

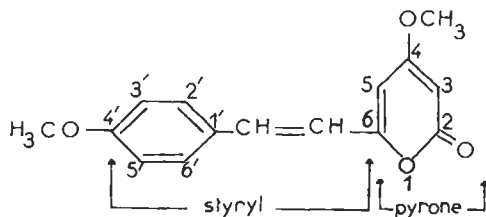
**PRÉSENCE DE STYRYL-6 α PYRONES,
NOTAMMENT DE BIS-NORYANGONINE
ET D'HISPIDINE,
CHEZ *GYMNOPILUS PENETRANS*
(FR. EX FR.) MURR. ***

par Marie-Paule DANGY-CAYE et Noël ARPIN

Résumé. — Les carpophores de *Gymnopilus penetrans* (Fr. ex Fr.) Murr. contiennent diverses styryl-6 α pyrones (>, 0,31 % du poids sec), notamment de la bisnoryangonine (ca. 50 %) et de l'hispidine (ca. 25 %), caractérisées par leurs propriétés spectrales et leur comportement chromatographique. L'incidence chimiotaxinomique de la répartition de ce type de molécules, à l'intérieur des Agaricales, est discutée.

INTRODUCTION

C'est à partir de diverses espèces de *Piper* (Pipéracées) (1, 2, 3), d'*Aniba* (Lauracées) (4) et d'*Alpinia* (Zingibéracées) (5) qu'ont été isolées les premières styryl-pyrones naturelles, souvent méthoxylées comme la yangonine ou méthoxy-4 (méthoxy-4'styryl)-6 α pyrone :



YANGONINE

Les effets toxiques des breuvages, connus sous le nom de « kava », préparés avec les racines de *Piper methysticum* Forst., résultent de la présence de styryl-pyrones. Bien que ces composés, à l'état purifié, ne reproduisent pas entièrement les troubles provoqués par les extraits bruts de racines, leur rôle sur le système nerveux a été clairement démontré (6).

Par ailleurs HANSEL et coll. (7) ont mis en évidence l'action inhibitrice de diverses styryl-pyrones vis-à-vis de certains microorganismes fongiques

* Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons, XXV ; pour XXIV, voir article précédent.

comme *Trichophyton ferrugineum*, *T. tonsurum*, *Cryptococcus neoformans*, inhibition qui s'avère totale pour *Aspergillus niger*.

Les structures de ces molécules ont été établies par étude de leurs propriétés chimiques, chromatographiques et spectrales (dans l'ultra-violet, le visible et l'infra-rouge) et par voie de synthèse, notamment grâce aux travaux de CHIMIELEWSKA et coll. (8) à Varsovie et de HANSEL et coll. (9) à Berlin.

EDWARDS et coll. (10) furent les premiers à isoler, en 1961, une styryl)-6 α pyrone, extraite pour la première fois *in natura*, d'une espèce 4' styryl)-6 α pyrone à partir de *Polyporus hispidus* Fr.; UENO et coll. (11) retrouvèrent cette même molécule, en 1964, dans *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat., autre champignon lignicole. BU'LOCK (12) a émis l'hypothèse que la dégradation de la lignine libérerait des composés précurseurs de l'hispidine; aussi la découverte de styryl-pyrones dans des Agaricales lignicoles, n'est-elle pas surprenante: le premier isolement de ce type de molécule, dans cet ordre, concerne la bis-noryangonine ou hydroxy-4 (hydroxy-4' styryl)-6 α pyrone, extraite pour la première fois *in natura*, d'une espèce américaine, *Gymnopilus decurrens* Hesler, par HATFIELD et BRADY (13).

Dès lors, il devenait extrêmement tentant pour ces derniers auteurs, travaillant tous deux au « Drug Plant Laboratory » de Seattle, d'examiner le contenu chimique de *Gymnopilus spectabilis* (Fr.) Sing., champignon lignicole connu, en outre, pour ses propriétés hallucinogènes (14, 15, 16); la bis-noryangonine fut à nouveau identifiée dans cette espèce (17).

Mais aux questions d'ordre pharmacologique et écophysiologique se superpose, pour *G. spectabilis*, un intéressant problème taxinomique.

HEIM (18) reconnut, le premier, les affinités existant entre *Pholiota spectabilis* (Fr.) Gil. et certaines Flammules, point de vue précisé ensuite par ROMAGNESI (19) qui rapprocha *Ph. spectabilis* des Flammules du groupe des *Sapinei*; on retrouve aujourd'hui ces espèces dans le genre *Gymnopilus* tel que l'entend SINGER (20).

