

***Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences***

***Isolement et caractérisation de métabolites
secondaires issus de champignons impliqués
dans la maladie de l'esca***

***Thèse présentée à la Faculté des sciences par :
Christine POLIART***

***Chimiste diplômée de l'Université de Rennes I
Pour l'obtention du titre de
Docteur ès Sciences***

à mon époux, Guy-Marie

à mes Parents

à Eliane

à Hélène et Nathalie

***aux membres de ma famille
et aux amis qui me sont chers***

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Isolement et caractérisation de métabolites
secondaires issus de champignons impliqués dans
la maladie de l'esca**

de Mme Christine Poliard

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

Mmes H. Stoeckli-Evans et G. Minervini (Milan),
MM. R. Tabacchi (directeur de thèse) et E. Martinoia

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 21 novembre 2000

Le doyen:



J.-P. Derendinger

Remerciements

Le travail présenté dans cet ouvrage a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie Organique Analytique de l'Université de Neuchâtel, sous la direction de Monsieur le Professeur Raffaele Tabacchi. Je souhaite le remercier de m'avoir accueillie dans son groupe et pour la liberté qu'il m'a laissée tout au long de ce travail. Je le remercie également de m'avoir fait don de sa confiance, particulièrement lors de la rédaction de cette thèse, écrite en partie en Angleterre.

Je tiens également à remercier :

Les membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, et pour la discussion constructive qu'ils ont dirigée lors de la soutenance de cette thèse :

Madame le Professeur Minervini de l'Université de Milan

Madame le Professeur Stoëckli-Evans de l'Université de Neuchâtel

Monsieur le Professeur Martinoia de l'Université de Neuchâtel

Tous les membres du groupe pour leur aide et leur bonne humeur. Je souhaite remercier particulièrement :

Les Docteurs Fkyerat et Dubin, pour l'esprit inoubliable de collaboration qu'ils ont insufflé à ce projet et leur humour perpétuel.

Le Docteur Guy-Marie Dubin, pour m'avoir initiée à l'analyse des substances naturelles lors de mon stage de maîtrise, guidée et soutenue tout au long de cette thèse, mais aussi et surtout, pour m'avoir transmis le virus de la spectrométrie de masse...

Le Docteur Abdellatif Fkyerat pour ses conseils avisés, sa disponibilité continuelle, et sa chaleureuse amitié.

Madame Armelle Michel, compagne de laboratoire puis compagne d'infortune, nos nombreuses discussions et son soutien tout au long de ce travail ont abouti à une belle amitié.

Le Docteur Saturnin Claude pour le temps et le soin qu'il a consacré à la réalisation des spectres de RMN, ainsi que pour les longues discussions que nous avons eues.

Et enfin, Camille Perret, Gilles Grossmann et Stefan Bieri, qui ont contribué à cette thèse lors de leur travail de diplôme.

Le Docteur Philippe Larignon de l'Institut National de Recherche Agronomique de Bordeaux, pour l'envoi régulier de souches de champignons, de matériel végétal infecté et sain (bois, sève et feuilles).

Monsieur le Professeur Roustan de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse, pour la réalisation des tests sur cals de vigne.

Mademoiselle Alexandra Bonomelli du laboratoire de recherche de LVMH, pour les tests sur protoplastes de vigne.

Les Docteurs Beffa et Oberson, pour avoir essayé de mettre au point un milieu de culture favorisant la croissance de *Phaeoacremonium aleophilum*.

Et enfin, mon Père, pour son exemple de courage face à l'adversité, son amour insatiable de la connaissance, et son soutien inébranlable.

Résumé

L'esca est une maladie cryptogamique de la vigne, dans laquelle cinq champignons sont impliqués : *Stereum hirsutum*, *Eutypa lata*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium chlamydosporum*, et *Fomitiporia punctata*. Cette maladie est une des plus graves que subit la vigne. En effet, ces champignons s'attaquent directement à la charpente du cep. Elle endommage non seulement les récoltes mais aussi l'encépagement du vignoble. Le traitement des ceps par l'arsénite de sodium est le seul moyen de lutte efficace. Cependant, sa toxicité pour l'homme et l'environnement est à l'origine de son interdiction dans de plus en plus de pays. Nous assistons donc à une recrudescence de cette maladie.

Le but de ce travail a été d'identifier les métabolites secondaires produits par *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium chlamydosporum*, et *Fomitiporia punctata*; d'évaluer leur toxicité à l'aide de biotest ; et enfin d'étudier des extraits de matériel végétal infecté afin de déterminer si ces composés fongiques étaient présents *in vivo*.

L'étude des milieux de culture artificiels de *Phaeoacremonium chlamydosporum* a permis d'identifier 11 métabolites secondaires, dont un est un nouveau produit naturel : l'acide 4-hydroxy-3-(3-méthyl-but-2-ényloxy)-benzoïque. De l'extrait des milieux de culture de *Phaeoacremonium aleophilum*, nous avons pu identifier 7 métabolites secondaires. Et enfin, 6 produits ont été isolés des milieux de culture de *Fomitiporia punctata*, dont un nouveau produit naturel : la 2,2-diméthyl-6-formyl-4-chromanone. Tous ces produits ont été identifiés soit à l'aide des techniques spectroscopiques (RMN, UV, IR) et spectrométriques (EI-MS, DCI-MS, ESI-MS) classiques, soit par GC-MS.

Quatre tests biologiques ont été réalisés : des tests sur plantules de tomate, des tests sur carrés de feuille de vigne, des tests sur protoplastes de vigne et des tests sur cals de vigne. Ils ont permis de mettre en évidence la toxicité de l'acide 3-phényl-lactique (5), l'acide 4-hydroxy-benzoïque (1), du 4-hydroxy-benzaldéhyde (2), et du tyrosol (4) vis à vis des cellules de la plante hôte.

