

[Chem. Pharm. Bull.]
28(4)1062-1066(1980)

Recherche Toxicologique des Substances Métaboliques de *Penicillium carneo-lutescens*

YASUO FUJIMOTO, MARIKO KAMIYA, HIROSHI TSUNODA,^{1a)}
KOICHIRO OHTSUBO,^{1b)} et TAKASHI TATSUNO^{1a)}

*Institut de la Recherche physique et Chimique^{1a)} et Tokyo Metropolitan
Institute of Gerontology Dept. of Clinical Pathology^{1b)}*

(Reçu le 29 Aout, 1979)

Toxicological research on the metabolites of *Penicillium carneo-lutescens* was carried out by us, and mycophenolic acid and botryodiplodin were isolated and detected as the two main toxic metabolites of this fungi.

The cytotoxicity of mycophenolic acid and the injuries on the thymus and the spleen caused by botryodiplodin were came to light.

Keywords—*Penicillium carneo-lutescens*; mycotoxin; mycophenolic acid; botryodiplodin; inhibition of HeLa cells-proliferation; caryorexis of thymus lymphocytes

Depuis presque dix ans, on a souvent trouvé des morts accidentelles de veaux qui ont été élevés par les fourrages commerciaux dans les régions de Tottori et de Shimane, régions qui font face à la mer du Japon.

Pour chercher la cause de ces accidents, on a recherché des maladies contagieuses des veaux par les bactéries ou les virus, mais on n'a pu découvrir aucune bactérie ou virus.

Nous nous doutons dernièrement que la cause de ces accidents est une mycotoxicose par les substances métaboliques de petits champignons qui polluaient les fourrages commerciaux. Après les avoir examinés microbiologiquement, nous avons découvert deux sortes de petits champignons, *Penicillium ochraceum* et *Penicillium carneo-lutescens* dans ces fourrages.

En ce qui concerne *Penicillium ochraceum*, nous avons déjà découvert qu'il produisait l'acide penicillique en culture liquide,²⁾ et nous avons aussi montré la toxicité de cette substance. Mais quant à *Penicillium carneo-lutescens* on n'a fait jusqu'alors ni recherche toxicologique ni recherche chimique.

Nous allons rapporter le résultat de la recherche toxicologique de *Penicillium carneo-lutescens*.

Matériel et Méthodes

1) **Culture**—On a cultivé *Penicillium carneo-lutescens* dans la solution de Czapek additionnée de 1% d'extrait de la levure, à 25° pendant 3 semaines. Dans la solution cultivée, on a ajouté 2% de charbon actif. On a récolté le charbon et on l'a lavé avec de l'eau et puis on a fait l'élution des toxines par le méthanol à partir du charbon. Après avoir évaporé le méthanol, on a obtenu l'extrait toxique, violet-rouge, de *P. carneolutescens*.

2) **Isolement des Toxines**—Pour isoler les toxines, on a employé la chromatographie sur colonne de gel de silice et comme système solvant, on a employé le mélange benzène-acétone (4:1) ou benzène-acétate d'éthyle (1:1). On a vérifié la pureté de la toxine dans chaque fraction par chromatographie sur couche mince avec le même système de solvants que la chromatographie sur colonne.

3) **Détermination des Structures Chimiques des Toxines**—On a établi la structure chimique de chaque substance toxique en considérant les résultats de résonance magnétique nucléaire (RMN), du spectra de masse, de l'absorption du spectre ultraviolet (UV) et infrarouge (IR) des substances toxiques mêmes et de leurs

1) Location: a) Hirosawa, Wako-shi, Saitama, 351, Japan; b) Sakashita-cho Itabashi, Tokyo, Japan.
2) H. Tsunoda, K. Kishi, K. Okubo, T. Tatsuno, and K. Ohtsubo, *Proc. Japan. Assoc. of Mycotoxicol.*, 5.6, 11 (1978).

dérivés. Quand on pouvait comparer la substance toxique obtenue à un témoin connu, on l'a identifié par IR et RMN.

4) **Examen de la Toxicité des Substances**—Pour examiner la cytotoxicité des substances, on a mesuré l'activité de l'inhibition de chaque fraction et de la substance pure, sur la prolifération des cellules HeLa selon la méthode que K. Ohtsubo³⁾ *et al.* ont déjà publiée, et on a établi le protocole de purification des substances toxiques. On a aussi observé la mortalité des souris (souche ddys) avec quelques étapes de purification et avec la substance pure.

Résultats

1) Isolement des Substances Toxiques

Le résultat de l'examen cytotoxique avec les cellules HeLa nous a montré qu'il y avait deux sortes de substances toxiques dans la fraction de *Rf.* voisin de 0.5, en chromatographie sur couche mince; (système de solvants: benzène-acétone=4:1). Une des toxines de *Rf.* 0.50 émettait une fluorescence sous le rayon d'UV(2537 Å), et l'autre de *Rf.* 0.48 brunissait après avoir chauffé à 120 ° avec l'acide sulfurique pulvérisé.