Pour vérifier le bien-fondé d'un tel rapprochement, KÜHNER, dès 1958, suggérait une étude comparative des pigments de *Ph. spectabilis* et de *Flammula hybrida* Fr., cette dernière étant la plus répandue des *Sapinei*. Ainsi, les analyses chromatographiques et électrophorétiques de GABRIEL (21), sur les différents extraits de ces deux espèces, montraient clairement la similitude de leur stock pigmentaire, mettant notamment en évidence, dans chacune d'elles, la présence de pigments absorbant à 365 nm et réagissant à la benzidine; l'un d'entre eux fut identifié, en 1969, à la bis-noryangonine, par HATFIELD et BRADY (17).

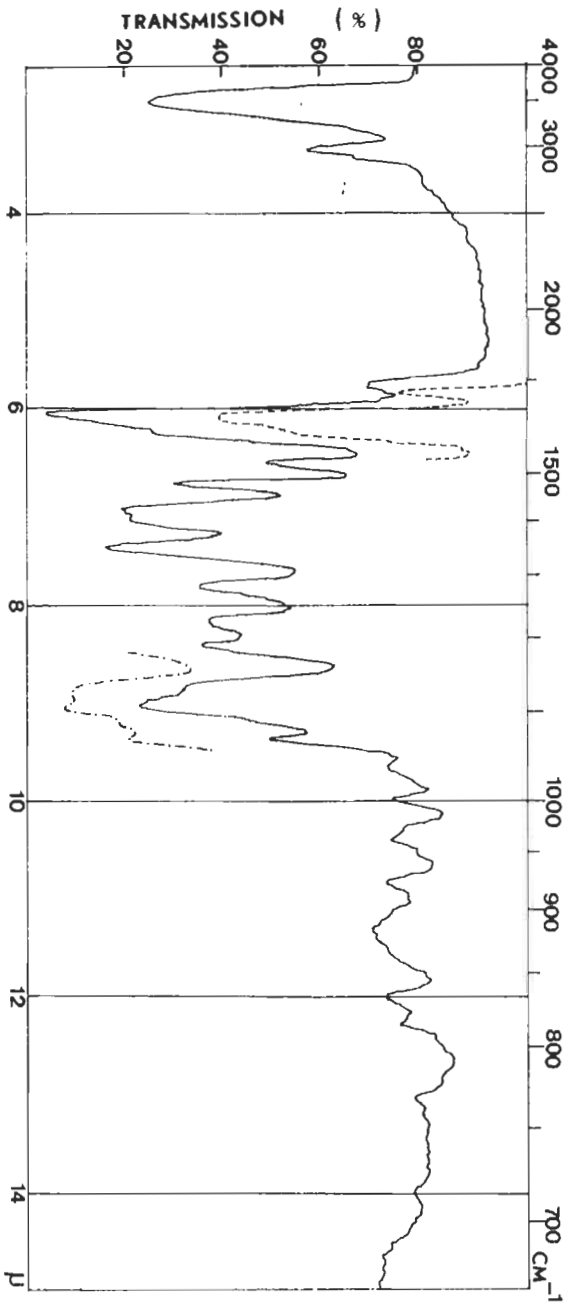


Fig. 1. — Spectre infra-rouge (KBr) de la bis-noryangonine isolée de *Gymnopitius penetrans*.

Cette même molécule fut à nouveau isolée, en mélange avec de l'hispidine, de diverses espèces de *Gymnopiles* américaines : *G. aeruginosus* (Pk.) Sing., *G. aurantiophyllus* Hesler, *G. braendlei* (Pk.) Hesler, *G. luteofolius* (Pk.) Sing., *G. obscurus* Hesler et *G. punctifolius* (Pk.) Sing. (22).

Enfin tout récemment, BRADY et BENEDICT (23) mentionnent pour la première fois la présence de *bis-noryangonine* à l'extérieur du genre *Gymnopilus*, en extrayant cette molécule de *Pholiota squarroso-adiposa* Lange.

Notre note a pour but de révéler l'existence et de préciser, dans certains cas, la nature des styryl-6 α pyrones d'une espèce européenne de *Gymnopile*, *Gymnopilus penetrans* (Fr. ex Fr.) Murr.

EXTRACTION ET ISOLEMENT DES STYRYL-PYRONES

Les carpophores de *Gymnopilus penetrans* ont été récoltés près de Chênelette (Rhône) durant l'automne 1971 et conservés au congélateur à -20° C.

