

LA CITRÉOMONTANINE, NOUVELLE α -PYRONE POLYÉTHYLÉNIQUE ISOLÉE DE *PENICILLIUM PEDEMONTANUM*

SYLVIE REBUFFAT, DANIEL DAVOUST, LUCIE MOLHO et DARIUS MOLHO

Laboratoire de Chimie du Muséum National d'Histoire Naturelle, 63 rue Buffon, 75005—Paris, France

(Reçu le 8 juin 1979)

Key Word Index—*Penicillium pedemontanum*; *P. pulvillorum*; Aspergillaceae; citreoviridin; citromontanin; polyene; pyrone-2.

Abstract—Citreomontanin, a new polyene 2-pyrone was isolated from the mycelium of *P. pedemontanum*. Based upon spectral data, it was assigned the structure: (all-*E*)-4-methoxy-5-methyl-6-(7,9,11-trimethyl-1,3,5,7,9,11-tridecahexaenyl)-2 *H*-pyran-2-one.

INTRODUCTION

P. pedemontanum est une souche de *Penicillium* décrite pour la première fois en 1963 [1] et encore peu étudiée quant à ses métabolites. Une mycotoxine, la citréoviridine (1), déjà isolée à partir d'autres souches de *Penicillium* (*P. toxicarium*, *P. citreoviride*, *P. pulvillorum*) [2] y a été rencontrée récemment [3]. Nous rapportons ici l'isolement et la description d'une autre lactone à enchaînement polyénique que nous proposons de nommer citréomontanine.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La citréomontanine a été extraite à partir du mycélium fraîchement récolté, humide ou lyophilisé de *P. pedemontanum*. Du fait de son instabilité, ce produit n'est pas isolable lorsque le mycélium est séché avant l'extraction. Après purification par chromatographie sur colonne et recristallisation, la citréomontanine est obtenue sous forme de cristaux orange. Sa masse moléculaire (352) et sa formule

brute ($C_{23}H_{28}O_3$) ont été déterminées par SM haute résolution (Tableau 2). L'analyse des données spectrales nous a conduits à proposer pour la citréomontanine la structure 2.

La bande à 1710 cm^{-1} observée en IR et l'absorption à 415 nm en UV, comme dans le cas de la citréoviridine [2], sont favorables à la présence d'un cycle α -pyronique substitué par une chaîne éthylénique. Le spectre de RMN du proton fait apparaître 5 méthyles, un méthoxyle et 10 protons éthyléniques, mais sa complexité le rend difficilement interprétable, même à 270 MHz. La présence d'un singulet à 5,39 ppm caractérise le proton éthylénique H_3 situé en α du carbonyle. L'enregistrement du spectre dans le benzène met en évidence pour ce proton un effet de blindage de 0,25 ppm, identique à celui décrit pour la citréoviridine [2].

Pour augmenter les inéquivalences entre les protons, nous avons additionné des quantités croissantes de $Eu(fod)_3$. Les déplacements induits par l'association du chélate avec la fonction lactone de la pyrone (Fig. 1) montrent que cette dernière est substituée en 4 et

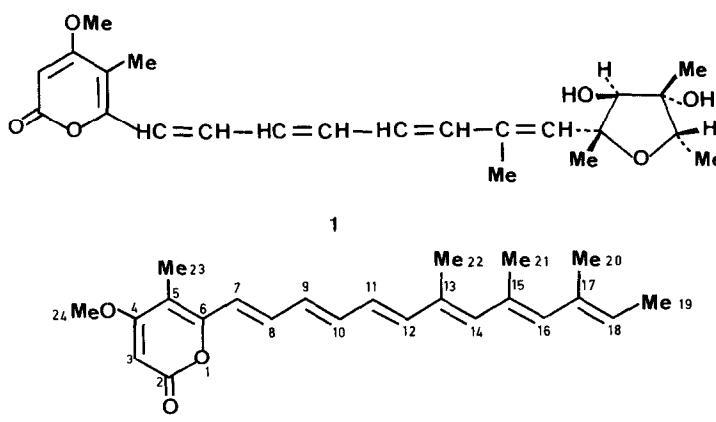


Tableau 1. Spectre de RMN du ^1H à 270 MHz de la citréomontanine, sans chélate, et après addition de $\text{Eu}(\text{fod})_3$