Nous avons isolé ces deux substances en employant la chromatographie sur colonne de gel de silice avec le mélange de solvants, benzène-acétate d'éthyle (1:1).

Après avoir évaporé le solvant, nous avons obtenu une huile incolore qui s'est solidifiée partiellement en quelques heures. Nous avons séparé le solide et l'huile, et après avoir recristallisé le solide par le méthanol, nous avons obtenu des cristaux aigues incolores, f. 140—142°.

Nous avons fait redissoudre l'huile dans l'acétate d'éthyle et l'avons lavée avec une solution aqueuse à 5% de bicarbonate de sodium pour éliminer la fraction acide. Après avoir évaporé l'acétate d'éthyle, nous avons obtenu l'huile incolore: qui s'individualise en deux spots très voisins, de *Rf.* 0.33, en chromatographie sur couche mince de silice avec comme système solvant: benzène-acétate d'éthyle (1:1).

Pour isoler les deux substances, nous avons employé la chromatographie liquide sous haute pression: colonne de gel de silice et comme système solvant, l'éther saturé d'eau. Alors, nous avons isolé deux sortes d'huiles pures; une est l'huile majeure et l'autre est l'huile mineure.

2) Identification des Toxines

i) **La Toxine Acide**—Par les résultats de spectre de masse, $M: 320(m/e)$ et de l'analyse d'élémentaire, nous avons donné la formule moléculaire, $C_{17}H_{20}O_6$, à la toxine acide, f. 142°. Avec cette substance la réaction colorés au $FeCl_3$ est positive, et le spectre d'absorption IR, nous a montré qu'elle a des groupes hydroxyle, carbonyle de la lactone, et carbonyle.

Comme nous montrons dans le tableau I, les résultats de RMN indiquent que la toxine même et son dérivé d'éther de méthyle ont tous deux des protons de groupement vinyl, des protons d'un méthyle aromatique et d'un méthyle situé sur le carbone de la double liaison. En outre pour le dérivé d'éther de méthyle nous avons trouvé des protons d'un méthoxy-carbonyle et d'un méthoxyle aromatique; mais, nous n'avons trouvé aucun proton aromatique. Nous avons donc pensé que tous les protons, situés sur le noyau aromatique, ont été substitués par les autres groupes; méthyle, méthoxyle, hydroxyle et carbonyle.

En considérant les résultats de ces mesures physico-chimiques, nous pensons que la structure chimique de cette substance est analogue à l'acide mycophénolique.⁴⁾ En effet, nous avons comparé nos résultats à ceux de témoins d'acide mycophénolique, et nous avons trouvé que la toxine obtenue est identique à l'acide mycophénolique.

ii) **La Toxine Neutre**—L'examen IR de la toxine neutre suggère que cette toxine a des groupes carbonyle ($\nu_{C=O}$ 1710 cm^{-1}) et hydroxyle (ν_{OH} 3400 cm^{-1}), elle-même n'a pas cristallisé, mais nous avons synthétisé le dérivé *p*-nitrobenzoate, en employant le chlorure de *p*-

3) K. Ohtsubo, M. Yamada, and M. Saito, *Japan J. Med, Sci, Biol.*, **21**, 185 (1968).

4) J.H. Birkinshaw, A. Bracken, E.N. Morgan, and H. Raistrick, *Biochem. J.*, **43**, 216 (1948).

TABLEAU I. Propriétés Physico-chimiques de la Substance Acide et de son Dérivé Méthylé

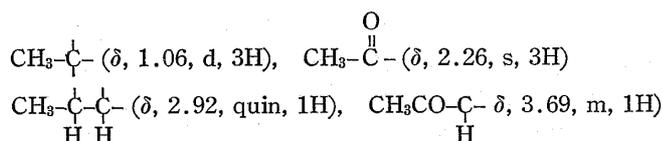
1) Substance acide	
IR: ν_{\max}^{KBr} (cm ⁻¹)	3400, 1740, 1700, 1620.
RMN: $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$ (ppm)	1.80 (3H, s), 2.14 (3H, s), 2.24—2.50 (4H, m)
	3.39 (2H, d), 3.77 (3H, s), 5.20—5.30 (3H, m)
2) Dérivé méthylé	
M ⁺ <i>m/e</i> 348.3: formule moléculaire: C ₁₉ H ₂₄ O ₆	
Analyse élémentaire	
observé (%) C: 63.22 H: 6.28	
calculé (%) C: 63.73 H: 6.29	
RMN: $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$ (ppm)	1.82 (3H, s), 2.19 (3H, s), 2.3—2.5 (4H, m), 3.42 (2H, d),
	3.62 (3H, s), 3.78 (3H, s), 4.06 (3H, s), 5.1—5.2 (3H, m)

