

LES PIGMENTS DE *TRICHOLOMA SULFUREUM* FR. EX BULL. ; IDENTIFICATION DE NOUVEAUX DÉRIVÉS DE LA FLAVOMANNINE. *

par Katia GLUCHOFF et W. STEGLICH

Résumé. — La coloration jaune-soufre de *Tricholoma sulfureum* est essentiellement le fait d'un isomère optique de la diméthyl-6,6' flavomannine et de trois de ses dérivés. La structure de ces pigments a été assurée par spectrométrie (uv-visible, ir, rmn et masse). L'intérêt chimiotaxinomique des résultats obtenus est discuté.

INTRODUCTION

R. KÜHNER a très tôt entrevu l'intérêt, tant pour le mycologue systématique que pour le chimiste, de l'étude de la localisation cytologique des pigments chez les Agaricales. Ainsi, dès 1934 (1), ses nombreuses observations l'ont conduit à distinguer les pigments intracellulaires (cytoplasmiques ou vacuolaires) des pigments de membrane et intercellulaires, cette répartition paraissant liée à la nature chimique des substances.

R. KÜHNER a ainsi caractérisé chez les Cortinaires, au niveau des espèces typiques des *Cinnamomei*, la présence, dans la chair et la trame des lames, de masses intercellulaires jaune-vif ou jaune-vert, de dimensions suffisantes pour être déjà évidentes au faible grossissement du microscope.

Ces études cytologiques ont été le point de départ des travaux de M. GABRIEL (2) : parmi les divers pigments isolés de *Cinnamomei*, celle-ci a pu caractériser une substance de nature anthranolique, notamment grâce à la coloration bleu-noir obtenue en présence de réactif de Mecke (3); l'examen microscopique de coupes traitées par ce réactif a permis d'identifier les masses interhyphiques à ce pigment.

* Recherches chimiotaxinomiques sur les Champignons, XXIV ; pour XXIII, voir C. R. Acad. Sc., 274, 3465-3467, 1972.

Partie XV dans la série « Pigments of Fungi ».

Son étude structurale vient d'être effectuée à partir de divers *Cinamomei* ainsi que de *Tricholoma equestre* Fr. ex L. (= *T. flavovirens* Pers. ex Fr.) (4) : il s'agit de la diméthyl-6,6'flavomannine (II).

Cette découverte nous a conduits à rechercher la présence de ce type de pigment dans d'autres *Tricholomes*, notamment *T. sulfureum*, chez lequel R. KÜHNER avait observé également une pigmentation intercellulaire (1).

EXTRACTION DES PIGMENTS

800 g de carpophores frais de *T. sulfureum* (récoltés en octobre 1971 dans la région lyonnaise), stockés à -20°C , sont soumis à des broyages successifs dans l'éthanol, jusqu'à obtention d'un extrait incolore. Après acidification par $\text{HCl } 2\text{N}$, la pigmentation est transférée en totalité dans le chloroforme. La phase organique est alors lavée deux fois, séchée (eau éliminée par congélation) et concentrée en vue de la chromatographie.

Le spectre d'absorption uv-visible de l'extrait chloroformique global (λ max. : 416, (320), 285 nm) se révèle identique à celui de *T. equestre*, suggérant par là même une nature voisine sinon semblable de la pigmentation. La quantité de pigments, appréciée sur la base de l'absorption spécifique de la diméthyl-6,6' flavomaninne isolée de *T. equestre* ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 394$ à 416 nm dans le chloroforme), est de 820 mg, ce qui correspond à une teneur par rapport au poids sec (48 g) de 1,7 %.

SÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES PIGMENTS

L'extrait chloroformique concentré à sec, repris par le benzène, est chromatographié sur colonne de polyamide acétylé Macherey-Nagel SC 6 AC. Le benzène seul d'abord, puis contenant des quantités croissantes de chloroforme et finalement du chloroforme avec 1 % de méthanol, permettent l'élution de 4 fractions pigmentaires impures accompagnées de leurs produits d'oxydation rouges ou violets. Une dernière zone orangée mineure est éluée, après extrusion de la colonne, par un mélange méthanol-chloroforme 1/1. Une nouvelle chromatographie des différentes fractions fournit, à l'état pur, 5 pigments parmi lesquels seul le mineur n'a pu être cristallisé ultérieurement. Leurs propriétés sont présentées dans les tableaux et figures ci-dessous, les pigments étant numérotés par ordre d'apparition en sortie de colonne chromatographique.

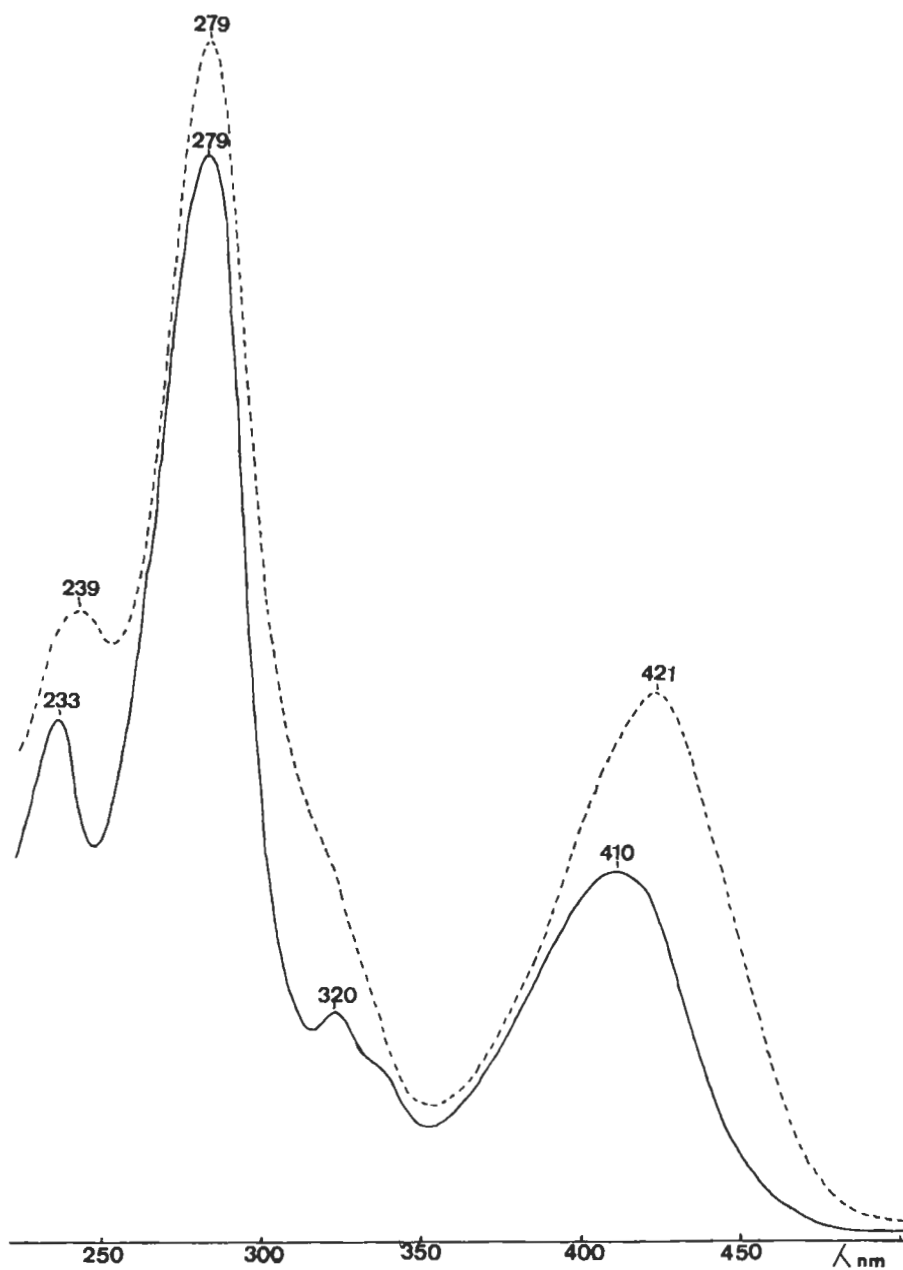


Fig. 1. — Spectres d'absorption uv-visible (D.O.), en solution éthanolique, de

----- T. s. 1
————— T. s. 3

TABLEAU I. — Propriétés chromatographiques des pigments de *T. sulfureum*

pigments	couleur vis. uv	éluant sur polyamide SC 6 AC	valeurs Rf sur couches minces						
			polyamide MN DC 11 AC					silice Merck DCF 254 ***	
