

**Recherches Toxicologiques sur les Substances Toxiques de  
*Penicillium tardum*. I. Isolément et Identification  
des Substances Cytotoxiques**

TAKASHI TATSUNO, NORIKO KOBAYASHI,<sup>1a)</sup> KAORU OKUBO,<sup>1b)</sup>  
et HIROSHI TSUNODA<sup>1c)</sup>

*Institut des Recherches Physiques et Chimiques,<sup>1a)</sup> Université Vétérinaire de Nippon,<sup>1b)</sup>  
et Université de Gunma<sup>1c)</sup>*

(Reçu le 23 Juillet, 1974)

The toxicological research of the metabolites of *Penicillium tardum* was carried out.

The cytotoxic metabolic substances of *P. tardum* have been confirmed as endocrocin and emodin. In addition, the known metabolites of this fungus, rugulosin and skyrin were isolated.

Les recherches microbiologiques, chimiques et toxicologiques sur les moisissures du riz et du blé, sont effectuées à notre Institut, par une équipe que dirige Mr. K. Uraguchi, et des études récentes<sup>2a,b)</sup> portaient en particulier sur les aspects toxicologiques d'intoxications dues à *P. islandicum*, *P. citrinum*, *P. citreo-viride* et *Fusarium nivale*.

Un des chercheurs de cette équipe, H. Tsunoda, observait récemment la mort de rats nourris au riz contaminé par *P. tardum*. Ceux-ci présentaient de graves lésions hépatiques et rénales.

*Penicillium tardum* est une moisissure ordinaire du riz conservé sans précautions, et si l'on peut expliquer les lésions hépatiques du rat par la présence de la rugulosine, l'origine des lésions rénales n'est pas claire. Les substances toxiques de *P. tardum* sont en effet la rugulosine et la skyrine.<sup>3)</sup> Cependant rien ne permet d'affirmer que la skyrine est bien la cause des lésions rénales observées.

A partir des résultats de l'essai biologique, nous avons entrepris des recherches sur les toxines de *P. tardum*. Nous avons ainsi isolé de l'emodine et de l'endocrocine, toutes deux cytotoxiques des cultures de cellules HeLa et F.L.; et en outre nous isolions la rugulosine et la skyrine.

**Matériel et Méthodes**

1) Nous avons cultivé *P. tardum* à 25° pendant 3 semaines, en solution de Czapek (à 5% de sucre de canne). Ensuite, nous avons séché et pulvérisé le mycélium. Nous avons extrait les toxines de la poudre de mycélium par le *n*-hexane, l'acétate d'éthyle, l'acétone et l'alcool *n*-butyrique, successivement.

2) En utilisant une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> et une de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, nous avons ensuite pu séparer de cet extract une fraction à fonction acide forte et une fraction à fonction acide faible. Nous purifions chacune des fractions isolées par chromatographie sur colonne de gel de silice chargée à l'acide oxalique (0.5 g/30 g de gel de silice).

Au fur et à mesure du fractionnement, les corps isolés sont caractérisés au moyen de chromatographie préparative sur couche mince, comme il est expliqué plus loin (Fractions R<sub>1</sub> et S<sub>1</sub>).

- 1) Location: a) Wako-shi, Saitama, 351, Japon; b) Musashino-shi, Tokyo, 180, Japon; c) Maebashi-shi, Gunma, 371, Japon.
- 2) a) M. Saito, T. Tatsuno, and M. Enomoto, "Microbial Toxins," Vol. VI, Academic Press, New York and London, 1971, p. 299; b) M. Saito, T. Tatsuno, and M. Enomoto, "Microbial Toxins," Vol. VII, Academic Press, New York and London.
- 3) Y. Yamamoto, A. Hamaguchi, I. Yamamoto, and S. Imai, *Yakugaku Zasshi*, **76**, 1428 (1956).

3) Simultanément, chacune des fractions était analysée chimiquement, et l'activité biologique, testée sur cellules HeLa ou F.L., cellule du placenta humain, selon la méthode modifiée de Toplin.<sup>4)</sup>

**Extraction et Fractionnement des Toxines**—1) Les substances toxiques de *P. tardum* sont extraites selon le schéma de la figure 1.