La recherche des métabolites dans des extraits de matériel végétal infecté et sain a été effectuée par LC-ESI-MSⁿ. Cette étude a permis de montrer que l'acide 3-phényl-lactique (5) était présent dans les extraits de feuilles présentant des symptômes. L'acide 4-hydroxy-benzoïque (1) et le 4-hydroxy-benzaldéhyde (2) ont été détectés dans les extraits de bois infecté et de bois sain, de feuilles malades et de feuilles saines. Enfin, la présence de 1-O-méthyl-émodyne (9) dans des extraits de bois malade a pu être mise en évidence. Aucun métabolite n'a pu être retrouvé dans les extraits de sève.

La présence spécifique de l'acide 3-phényl-lactique dans les feuilles présentant des symptômes ainsi que son activité toxique vis à vis des protoplastes et des cals de vigne suggère que ce métabolite est impliqué dans la maladie.

Summary

Esca is a cryptogamic disease in which five fungi are implied: *Stereum hirsutum*, *Eutypa lata*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium chlamydosporum* and *Fomitiporia punctata*. The pathogens destroy directly the trunk of old vines, causing important economic losses. Only the use of sodium arsenite reduces the damages caused by those fungi. Toxic for the environment, that treatment is banned progressively throughout the world. Therefore, a spreading of the disease has been noticed.

The aim of this study has been to identify the secondary metabolites produced by *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium chlamydosporum* and *Fomitiporia punctata*. The toxicity of those compounds was then evaluated using four bioassays. Eventually, a study of some infected vegetal material was carried on to determine if those molecules were produced *in vivo*.

11 metabolites were identified in the culture media of *Phaeoacremonium chlamydosporum*, among which 4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyloxy)-benzoic acid, a new natural product. In the culture media of *Phaeoacremonium aleophilum*, 7 compounds were identified. And 6 metabolites were characterized in the culture media of *Fomitiporia punctata*, among which 2,2-diméthyl-6-formyl-4-chromanone, a new natural product. All those compounds were identified using either spectroscopic (RMN, UV, IR) and spectrometric (EI-MS, DCI-MS, ESI-MS) techniques or GC-MS.

Four bio-assays were realized: one on tomato plants, an other on vine leaves, a third on vine protoplasts, and the last on callus of vine. The results show the toxicity towards vine cells of 3-phenyl-lactic acid (5), 4-hydroxy-benzoic acid (1), 4-hydroxy-benzaldehyde (2), and tyrosol (4).

The investigation of the infected vegetal material was done by LC-ESI-MSⁿ. This study has revealed that 3-phenyl-lactic acid (5) is present in the infected leaves' extracts. 4-hydroxy-benzoic acid (1) and 4-hydroxy-benzaldehyde (2) were detected in the infected wood and the infected leaves but also in the sane ones. 1-O-methyl-emodin (9) could be found specifically in one infected wood extract. No metabolite was detected in the extracts of rising sap.

The specific presence of 3-phenyl-lactic acid in the infected leaves, and its toxic activity towards the protoplasts and callus of vine, indicate that this metabolite might be implied in the disease.

Table des matières

Chapitre I : Introduction

I.1- Les maladies cryptogamiques de la vigne	1
I.2- L'esca	2
I.2.1- Description de la maladie	2
I.2.1.1- Forme lente	2
I.2.1.1.1- Symptômes sur les organes verts	2
I.2.1.1.2- Symptômes à l'intérieur du tronc et des branches principales	3
I.2.1.2- Forme foudroyante : « l'apoplexie »	4
I.2.2- Historique - Etiologie de l'esca	4
I.2.3- Moyens de lutte	6
I.2.3.1- Mesures prophylactiques	6
I.2.3.2- Le curetage	6
I.2.3.3- La dessiccation	6
I.2.3.4- Méthode de lutte chimique	7
I.3- Brown-wood streaking (Black goo ou Slow dieback of grapevines)	7
I.3.1- Historique	7
I.3.2- Description de la maladie	7
I.3.3- Origine de la maladie	7
I.4- Présentation des champignons étudiés	8
I.4.1- <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	8
I.4.2- <i>Phaeoacremonium chlamydosporum</i>	9
I.4.3- <i>Fomitiporia punctata</i> (Fr.) Murill	10
I.5- Résultats antérieurs	11
I.5.1- Etude d' <i>Eutypa lata</i>	11
I.5.2- Etude de <i>Stereum hirsutum</i>	12
I.6- But du travail	13

Chapitre II : Milieux de culture

II.1- <i>Phaeoacremonium chlamydosporum</i>	15
II.1.1- Culture sur milieu solide	16
II.1.2- Culture en milieu liquide	16
II.1.3- Influence du temps de culture sur la masse d'extrait brut obtenue	17
II.1.4- Influence du temps de culture sur la diversité des métabolites sécrétés	17
II.1.5- Conclusion	19
II.2- <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	19
II.2.1- Culture sur milieu solide	19
II.2.2- Culture en milieu liquide	19
II.2.2.1- Influence du temps de culture sur la masse d'extrait brut obtenue	19
II.2.2.2- Influence du temps de culture sur la diversité des métabolites sécrétés	20
II.2.2.3- Conclusion	21
II.2.3- Recherche d'un milieu adapté à la culture de <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	21
II.3- <i>Fomitiporia punctata</i>	23
II.3.1- Culture sur milieu solide	23
II.3.2- Culture en milieu liquide	23
II.3.3- Influence du milieu de culture sur la diversité des métabolites sécrétés	23