Le matériel fongique, broyé à l'aide d'un mixer, est soumis à extraction, à l'ambiante, par de l'alcool éthylique à 95° ; cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à obtention d'un extrait incolore et n'absorbant plus à 360 nm. Le résidu d'extraction se présente sous la forme d'une poudre dont la coloration brune traduit la présence de substances colorées non extractibles par l'alcool ; il correspond à un poids sec de 115 g.

On concentre alors l'extrait global, sous vide, à 40° C ; la solution alcoolique, enrichie en eau, est reprise plusieurs fois par l'éther éthylique, choisi de préférence à l'acétate d'éthyle. En effet si ce dernier entraîne légèrement plus de pigments, il possède l'inconvénient de dissoudre nombre de composés indésirables. Une chromatographie comparative des extraits obtenus à partir de ces deux solvants ne permet de déceler aucune différence sensible en ce qui concerne la quantité et la nature des styryl-pyrones extraites. Dans les deux cas, l'hypophase hydro-alcoolique demeure colorée : le spectre uv-visible de cette dernière montre une inflexion à 360 nm suivie d'une très intense absorption vers les plus courtes longueurs d'onde. Aussi apparaît-il difficile de déterminer la quantité de styryl-pyrones à partir de l'extrait global ; la teneur minimale a donc été calculée en ne tenant compte que des extraits éthérés. En se basant sur le coefficient d'absorption spécifique de la *bis-noryangonine*, composé majeur ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ à 364 nm dans l'alcool éthylique : 1164 ; $\log \epsilon$: 4,44 (13)) cette teneur minimum est de 0,31 % du poids sec.

