

LES ASCOPYRONES P ET T : DEUX NOUVEAUX COMPOSÉS ISSUS DU MÉTABOLISME D'ASCOMYCÈTES "ACTIVÉS"

Marie-Antoinette BAUTE, Gérard DEFFIEUX, Robert BAUTE
et Joseph VERCAUTEREN*

Laboratoire de Mycologie et Biologie végétale

*Laboratoire de Pharmacognosie

Faculté de Pharmacie (Université de Bordeaux II)

Place de la Victoire, 33000 BORDEAUX (FRANCE)

Plusieurs Ascomycètes appartenant aux Pezizales et aux Tubérales expriment, après traitement plasmolytique "activateur", une activité enzymatique qui dégrade les glucanes α -D-1,4 (glycogène, amidon...) en 1,5-D-anhydrofructose, puis transforme ce sucre en ascopyrone P (chez les Pezizales) ou en ascopyrone T (chez les Tubérales). Les implications biogénétiques, mycologiques et pratiques de ces bioconversions sont envisagées.

INTRODUCTION

Nos recherches antérieures ont montré que divers Ascomycètes, soumis à un traitement plasmolytique "activateur", expriment une activité enzymatique originale qui dégrade leur glycogène cellulaire en un sucre inhabituel, le 1,5-D-anhydrofructose (AF). Chez certaines espèces ou souches, le phénomène s'arrête à ce stade, mais, dans la plupart des cas, les réactions se poursuivent par le jeu de déshydratations enzymatiques, conduisant alors à un composé pyronique antibiotique, la microthécine [1], ou, chez certaines Pezizes — dont *Peziza echinospora* —, à un antibiotique du groupe des penténomycines, l'échinosporine ou 5-épипenténomycine I [2]¹.

Au gré des récoltes de nouvelles espèces, nous poursuivons la recherche systématique d'AF, de microthécine et d'échinosporine par la technique indiquée antérieurement [2,4] : macération de quelques fragments du "champignon" (c'est-à-dire ici de l'ascocarpe), préalablement congelé, dans une solution aqueuse de maltodextrines² (amidon partiellement hydrolysé), puis recherche par chromatographie en couche mince, dans ce macérat, de la présence éventuelle des substances précitées. En outre, tout spot différent³ est pris en compte et l'identification du composé correspondant est entreprise. Cette démarche, qui nous avait déjà permis d'identifier l'échinosporine [2], nous a mis sur la voie de deux nouveaux composés pyroniques qui font l'objet de cet article.

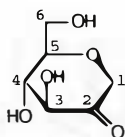
¹ Lors de la publication de nos résultats sur la 5-épипenténomycine I de *Peziza echinospora*, nous ignorions que ce composé venait d'être isolé d'une Pezize non identifiée par une équipe de mycochimistes lyonnais, sans d'ailleurs de précisions quant à sa biogénèse [3].

² En théorie, l'addition de maltodextrines n'est pas indispensable, mais elle peut pallier une insuffisance en glycogène du champignon testé et, de toute façon, elle améliore la sensibilité du test.

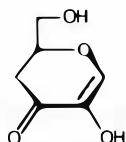
³ Par un ou plusieurs des caractères suivants : R_f , forme du spot, absorption ou non à 254 nm, couleur après action du réactif à l'anisaldéhyde sulfurique.

RÉSULTATS

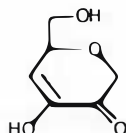
L'un des deux nouveaux composés, noté **1**, a été détecté chez *Plicaria anthracina*, *P. leiocarpa*, *Peziza petersi* et *Anthrachia melaloma*, l'autre, **2**, chez plusieurs espèces de Truffes (au sens large) : trois *Tuber* (*T. melanosporum*, *T. brumale*, *T. uncinatum*) et deux *Terfezia* non identifiés.