Chapitre III : Isolement et identification des métabolites

III.1- <i>Phaeoacremonium chlamydosporum</i>	27
III.1.1- Procédure d'extraction	27
III.1.2- Métabolites isolés et identifiés	28
III.1.2.1- Identification de l'acide 4-hydroxy-benzoïque	29
III.1.2.2- Identification du 4-hydroxy-benzaldéhyde	33
III.1.2.3- Identification du 4-hydroxy-benzonitrile	35
III.1.2.4- Identification du 2-(4-hydroxy-phényl)-éthanol	38
III.1.2.5- Identification de l'acide 2-hydroxy-3-phényl-propionique	41
III.1.2.6- Identification du 3-hydroxy-5-décanolide	44
III.1.2.7- Identification de la 3,6,8-trihydroxy-3,4-dihydro-(2H)-naphtalén-1-one	47
III.1.2.8- Identification de 4,8-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-naphtalén-1-one	51
III.1.2.9- Identification de la 1,3-dihydroxy-8-méthoxy-6-méthyl-anthraquinone	55
III.1.2.10- Identification de l'acide 3-(3-méthylbut-2-enyloxy)-4-hydroxy-benzoïque	58
III.1.2.11- Identification du N-butyl-benzène-sulfonamide	63
III.2- <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	67
III.2.1- Procédure d'extraction	67
III.2.2- Métabolites isolés et identifiés	67
III.2.2.1- Identification de l'acide 4-hydroxy-benzoïque	67
III.2.2.2- Identification du 4-hydroxy-benzaldéhyde	68
III.2.2.3- Identification de la 3,6,8-trihydroxy-3,4-dihydro-(2H)-	

naphtalén-1-one	69
III.2.2.4- Identification du N-butyl-benzène-sulfonamide	70
III.2.3- Métabolites identifiés par GC-MS	71
III.3- <i>Fomitiporia punctata</i>	73
III.3.1- Procédure d'extraction	73
III.3.2- Métabolites isolés et identifiés	75
III.3.2.1- Identification de l'acide 4-hydroxy-benzoïque	75
III.3.2.2- Identification du 4-hydroxy-benzaldéhyde	76
III.3.2.3- Identification du (+/-)-dihydroactinidiolide	76
III.3.2.4- Identification de la 3-oxo- α -ionone	79
III.3.2.5- Identification de la 6-formyl-2,2-diméthyl-4-chromanone	82
III.3.2.6- Identification de la 8-hydroxy-6-méthoxy-2-méthyl- isochroman-1-one (6-méthoxy melléine)	86

Chapitre IV : Tests biologiques

IV.1- Tests sur plantules de tomate (cv. Bony Best)	91
IV.2- Tests sur carrés de feuilles de ceps de vigne	93
IV.3- Tests sur protoplastes de vigne	94
IV.4- Tests sur cals de vigne	97
IV.5- Conclusion	98

Chapitre V : Etude du matériel végétal

V.1- Description du spectromètre de masse utilisé	101
V.1.1- L'ionisation par électrospray	101
V.1.1.1- Principes	102
V.1.1.2- Aspects pratiques	104
V.1.2- La trappe ionique	105
V.1.3- Techniques d'analyse utilisées	106
V.2- Caractéristiques en LC-ESI-MS des produits recherchés	107
V.3- Origine du matériel végétal	108
V.4- Etude du bois	109
V.4.1- Bois malade ne présentant pas de symptôme foliaire	109
V.4.1.1- Préparation des échantillons	109
V.4.1.2- Analyse de l'extrait brut	109
V.4.1.3- Analyse des fractions de l'extrait brut	110
V.4.1.3.1- Analyse de la fraction AcOEt	110
V.4.1.3.2- Analyse des autres fractions	112
V.4.2- Bois malade présentant des symptômes foliaires	112
V.4.2.1- Préparation des échantillons	112
V.4.2.2- Analyse de l'extrait brut	112
V.4.2.3- Analyse des fractions de l'extrait brut	112
V.4.2.3.1- Etude de la fraction CH ₂ Cl ₂	112
V.4.2.3.2- Etude de la fraction AcOEt	113

V.4.2.3.3- Etude de la fraction butanol	114
V.4.3- Bois malade provenant de Vaux-Rouillac	115
V.4.3.1- Préparation des échantillons	115
V.4.3.2- Analyse des différentes fractions	115
V.4.4- Etude du bois sain	119
V.5- Etude des feuilles	119
V.5.1- Etude des feuilles présentant des symptômes d'esca	119
V.5.2- Etude des feuilles ne présentant aucun symptôme	120
V.6- Etude de la sève	120
V.7- Conclusion	120

Chapitre VI : Recherche et dosage de l'eutypine dans des lyophilisats de milieux de culture d'*Eutypa lata* par LC-ESI-MS²

VI.1- But de l'étude	121
VI.2- Matériel de départ	121
VI.3- Recherche d'eutypine par LC-ESI-MS²	122
VI.3.1-Choix de la méthode	122
VI.3.2- Mise au point de la méthode	122
VI.3.3- Recherche de l'eutypine dans les extraits de culture	125
VI.4- Dosage de l'eutypine par LC-ESI-MS	129
VI.4.1- Méthode	129
VI.4.2- Courbe d'étalonnage	130
VI.4.3- Dosage de l'eutypine dans les extraits de culture	131
VI.4.4- Conclusion	131