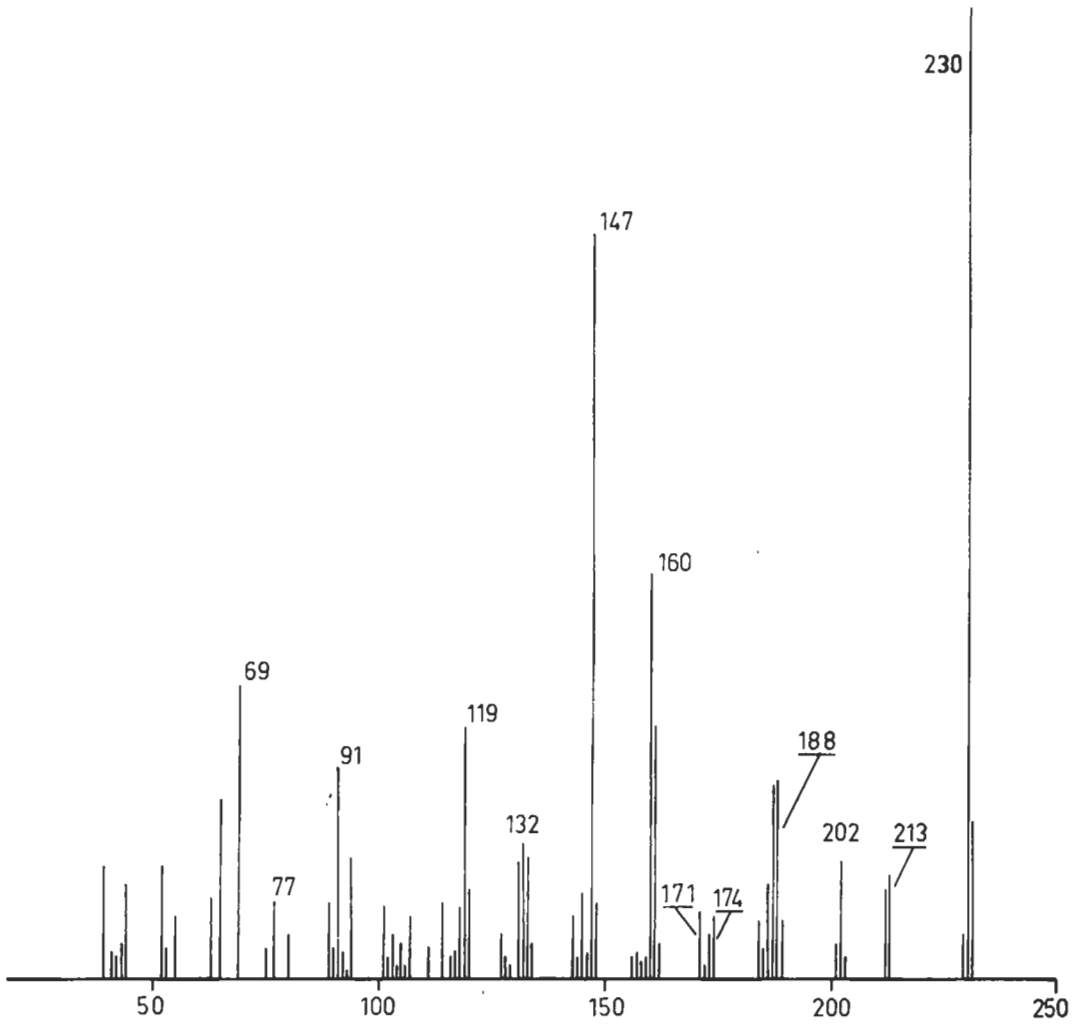


Fig. 2. — Spectre de masse (70 eV, 230° C) de la bis-noryangonine de *G. penetrans*.

Une chromatographie préliminaire, sur couche mince, met en évidence, outre une zone colorée très fortement polaire et de R_f nul (zone D), la migration de 3 zones colorées A, B, C, aux caractéristiques suivantes :

Tableau 1

Zones	R_f *	Fluorescence	% relatifs
A	0,76	jaune	ca. 10 %
B	0,60	jaune-vert	ca. 50 %
C	0,36	jaune	ca. 25 %
D	0	jaune-orange	ca. 15 %

* chromatographie sur gel de silice; solvant : acétate d'éthyle-éther de pétrole-acide acétique (5-3-1) (13).

On réalise alors la séparation du mélange sur colonne de polyamide acétylé MN-6 AC (diamètre de la colonne : 9 cm, hauteur : 30 cm). L'élu-tion avec successivement 2-3, 4-6, 15-20 % de méthanol dans le chloroforme permet l'obtention des zones A, B, C, dont les proportions sont indiquées dans le tableau 1. Il reste au sommet de la colonne une bande de fluorescence jaune-orangée, non éluable avec le méthanol pur, et correspondant à la zone D, au sujet de laquelle nous ne disposons d'aucune donnée supplémentaire.

La zone A se révèle être en fait un mélange de deux composés, tandis que les zones B et C, purifiées par nouvelles chromatographies, correspondent chacune à une styryl-pyrone.

IDENTIFICATION DES STYRYL-PYRONES

Styryl-pyrone issue de la fraction B.

Après dissolution du composé dans un minimum d'alcool à 95° et addition de la quantité d'eau nécessaire à l'apparition d'un trouble, on obtient au bout de plusieurs jours, 17 mg de produit jaune cristallisé, aux caractéristiques suivantes :

— F : 245-250° C

— Propriétés spectrales

+ spectre uv-visible : λ max 360, 310 dans l'alcool éthylique.

- + spectre infra-rouge (KBr) : 3 450-3 210 (OH), 1 668 (lactone), 1 625, 1 560 (C = C aromatiques), 1 385, 1 266, 1 180 et 1 165 (C-O-C et C-OH), 1 015, 970 (CH = CH *trans*) 840 (C-H aromatiques hors du plan) cm^{-1} , Cf fig. 1.
- + spectre de masse : pic moléculaire à m/e : 230 ; pour la fragmentation Cf. fig. 2.
- + spectre de résonance magnétique nucléaire (acétone deutérée) Cf. tableau 2.

Tableau 2

Déplacements chimiques et constantes de couplage des protons de la *bis*-noryangonine de *G. penetrans*

	H-3	H-5	H β	H α	H-3'-5'	H-2'-6'	H-2'-3' 5'-6'
δ , 10^{-6}	5,41	6,14	6,71	7,40	6,92	7,56	—
J Hz		m,2		$\alpha \beta$,15	2	2	9

L'ensemble de ces propriétés correspond très précisément à celles données par HATFIELD (24) pour la *bis*-noryangonine de synthèse. De plus une co-chromatographie réalisée en présence d'un témoin synthétique confirme définitivement cette identité. Le pigment principal de *G. penetrans* est donc la *bis*-noryangonine.

Styryl-pyrone issue de la zone C.

Ce composé possède un spectre uv-visible (λ max : 372 et 252 dans l'alcool) qui se superpose à celui de l'hispidine synthétique (24). Par spectrométrie de masse on obtient le pic moléculaire attendu (m/e : 246) et une fragmentation (m/e : 229, 228, 203, 202, 187, 176, 148 et 135) en tous points semblable à celle de l'hispidine de référence. Cette identité se trouve corroborée par la superposition des deux produits, naturel et synthétique, en co-chromatographie.