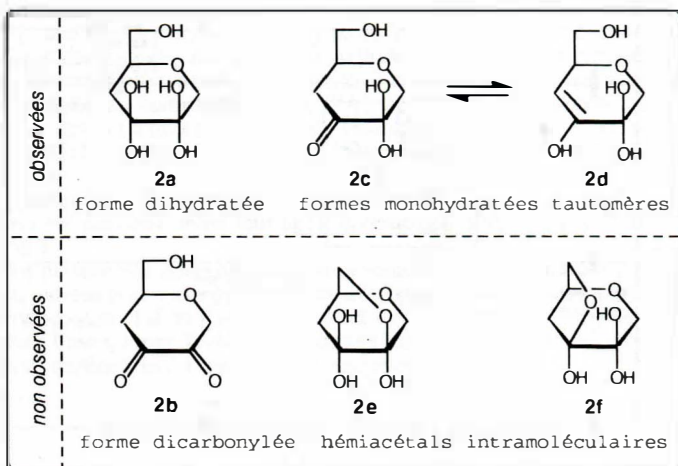
1,5-D-anhydrofructose (AF)
forme carbonylée



1, ascopyrone P



3, "céténool transitoire"



2, ascopyrone T

Etude structurale

Pour les deux composés, et plus particulièrement pour **2**, les spectres de RMN réalisés dans l'acétone deutériée sont complexes et suggèrent l'existence de plusieurs formes en équilibre. En solution aqueuse, au contraire, les spectres, réalisés après présaturation du signal de l'eau à 4,8 ppm, sont plus simples et semblent correspondre à une forme majoritaire.

Composé 1

Parmi les signaux des six atomes de carbone que révèle le spectre de RMN du ^{13}C , ceux à δ 187,0, 147,0 et 130,5 ppm indiquent l'existence d'une forme carbonylée α,β -insaturée. La présence d'une fonction énolisable sur ce même motif est mise en évidence par un déplacement réversible du maximum d'absorption UV de 292 nm en milieu neutre à 339 nm en milieu alcalin (pH > 10), ainsi que par l'acidité de la solution. Les deux bandes observées en IR à 1660 et 1615 cm^{-1} sont conformes à l'enchaînement $\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{O}$.

Les spectres de RMN 2D (HMQC et HMBC) sont en accord avec la structure **1**, qui est celle du 1,5-anhydro-4-désoxy-D-glycéro-hex-1-ène-3-ulose (numérotation

biochimique); les couplages H-1—C-3 et H-1—C-5 apparaissent nettement dans le spectre HMBC (figure 1). La masse moléculaire de 144, déterminée par spectrométrie de masse, et les données de l'analyse élémentaire correspondent bien à la formule brute $C_6H_8O_4$. Ces divers résultats montrent que la structure 1 est observée à l'état solide comme en solution aqueuse.