Récapitulatif

Chapitre VII : Discussion

VII.1- Milieux de culture	135
VII.1.1- <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	135
VII.1.2- <i>Fomitiporia punctata</i>	136
VII.2- Origine biosynthétique des métabolites	136
VII.2.1- Acide <i>p</i> -hydroxy-benzoïque	137
VII.2.2- <i>p</i> -Hydroxy-benzaldéhyde	139
VII.2.3- Tyrosol	140
VII.2.4- Acide 2-hydroxy-3-phényl-propionique	141
VII.2.5- 4-hydroxy-6-pentyl-tétrahydro-pyran-2-one	142
VII.2.6- Scytalone	144
VII.2.7- Isosclérone	144
VII.2.8- 1-O-méthyl-émodyne	146
VII.2.9- Acide 4-hydroxy-3-(3-méthyl-but-2-ényloxy)-benzoïque	146

VII.2.10- Phényl-méthanol	148
VII.2.11- Phényl-acétate de méthyle	148
VII.2.12- 6-Formyl-2,2-diméthyl-4-chromanone	148
VII.2.13- 3-Oxo- α -ionone	148
VII.2.14- Dihydroactinidiolide	148
VII.2.15- 6-Méthoxy-melléine	149
VII.3- Activité biologique	149
VII.3.1- Toxicité des métabolites	149
VII.3.2- Activité biologique potentielle de certains métabolites	150
VII.4- Matériel végétal	152
VII.5- Dosage d'eutypine	152
Chapitre VIII : Conclusion et perspectives	154
Chapitre IX : Partie expérimentale	
IX.1- Techniques chromatographiques	159
IX.1.1- Chromatographie sur couche mince (CCM)	159
IX.1.2- Chromatographies liquides à basse pression (LPLC)	159
IX.1.3- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	159
IX.2- Méthodes spectroscopiques et spectrométries	160
IX.2.1- Résonance magnétique nucléaire (RMN)	160
IX.2.2- Spectrométrie de masse	160
IX.2.2.1- Spectres EI ou DCI	160
IX.2.2.2- GC-MS	160
IX.2.2.3- LC-MS	161
IX.3- Cultures fongiques	161
IX.4- Procédures d'extraction	161
IX.4.1- Extraction des milieux de culture	161
IX.4.2- Extraction du bois	161
IX.4.3- Extraction de la sève	162
IX.4.4- Extraction des feuilles	162
IX.5- Tests biologiques	162
IX.5.1- Test sur plantules de tomate	162
IX.5.2- Tests sur carrés de feuilles	162
Chapitre X : Bibliographie	163

Chapitre I

Introduction

I.1- Les maladies cryptogamiques de la vigne

Les champignons sont de minuscules organismes (souvent même microscopiques) ne possédant ni chlorophylle ni tissus conducteurs [1]. La plupart des 100000 espèces connues de mycètes sont saprophytiques, aidant à la décomposition de la matière organique morte sur laquelle ils vivent. Cependant, plus de 8000 espèces de champignons peuvent générer des pathologies chez les plantes. Ces agents pathogènes sont responsables de la majorité des maladies des plantes [2]. Ils peuvent provoquer des nécroses locales ou complètes des tissus de leur hôte, une hypoplasie (retard dans le développement des organes de la plante, ou de la plante entière), ou une hyperplasie (croissance accrue de parties ou totalité de la plante). Ainsi, la détérioration des plantes cultivées génère un problème économique important, qui s'accroît rapidement en absence de traitement.

La vigne est une plante sensible à de nombreux cryptogames. La plupart des agents pathogènes attaquent les parties vertes de la plante et/ou les baies, c'est le cas de :

- *Uncinula necator* : responsable de l'oïdium.
- *Plasmodora viticola* : responsable du mildiou.
- *Elsinoe ampelina* : responsable de l'anthracnose.
- *Guignardia bidwelli* : responsable du black rot.
- *Botrytis cinerea* : responsable de la pourriture grise.

Deux maladies ont des incidences encore plus graves sur le vignoble. Il s'agit de l'eutypiose et de l'esca. En effet, les champignons responsables de ces maladies s'attaquent directement à la charpente des souches dont ils provoquent la mort à plus ou moins brève échéance. Il en résulte une diminution progressive de l'encépagement du vignoble. Ces deux maladies provoquent donc non seulement une diminution de récolte sur plusieurs années, mais aussi des frais de replantation.

Avec l'interdiction progressive du seul traitement chimique efficace contre l'esca, cette maladie pourrait devenir, dans un proche avenir, le problème phytosanitaire le plus important du vignoble [3].

I.2- L'esca

I.2.1-Description de la maladie

L'esca peut se manifester sous deux formes : une forme lente ou une forme foudroyante encore appelée apoplexie.

I.2.1.1- Forme lente

La forme lente est la plus fréquemment rencontrée au vignoble. Les premiers symptômes sont visibles après la floraison et se poursuivent tout au long de l'été. Plusieurs semaines, mois ou années peuvent s'écouler avant qu'un cep atteint ne meure. Il arrive qu'un cep présentant les symptômes de la maladie une année, paraisse sain l'année suivante. Cependant, il n'en reste pas moins condamné à une mort certaine.

Enfin, un pied de vigne contaminé n'arbore pas forcément l'ensemble des symptômes qui vont être décrits.

I.2.1.1.1- Symptômes sur les organes verts

Une des premières indications de la maladie, au printemps, est le retard et la faible croissance des jeunes pousses, ce qui perturbe leur lignification.

La détérioration du feuillage commence par la partie inférieure des sarments [4]. Les extrémités du limbe se dessèchent. Puis des taches jaunâtres ou rougeâtres apparaissent entre les nervures, coalescent, et deviennent nécrotiques (photo I.1). Finalement, seules quelques bandes de tissu non affecté subsistent.