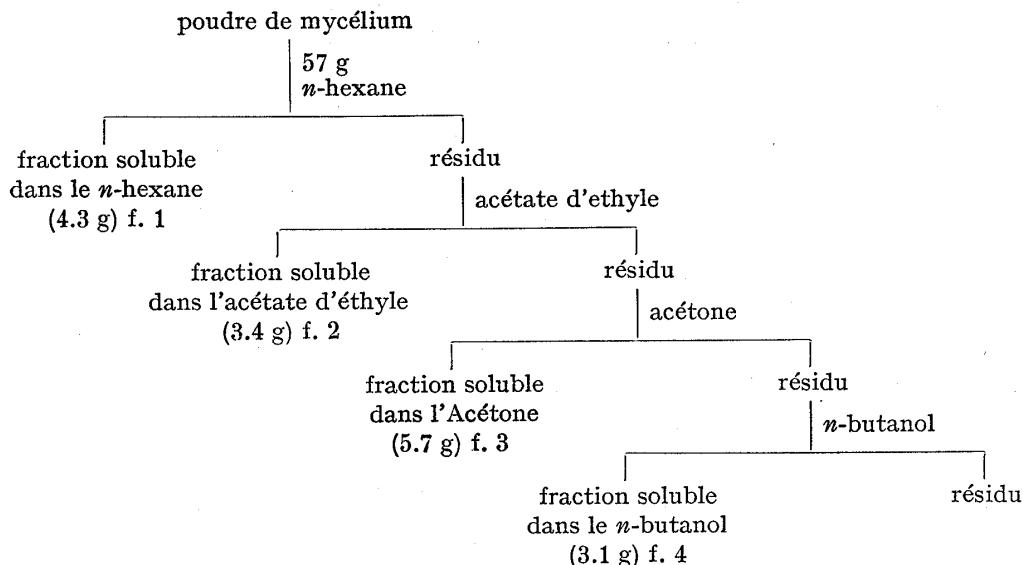


Fig. 1. Voie de L'extraire des Toxines

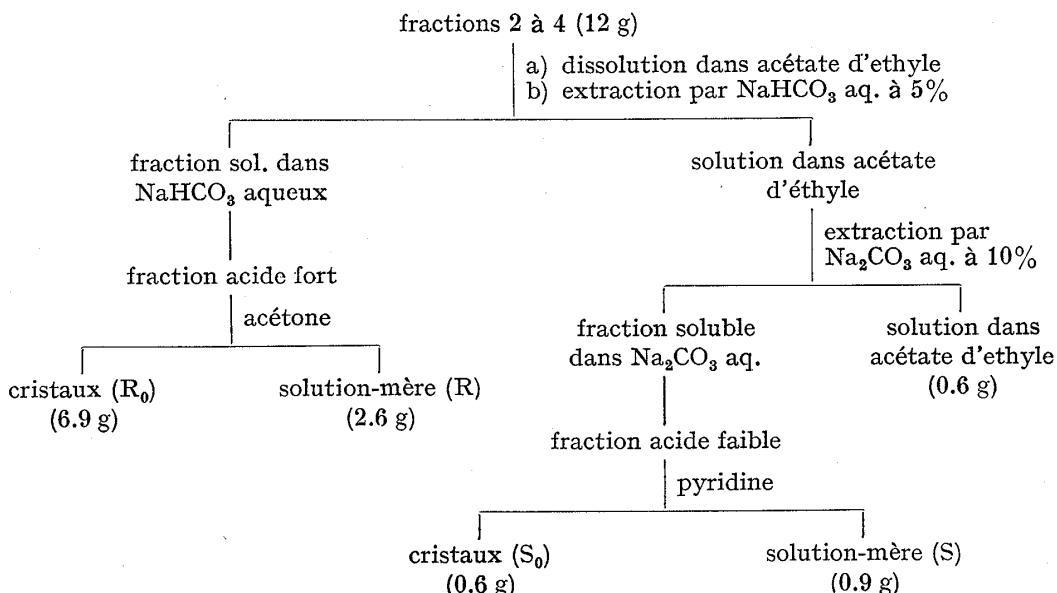


Fig. 2. Fractionnement des Toxines

Nous avons examiné les fractions 2, 3 et 4 par chromatographie sur couche mince, et les extraits se sont tous révélés identiques, bien que les quantités extraites aient été différentes. Ces fractions ont donc été rassemblées et sont servi de base aux phases suivantes de l'extraction.

## 2) Purification des substances toxiques.

On dissout l'extrait dans l'acétate d'éthyle, et après addition de solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> à 5%, on isole la fraction acide fort, tandis que la fraction acide faible est extraite du surnageant par une solution aqueuse de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10%, comme le montre le schéma de la figure 2.