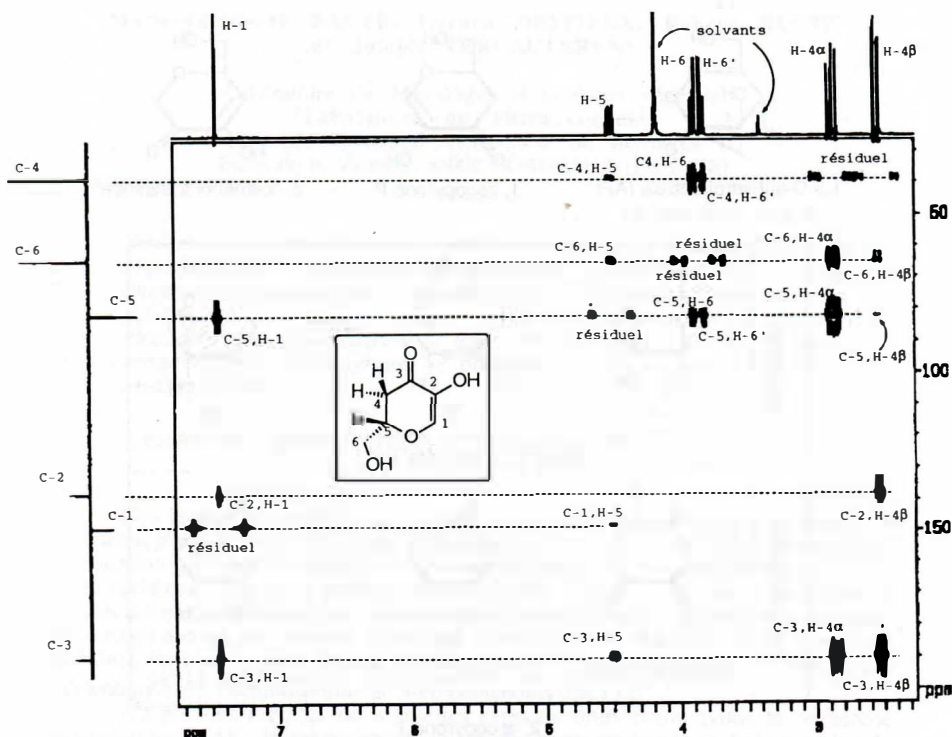


Fig. 1 : Spectre HMBC du composé 1

Ce composé avait déjà été identifié parmi les produits de la pyrolyse de la cellulose et d'autres polyholosides [5]; sa structure cristalline a été décrite [6]. Nos résultats sont d'ailleurs en accord avec ceux de la littérature. Une caractéristique de ce composé est la stabilité de sa fonction énol.

Etant donné qu'il est observé pour la première fois dans des conditions biologiques, en tant que produit d'une activité enzymatique qui paraît être spécifique des Ascomycètes du groupe des Pezizales, nous proposons de le nommer *ascopyrone P*.

Composé 2

a) En milieu aqueux, l'existence de la forme dicarboxylée dihydratée 2a de la forme α -dicarboxylée 2b est suggérée par la présence, dans le spectre de RMN, de deux signaux (à δ 96,1 et 95,1 ppm) correspondant à deux carbones acétaliques, ainsi que par l'obtention aisée d'une dioxime qui traduit la présence, au moins potentielle, de deux C=O.

Ceci est confirmé par l'analyse des spectres de RMN 2D, qui permet de proposer la structure 2a; le spectre HMBC ne montrant aucun couplage entre H-6 et C-2 ou C-3, on peut exclure l'existence d'hémiacétals intramoléculeurs tels que 2e ou 2f. En outre,

cette structure diacétalique est en accord avec l'absence d'absorption UV du composé en solution aqueuse.

b) A l'état solide, après évaporation de l'eau sous pression réduite, le composé apparaît comme étant un mélange de deux formes, 2c et 2d, responsables respectivement des bandes à 1735 et 1645 cm^{-1} observées dans le spectre IR en pastille de KBr. Le pic de base du spectre de masse, à $m/z = 131$, correspond à $[\text{M} - \text{CH}_2\text{OH}]^+$, ce qui est habituel chez de tels composés. L'analyse élémentaire est en accord avec la formule brute $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$.

Contrairement à 1, le composé 2 n'est pas mentionné dans la littérature. Etant donné qu'on peut le considérer, d'après ce qui précède, comme une pyrone potentielle, nous proposons de le nommer **ascopyrone T** (T pour Tubérales).

Quelques propriétés des ascopyrones P et T

1° En solution aqueuse acidifiée et à chaud, l'ascopyrone P se transforme, comme la microthécine, en furylhydroxyméthylcétone [1]; en revanche, l'ascopyrone T ne donne pas cette réaction.

2° La formation des deux ascopyrones présente plusieurs analogies avec celle des composés précédemment identifiés chez d'autres Ascomycètes (microthécine, échinosporine) [2,7,8] : elle a pour origine le glycoène endogène, elle passe par l'AF et elle est subordonnée au démasquage, par un traitement plasmolytique "activateur" (dessiccation, congélation-décongélation, broyage...), des enzymes impliquées dans la biosynthèse. En effet, l'addition de maltodextrines ou d'AF au macérat d'ascocarpe augmente la production par rapport à un macérat témoin, tandis qu'une macération (ou un broyage) en présence d'EDTA ne produit que de l'AF : les ascopyrones ne préexistent pas dans les cellules intactes.

Par ailleurs, une certaine quantité de microthécine, variable selon les champignons (et peut-être selon leur âge), accompagne l'ascopyrone P, mais jamais l'ascopyrone T.