sans chélate			+ $\text{Eu}(\text{fod})_3$		
Nbre de protons	δ (ppm)	Attribution J (Hz)	Nbre de protons	δ (ppm)	Attribution J (Hz)
3	1,65 (s)		3	1,64 (d)	$\text{Me}_{19}\text{J}_{\text{Me}_{19}\text{H}_{18}} = 7$
3	1,71 (s)	Me sur double liaison	3	1,68 (s)	$\text{Me}_{20}, \text{Me}_{21}$
6	1,88 (s)		3	1,88 (s)	
3	1,91 (s)		3	1,96 (s)	Me_{22}
			3	2,72 (s)	Me_{23}
3	3,74 (s)	OMe_{24}	3	4,08 (s)	Me_{24}
1	5,39 (s)	H_3			
1	5,39 (m)	H_{18}	1	5,41 (q)	$\text{H}_{18}\text{J}_{\text{Me}_{19}\text{H}_{18}} = 7$
1	5,81 (s.e.)	H_{16}	1	5,81 (s.e.)	H_{16}
1	5,99 (s.e.)	H_{14}	1	5,96 (s.e.)	H_{14}
			2	6,37 (d q)	$\text{H}_{11} + \text{H}_{12}\text{J}_{\text{H}_{11}\text{H}_{12}} = 15$ (2) $\text{J}_{\text{H}_{10}\text{H}_{11}} = 10$
5	6,15 à 6,56 (m.c.)	H_7 à H_{12}	2	6,73 (q q)	$\text{H}_9 + \text{H}_{10}\text{J}_{\text{H}_9\text{H}_{10}} = 15$ (2) $\text{J}_{\text{H}_8\text{H}_9} = \text{J}_{\text{H}_{10}\text{H}_{11}} = 10$
1	6,22 (d)	H_7	1	7,19 (d)	$\text{H}_7(1)\text{J}_{\text{H}_7\text{H}_8} = 15$
1	7,14 (q)	$\text{H}_8\text{J}_{\text{H}_7\text{H}_8} = 15$ $\text{J}_{\text{H}_8\text{H}_9} = 10$	1	8,68 (q)	$\text{H}_8\text{J}_{\text{H}_7\text{H}_8} = 15$ $\text{J}_{\text{H}_8\text{H}_9} = 10$
			1	9,42 (s)	H_3

$[\text{L}_0]/[\text{S}_0] = 0,4$; CDCl_3 , HMDS réf. int.; s.e.: singulet élargi; m.c.: massif complexe.

(1) Déplacement chimique estimé par extrapolation de la courbe $\delta\nu_{\text{induit}} = f([\text{L}_0]/[\text{S}_0])$.

(2) La courbe $\delta\nu_{\text{induit}} = f([\text{L}_0]/[\text{S}_0])$ ne pouvant être tracée avec une précision suffisante pour ces protons, les déplacements chimiques sans lanthanide ne peuvent être estimés.

en 5, respectivement par un méthoxyle et un méthyle.

Des expériences de double irradiation permettent l'attribution des différents signaux (Tableau 1). L'aspect élargi des signaux imputables à H_{14} et H_{16} indique que ces protons sont couplés simultanément avec des méthyles et des protons éthyléniques, ce qui confirme leur position et celle des méthyles 20 et 21. Il

faut également souligner que H_{14} subit un léger blindage en présence de chélate. Le sens du déplacement observé est attribuable à l'intervention du facteur angulaire de la relation de McConnell-Robertson [4]. La position du méthyle 22 est mise en évidence par sa vitesse de déplacement sous l'influence du chélate, et celle du méthyle 19 par le couplage observé avec H_{18} .