La fraction acide fort contient une grande quantité de rugulosine, et par cristallisation dans l'acétone chaude, nous avons isolé ce produit pur, alors que la solution-mère est encore très riche en cette substance et en un mélange non défini.

4) M. Saito, K. Ohtsubo, M. Umeda, M. Enomoto, H. Kurata, S. Udagawa, F. Sakabe, and M. Ichinoe, *Japan J. Exp. Med.*, **41**, 1 (1971).

TABLEAU I. *Rf* et Coloration des Fractions

Fractions	<i>Rf</i>	Coloration	Subltance correspondant
$R_0$	0.45	jaune pâle→jaune	rugulosine
$R$			
$R_0$	0.45		
$R_1$	0.46	jaune→cramoisi	
$R_2$	0.42	jaune pâle→jaune	
$S_0$	0.72	orange pâle→orange	skyrine
$S_1$	0.75	jaune foncé→orange	
$S_0$	0.72		
$S_2$	0.55	orange pâle→cramoisi	
$S_3$	0.47	jaune→orange	

La fraction acide faible contient la skyrine, et apres dissolution dans la pyridine, à chaud, on laisse cristalliser à 0°. La solution de pyridine contient encore un peu de skyrine et d'autres substances.

**Etudes Chimiques et Biologiques**—1) Chromatographie sur couche mince des fractions  $R_0$ ,  $R$ ,  $S_0$  et  $S_1$ .

Préparation des plaques: base (sulfate de calcium-gel de silice) acide oxalique (0.5 g/30 g de base). Eluant: benzène-acétone (6: 1, à 22°). Les résultats de la chromatographie sont rassemblés Tableau I.

2) Caractérisation de rugulosine et skyrine.

a) La fraction  $R_0$  est recristallisée dans le méthanol, puis séchée une journée à 60° sous pression réduite.

Caractères physiques: Point de fusion 290° (décomposition),  $\alpha_D^{25}$ ; +490 (dioxanene), IR;  $\nu_{C=O}$  1680, 1620  $\text{cm}^{-1}$ .

$R_0$  est identique en tous points a la (+)rugulosine.

Le rendement obtenu à partir de 57 g de mycélium desséché de *P. tardum*, est de 7.2 g.

b) La fraction  $S_0$  est recristallisée dans la pyridine, puis éthoxycarbonysée par le chlorocarbonate d'éthyle, selon la méthode habituelle.

Point de fusion 171—172°; Ensuite, cristallisation dans le *n*-butanol.

L'éthoxycarbonate de la fraction  $S_0$  est identique à l'hexaéthoxycarbonate de skyrine: Point de fusion, spectres infrarouge et résonance magnétique nucléaire (IR et RMN) identiques. (1.17 ppm, t, 6H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ; 1.25 ppm, t, 12H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ; 2.2 ppm, s, 6H, arom.  $-\text{CH}_3$ , 4.08 ppm, q, 4H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ; 4.42 ppm, q, 8H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ; 7.2—7.8 ppm, m, 6H, arom.  $-\text{H}$ ).

3) Purification et identification de  $S_1$ .

La purification du résidu  $S_1$  fut effectuée par chromatographie sur couche mince préparative: base (sulfate de calcium-gel de silice) acide oxalique 51 g/60 g de base).

Le point de fusion des cristaux obtenus dans l'acétone est 254—257°.

Autres caractéristiques physiques observées: UV;  $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$  252,264, 280,440 nm. IR;  $\nu_{OH}$  3370,  $\nu_{C=O}$  faible; 1665, 1676  $\text{cm}^{-1}$ , fort; 1620  $\text{cm}^{-1}$ .

Par acétylation, nous obtenons le dérivé acétylé de  $S_1$ . L'acétate de  $S_1$  est identique au triacétate d'émodine (même point de fusion que le melange  $S_1$ +triacétate-émodine).

Nous n'avons pas observé de dépression des points de fusion.

4) Purification et identification de  $R_1$ .

a) Purification par reprise dans l'éther et extraction par plusieurs passages dans une solution aqueuse à 10% de  $\text{MgCl}_2$ . Puis acidification par l'acide sulfurique et extraction du pigment à l'éther. Lavage à l'eau de la solution éthérée et séchage sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Après évaporation de l'éther, nous avons obtenu 30 mg de pigment orange.