3° La mesure des concentrations minimales inhibitrices vis-à-vis de quelques bactéries [2] indique pour l'ascopyrone P une très légère activité antibiotique à l'égard de deux Staphylocoques et d'un Colibacille (CMI de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement); quant à l'ascopyrone T, elle s'est montrée inactive sur tous les germes testés (des concentrations supérieures à 1 mg/ml n'ont pas été essayées).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'ascopyrone P, les différentes formes de l'ascopyrone T et d'autres formes non représentées sont vraisemblablement interconvertibles par des équilibres d'hydratation-déshydratation et de tautomérie cétoénolique. L'une de ces formes est le cétoénol instable 3 dont nous avons invoqué la formation transitoire — sur la base d'une absorption transitoire à 265 nm — pour expliquer le passage de l'AF à la microthécine (ou à l'échinosporine) [2,9]; ceci pourrait rendre compte de la coexistence, signalée plus haut, de l'ascopyrone P et de la microthécine. Mais, curieusement, la microthécine n'accompagne jamais l'ascopyrone T; de plus, les deux ascopyrones ne semblent pas coexister chez une même espèce: ceci suggère l'existence, entre ces deux composés, d'une barrière thermodynamique trop élevée.

La production majoritaire, voire exclusive, de tel composé par tel groupe taxonomique suggère donc que, parmi les équilibres chimiques évoqués ci-dessus, certains sont "orientés" par l'intervention d'enzymes spécifiques; une meilleure connaissance de ces réactions nous conduira sans doute à corriger le schéma biogénétique que nous avons proposé antérieurement. L'étude par RMN de l'anhydrofructose en solution aqueuse devrait être un point de départ intéressant, puisque ce sucre est le précurseur de tous ces composés.

Quoi qu'il en soit, l'anhydrofructose apparaît désormais, sur le plan biochimique, comme une plaque tournante dans le métabolisme glucidique de nombreux Ascomycètes. Sur un plan pratique, la facilité de son obtention à partir de l'amidon [8] fait de lui la source potentielle de plusieurs pyrones chirales qui pourraient se révéler utiles comme

précurseurs dans des synthèses stéréospécifiques.

Quelle peut être la signification biologique des ascopyrones P et T ? Pour la microthécine et l'échinosporine, douées d'activité antibiotique, on pouvait imaginer une fonction de défense du champignon soumis à des agressions (la cortalcérone jouerait un rôle semblable chez les Basidiomycètes) [2]; mais un tel rôle ne peut plus être invoqué ici, puisque l'ascopyrone P n'est que très faiblement antibiotique et l'ascopyrone T pratiquement pas. Notons, dans un tout autre ordre d'idées, que celle-ci n'a rien à voir non plus avec l'arôme des Truffes, dont le support chimique est très différent. Pour le moment, la signification biologique éventuelle de ces composés reste obscure. Toutefois, si l'on se rappelle que le froid compte parmi les agents d'"activation", on peut imaginer que la production de ces "petites" molécules à partir du glycogène serait, pour le champignon, un moyen de protéger son mycélium contre le gel en augmentant la molarité intracellulaire.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les Champignons.— Les Pezizes proviennent de la région bordelaise; elles ont été récoltées et identifiées par nous-mêmes. Les échantillons de *Tuber* nous ont été fournis par la station de l'INRA de Bordeaux et ceux de *Terfezia* ont été achetés sur des marchés marocains.

Mise en évidence de la production d'ascopyrones P ou T par des ascocarpes "activés".— Un fragment du champignon congelé est mis à décongeler dans quelques ml d'une solution aqueuse de Glucidex[®] [8] à 5% préalablement agitée avec 1% de toluène qui parachève l'action plasmolytique de la congélation-décongélation et protège contre les contaminations bactériennes. On laisse macérer quelques heures à 30°, puis on pratique une CCM (silice Macherey-Nagel Sil G/UV254, développement par le mélange chloroforme-méthanol 85 : 15); les plaques sont examinées sous UV de 254 nm, puis les spots sont révélés par le réactif à l'anisaldéhyde sulfurique. Ascopyrone P : spot de R_f 0,48, absorbant à 254 nm, révélation en vert foncé virant au violacé avec le temps; ascopyrone T : tache n'absorbant pas, centrée sur R_f 0,45, révélation en bleu.