Photo I.1 : Symptômes foliaires de l'esca (photo réalisée par Dubos et al)

Des symptômes sur les baies peuvent apparaître. Ils ont surtout été observés en Italie [5, 6] et en Californie [7], expliquant le nom donné à la maladie outre-Atlantique : « black measles ». Ils

se caractérisent par de petites taches marron, violet ou pourpre sur la peau des baies (photo I.2). Ces taches résultent de la mort de cellules de l'épiderme et de l'hypoderme proches de la partie terminale d'un vaisseau du xylème. Mais elles ne se propagent pas dans les tissus sous-jacents [8].



Photo I.2 : Symptômes de l'esca (ou « black-measles ») sur les baies [8]

I.2.1.1.2- Symptômes à l'intérieur du tronc et des branches principales

Les coupes transversales et longitudinales d'un tronc de cep contaminé, mettent en évidence la présence de deux nécroses caractéristiques : une centrale (photo I.3) et une sectorielle (photo I.4). Elles prennent naissance au niveau des plaies de taille et s'étendent ensuite à l'intérieur du tronc de part et d'autre de leur point d'origine.

La nécrose centrale peut être subdivisée en trois zones :

- Une première zone, au centre du tronc, est constituée de tissus de bois changés en une masse spongieuse et friable, de couleur claire, semblable à l'amadou. Elle est observable surtout chez les plants de vigne de plus de huit ans.
- La deuxième zone est un liseré de couleur noir qui entoure la première zone et la sépare de la troisième.
- La troisième zone est caractérisée par une bande dure de bois de couleur brun rose.

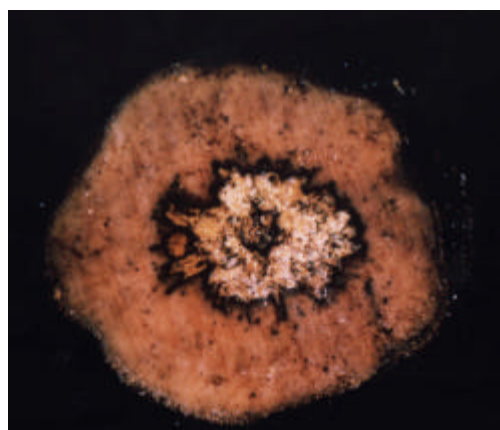


Photo I.3 : Coupe transversale de tronc de cep atteint d'esca présentant la nécrose centrale (photo réalisée par Dubos et al)

La nécrose sectorielle présente deux zones distinctes : une zone brune à consistance dure délimitant une zone claire et tendre.

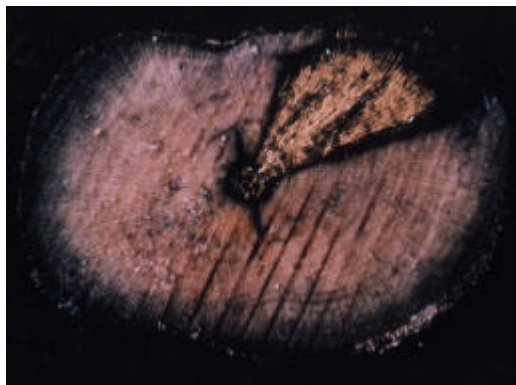


Photo I.4 : Coupe transversale de tronc de cep atteint d'esca présentant la nécrose sectorielle

I.2.1.2- Forme foudroyante : « l'apoplexie »

Cette forme de la maladie se manifeste par un dessèchement rapide des feuilles, baies et jeunes pousses d'un cep. Des coupes longitudinales et transversales du tronc mettent en évidence les nécroses caractéristiques déjà décrites pour la forme lente.

Elle se produit en été à la suite de périodes de chaleurs importantes précédées de fortes pluies.

I.2.2- Etiologie de l'esca - Historique

Les recherches menées sur les causes de l'esca ont abouti à l'implication de plusieurs mycètes. Leur nombre et leur genre ont cependant changé au cours du siècle. L'étiologie de cette maladie reste très discutée.

En 1909, Vinet reportait l'identification de deux champignons présents sur des ceps atteints : *Polyporus versicolor* et *Stereum hirsutum* [9]. Pour Rives, en 1921, *Stereum hirsutum* était responsable de l'apparition de matières gommeuses dans les fibres ligneuses et les cellules des rayons médullaires, induisant ainsi la désagrégation des tissus [10]. En 1922, Gard indiquait que le *Polyporus igniarius* isolé par Ravaz correspondait au *Fomes igniarius* (L.) Fries [11]. Bachala, en 1926, attribuait la maladie à trois champignons : *Polyporus igniarius*, *Polyporus fulvius* et *Stereum hirsutum* [12]. Cette période s'achevait par les travaux de Viala qui mentionnait l'observation d'une espèce ou sous-espèce dérivée de *Stereum hirsutum*, le *Stereum necator* Viala [13].

En 1959, Chiarappa mettait en évidence la relation qui existe entre la dégradation du bois de vigne et la maladie appelée « black-measles » [7]. Il indiquait la présence de *Fomes igniarius* et d'un *Cephalosporium sp* dans la zone brune bordant l'amadou. Son étude permettait également de montrer que le *Stereum necator* isolé par Viala, n'était en fait que le mycélium de *Fomes igniarius*. D'autre part, cet auteur entreprit une étude de la pathogénicité des différents champignons impliqués. Il fut incapable d'induire *in vitro* ou *in vivo* la nécrose typique du bois à l'aide de *Stereum hirsutum*, ce qui l'amena à conclure que ce champignon était saprophyte. Il mentionnait également que *Fomes igniarius* était un des plus destructeurs des champignons de la pourriture blanche, capable de détruire le duramen et l'aubier. Son étude du *Cephalosporium sp.* montra que ce champignon pouvait se déplacer librement dans le bois sain, et était responsable de la coloration

brune du bois. Ensuite, il réalisa une étude des différentes enzymes oxydatives extracellulaires produites par ces différents champignons. Ce travail permit de montrer que *Fomes igniarius* est un grand producteur de peroxydases, enzymes impliquées dans la décomposition de la lignine.