Tableau 2. Spectre de masse de la citréomontanine (200 $^{\circ}$, 70 eV, introduction directe)

m/e	AR%	Formule brute	Masse calculée	Masse observée	Fragmentations (1)
352	97	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_3$	352,2038	352,2040	M^+
337	21	—	—	—	a m^*
323	9	$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_3$	323,1647	323,1645	b m^*
297	12	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_3$	297,1490	297,1480	c m^*
245	12	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$	245,1178	245,1198	d m^*
232	47	$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_3$	232,1099	232,1097	e m^*
173	66	$\text{C}_{13}\text{H}_{17}$	173,1330	173,1432	g₁ m^*
171	28	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}$	171,1174	171,1175	g₂ m^*
199	26	$\text{C}_{15}\text{H}_{19}$	199,1487	199,1484	h m^*
160	38	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}$	160,1252	160,1250	f m^*
154	34	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$	154,0630	154,0646	i m^*
145	36	$\text{C}_{11}\text{H}_{13}$ $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}$	145,1017	145,1006	— (2), (3)
139	90	—	—	—	j
120	63	—	—	—	—
105	100	—	—	—	—
91	44	—	—	—	—

Formules brutes des principaux fragments déterminées en haute résolution.

(1) Les fragmentations marquées m^* (ions métastables observés) sont relatives à l'ion moléculaire.

(2) L'ion doublet à m/e 145 ne provient pas de l'ion moléculaire.

(3) Rapport des deux ions du doublet à m/e 145: $\text{C}_{11}\text{H}_{13}$: 6; $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}$: 1.

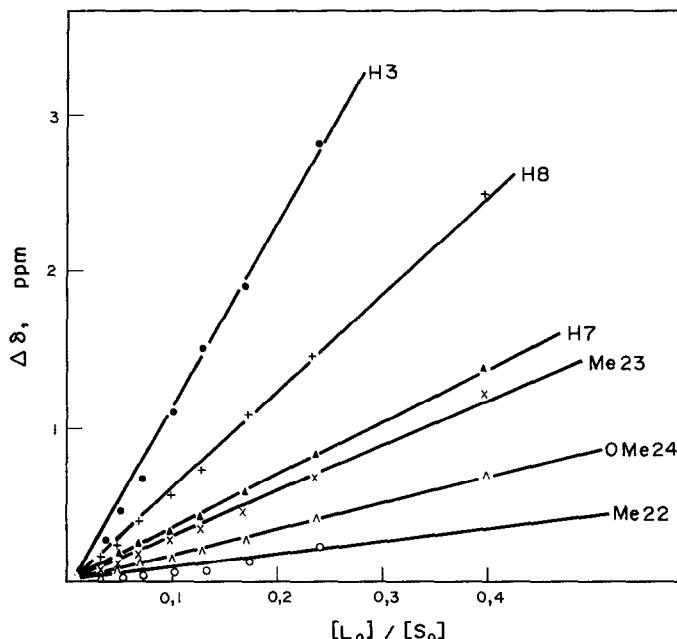


Fig. 1. Déplacements induits observés pour différents rapports des concentrations $[\text{Eu}(\text{fod})_3]/[\text{citréomontanine}]$ (80 MHz, CDCl_3 , TMS réf. int.). $[\text{L}_0]$: Concentration globale en chélate; $[\text{S}_0]$: concentration globale en substrat.

La localisation des méthyles 20, 21 et 22 est confirmée par l'examen en spectrométrie de masse du composé fourni par hydrogénéation catalytique de la citréomontanine sur charbon palladié. Les doubles liaisons de la chaîne éthylénique et la liaison $\text{C}_5=\text{C}_6$ sont alors saturées et le produit formé de masse 366 est constitué d'un mélange de δ -lactones α,β -éthyléniques diastéréoisomères. Il présente en SM les fragmentations favorables aux branchements latéraux postulés ($\text{M}^+ - 29, - 57, - 71, - 99, - 113, - 141$) dans une abondance relative supérieure à 10%, alors que les coupures caractéristiques d'un autre enchaînement ($\text{M}^+ - 43, - 85, - 127$) sont défavorisées [5] (Voir Partie Expérimentale).

