXXI; l'énolisation en XXXII et l'isomérisation de l'énol en base de SCHIFF XXXIII, ainsi que l'hydrolyse de cette dernière, donnent finalement l'acide aspartique (XIII).

Conclusion. L'aspergillomarasmine A ayant été oxydée par une D-amino-oxydase avec libération d'acide L-aspartique, on peut attribuer à cette substance la stéréochimie LDD (*SRR*) (XXVI).

Il est probable que l'aspergillomarasmine B (acide lycomarasmique) (VII) a la même stéréochimie, d'autant plus qu'il semble que dans les milieux de cultures d'*Aspergillus flavus oryzae* l'aspergillomarasmine B soit formée à partir de l'aspergillomarasmine A (peut-être par une oxydation partielle conduisant au céto-acide XXVII qui peut se décarboxyler).

L'aspergillomarasmine B (VII) étant identique à l'acide lycomarasmique, la lycomarasmine (IV) aurait également la configuration LD.

Partie expérimentale

Chromatographies sur papier (voir tableau II). Elles ont été effectuées en chromatographies descendantes sur papier WHATMAN n° 1. Solvants utilisés (*v/v*):

n° 1. butanol-1: acide acétique: eau (4:1:5), phase supérieure.
n° 2. phénol: eau (8:2), en présence de KCN.
n° 3. pyridine: acide acétique: eau (10:7:3).
n° 4. butanol-1: pyridine: acide chlorhydrique 0,1N (5:3:2).
n° 5. alcool butylique tertiaire: acide formique: eau (69,5:1:29,5).
n° 6. isopropanol: ammoniaque: eau (70:10:20).
n° 7. pyridine: eau (97,5:52,5).

Révélation par une solution de ninhydrine à 0,2% dans le butanol-1.

Electrophorèses sur papier. Elles ont été effectuées sur papier WHATMAN 3MM dans le système pyridine: acide acétique: eau (100:4:900; pH 6,4), pendant 4 h et à 10,5 V/cm.

Hydrolyses acides. A moins d'une indication contraire, les hydrolyses acides se font en tube scellé, en présence de 1 ml de HCl 6N par mg de substance, à 120°, pendant 16 h. On évapore l'hydrolysat et on le reprend plusieurs fois par 1 ml d'eau pour éliminer HCl.

Dosages des produits d'hydrolyse. Après hydrolyse acide de 40 h à 110° dans HCl 6N de l'aspergillomarasmine A ou de l'anhydro-aspergillomarasmine A, on élimine HCl par évaporation répétées en présence d'eau et chromatographie sur Dowex 50-X 12 selon PIEZ & MORRIS [18].

Après hydrolyse de 3 jours à 100° dans HCl 6N de l'aspergillomarasmine B, l'acide aspartique et la glycine ont été chromatographiés sur Amberlite C. G. 120 et dosés selon MOORE, SPACKMAN & STEIN [23].

Isolement des aspergillomarasmines. On cultive la souche d'*Aspergillus flavus oryzae* dans des boîtes de ROUX contenant 250 ml de milieu de culture «CZAPEK DOX» modifié, pendant 10 jours à 30°. Le milieu de culture contient 40 g de glucose, 3 g de $NaNO_3$, 1 g de KH_2PO_4, 0,5 g de $MgSO_4$, 0,5 g de KCl, 10 mg de $FeSO_4$ et 1 mg de $ZnSO_4$ par litre d'eau distillée.

On élimine l'*Aspergillus* par filtration et on amène le jus de culture à pH 9,5 par NH_4OH. Par litre de milieu de culture on ajoute 20 ml de $CaCl_2$ 1M et 10 g de $Ca_3(PO_4)_2$, puis lentement 3 volumes d'acétone. On laisse reposer plusieurs heures à 0°, puis on centrifuge. Le précipité est remis en suspension dans 15 ml d'eau, la liqueur ajustée comme précédemment à pH 9,5 est centrifugée, et le surnageant, recueilli. Cette opération est effectuée trois fois et les surnageants sont réunis.