			0 % *	50 % *	100 % *	1 % **	3 % **		10 % **
T. s. 1	jaune brun	0 % *	0,29	0,69					
T. s. 2	» »	50 % *		0,33	0,84				
T. s. 3	» »	100 % *			0,40	0,47			
T. s. 4	» »	1-2 % **			0,16	0,24	0,48		
T. s. 5	jaune orange or	5 % **						0,30	0,60

* chloroforme/benzène v/v.

** méthanol /chloroforme v/v.

*** benzène/formiate d'éthyle/acide formique 13/5/4.

TABLEAU II. — Maximums d'absorption uv-visible des pigments de *T. sulfureum*

T. s. 1	λ max (éthanol) : 421, 279, 239 nm
T. s. 2	λ max (éthanol) : 414, (318), 278, 233 nm.
T. s. 3	λ max (éthanol) : 410, (320), 279, 233 nm
T. s. 4	λ max (éthanol) : 413, (319), 276, 233, 5 nm
T. s. 5	λ max (éthanol) : 442, 290, 235 nm ; + NaOH : 515, 314, 240 nm

TABLEAU III. — Cristallisation, propriétés optiques et distribution des pigments principaux de *T. sulfureum*

pigments	solvant de cristallisation	[α] 546 nm	E 1 % 1 cm	% relatif
T. s. 1	C ₆ H ₆ /EP •	+ 970° (0,32g/l-CHCl ₃)	402 (424 nm-CHCl ₃)	11,6
T. s. 2	C ₆ H ₆	+ 500° (0,46g/l-DMSO • •) * — 300° (0,40g/l-DMSO)	309 (414 nm-CHCl ₃)	27,0
T. s. 3	C ₆ H ₆	+ 523° (0,32g/l-CHCl ₃)	354 (414 nm-CHCl ₃)	45,5
T. s. 4	CHCl ₃	+ 533° (0,6g/l-CH ₃ OH)	278 (410 nm-CH ₃ OH)	15,9

* valeur fournie par un échantillon d'une récolte antérieure

• éther de pétrole ;