Le spectre de masse de la citréomontanine est également en accord avec la structure de méthoxy-4 méthyl-5 (triméthyl-7,9,11 tridecahexaène-1,3,5,7,9,11 yl)-6 2H pyrannone-2 attribuée. Nous indiquons Fig. 2 les principales fragmentations observées à partir de l'ion moléculaire: elles sont pour la plupart d'entre elles voisines de celles rencontrées dans le cas des caroténoïdes [6]. Dans le cas de l'ion m/e 232, tout se passe comme si le méthyle 22 migrait en C_{12} , mais une étude plus précise de ce réarrangement reste à faire.

La stéréochimie de la citréomontanine est

dédoublable de l'analyse en RMN (^1H et ^{13}C) des déplacements chimiques, des constantes de couplage et des déplacements induits par $\text{Eu}(\text{fod})_3$. Les doubles liaisons $\text{C}_7=\text{C}_8$, $\text{C}_9=\text{C}_{10}$ et $\text{C}_{11}=\text{C}_{12}$ sont toutes de configuration *E* ainsi que le montrent les constantes de couplage de 15 Hz observées; ces trois liaisons sont coplanaires ($J_{\text{H}_8\text{H}_9} = J_{\text{H}_{10}\text{H}_{11}} = 10$ Hz); le déplacement induit de H_8 est plus intense que celui de H_7 , ce qui implique que la conformation de la liaison C_6-C_7 est *s-trans*; et la valeur du déplacement chimique de H_{16} permet de déduire la configuration de la liaison $\text{C}_{17}=\text{C}_{18}$. En effet, Cardenas a établi que, dans les butadiènes substitués, une différence de déplacement chimique de l'ordre de 1 ppm du proton en α de la double liaison considérée existait en fonction de sa configuration [7]. Ainsi, dans un cas assimilable au nôtre, ce déplacement chimique est de 6,30 ppm pour une liaison *E* et de 6,73 ppm pour une liaison *Z*. Dans notre cas, la valeur trouvée inférieure à 6 ppm (5,99 ou 5,81 en raison de l'ambiguité d'attribution entre les déplacements chimiques de H_{14} et H_{16}) nous permet d'attribuer la configuration *E* à la liaison $\text{C}_{17}=\text{C}_{18}$.

En RMN du ^{13}C , l'examen des déplacements chimiques des méthyles précise la configuration des liaisons $\text{C}_{13}=\text{C}_{14}$ et $\text{C}_{15}=\text{C}_{16}$ (pour les différents carbones, les attributions figurant Tableau 3 ont été proposées à

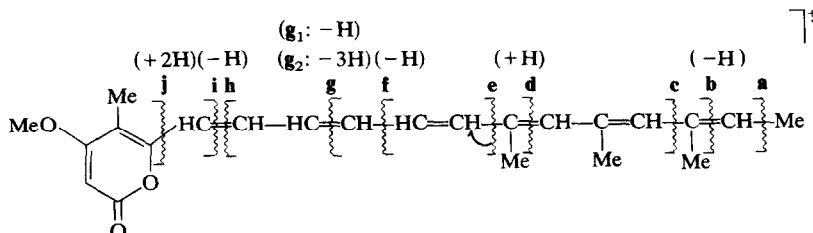


Fig. 2. Principales fragmentations observées à partir de l'ion moléculaire. La fragmentation **e** semble faire intervenir la migration du méthyle 22.

Tableau 3. Spectre de RMN du ^{13}C de la citréomontanine (CDCl_3 , TMS réf. int.)

δ (ppm)	Carbone	δ (ppm)	Carbone
163,79	C_2	132,30	C_{13}^*
88,68	C_3	136,59	C_{14}^{\dagger}
170,77	C_4	133,56	C_{15}^*
107,57	C_5	136,48	C_{16}^{\dagger}
154,97	C_6	133,79	C_{17}^*
118,39	C_7	125,95	C_{18}
142,43	C_8	13,91	C_{19}
127,20	C_9	16,77	C_{20}
139,80	C_{10}^{\ddagger}	18,94	C_{21}
130,75	C_{11}	14,13	C_{22}
139,28	C_{12}^{\ddagger}	8,87	C_{23}
		56,16	C_{24}

*.†‡: Ces valeurs peuvent être interverties.

l'aide des données de la littérature [8-11]). En effet, dans le cas d'une stéréochimie *E*, l'effet γ provoque un blindage du méthyle situé sur la double liaison concernée (déplacement chimique compris entre 12 et 18 ppm), alors que lorsque la configuration est *Z*, cette interaction stérique n'existe pas et le déplacement chimique des méthyles a une valeur comprise entre 23 et 25 ppm [9, 10].