On ajoute 5 ml de $CaCl_2$ par 30 ml de surnageant, en maintenant à pH 9,5; on précipite par 2,5 volumes d'acétone et on centrifuge. Le précipité est séché, puis repris dans 15 ml d'eau. On élimine les fractions insolubles par centrifugation. Le surnageant est passé sur Amberlite IRC 50 chargée d'ions NH_4 et élué avec de l'eau.

On amène l'éluat à 2°, puis on ajoute goutte à goutte et en agitant sans arrêt H_2SO_4 1N jusqu'à pH 3,2. On laisse reposer 30 min à 0°. Si le liquide contient de l'aspergillomarasmine A, celle-ci commence à cristalliser. On amène la solution à pH 3,0, puis on recueille les cristaux par centrifugation.

Le surnageant est amené à pH 2,5 et refroidi à 0°, ce qui favorise la précipitation de l'aspergillomarasmine B.

L'anhydro-aspergillomarsmine B apparaît dans les cultures âgées, en particulier dès que le pH atteint 8.

Aspergillomarasmine A. – *Purification.* On suspend l'aspergillomarasmine A dans l'eau (1 g dans 15 ml) et on ajoute peu à peu, tout en agitant, de la soude caustique 0,1N jusqu'à pH 4,5. On amène à 500 ml par addition d'eau, puis on acidifie jusqu'à pH 2,9 par HCl 0,1N versé goutte à goutte et en agitant. Pour éviter l'obtention du sel monosodique, la précipitation ne doit commencer qu'à un pH inférieur à 3. Tant que la précipitation de l'aspergillomarasmine A n'est pas terminée, c'est-à-dire pendant plusieurs heures, on maintient le pH à 2,9 par HCl 0,1N. On laisse reposer 16 h à 2°.

Le précipité est filtré, puis lavé par 25 ml d'eau (amenée à pH 2,5 par HCl), par 50 ml d'alcool: éther (1:1) et enfin par 25 ml d'éther. On le sèche sous vide en présence de P_2O_5.

$C_{10}H_{17}O_8N_3$	Calc.	C 39,10	H 5,54	N 13,70	%
	Tr.	,, 38,26; 38,74; 38,83	,, 5,76; 5,71; 5,35	,, 13,71; 14,02; 13,50	%

Isolement de l'anhydro-aspergillomarasmine A (XII) après hydrolyse acide ménagée. Le produit d'hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine A (300 mg dans 6 ml HCl 6N en tube scellé à 120° pendant 4 h) est amené à sec et repris plusieurs fois par de l'eau. On le reprend dans 1 ml d'eau et on le chromatographie sur papier dans le système n° 1. La bande de Rf correspondant à l'anhydro-aspergillomarasmine A est éluée par de l'eau et amenée à sec. On obtient 100 mg de produit amorphe.

Isolement de l'acide aspartique et de l'acide diamino-2,3-propionique après hydrolyse acide dans les conditions normales. – a) *Acide aspartique:* On traite l'hydrolysat comme indiqué ci-dessus pour l'isolement de l'anhydro-aspergillomarasmine A. Après chromatographie préparative dans le solvant n° 1, on élue par de l'eau la bande de Rf correspondant à l'acide aspartique et on l'amène à sec. On obtient 34 mg d'acide aspartique à partir de 100 mg d'aspergillomarasmine A. $[\alpha]_D^{20} = +8°$ ($c = 0{,}7$ dans HCl 6N).

b) *Acide diamino-2,3-propionique:* Après hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine A dans les conditions normales, on reprend l'hydrolysat plusieurs fois par un peu d'eau (pour faciliter l'évaporation de HCl) et enfin par 1 ml d'eau. Après électrophorèse préparative de l'hydrolysat, on élue la bande correspondant à l'acide diamino-2,3-propionique, on filtre sur du noir animal et on amène à sec. $[\alpha]_D^{20} = 0°$ ($c = 1$ dans HCl 2N).