• • diméthylsulfoxyde

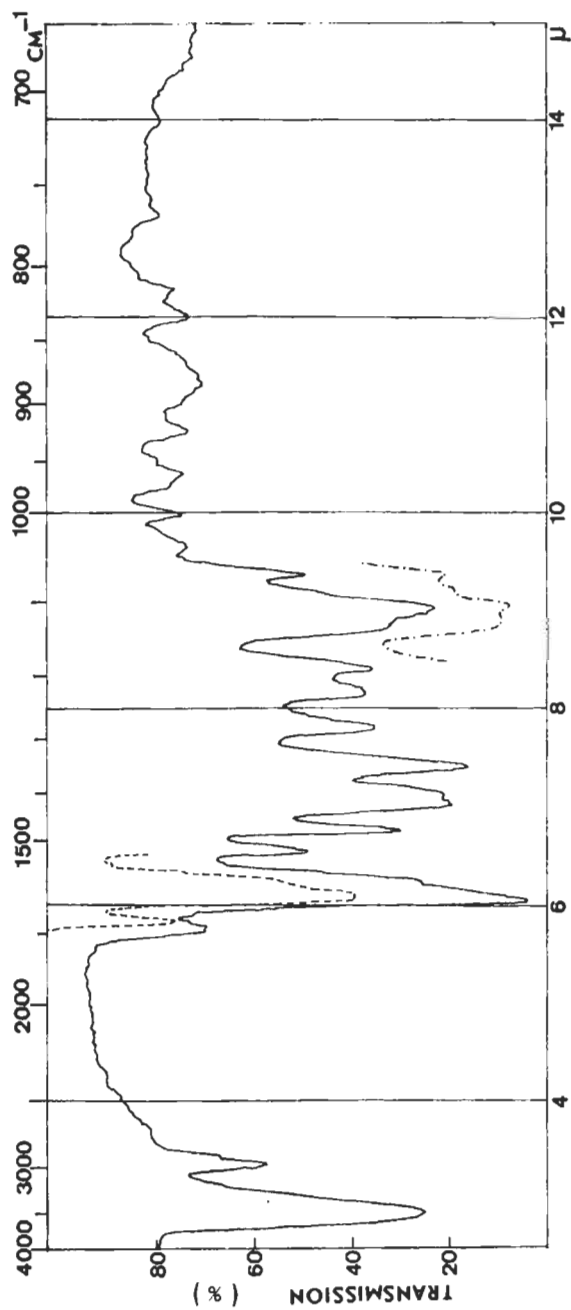


Fig. 2. — Spectres infrarouges (pastillage dans KBr) de T.s.3 ———, T.s.1 — — —, T.s.4

TABLEAU IV. — Spectres de résonance magnétique nucléaire des pigments de *T. sulfureum*

Déplacements chimiques δ 10^{-6} [intensités relatives]									
	H-2	H-4	H-5	H-10	C-CH ₃	O-CH ₃	OH-3	OH-8	OH-9
T. s. 1 * (60 MHz)	2,81 [2] 3,21 [2]	3,03 [2]	6,66 [1] 6,91 [1]	6,97 [1] 7,91 [1]	1,45 [6] 1,43 [6]	3,81 [6] 3,85 [6]	1,6 1,8	10,03 9,88	16,16 15,74
T. s. 2 ** (60 MHz)	2,80 [4] <i>m</i>	2,96 [4]	6,70 [2]	6,90 [2]	1,30	3,70 [6]			
T. s. 3 • (90 MHz)	2,85 [4] <i>m</i>	3,10 [2] 4,68 [1]	6,69 [1] 6,80 [1]	6,96 [1] 7,31 [1]	1,40 [6] 1,27 [6]	3,82 [6]			
	H-2 ou H-x	H-4 ou H-x							
T. s. 4 •• (100 MHz)	2,75/3,04+ 2,88/2,96+ [4]	4,65 [1] 4,70 [1]	6,89 [2]	7,29 [1] 7,38 [1]	1,35 [6] 1,39 [6]	3,81 [6]			

* CDCl₃ ; ** DMSO-D₆ ; • CDCl₃/CD₃OD 4/1 ; •• Acétone-D₆*m* multiplet ; + AB-quartet, J = 17,5 Hz

TABLEAU V. — Principaux pics de fragmentation des pigments de *T. sulfureum* en spectrométrie de masse