Styryl-pyrones issues de la zone A.

La zone A, de R_f 0,76 sur gel de silice avec le solvant acétate d'éthyle-éther de pétrole-acide acétique (5-3-1), se dédouble en 2 composés de

R_f 0,48 et 0,56 dans un solvant contenant dix fois moins d'acide que précédemment (dans ce dernier système, les R_f de la *bis-noryangonine* et de la *yangonine* sont respectivement égaux à 0,34 et 0,72).

Les maximums d'absorption observés dans l'éthanol se situent à 370 nm pour le composé de R_f 0,48 et à 376 nm pour celui de R_f 0,56.

Dans ces conditions, on peut penser pour ces styryl-pyrones, soit à des isomères de la *yangonine*, ou plutôt aux deux *noryangonines* possibles (en 4 et 4'). La faible quantité de matériel disponible ne nous a pas permis d'aller plus en avant dans leur élucidation structurale.

DISCUSSION

La teneur relativement élevée en styryl-pyrones de *G. penetrans* (0,31 % du poids sec, au minimum) explique en partie seulement la coloration fauve ochracée du chapeau et celle jaunâtre de la chair, car, on l'a vu, après extraction exhaustive par l'alcool, la poudre résiduelle demeure nettement colorée.

La présence de ces styryl-pyrones, notamment de la *bis-noryangonine* et de l'*hispidine* qui à elles deux constituent les trois-quarts de ces composés, justifie, également en partie, la coloration rouge ou marron rouge obtenue après action des alcalis tant sur les carpophores frais que sur les extraits de ceux-ci.

En plus des substances lipophiles réagissant au chlorure d'antimoine, vraisemblablement de nature terpénique (stéroïdes ?), GABRIEL (21) avait isolé, par électrophorèse, à partir de *G. spectabilis* et de *G. hybridus*, des substances jaunes, dont deux abondantes numérotées 6 et 8, absorbant à ca. 365 nm. Etant donné la très grande similitude existant entre *G. penetrans* et *G. hybridus*, considérés parfois comme deux formes de la même espèce (25), il est possible d'assimiler ces zones 6 et 8 respectivement à la *bis-noryangonine* et à l'*hispidine*, compte tenu des proportions relatives de ces deux substances (la zone 8 de GABRIEL étant beaucoup moins importante que celle portant le n° 6).

Si le fait de n'avoir trouvé des styryl-pyrones que dans des Champignons lignicoles milite en faveur de l'hypothèse de BU'LOCK (12), il faut remarquer, néanmoins, que nombre de Champignons poussant sur le bois ne synthétisent pas, apparemment du moins, de telles molécules. Aussi sera-t-il extrêmement intéressant de vérifier si les Gymnopiles non lignicoles se comportent comme ceux du groupe des *Sapinei* du point de vue qui nous préoccupe.

En fait la synthèse de styryl-pyrones par des cultures mycéliennes de *Phaeolus schweinitzii* Fr. sur milieu de base classique (24) semble bien montrer que ce type de métabolisme relève de potentialités génétiques qui s'expriment même si les précurseurs directement impliqués se trouvent absents du milieu nutritif : la présence de styryl-pyrones devrait alors être considérée comme un caractère chimiotaxinomique de valeur.