TABLEAU II. Propriétés Physico-chimiques de la Substance Neutre et de son Dérivé

IR: ν_{\max}^{KBr} (cm ⁻¹)	3400, 1710
Dérivé <i>p</i> -Nitrobenzoylé : f. 138—140°	
M ⁺ <i>m/e</i> : 296.2 formule moléculaire: C ₁₄ H ₁₅ O ₆ N	
IR: ν_{\max}^{KBr} (cm ⁻¹)	1710
RMN: $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$ (ppm)	1.06 (d, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.92 (quin, 1H), 3.69 (m, 1H)
	4.22 (d, 1H), 4.51 (d, 1H)

nitrobenzoate et la pyridine, et f. est 138—140°. Nous avons examiné la structure chimique de ce *p*-nitrobenzoate. Nous montrons les résultats physico-chimiques de ce dérivé dans le tableau II.

Nous avons déduit la structure partielle de cette substance en tirant le meilleur parti possible des résultats des mesures physico-chimiques:



En outre, nous avons vérifié en détail le découplage par l'irradiation et la mesure du shift chimique par l'addition de Eu(fod)₃d₂₇. En considérant ces résultats, nous avons déduit la structure chimique de la substance, C₁₉H₁₅O₆N, comme la figure 1 l'indique.

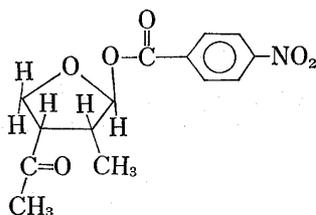


Fig. 1. Structure Chimique du Dérivé *p*-Nitrobenzoylé de la Substance Neutre

Alors, nous avons déterminé que la toxine majeure neutre est le hydroxy-2 méthyle-3 acétyle-4 tétrahydrofurane. D'ailleurs, la toxine mineure qui a été isomérisée par la bicarbonate de sodium est un isomère diastéréomérique concernant le C-4 substitué par le groupe acétyle.

Cette substance est déjà publiée comme étant la botryodiplodin, substance métabolique de *Botryodiplodia theobroma* Pat, dont toutes les valeurs physico-chimiques de notre toxine coïncident avec celles que R.Sen Gupta *et al.* ont déjà publiée.⁵⁾

5) R. Sen Gupta, R.R. Chandran, and P.V. Divekar, *Indian J. Exp. Biol.*, 4, 152 (1966).

Comme essai préliminaire, nous avons administré intrapéritoneralement aux souris 10 mg/kg et 35 mg/kg de fractions, l'acide micophénolique et la botryodiplodin et nous avons observé les souris pendant trois jours. En cas d'administration de 10 mg/kg, nous avons trouvé une mortalité de 1/4 et en cas de 34 mg/kg, nous avons trouvé une mortalité de 2/2.

Le résultat de la vérification histopathologique des souris mortes nous a montré les mêmes lésions pathologiques que nous décrivons ci-dessous en cas de l'administration de la botryodiplodin pure; c'est-à-dire, que la toxicité de cette fraction était causée par celle de la botryodiplodin.

Cependant, dans l'essai de la culture de cellule HeLa, nous avons trouvé des résultats intéressants pour l'acide mycophénolique. Avec la technique qu'Ohtsubo *et al.* ont déjà publiée sur l'inhibition de la prolifération de la cellule HeLa par autres mycotoxines, les résultats que nous avons obtenus avec l'acide mycophénolique, sont montrés dans le tableau III.

TABLEAU III. Inhibition de la prolifération des cellules HeLa

Substance	Concentration de la substance			
	10 ng/ml	3.2 ng/ml	1.0 ng/ml	0.32 ng/ml
nivalénol	4.0 ^{a)}	4.0	4.0	2.0
Acide Mycophénolique	3.5	3.0	2.5	2.0

a) le chiffre donné représente le degré d'inhibition de la prolifération des cellules HeLa.

4.0: inhibition complétet de la prolifération

3.0: inhibition la partielle de la prolifération

2.0: inhibition faible de la prolifération, mais la dégénération des noyaux et la réduction des nucléoles est forte

1.0: pas d'inhibition de la prolifération, et la dégénération des noyaux et la réduction des nucléoles est faible

0.0: comparable au témoin

Quand nous comparons les résultats à celui du nivalenol qui est connu comme inhibiteur de la biosynthèse des protéines et de l'acide desoxyribonucléique, en cas de l'acide mycophénolique, même si la dose est considérable, l'inhibition de la prolifération des cellules HeLa n'était pas totale, mais la courbe d'inhibition de la prolifération s'inclinait doucement.