T. s. 1	(290° C) m/e 588 (3 %) M+ ; 587 (10) ; 586 (30) ; 572 (5) ; 571 (17) ; 570 (65) ; 555 (13) ; 554 (34) ; 553 (34) ; 552 (100) ; 539 (5) ; 535 (8) ; 523 (14) ; 522 (14) ; 521 (43) ; 297 (8) ; 276 (6) ; 270 (8) ; 260,5 (11).
T. s. 2	(280° C) m/e 574 (3 %) M+ ; 570 (3) ; 556 (24) ; 539 (37) ; 538 (100) ; 521 (9) ; 508 (28) ; 507 (83) ; 489 (7) ; 283 (11) ; 270 (32) ; 269 (16) ; 253,5 (11).
T. s. 3	(257 ° C) m/e 590 (42 %) M+ ; 573 (31) ; 572 (84) ; 556 (10) ; 555 (37) ; 554 (100) ; 552 (18) ; 541 (7) ; 538 (5) ; 537 (6) ; 524 (13) ; 523 (40) ; 521 (8) ; 286 (10) ; 283 (6) ; 277 (10) ; 271 (7) ; 270 (18) ; 269 (7) ; 261,5 (9).
T. s. 4	(290° C) m/e 570 (100) ; 554 (56) ; 539 (40) ; 523 (26) ; 507 (8) ; 299 (8) ; 297 (6) ; 286 (54) ; 271 (16) ; 270 (18) ; 262 (8) ; 257 (6) ; 255 (7).
T. s. 5	(180 ° C) m/e 287 (19 %) ; 286 (100) M+ ; 285 (10) ; 284 (7) ; 272 (6) ; 271 (25) ; 270 (18) ; 269 (6) ; 258 (6) ; 243 (11) ; 227 (6) ; 168 (10) ; 153 (6) ; 151 (5) ; 149 (8) ; 143 (6) ; 139 (5) ; 135 (6) ; 129 (6) ; 117 (7) ; 115 (5) ; 114 (6).

DÉTERMINATION STRUCTURALE

La grande ressemblance des spectres uv-visible et ir des pigments 2, 3 et 4 (tableau II, fig. 1 et 2) suggère l'identité de leur chromophore ; aussi aborderons-nous avec eux la détermination des structures.

Pigment 2. Par l'ensemble de ses propriétés chromatographiques et spectrales, le pigment 2 s'avère identique, pouvoir rotatoire excepté, au pigment majeur de *T. equestre*, optiquement inactif (4) : T. s. 2 est donc le dérivé (atrop + ou —) (tableau III) de la diméthyl-6, 6' flavomannine (II).

Pigment 3. Il représente à lui seul près de la moitié de la pigmentation de *T. sulfureum* (tableau III).

L'augmentation de la polarité de ce composé par rapport à celle de T. s. 2 (tableau I) résulte vraisemblablement d'une modification de la partie saturée de la molécule.

Le dédoublement des signaux aromatiques et méthyliques dans le spectre de rmn (tableau IV) indique qu'il s'agit d'un dimère asymétrique ; un groupement méthylène en 4 a disparu : l'un des protons a été remplacé par un hydroxyle, l'autre résonne maintenant à δ 4,68. En outre, cette substitution est responsable du déblindage de l'un des protons en 10 (δ 7,31).

La courbe ORD du pigment 3 est l'image inverse de celle antérieurement obtenue pour le pigment lévogyre de *Cortinarius vitellinus* Mos. (6), dont toutes les autres propriétés sont identiques à celles de T. s. 3 : celui-ci est donc l'hydroxy-4 diméthyl-6,6' (atrop +) flavomannine (III).

Le spectre de masse corrobore cette détermination : le pic moléculaire à m/e 590 répond à la formule $C_{32}H_{30}O_{11}$; on observe en outre d'importants fragments à m/e 572, 554, 523, correspondant aux départs de $[H_2O]$, $[2 H_2O]$ et $[2 H_2O + OCH_3]$, éliminations caractéristiques chez ces composés (tableau V).

Pigment 4. De polarité encore supérieure à celle de T. s. 3, il en diffère également par une absorption supplémentaire en ir, à ca. $1\,075\text{ cm}^{-1}$ (fig. 2), suggérant ainsi une nouvelle substitution par un hydroxyle au niveau des cycles saturés.