En 1976, Hawksworth réexamina le *Cephalosporium* sp. isolé par Chiarappa, et indiqua qu'il était proche de *Phialophora parasitica*, mais pourrait bien constituer une nouvelle espèce [14]. D'autre part, Galet, en 1977, signalait que *Polyporus (Fomes) igniarius* avait été rebaptisé *Phellinus igniarius* (L. Fr.) Patouillard [15].

En 1987 et 1988, une nouvelle période est amorcée avec les travaux de Dubos et Minervini. Ils révèlent que deux champignons sont principalement retrouvés dans la nécrose typique de l'esca (amadou) : *Phellinus* sp. et *Stereum hirsutum* [3, 168]. *Eutypa lata*, champignon responsable de l'eutypiose, une autre maladie de la vigne, est isolé des nécroses de consistance dure et de couleur brun-chamois. Enfin, deux espèces de *Cephalosporium* sont le plus fréquemment présentes dans les nécroses brunes de consistance dure [3].

Les études de Gams sur les *Cephalosporium* isolés par Chiarappa et Dubos, menèrent à la création d'un nouveau genre d'hyphomycètes, les *Phaeoacremonium*, genre morphologiquement intermédiaire entre les *Acremonium* et les *Phialophora* [16]. Il décrivit quatre espèces de *Phaeoacremonium* isolées de tiges et racines de *Vitis vinifera* :

- ➔ *Phaeoacremonium aleophilum* : espèce trouvée en Italie et Yougoslavie
- ➔ *Phaeoacremonium angustius* : espèce isolée en Californie et en Argentine
- ➔ *Phaeoacremonium chlamydosporum* : espèce isolée en Italie, en Afrique du Sud, et en Californie
- ➔ *Phaeoacremonium inflatipes* : espèce trouvée en Californie

L'étude de 309 ceps de vignes atteints d'esca par Dubos en 1997 a permis d'établir que cinq champignons semblaient impliqués dans la maladie [17] :

- ➔ *Stereum hirsutum* et *Phellinus punctatus* : isolés de la nécrose typique de l'esca (amadou)
- ➔ *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeoacremonium chlamydosporum* : présents dans les zones bordant le bois dégradé
- ➔ *Eutypa lata* : isolé de la nécrose sectorielle de consistance molle

Les tests de pathogénicité réalisés sur ces champignons montrèrent qu'aucun était capable de reproduire l'ensemble des symptômes de l'esca, suggérant que la maladie était le résultat de l'action de chacun de ces mycètes.

Enfin, en 1999, Mugnai signalait que la pourriture blanche du bois de vigne était rarement associée à la présence de *Stereum hirsutum*, mais à *Fomitiporia punctata* (anciennement nommé *Phellinus punctatus*, cf. Schéma I.1) [8].

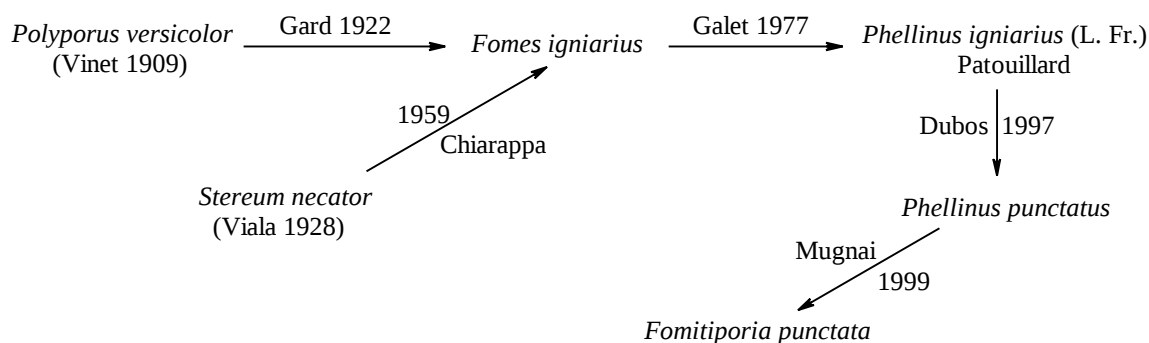


Schéma I.1 : Récapitulatif de l'évolution de la taxonomie de *Fomitiporia punctata*

I.2.3- Moyens de lutte

I.2.3.1- Mesures prophylactiques

Afin de limiter l'extension de la maladie, plusieurs mesures prophylactiques doivent être respectées [8].

Tout d'abord, il convient d'éviter les grosses plaies de taille et les blessures qui constituent d'importantes zones de contamination. Toute blessure devrait être enduite d'un vernis cicatrisant ou d'une préparation contenant un fongicide à large spectre d'action (par exemple à base de cuivre). Lors de la taille, les outils doivent être plongés après chaque opération dans une solution désinfectante (formol, sulfate de cuivre, etc...). Il convient de tailler les ceps apparemment sains avant les autres.

Les ceps foudroyés par la maladie doivent être arrachés, puis brûlés avec les résidus de la taille, afin de diminuer les sources d'inoculum.

Enfin, après des gelées sévères, il convient de traiter rapidement les vignes avec des fongicides.

I.2.3.2- Le curetage

Le curetage est un procédé chirurgical oriental très ancien. Il consiste à enlever la partie du bois transformée en amadou [18, 19, 20] et à goudronner les plaies.

Ce procédé demande beaucoup de mains-d'œuvre et doit être répété chaque année. Il ne permet pas d'arrêter le développement des parasites, mais juste de ralentir leur progression dans les tissus du bois.