Quant à la dégénération des noyaux, pour toutes les doses, nous avons trouvé une réduction du nucléole, et en particulier, nous n'avons pas pu observer de nucléole pour des doses supérieures à 3.2 ng/ml.

Selon K. Ohtsubo, les toxines qui inhibent la prolifération des cellules HeLa, avec une courbe inclinée doucement et qui ont une faible toxicité pour les animaux, inhibent, dans presque tous les cas, la biosynthèse de l'acide ribonucléique.

a) Toxicité de la Botryodiplodin et de Son Isomère

Nous avons examiné l'effect léthal aigu de la botryodiplodin et de son isomère. 48 souris mâles, de souche ddYS, de quatre semaines, ont été divisées en 8 groupes. Les toxines ont été dissoutes dans de l'eau distillée, 10 ng/ml, diluées par du sérum artificiel et injectées par voie intrapéritonéale à la dose de 0.1 ml/10 g de poids du corps des souris. La période de l'observation était d'une semaine.

Comme nous montrons dans le tableau IV, l'isomère diastéréomérique n'était pas toxique même à la dose la plus haute que nous avons administrée, 24 mg/kg, en effect, il n'y a eu aucun symptôme. Au contraire, la botryodiplodin était nettement toxique, avec une DL₅₀ de 16.8 mg/kg.

L'autopsie de quelques cadavres révélait un exsudat fibrineux dans la cavité péritonéale, un gonflement hydropique, une dilatation du jejunum et de l'iléon haut avec un contenu augmenté de la bile. Aucune hémorragie n'a été observée.

A cause de l'autolyse augmentée des cadavres, nous n'avons pas obtenu d'observation histopathologique dans cet examen.

TABLEAU IV. Mortalité des Souris Apres Injection par la Voie *i.p.* de Botryodiplodin

(Dcse)	No. des animaux utilisés	No. des animaux morts par jours après l'injection							No. total des animaux morts
		1	2	3	4	5	6	7	
Botryodiplodin									
6 mg/kg	6								0
12 mg/kg	6							1	1
17 mg/kg	6					3			3
24 mg/kg	6		4		1				5
34 mg/kg	6		4	1		1			6
Isomère du botryodiplodin									
6 mg/kg	6								0
12 mg/kg	6								0
24 mg/kg	6								0

DL₅₀ du botryodiplodin: 16.8 mg/kg (12.6—22.3, $p=0.05$).

b) Exament Histopathologique des Souris Auxquelles on a Injecté les Toxines de *P. Carneolutescens*

Pour éclaircir la cible affectée par les toxines, à la période mourante, nous avons sacrifié les souris qui avaient reçu 100 mg/kg ou 50 mg/kg de toxines.

En cas d'administration de 100 mg/kg, nous avons trouvé la vacuolisation des cellules hépatiques dans la région du lobule central.

Il y avait aussi vacuolisation de l'épithélium tubulaire dans le tubule proximal du rein. La caryoréxie et la déplétion des lymphocytes ont été également observées dans le cortex du thymus. Les caryoréxies ont été observées dans le follicule lymphatique de la rate, et les cellules de la pulpe rouge ont été aussi réduites.

Nous avons pu observer macroscopiquement quelques dilatations, mais il n'y avait pas de changement remarquable dans l'épithélium du jéjunum et de l'iléon. Nous n'avons pas observé de lésions graves excepté une congestion aiguë.

Dans le cas d'administration de doses inférieures de toxine, nous n'avons observé histopathologiquement que l'atrophie du cortex thymique et une caryorexie faible dans le follicule splénique.

Discussion

Il n'y avait aucune étude toxicologique jusqu'ici, des substances métaboliques de *Penicillium carneolutescens*.

En considérant qu'il y ait quelque relation entre la toxicité des substances métaboliques de *P. carneolutescens* et l'intoxication des veaux dans les régions qui font face à la mer du Japon, nous avons fait une recherche toxicologique des substances métaboliques de ce petit champignon.

Nous avons pu isoler, en effet, deux sortes de toxines; l'une était la toxine principale, la botryodiplodin, qui a été décrite comm étant la substance métabolique de *Botryodiplodia theobroma* Pat par R.Sen. Gupta, et l'autre était l'acide mycophénolique qui a été isolé par H. Raistricle et W.R. Logan comme étant une substance métabolique de *P. brevicompactum* DIERCKX, *P. stoniferum* THOM, et *P. urticae*.

Selon notre recherche, nous avons pour la première fois mis en lumière, les propriétés toxicologiques de ces deux substances et nous pensons que les toxines jouent un rôle certain dans l'intoxication des fourrages des veaux.

Remerciement Nous remercions le Ministère des Sciences et de la Technologie du Japon qui a fourni une partie des fonds pour cette recherche.