Ce pigment passé en chromatographie extractive fut réduit à 24 mg de poudre  $R_1$  pure.

b) Identification

Spectre de Masse;  $m/e$  314 ( $\text{M}^+$ ), 296 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{M}^* = 279.3$ ), 268 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}-\text{CO}$ ,  $\text{M}^* = 242.6$ ): UV;  $\lambda_{\text{max}}^{\text{methanol}}$  225, 248, 253, 268, 288, 435 nm: IR;  $\nu_{OH}$  3360,  $\nu_{C=O}$  1715, 1660, 1620  $\text{cm}^{-1}$ . Acétate de  $R_1$ ; point de fusion 215—217°.

D'après le spectre de masse et la réaction colorée du  $\text{Mg}(\text{AcO})_2$ -méthanol, on peut penser que  $R_1$  est un dérivé de  $\alpha$ -hydroxyl-anthraquinone portant un carbonyle adjacet au groupement  $\alpha$ -hydroxyle.

Ces résultats nous ont incité à rapprocher la substance  $R_1$  de l'endocrocine, isolée auparavant de la toxine d'*Aspergillus amsterdami*, par Mr. S. Shibata.<sup>5)</sup> Et c'est grâce à un échantillon qu'il nous a fourni complaisamment, que nous avons pu vérifier cette hypothèse, par comparaison des spectres IR et des chromatographies sur couche mince. Les résultats sont absolument identiques.

5) S. Shibata and S. Natori, *Pharm. Bull.*, 1, 160 (1953).

TABLEAU II. Essai Biologique; L'inhibition des cellules HeLa et (F.L.)

Fraction	100 µg/ml	36 µg/ml	10 µg/ml	3.6 µg/ml
R <sub>0</sub>	4 <sup>a)</sup>	4	4	2 <sup>b)</sup>
S <sub>0</sub>	4	1 <sup>c)</sup>	0 <sup>d)</sup>	0
S <sub>1</sub>	4	4	2	0
(émodine)	(4)	(3) <sup>e)</sup>	(1)	(0)
R <sub>1</sub>	4	4	2	1
(endocrocine)	(4)	(3)	(2)	(2)

a) 4: Inhibe totalement la prolifération des cellules HeLa (F.L.)

b) 2: Inhibe un peu la prolifération des cellules HeLa (F.L.)

c) 1: Pas d'inhibition, légères modifications des noyaux

d) 0: Identique au témoin

e) 3: Inhibe partiellement la prolifération des cellules HeLa (F.L.)

5) Essai biologique; les résultats de l'inhibition des cellules HeLa et F.L. sont rassemblés dans le Tableau II.

### Discussion

Nous avons fractionné et purifié les substances toxiques de *P. tardum*, pour examiner l'activité biologique de chaque produit isolé. Nous avons pu déterminer la présence de deux sortes de pigments inhibant la prolifération des cellules HeLa et F.L. Il s'agit respectivement de l'émodine et de l'endocrocine.

Ces deux substances avaient déjà été découvertes dans les toxines de moisissures telles que *P. islandicum*, *P. brunneum*, *Chetomium elatum*, etc.— Mais aucun article n'a encore rapporté la présence d'émodine dans *P. tardum*.

Par contre, l'émodine est une substance extraite de la rhubarbe et elle est employée comme laxatif, ce qui semblerait expliquer les effets observés chez le rat. En outre, Mr. Y. Ueno<sup>6)</sup> indique dans sa publication que l'émodine inhibe la prolifération du Protozoon tetra-hymena Pyriformis G.L., avec la même force que la lutéoskyrine et la rugulosine.

Shibata, *et al.* rapportent que l'endocrocine est une substance métabolique d'*Aspergillus amsterdami*, mais la toxicité de cette substance n'est pas discutée dans cette publication. Cependant, la toxicité de l'endocrocine nous est apparue un peu plus forte que celle de l'émodine.

En considérant les résultats, nous pouvons dire que les substances soient cytotoxiques sur la cellule même, mais il s'agissait de la toxicité de ces substances sur les mammifères. Nous allons pousser plus avant la recherche toxicologiques sur la souris et les autres mammifères.

**Remerciements** Cette recherche a été aidée en partie par un crédit du Fonds de Recherche pour l'Agriculture et la Pisciculture du Ministère Japonais de l'Agriculture (Année 1972—1973).

6) Y. Ueno and M. Saheki, *Japan. J. Exp. Med.*, 38, 157 (1968).