Désamination nitreuse et hydrolyse acide. On traite 2 mg d'aspergillomarasmine A par 0,05 ml de HCl 1N et 3 mg de $NaNO_2$. Après 15 min on ajoute 7 mg de phénylalanine et 1 ml de HCl 6N. Après 30 min le tube est scellé et maintenu 16 h à 120°. Les produits d'hydrolyse sont traités selon les indications données précédemment (voir hydrolyse acide). La même réaction a été effectuée sur l'«acide A» (anhydro-aspergillomarasmine A).

Oxydation par l'acide periodique. A une solution contenant 4 mg de HIO_4, on ajoute 2 mg d'aspergillomarasmine A, 1 ml d'eau et du $NaHCO_3$ jusqu'à pH 8–9. On abandonne 2 h à température ordinaire.

Les tentatives d'isolement d'un produit défini, après estérification et chromatographie en phase gazeuse, n'ont pas abouti.

Hydrogénolyse des esters benzyliques. A 10 mg d'aspergillomarasmine A, on ajoute 1 ml d'alcool benzylique, 5 mg d'acide *p*-toluènesulfonique et on chauffe à reflux pendant 2 h. L'alcool est chassé sous vide à 120–130°. Le résidu est repris sous N_2 par 10 ml de méthanol et hydrogéné pendant 16 h en présence de 20 mg de palladium sur charbon, à 5%. Le catalyseur est éliminé par centrifugation et lavé 3 fois par 2 ml d'eau chaude; les surnageants sont réunis, amenés à sec, puis repris par 1 ml d'eau. Une chromatographie préparative du produit dans le système n° 2 permet d'éluer par l'eau la bande de Rf correspondant à l'alanine; l'éluat est amené à sec.

Le dosage de l'alanine a été effectué par réaction à la ninhydrine en présence de tampon cyanure-acétate selon ROSEN [24]. Rendement: 1,1mg d'alanine à partir de 60mg d'aspergillomarasmine A; $[\alpha]_D^{20} = 0°$ ($c = 0{,}3$ dans HCl 1N).

Aspergillomarasmine B (acide lycomarasmique). – *Purification.* On suspend l'aspergillomarasmine B dans l'eau (1 g dans 15 ml) et on ajoute NaOH 0,1N jusqu'à dissolution. Le pH

est amené à 2,5 par H_2SO_4, ce qui provoque la précipitation de l'aspergillomarasmine B. On isole les cristaux comme décrit ci-dessus pour l'aspergillomarasmine A.

Rendement: 140 mg d'aspergillomarasmine B par litre de milieu de culture.

$C_9H_{14}O_8N_2$	Calc.	C 38,84	H 5,07	N 10,07	O 46,04%
	Tr.	,, 39,22; 39,98	,, 5,75; 5,01	,, 10,01; 10,09	,, 45,80%
		,, 39,36; 38,97	,, 5,04; 5,14	,, 10,32; 9,88%	

Tétraester méthylique de l'aspergillomarasmine B. L'aspergillomarasmine B est agitée en présence d'un excès d'une solution éthérée de diazométhane. On arrête la réaction lorsque toute la substance solide a disparu. On distille l'ester dans un tube à boules (140–150° sous 0,05 Torr); il se présente sous la forme d'une huile jaune clair et visqueuse.

$C_{13}H_{22}O_8N_2$	Calc.	C 46,80	H 6,60	N 8,39	(O)–CH_3 17,99	(N)–CH_3 0	%
	Tr.	,, 47,80	,, 6,90	,, 8,13	,, 17,58	,, 2,30%	

Les résultats des analyses sont probablement perturbés par une méthylation partielle sur les azotes.

Isolement de l'acide aspartique, de la glycine et de l'anhydro-aspergillomarasmine B à partir de l'aspergillomarasmine B. – a) *Acide aspartique et glycine:* Après hydrolyse acide de l'aspergillomarasmine B (50 mg dans HCl 6N en tube scellé pendant 10 j. à 120°), on sépare les deux acides aminés sur Amberlite IR 45 A.G. On élue la glycine par de l'eau, puis l'acide aspartique par HCl 1N. On obtient 17 mg d'acide aspartique brut; $[\alpha]_D^{20°} = +20°$ ($c = 1$ dans HCl 2N).

b) *Anhydro-aspergillomarasmine B:* A 500 mg d'aspergillomarasmine B on ajoute 20 ml d'eau et on ajuste à pH 5 par NaOH 1N. On chauffe le mélange au bain-marie à 60°, on amène le pH au-dessous de 1 par HCl 5N et on chauffe encore 15 min à 60°. On refroidit à 15°, puis on ajuste le pH à 2,3 par NaOH. Après 16 h à 0°, on filtre les cristaux, on les lave à l'alcool-éther (1:1) et on les sèche sous vide. On obtient 165 mg d'anhydro-aspergillomarasmine B.