Les valeurs que nous observons ici, comprises entre 13,9 et 18,9 ppm, sont donc en faveur d'une configuration *E* pour ces deux liaisons. Le déplacement chimique de 18,9 ppm est attribuable au méthyle 21. Il s'expliquerait par une non coplanéité des doubles liaisons $\text{C}_{13}-\text{C}_{14}$, $\text{C}_{15}-\text{C}_{16}$ et $\text{C}_{17}-\text{C}_{18}$, la torsion des liaisons simples $\text{C}_{14}-\text{C}_{15}$ et $\text{C}_{16}-\text{C}_{17}$ minimisant ainsi l'interaction stérique entre les méthyles 20, 21 et 22. Cet effet stérique serait également susceptible d'expliquer la valeur faible trouvée pour l'*e* relatif au maximum d'absorption en UV ($\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$: citréoviridine (1): 388 nm (48 000) [2]; citréomontanine (2): 415 nm (57 000)).

Le nouveau polyène que nous avons isolé possède une configuration *E* pour toutes les doubles liaisons. Nous constatons donc une similitude partielle de structure avec la citréoviridine. Nous avons en outre recherché la citréomontanine dans le mycélium d'un autre champignon synthétisant la citréoviridine, *P. pulvillorum*, et nous l'y avons rencontrée dans les mêmes proportions. Il se pourrait donc que citréomontanine et citréoviridine soient présentes conjointement dans les mêmes souches de champignons et qu'il existe une relation biosynthétique entre ces deux métabolites. Ce point fera l'objet d'une étude ultérieure.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les points de fusion (non corrigés) ont été pris sur platine chauffante Reichert. Les spectres de masse à haute résolution ont été réalisés sur spectromètre AEI MS 50 à double focalisation (Centre de spectroscopie de l'Université P. et M. Curie) (tension d'accélération 8 kV, énergie des électrons 70 eV, courant filament 0,5 mA); les mesures de masse exacte ont été effectuées avec une résolution de 15.000; les ions fragments issus de M^+ ont été déterminés par balayage combiné de la tension d'accélération et de la tension du

secteur électrique ($E^2/V = \text{Cte}$). Les spectres de masse à basse résolution ont été enregistrés sur le spectromètre Thomson THN 208. Les spectres de RMN du ^{13}C à 20,115 MHz (tubes utilisés de 10 mm de diamètre) et du ^1H à 80 MHz ont été obtenus sur un appareil Brücker WP 80 DS. Les spectres de RMN du ^1H à 270 MHz ont été réalisés sur un appareil Brücker WH 270 équipé en transformée de Fourier (Laboratoire du Prof. Roques, Université René Descartes). Les souches de *Penicillium pedemontanum* et de *P. pulvillorum* nous ont été fournies par la Mycothèque du Muséum National d'Histoire Naturelle.

Culture de Penicillium pedemontanum et de P. pulvillorum. Les cultures ont été effectuées soit en fioles de Roux, soit à l'aide du fermenteur Microferm New-Brunswick. Le milieu de culture et l'eau distillée utilisés ont été stérilisés à l'autoclave à 110° pendant 30 min. Les deux souches de champignons et les deux modes de culture fournissent des résultats comparables quant à la quantité de citréomontanine obtenue.

Culture en fioles de Roux. Le mycélium stérile en suspension dans de l'eau distillée est introduit dans les fioles contenant chacune 150 cm³ de milieu Czapek-Dox. Ces fioles sont maintenues 15 jours à 22°. Une fiole de Roux fournit 2 g de mycélium (poids sec évalué).