Cette hypothèse est confirmée par la présence, dans le spectre de rmn (tableau IV), de 2 protons $—CHOH—$ résonant à δ 4,65 et 4,70 ; corrélativement, les signaux de 2 protons méthyléniques ont disparu.

La résonance distincte de chaque proton $—CHOH—$, jointe au dédoublement des signaux des méthyles en 3,3' et des protons en 10,10', assigne aux hydroxyles alcooliques secondaires des positions non symétriques dans la molécule : on peut envisager, soit substitution en 4 et 4' mais avec configuration différente des hydroxyles, soit substitution d'atomes non symétriques dans chaque demi-molécule.

D'après ces premiers résultats, T. s. 4 doit être seulement défini comme une dihydroxy-x, x' diméthyl-6, 6' (atrop +) flavomannine*.

Malgré l'absence du pic moléculaire à m/e 606, le spectre de masse présente un mode de fragmentation voisin de ceux des pigments 2 et 3 (tableau V) ; le pic à m/e 570 peut notamment être interprété comme provenant de la perte aisée de 2 molécules d'eau.

Pigment 1. Si on le compare aux pigments précédemment discutés, le léger déplacement bathochrome de son maximum d'absorption dans le visible (tableau II et fig. 1) traduit une modification du chromophore sous forme d'une double liaison conjuguée supplémentaire ; à l'appui de cette idée, le

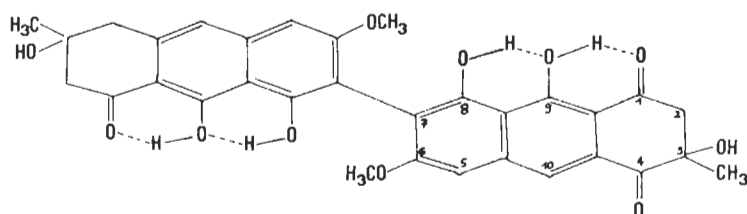
* Note ajoutée sur épreuves : x, x' = 4,4' (voir réf. 5).

spectre ir développe une bande d'absorption nouvelle vers $1685-1690\text{ cm}^{-1}$ correspondant à un carbonyle conjugué non chélaté.

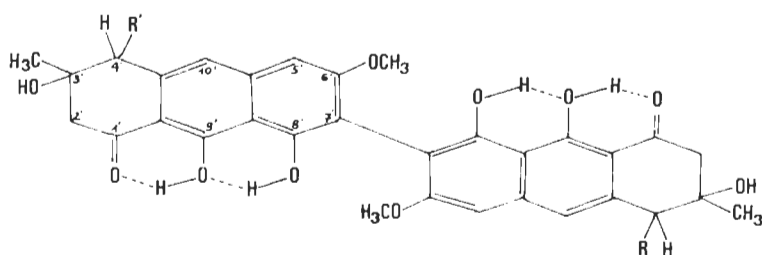
Le spectre de rmn (tableau IV) confirme ces données et assure définitivement la structure de ce pigment. Les signaux méthyles, méthoxyles et aromatiques sont dédoublés : la molécule est donc un dimère asymétrique ; l'apparition d'un proton aromatique en position très déblindée ($\delta\ 7,91$), soit en α d'un carbonyle, avec disparition corrélative de l'un des groupements méthylènes en 4, permet d'établir la présence d'un carbonyle en 4.

T. s. 1 est par conséquent l'oxo-4 diméthyl-6, 6' (atrop +) flavomanine (I).

Dans le spectre de masse, ne présentant qu'un faible pic moléculaire à $m/e\ 588$, on retrouve le mode de fragmentation de T. s. 2 caractérisé par la perte de molécules d'eau et de radicaux méthoxyles, d'où les pics importants à $m/e\ 570, 552, 521$ (tableau V).