N. B.— Caractéristiques des autres composés susceptibles d'être présents (dans l'ordre : R_f -absorption à 254 nm-couleur de révélation) : 0,00-pas d'absorption-vert : maltose et maltodextrines en excès; 0,05-pas d'absorption-vert : glucose; 0,13-pas d'absorption-bleu : anhydrofructose; 0,28-pas d'absorption-brun : dérivé non identifié de la microthécine; 0,30-absorption-bleu : échinosporine; 0,50-absorption-bleu : microthécine; 0,70-absorption-bleu : furylhydroxyméthylcétone, produit dérivant de la microthécine [1].

Ascopyrone P

a) Isolement.— Il a été réalisé à partir d'ascocarpes de *Plicaria leiocarpa* récoltés en abondance en janvier-février 1990 sur des brûlés de forêt de Pins maritimes dans la région du Porge (Gironde). Les ascocarpes ont été utilisés sous forme d'exsiccata (la dessiccation, qui n'affecte apparemment pas l'activité enzymatique, réalise l'"activation" nécessaire à son expression).

On pratique 3 macérations successives de 24 h à 30° de 1 g d'exsiccata dans 10 ml d'une solution de Glucidex[®] à 50 mg/ml, préalablement agitée avec 1% de toluène. Les macérats, réunis, sont additionnés de 3 vol de MeOH et le précipité apparu est éliminé par une centrifugation de 10 min à 4 000 t/min. Le surnageant est concentré à environ 2 ml.

Le liquide sirupeux ainsi obtenu est chromatographié sur résine Dowex 50WX4 (200-400 mesh) (colonne de 2,6 x 70 cm; élution par l'eau au débit de 30 ml/h; détection par les UV et par CCM); le produit s'élue dans la fraction 450-490 ml, que l'on concentre à 1 ml environ.

Ce liquide est alors soumis à une gel-filtration sur Fractogel TSK HW 40 (Merck) (colonne de 2,6 x 70 cm réfrigérée à 12°; eau; débit de 50 ml/h); le produit s'élue entre 300 et 350 ml. L'évaporation sous pression réduite donne 30 à 40 mg d'un solide

blanc microcristallin. $F = 92^\circ$ (litt.: 91° - 96°); $[\alpha]_D^{22} = +134^\circ$ (H_2O ; c 0,55) [litt.: $+155^\circ$ (H_2O ; c 1,1)]; $\lambda_{\max} H_2O$ nm (log ϵ): 292 (3,80) (litt.: 293).

b) Analyse structurale

Analyse élémentaire.— Trouvé : C : 48,25; H : 5,44; O : 44,78. Calculé pour $C_6H_8O_4$: C : 50,00; H : 5,55; O : 44,44%.

Spectre IR.— $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 1660 et 1615 (O=C-C=C-O), 1430, 1310, 1170, 1130, 1055, 1035, 1015, 905, 890, 825, 760.

Spectre de RMN de 1H (500,13 MHz, H_2O , présaturation à 4,8 ppm pendant 2 sec.).— δ (TMS) (multiplicité) : 7,50 (1 H, s, H-1); 4,53 (1 H, m, H-5); 3,80 (2 H, m, H-6 et H-6'); 2,82 (1 H, dd, $J_{4,\alpha,5} = 14,7$ Hz, $J_{4\alpha,4\beta} = 17,4$ Hz, H-4 α); 2,50 (1 H, dd, $J_{4\beta,5} = 3,6$ Hz, H-4 β).

Spectre de RMN de ^{13}C (125,77 MHz, H_2O).— δ : 187,0 (C-3); 147,0 (C-1); 130,5 (C-2); 75,3 (C-5); 58,2 (C-6); 32,0 (C-4).