Le tout récent isolement de bis-noryangonine à partir des carpophores de *Pholiota squarroso-adiposa* (23) laisse supposer une répartition des styryl-pyrones non restreinte, au sein des Agaricales, au genre *Gymnopilus*. Aussi, une étude systématique de la distribution de ces substances à l'intérieur des genres *Pholiota*, *Flammula* et *Gymnopilus* se trouve-t-elle actuellement entreprise dans notre Laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. BORSCHÉ W. et GERHARDT M., 1914. — Untersuchungen über die Bestandteile der Kawa-Wurzel. I. Über Yangonin. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 47, 2902-2918.
2. KLOHS M.-V., 1967. — Chemistry of Kava, in EFRON D.-H. Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs. Public Health Service Publication n° 1645, US Government Printing Office, Washington, 126-132.
3. SAUER H. et HANSEL R., 1967. — Kawalaktone und Flavonoïde aus einer endemischen Piper-Art Neu Guineas. Planta Med., 15, 443-458.
4. GOTTLIEB O.-R. et MORS W.-B., 1959. — The Chemistry of rosewood. III. Isolation of 5, 6-dehydrokawain and 4-methoxyparacotoin from *Aniba firmula* Mez. J. Org. Chem., 24, 17-18.
5. KIMURA Y., TAKIDO M., NAKANO K. et TAKISHITA M., 1966. — Constituents of *Alpinia plants*. X. On the constituents of rhizomata of *A. speiosa* and *A. kumatahe*. Yakugaku Zasshi, 86, 1184-1187; Chem. Abstr., 67, 21775 e.
6. MEYER H.-J., 1967. — Pharmacology of Kava, in EFRON D.-H. Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs. Public Health Service Publication n° 1645. US Government Printing Office, Washington, 133-140.
7. HANSEL R., WEISS D. et SCHMIDT B., 1966. — Fungistatische Wirkung der Kawadroge und ihrer Inhaltsstoffe. Planta Med., 1, 1-9.
8. CHMIELEWSKA I., CIESLAK J., CORCZYNSKA K., KONTNIK B. et PITAKOWSKA K., 1958. — Structure de la yangonine. Etude spectrographique dans l'ultra-violet et l'infrarouge. Tetrahedron, 4, 36-42.
9. HANSEL R., RIMPLER H. et LANGHAMMER L., 1966. — I. R. Spektren der α Pyrone vom Yangonin und Kawain-Type und Synthese von 4-Methoxy-5, 6-dihydro-6-methylpyron-2 als Modellschubstanz. Z. Anall. Chem., 218, 346-353.
10. EDWARDS R.-L., LEWIS D.-G. et WILSON D.-V., 1961. — Constituents of higher fungi. Part. I. Hispidin, a new 4-hydroxy-6-styryl-2-pyrone from *Polyporus hispidus* (Bull. Fr. J. Chem. Soc., 4995-5002).
11. UENO A., FUKUSHIMA S., SAIKI Y. et HARADA T., 1964. — Studies on the components of *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat. Chem. Pharm. Bull., 12, 376-378.
12. BU'LOCK J.-D., 1967. — Essays in biosynthesis and microbial development. John Wiley and sons, Inc, New York, 2-7.
13. HATFIELD G.-M. et BRADY L.-R., 1968. — Isolation of bis-noryangonin from *Gymnopilus decurrens*. Lloydia, 31, 225-228.

14. BUCK R.-W., 1967. — Psychedelic effects of *Pholiota spectabilis*. New England J. Med., 276, 391.
15. ROMAGNESI M.-H., 1964. — Champignons toxiques au Japon. Bul. Soc. Mycol. Fr., 80, IV-V.
16. WALTERS M.-B., 1965. — *Pholiota spectabilis*, a hallucinogenic fungus. Mycologia, 57, 837-838.
17. HATFIELD G.-M. et BRADY L.-R., 1969. — Occurrence of bis-noryangonine in *Gymnopilus spectabilis*. J. Pharm. Sci., 58, 1298.
18. HEIM R., 1931. — Le genre *Inocybe* précédé d'une introduction générale à l'étude des Agarics ochrosporés, p. 75. Paris, Le Chevalier.
19. ROMAGNESI M.-H., 1936. — Sur quelques groupements naturels d'Agarics ochrosporés. Rev. Mycol., 1, 207-213.
20. SINGER R., 1962. — The Agaricales in modern taxonomy; 2^e ed. J. Cramer. Weinheim, 915 p.
21. GABRIEL Madeleine, 1958. — Recherches sur les pigments des Agaricales. Comparaison des pigments de *Gymnopilus spectabilis* Fr. et *hybridus* Fr. Ann. Univ. Sc. Nat. Lyon, X, 65-68.
22. HATFIELD G.-M. et BRADY L.-R., 1971. — Occurrence of bis-noryangonin and hispidin in *Gymnopilus species*. Lloydia, 34, 260-263.
23. BRADY L.-R. et BENEDICT R.-G., 1972. — Occurrence of bis-noryangonin in *Pholiota squarroso-adiposa*. J. Pharm. Sci., 61, 318.
24. HATFIELD G.-M., 1970. — Occurrence and biosynthesis of fungal styrylpyrones. These Doc. Philosophy, University of Washington.
25. KÜHNER R. et ROMAGNESI H., 1953. — Flore analytique des Champignons Supérieurs. Ed. Masson et C^{ie}. Paris.

Département de Biologie végétale,
Laboratoire de Mycologie associé au C.N.R.S.,
Université Claude-Bernard (Lyon I),
43, boulevard du 11-Novembre-1918, F-69621 Villeurbanne.