On peut aussi préparer cette substance par hydrolyse aqueuse: 32 mg d'aspergillomarasmine B sont traités par 1,5 ml d'eau en tube scellé pendant 210 min à 95°; on laisse reposer 24 h à 0°, on filtre, lave et sèche les cristaux comme indiqué ci-dessus pour l'isolement par hydrolyse acide. On obtient 14 mg d'anhydro-aspergillomarasmine B [16].

$C_9H_{12}O_7N_2$	Calc.	C 41,53	H 4,61	N 10,75%
	Tr.	,, 41,32	,, 4,62	,, 10,85; 10,68%

Oxydation enzymatique de l'aspergillomarasmine A. – Un essai de culture d'*Aspergillus ustus* n° 473 (collection du Museum National d'Histoire Naturelle, Paris), selon MIZUSHIMA & SAKAGUCHI [22], nous ayant donné de très faibles rendements en *Aspergillus*, nous avons modifié les conditions de culture comme suit:

Chaque boîte de ROUX contient: 2 g de glucose, 0,5 g d'acide D-glutamique, 0,2 g de K_2HPO_4, 0,1 g de $MgSO_4$, $7H_2O$, 2 mg de $FeSO_4$, $7H_2O$, 1 mg de $MnSO_4$, $7H_2O$, 1 mg de $ZnSO_4$, $7H_2O$ dans 100 ml d'H_2O distillée. Les milieux sont autoclavés 20 min à 110°, puis ensemencés.

Après 14 jours de culture à 23° on filtre le mycélium, on le lave par de l'eau distillée et on le lyophilise.

A partir de 600 ml de milieu de culture, on obtient environ 2 g d'*Aspergillus* que l'on conserve à –20°.

L'extrait brut est obtenu en broyant dans un mortier 20 g d'*Aspergillus ustus* avec 5 g d'alumine ALCOA 301 et 10 ml de tampon borate-phosphate (30 ml Na_2HPO_4, $12H_2O$ 0,2M, 70 ml H_3BO_3 0,2M et 100 ml d'eau), ajusté à pH 8,0 pendant 15 min à 4°. On ajoute 10 ml de tampon, on abandonne 60 min à 4° et on centrifuge 30 min à 16000 tours/min (SERVALL). Le culot est repris par 15 ml de tampon, abandonné 60 min à 4° et centrifugé comme précédemment. Les surnageants réunis sont maintenus 16 h à –20°, puis recentrifugés comme ci-dessus. On obtient ainsi environ 30 ml d'un extrait légèrement jaune, que l'on conserve à –20°.

Les oxydations ont été effectuées dans l'appareil de WARBURG à 28°. Chaque récipient contient: 1 ml d'extrait brut (poids sec 15 mg/ml) et 1,4 ml de tampon borate-phosphate dans le puits principal; 0,2 ml de NaOH 10% dans le puits central et 10 µmoles de substrat/0,4 ml de tampon dans le bras latéral; substances de référence: acides D- et L-aspartiques.

Les résultats de cette oxydation enzymatique sont reportés sur la figure 5.

Essais de flétrissement sur les feuilles de tomates (voir tableau I). – Les tiges de tomates sont introduites dans des solutions contenant par ml 0,2 mg de substance (solubilisée par le minimum de soude caustique 0,5 N) et 0,03 mg de $FeCl_3$. On observe les feuilles toutes les 6 heures environ.

Au début, les bords des feuilles se roulent. A ce moment, commence le flétrissement, qui est en général terminé en 24 h. Les feuilles se dessèchent progressivement et deviennent totalement sèches en 48 h.