I.2.3.3- La dessiccation

La dessiccation est une technique traditionnelle employée par des vignerons grecs de l'Attique et du Péloponnèse [20]. Elle consiste à cureter le tronc puis à le maintenir à l'air en plaçant une pierre au niveau de la fente. Cette technique permet de ralentir la maladie, mais ne la supprime pas.

I.2.3.4- Méthode de lutte chimique

Cette méthode s'avère très efficace. Elle consiste à badigeonner le tronc et les branches principales avec une solution d'arsénite de sodium (12,5 g.l⁻¹). Les traitements doivent être réalisés consécutivement deux années de suite, deux semaines au moins après la taille, et deux à trois semaines au plus tard avant le débourrement pour éviter tout risque d'accident végétatif. Ils peuvent être suspendus la troisième et la quatrième année, mais doivent être répétés les deux années suivantes.

Cependant, la toxicité de l'arsénite de sodium vis à vis de l'homme et de l'environnement, a conduit l'Italie, l'Allemagne et la Grèce à interdire son utilisation. Dans ces pays, une recrudescence de la maladie a pu être constatée, en particulier dans les vignobles italiens.

I.3- Brown-wood streaking (Black-goo ou Slow dieback of grapevines)

I.3.1- Historique

Cette maladie a été décrite en Afrique du Sud par Ferreira en 1994, sous le nom de «slow dieback ». [21] Cet auteur isola, de ceps infectés, un champignon proche de *Phialophora parasitica*, mais présentant des différences morphologiques avec ce dernier. Ce champignon a ensuite été identifié comme étant *Phaeoacremonium chlamydosporum*. [14, 16]

En 1995, Morton mentionna la présence d'un syndrome similaire à celui observé en Afrique du Sud, qu'elle appela «black-goo » [22]. En 1998, Gubler proposa un nouveau nom pour cette maladie : « *Phaeoacremonium* grapevine decline ». Cet auteur isola trois espèces de *Phaeoacremonium* de jeunes ceps dépérissant : *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeoacremonium inflatipes* [23, 24].

I.3.2- Description de la maladie

Contrairement à l'esca, ce syndrome affecte essentiellement les jeunes vignes âgées de 1 à 7 ans. Il provoque un lent (quelque fois même soudain) dépérissement des plants infectés et un retard important de leur croissance.

Les feuilles d'un cep atteint jaunissent, s'enroulent et présentent des nécroses ponctuelles [22].

Les symptômes observables à l'intérieur du cep sont des bandes longitudinales de bois décoloré en brun foncé/noir, qui apparaissent sous forme de points noirs en coupe transversale. Elles sont accompagnées d'une « gommose » abondante produite par les cellules parenchymateuses associées aux vaisseaux du xylème. Ces bandes de bois décoloré prennent naissance soit au niveau des plaies de taille, soit au niveau de la zone greffée. Elles peuvent s'étendre profondément dans le tronc et se propager jusqu'aux racines.

I.3.3- Origine de la maladie

Les différentes recherches entreprises sur le black-goo ont abouti à l'établissement de deux hypothèses quant à son origine.

Phaeoacremonium chlamydosporum a été isolé de nombreuses boutures de vigne possédant des racines, et utilisées par les pépiniéristes pour fournir de nouveaux ceps [25]. Par conséquent, ce champignon serait déjà présent sur les plants mères ou entrerait par les plaies réalisées lors du processus de préparation et de conservation des boutures.

D'autre part, *Phaeoacremonium chlamydosporum* produit des chlamydospores. Ces spores, présentes dans le sol, pourraient être capables de pénétrer dans la plante par ses racines.

I.4- Présentation des champignons étudiés

I.4.1- *Phaeoacremonium aleophilum*

Phaeoacremonium aleophilum (photo I.5) est un ascomycète appartenant à la famille des hyphomycètes.



Photo I.5 : Mycélium de *Phaeoacremonium aleophilum* sur PDA

Son mycélium est constitué d'hyphes ramifiés et cloisonnés de couleur brun clair dont le diamètre varie de 1.5 à 3 μm [16]. Ces hyphes sont soit simples, soit accolés les uns aux autres en brins (jusqu'à 10 hyphes accolés par brin).

Ce champignon ne présente pas de chlamydospores. Ses conidiophores émergent des hyphes. Ils sont souvent réduits à quelques cellules conidiogènes présentant rarement un ou deux septa. La taille des conidiophores varie de 4 à 40 μm de longueur sur 2 à 3 μm de largeur. Les conidies se regroupent en rond à l'extrémité des cellules conidiogènes (figure I.1).

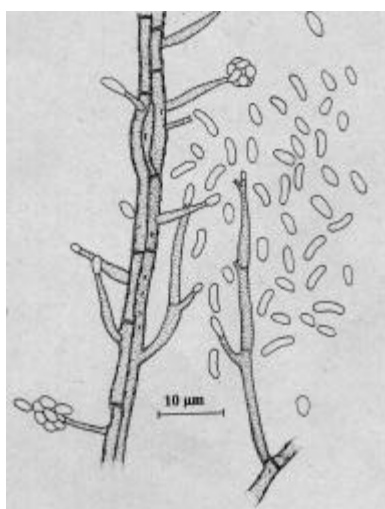


Figure I.1 : Conidies, conidiophores et cellules conidiogènes de *Phaeoacremonium aleophilum* [16].

Une des particularités de ce champignon est de croître à des températures élevées (température optimale de croissance : 35 °C [16]).

Phaeoacremonium aleophilum est très fréquemment isolé du liseré noir et du bois décoloré en brun-rouge qui bordent la zone de bois dégradé en amadou.