(I)



(II) $R = R' = H$

(III) $R = OH \quad R' = H$

Pigment 5. Présent en faible teneur (non évaluée) dans le champignon, ce composé a un caractère nettement plus polaire que tous les autres (tableau I).

Son spectre uv-visible (tableau II) et ses réactions colorées (virage immédiat au rouge en présence de soude ou d'acétate de magnésium) soulignent son individualité tout en évoquant une nature quinonique *.

DISCUSSION

T. sulfureum synthétise, outre un isomère optique de la diméthyl-6,6' flavomannine, isolée précédemment de *T. equestre* et divers *Dermocybe* (4), 3 dérivés nouveaux de ce pigment. Parmi ceux-ci, le dérivé hydroxylé en 4, pigment majeur du champignon, s'est révélé l'isomère dextrogyre du pigment de *C. vitellinus* (6); par contre, les 2 autres composés, respectivement dihydroxy-4,4' et oxo-4 diméthyl-6,6' flavomannine, sont ici caractérisés pour la première fois à l'état naturel.

Au plan chimiotaxinomique, il paraît *a priori* inattendu que deux genres d'Agaricales éloignés comme le sont *Tricholomes* et *Cortinaires* synthétisent un même type de molécule aussi élaborée. Mais, le caractère encore fragmentaire de nos connaissances quant à la répartition de cette famille de composés rend prématurée leur utilisation taxinomique au niveau supragénérique **.

Par contre, plus surprenantes et plus significatives apparaissent les divergences pigmentaires au sein des *Tricholomes* : en effet, *T. sejunctum* Fr. ex Sow., rapproché par R. KÜHNER de *T. equestre* dans sa section des *Sejuncta* (7), présente une pigmentation jaune dans les vacuoles des hyphes cuticulaires, de nature très différente et vraisemblablement azotée.

Plus généralement, les dérivés de la flavomannine semblent, dans le genre *Tricholoma*, limités à quelques espèces seulement, non obligatoirement affines (résultats inédits). Le mode ponctuel de répartition de ce type

* Note ajoutée sur épreuves : il s'agit en fait de l'endocrocine : trihydroxy-1,6,8 méthyl-3 carboxy-2 anthraquinone (voir réf. 5).

** Quant aux variations d'isomérisie optique de ces pigments d'une espèce à l'autre e: parfois dans une même espèce (cf. T. s. 2 de *T. sulfureum*), il est encore trop tôt pour juger de leur importance au plan chimique et donc taxinomique; seules des études ultérieures sur la biosynthèse et la configuration de tous les dérivés naturels de la flavomannine apporteront des éléments d'appréciation.

de pigment rend leur utilisation comme indicateur taxinomique pour l'instant délicate.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. KÜHNER R., 1934. — Observations sur la localisation cytologique des substances colorées chez les Agarics et les Bolets. *Le Botaniste*, 26, 347-369.
2. GABRIEL Madeleine, 1965. — Contribution à la Chimiotaxinomie des Agaricales. Pigments des Bolets et des Cortinaires. Thèse, Lyon, 70 p.
3. PAECH K. et TRACEY M. V., 1955. — *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. Springer-Verlag, 3, p. 556.
4. STEGLICH W., TÖPFFER Edda, REININGER W., GLUCHOFF Katia et ARPIN N., 1972. — Isolation of Flavomannin-6,6'-dimethyl ether and one of its racemates from higher Fungi. *Phytochemistry*, 11, 3 299-3 304.
5. STEGLICH W., GLUCHOFF Katia et coll. — à paraître.
6. STEGLICH W. et TÖPFFER Edda. — *Z. f. Naturforsch.*, sous presse.
7. KÜHNER R. et ROMAGNESI H., 1953. — *Flore analytique des Champignons Supérieurs*. Masson, Paris, 556 p.

*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.*

*Organisch Chemisches Institut der Technischen Universität Berlin,
Strasse des 17 Juni Nr. 135,
1 Berlin 12.*