RÉSUMÉ

La structure chimique, ainsi que la configuration de deux phytotoxines isolées d'*Aspergillus flavus oryzae:* les aspergillomarasmines A (XXVI) et B (VII) (cette dernière étant identique à l'acide lycomarasmique) sont établies.

Institut de Chimie des Substances Naturelles
C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (S.-et-O.), France

BIBLIOGRAPHIE

[1] K. Morizawa, Acta Schol. med. Univ. Imp. Kyoto *9*, 285 (1927).
[2] E. Moore & D. W. Wilson, J. biol. Chemistry *119*, 573 (1937).
[3] C. Lioret, Bull. Soc. fr. Physiol. vég. *2*, 76 (1956).
[4] K. Biemann, C. Lioret, J. Asselineau, E. Lederer & J. Polonsky, Biochim. biophysica Acta *40*, 369 (1960); Bull. Soc. Chim. biol. *42*, 979 (1960).
[5] S. Darling & P. O. Larsen, Acta chem. scand. *15*, 743 (1961).
[6] A. Kjaer & P. O. Larsen, Acta chem. scand. *15*, 750 (1961).
[7] J. S. Trupin & H. P. Broquist, Fed. Proc. *22*, 243 (1963).
[8] A. Ménager & G. Morel, Compt. rend. Séances Acad. Sci. *259*, 4795 (1964).
[9] N. Clausen-Kaas, P. A. Plattner & E. Gäumann, Ber. Schweiz. botan. Ges. *54*, 523 (1944); P. A. Plattner & N. Clausen-Kaas, Helv. *28*, 188 (1945); Experientia *1*, 195 (1945).
[10] E. Hardegger, P. Liechti, L. M. Jackman, A. Boller & P. A. Plattner, Helv. *46*, 60 (1963).
[11] E. Hardegger, J. Seres, R. Andreatta, F. Szabo, W. Zankowska-Jasinska, A. Romeo, C. Rostetter & H. Kindler, Helv. *46*, 1065 (1963).
[12] E. Lederer, Chimie pure appl. *7*, 247 (1963).
[13] M. Robert, M. Barbier, E. Lederer, L. Roux, K. Biemann & W. Vetter, Bull. Soc. chim. France *1962*, 187; A. L. Haenni, M. Barbier & E. Lederer, Compt. rend. Séances Acad. Sci. *255*, 1476 (1962).
[14] P. Liechti, Thèse de l'ETH., Zurich 1958.
[15] D. Bogdanovsky & M. Barbier, Bull. Soc. chim. France *1965*, 832.
[16] M. Barbier, D. Bogdanovsky, W. Vetter & E. Lederer, Liebigs Ann. Chem. *668*, 132 (1963).
[17] D. Bogdanovsky & M. Barbier, Bull. Soc. chim. France *1964*, 2778.
[18] K. A. Piez & L. Morris, Analyt. Biochem. *1*, 187 (1960).
[19] V. V. S. Murti, T. R. Seshadri & T. A. Venkitasubramanian, Phytochemistry *3*, 73 (1964); M. Devys & M. Barbier, Observation personnelle avec un acide L-(+)-diamino-2,3-propionique de synthèse.
[20] K. Biemann, J. Seibl & F. Gapp, Biochem. biophys. Res. Commun. *1*, 307 (1959); J. Amer. chem. Soc. *83*, 3795 (1961).
[21] K. Heyns & H. F. Grutzmacher, Z. Naturforsch. *16 B*, 293 (1961).
[22] K. Izaki, S. Mizushima, H. Takahashi & K. Sakaguchi, Symposia on Enzyme Chemistry (Japon) *11*, 143 (1956); S. Mizushima & K. Sakaguchi, Bull. agric. chem. Soc. Japan *20*, 131 (1956).
[23] S. Moore, D. H. Spackman & W. H. Stein, Analyt. Chemistry *30*, 1185 (1958); D. H. Spackman, W. H. Stein & S. Moore, *ibid. 30*, 1190 (1958).
[24] H. Rosen, Arch. Biochem. Biophysics *67*, 10 (1957).