Spectre de masse en ionisation électronique (70 eV).— m/z (int. rel.): 144 [M]⁺ (100), 126 [M - H_2O]⁺ (22), 115 (25), 113 [M - CH_2OH]⁺ (28), 98 (29), 97 (67), 87 (88).

Ascopyrone T

a) Isolement.— Il a été effectué à partir de 10 g d'un broyat grossier d'ascocarpe de *Terfezia* sp. d'origine marocaine. Le protocole est le même que pour l'ascopyrone P. Le produit s'élue à partir de la résine Dowex dans la fraction 250-290 ml, et à partir du Fractogel dans la fraction 200-250 ml. La lyophilisation donne 500 mg d'un solide blanc amorphe. $F = 65^\circ$; $[\alpha]_D^{22} = +110^\circ$ (H_2O ; c 1); pas d'absorption significative dans l'UV.

b) Analyse structurale

Analyse élémentaire.— Trouvé : C : 44,9; H : 6,3; O : 47,5. Calculé pour $C_6H_{10}O_5$: C : 44,44; H : 6,17; O : 49,38%.

Spectre IR.— $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3380 (O-H), 2930 et 2880 (C-H), 1735 (C=O), 1638 (C=C), 1090 et 1050 (C-O), 1450, 1370, 1270, 1050, 920, 825, 700.

Spectre de RMN de 1H (500,13 MHz, H_2O).— δ (TMS) (multiplicité) : 3,82 (1 H, m, $W_{1/2} = 24$ Hz, H-5); 3,67 (2 H, m, $W_{1/2} = 35$ Hz, H-1 et H-1'); 3,65 (2 H, m, $W_{1/2} = 51$ Hz, H-6 et H-6'); 1,85 (2 H, m, $W_{1/2} = 58$ Hz, H-4 et H-4').

Spectre de RMN de ^{13}C (500,13 MHz, H_2O).— δ : 96,1 (C-2); 95,1 (C-3); 78,5 (C-5); 72,9 (C-1); 66,4 (C-6); 39,6 (C-4).

Spectre de masse en ionisation électronique (70 eV).— m/z (int. rel.): 162 [M]⁺ (8,6), 144 [M - H_2O]⁺ (7,3), 131 [M - CH_2OH]⁺ (100).

Oxime de l'ascopyrone T

Préparation.— Elle a été préparée selon le protocole utilisé pour l'oxime de l'anhydrofructose [7]; la bande correspondant à l'oxime sur les chromatoplaques a un R_f de 0,26 avec le système $CHCl_3$ -MeOH 85 : 15. $F = 175^\circ$; $\lambda_{\max} H_2O$ nm (log ϵ): 240 (3,87).

Analyse élémentaire.— Trouvé : C : 41,16; H : 6,01; O : 35,76; N : 15,95%. Calculé pour $C_6H_{10}O_4N_2$: C : 41,38; H : 5,75; O : 36,78; N : 16,09%.

Spectre IR.— $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$: 3540, 3245, 3040, 2910, 1465, 1410, 1390, 1350, 1310, 1260, 1215, 1190, 1165, 1115, 1100, 1070, 1050, 1015, 990, 940, 835, 770, 710, 640.

Spectre de RMN de 1H [500,13 MHz, $(CD_3)_2SO$].— δ (signal résiduel du DMSO à 2,6 ppm) (multiplicité) : 11,55 et 11,51 (2 H, s, N-OH); 4,88 (1H, 4,84 (1H, d, $J_{1,1'} = 17$ Hz, H-1); 4,39 (1H, d, H-1'); 3,61 (1H, m, H-5); 3,52 (2H, m, H-6 et H-6'); 2,75 (1H, dd, $J_{4,5} = 3,7$ Hz, $J_{4,4'} = 18,1$ Hz, H-4); 2,46 (1H, dd, $J_{4,5} = 11,4$ Hz, H-4').

Spectre de RMN de ^{13}C [125,77 MHz, $(CD_3)_2CO/CD_3OD$].— δ (signal résiduel de l'acétone à 30,2 ppm) : 153,6 (C-2); 152,0 (C-3); 78,8 (C-5); 68,4 (C-1); 67,6 (C-6); 31,6 (C-4).