Culture en fermenteur. La suspension stérile de mycélium est introduite dans le fermenteur contenant 8 l. de milieu Czapek-Dox. La culture est maintenue à 22°, sous aération et agitation permanentes pendant 15 jours. Une culture fournit en moyenne 13 g de mycélium pour *P. pedemontanum* et 15 g pour *P. pulvillorum* (poids secs évalués).

Isolation et purification de la citréomontanine (2). Le mycélium est filtré et aussitôt lyophilisé ou extrait par MeOH. Dans ce dernier cas, le MeOH est ensuite distillé sous pression réduite. Le résidu obtenu ou le mycélium lyophilisé est repris par EtOAc. La solution d'EtOAc séchée et concentrée sous vide fournit un résidu brun rougeâtre qui est chromatographié sur colonne de silice (Si gel Merck—70-230 mesh; solvant d'élution: hexane-Me₂CO, 2:1). La citréomontanine est ensuite purifiée à nouveau par chromatographie sur colonne (Si gel; solvant d'élution: toluène-EtOAc, 7:3), puis par recristallisations, successivement dans le Me₂CO et le MeOH. La citréomontanine pure obtenue représente 0,5% du poids évalué de mycélium sec. Le jus de culture renferme également de la citréomontanine, mais en très faible quantité.

Citréomontanine (2). Cristaux orange, F°: 165-166 (MeOH). R_f : 0,49 (hexane-Me₂CO, 2:1); 0,47 (toluène-EtOAc, 7:3) (Plaques analytiques Si gel Merck 60 F 254). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 415 (4,75), 315 (4,17), 268 (4,13), 232 (4,15), 208 (4,25). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1710 ($\text{C}=\text{O}$), 1630, 1600, 1540, 1410, 1250.

Hydrogénéation catalytique de la citréomontanine. 50 mg de citréomontanine sont hydrogénés pendant 3 hr dans EtOH en présence de charbon palladié. Après filtration, on obtient un résidu huileux constitué d'un mélange de diastéréoisomères de la lactone α,β -insaturée correspondante ($\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_3$). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm: 215, 240, 290. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 2930, 1720, 1625. SM (70 eV, 200): M^+ : 366 (38%), 351 (27%), 141 (100%) 337 (10%), 309 (18%), 323 (1%) 295 (10%), 267 (45%), 281 (6%) 253 (16%), 225 (11%), 239 (3%).

Remerciements—Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à M. le Prof. J.-J. Basselier (Université P. et M. Curie) pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à notre travail. Nous remercions très vivement M. le Prof. B. P. Roques à qui nous devons l'obtention des spectres de RMN du ^1H à 270 MHz.

Nos remerciements vont également à Mlle J. Mercier pour la réalisation des spectres de masse à haute résolution ainsi qu'à M. J.-P. Brouard qui a effectué les spectres de masse à basse résolution. Nous remercions enfin Mmes J. Nicot et M. J. Charpentier qui nous ont procuré le matériel mycologique nécessaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Luppi Mosca, A. M. et Fontana, A. (1963) *Allionia* **9**, 35.
2. Sakabe, N., Goto, T. et Hirata, Y. (1977) *Tetrahedron* **33**, 3077.
3. Nano, G. M. et Bellando, M. (1976) *Allionia* **21**, 73.
4. McConnell, H. M. et Robertson, R. E. (1958) *J. Chem. Phys.* **29**, 1361.
5. (a) Odham, G. (1965) *Ark. Kemi* **23**, 431; (b) Odham, G. (1967) *Ark. Kemi* **27**, 231.
6. Johannes, B., Brzezinka, H. et Budzikiewicz, H. (1974) *Org. Mass Spectrom.* **9**, 1095.
7. Cardenas, C. G. (1969) *Tetrahedron Letters* 4013.
8. Grant, D. M. et Cheney, B. V. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5315.
9. Barlow, L. et Pattenden, G. (1974) *J. Chem. Soc. Perkin* **1**, 1029.
10. Turner, W. V. et Pirkle, W. H. (1974) *J. Org. Chem.* **39**, 1935.
11. Englert, G. (1975) *Helv. Chim. Acta* **58**, 2367.