Spectre de masse en ionisation chimique (NH_3).— m/z (int. rel.): 175 [M + H]⁺

(18), 159 (100), 157 [M + H - H₂O]⁺ (15), 143 (72), 141 (18).

Les auteurs remercient MM. SORIANO et FONDEVILLE pour leur assistance technique efficace. Ils expriment leur reconnaissance à MM. OLIVIER et GUINBERTEAU, de la station de l'INRA de Bordeaux, pour le don de plusieurs échantillons de Tuber, et à M. HIMMI pour l'envoi de *Terfezia* du Maroc.

RÉFÉRENCES

1. Baute (M.-A.), Deffieux (G.) and Baute (R.). Bioconversion of carbohydrates to unusual pyrone compounds in fungi : occurrence of microthecin in morels. *Phytochemistry*, 1986, **25**, 1472-1473.
2. Baute (M.-A.), Deffieux (G.), Baute (R.), Badoc (A.), Vercauteren (J.), Léger (J.-M.) and Neveu (A.). Fungal enzymic activity degrading 1,4- α -D-glucans to echinosporin (5-epipentenomycin I). *Phytochemistry*, 1991, **30**, 1419-1423.
3. Bernillon (J.), Favre-Bonvin (J.), Pommier (M.-T.) and Arpin (N.). First isolation of (+)-epipentenomycin I from *Peziza* sp. carpophores. *J. Antibiot.*, 1989, **42**, 1430-1432.
4. Baute (M.-A.), Baute (R.) et Deffieux (G.). Bioconversions fongiques produisant, à partir de sucres, des composés pyroniques inhabituels à activité antibiotique. XII.- Mise en évidence de la production de microthécine chez divers Ascomycètes du groupe des Discomycètes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1986, **125**, 12-16.
5. Shafizadeh (F.), Furneaux (R. H.), Stevenson (T. T.) and Cochran (T. G.). 1,5-anhydro-4-deoxy-D-glycero-hex-1-en-3-ulose and other pyrolysis products of cellulose. *Carbohydr. Res.*, 1978, **67**, 433-447.
6. Stevenson (T. T.), Stenkamp (R. E.), Jensen (L. H.), Cochran (T. G.), Shafizadeh (F.) and Furneaux (R. H.). The crystal structure of 1,5-anhydro-4-deoxy-D-glycero-hex-1-en-3-ulose. *Carbohydr. Res.*, 1981, **90**, 319-325.
7. Deffieux (G.), Baute (M.-A.), Baute (R.), Atfani (M.) and Carpy (A.). 1,5-D-anhydrofructose, the precursor of the pyrone microthecin in *Morchella vulgaris*. *Phytochemistry*, 1987, **26**, 1391-1393.
8. Baute (M.-A.), Baute (R.) and Deffieux (G.). Fungal enzymic activity degrading 1,4- α -D-glucans to 1,5-D-anhydrofructose. *Phytochemistry*, 1988, **27**, 3401-3403.
9. Baute (R.), Baute (M.-A.) and Deffieux (G.). Proposed pathway to the pyrones cortalcerone and microthecin in fungi. *Phytochemistry*, 1987, **26**, 1395-1397.

ABSTRACT

**Fungal bioconversions yielding unusual pyrones from carbohydrates
XVII.— Enzymic production of ascopyrones P and T
from 1,4- α -D-glucans by Ascomycetes belonging to
Pezizales and Tuberales**

When subjected to 'activating' plasmolytic treatments, several Ascomycetes exhibit an enzymic activity which degrades 1,4- α -D-glucans to 1,5-D-anhydrofructose, then converts this sugar to ascopyrone P (in Pezizales) or ascopyrone T (in Tuberales). Biogenetical, mycological and practical implications of these bioconversions are discussed.

Key-words: Fungi, Ascomycetes, Discomycetes, Pezizales, Tuberales, ascopyrone P, ascopyrone T, microthecin, carbohydrates, 1,5-D-anhydrofructose, 1,4- α -D-glucans, bioconversion, enzymic activity.