Des tests de pathogénicité ont été menés sur ce champignon tout d'abord par Dubos, puis par Mugnai. L'inoculation de *Phaeoacremonium aleophilum* à des jeunes plants de vigne aboutit à l'obtention d'une nécrose sectorielle de couleur brune et de consistance molle, lors des premiers tests. Par contre, les tests réalisés par Mugnai menèrent à l'obtention de bandes de bois décolorés en brun foncé-rouge, s'étendant vers le haut et vers le bas, de part et d'autre du point d'inoculation. L'observation au microscope de ces zones de bois révélèrent la présence de substances gommeuses dans la lumière des vaisseaux du xylème et une tylose.

Ces tests indiquent que ce mycète est capable de coloniser des tissus de bois vivants.

D'autre part, des tests enzymatiques réalisés *in vitro* montrent que *Phaeoacremonium aleophilum* présente une forte activité hydrolytique vis à vis de l'amidon. Ce champignon est également capable de dégrader la cellulose par production d'endo-1,4- β -glucanase et de β -glycosidase [8].

I.4.2- *Phaeoacremonium chlamydosporum*

Phaeoacremonium chlamydosporum (photo I.6) est un ascomycète appartenant à la famille des hyphomycètes. Des études entreprises par Dupont sur les espèces de *Phaeoacremonium* isolés de la vigne, montrent que *Phaeoacremonium chlamydosporum* semble plus proche de *Phialophora verrucosa* que de *Phaeoacremonium aleophilum* ou *Phaeoacremonium parasiticum*. *Phaeoacremonium chlamydosporum* devrait donc être déplacé vers un autre genre [26].

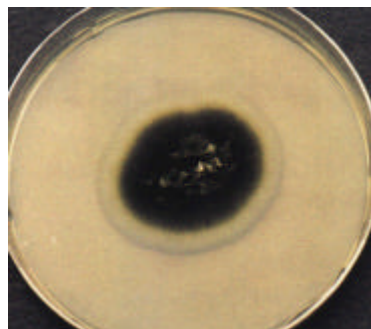


Photo I.6 : Mycélium de *Phaeoacremonium chlamydosporum* sur PDA

Le mycélium de *Phaeoacremonium chlamydosporum* est constitué d'hyphes ramifiés et cloisonnés de couleur vert-brun. Ces hyphes peuvent être soit simples, soit accolés les uns aux autres en brins (jusqu'à 10 hyphes par brin). Leur diamètre varie de 2 à 4 μm . Ce champignon présente beaucoup ou peu de chlamydospores suivant les souches. Les conidiophores émergent des hyphes et comportent un à trois septa. Leur taille varie de 12 à 40 μm de longueur sur 1.5 à 4 μm de largeur. Les conidies se regroupent en rond à l'extrémité des cellules conidiogènes (figure I.2).

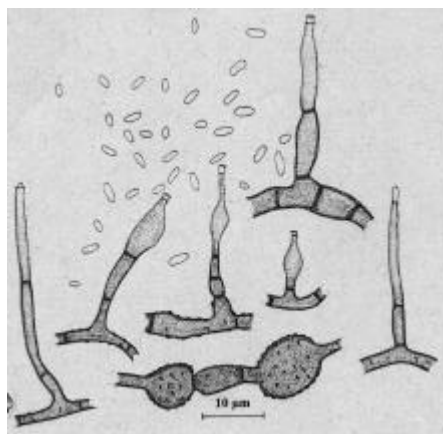


Figure I.2 : Conidies, conidiophores et cellules conidiogènes de *Phaeoacremonium chlamydosporum* [16].

Phaeoacremonium chlamydosporum est très fréquemment isolé des zones noires de bois et des zones décolorées brun-rouge qui bordent la nécrose centrale friable. Les tests de pathogénicité réalisés par Dubos sur ce champignon montrent qu'il induit une nécrose brun-foncé. Quant à ceux de Mugnai, ils indiquent que *Phaeoacremonium chlamydosporum* provoque la formation de bandes de bois décolorées en brun foncé-rouge s'étendant vers le haut et vers le bas, de part et d'autre du point d'inoculation.

Ces tests révèlent que le champignon est capable de coloniser des tissus de bois vivants.

D'autre part, des tests enzymatiques réalisés *in vitro* montrent que *Phaeoacremonium chlamydosporum* présente une forte activité hydrolytique vis à vis de l'amidon. Ce champignon est également capable de dégrader la cellulose par production d'endo-1,4- β -glucanase et de β -glycosidase [8].

I.4.3- *Fomitiporia punctata* (Fr.) Murrill

Fomitiporia punctata (photo I.7) est un champignon appartenant à l'embranchement des basidiomycètes. Il fait partie de la famille des Polyporaceae.

Les basidiocarpes de *Fomitiporia punctata* sont rarement observés sur des troncs vivants de ceps atteints.

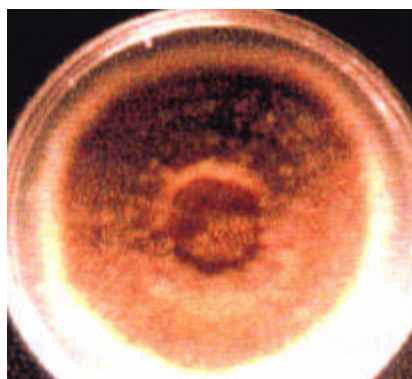


Photo I.7 : Mycélium de *Fomitiporia punctata* sur PDA

Ce champignon est très fréquemment présent dans la nécrose typique de l'esca de consistance molle (amadou).

Les premiers tests de pathogénicité réalisés par Dubos montrèrent que *Fomitiporia punctata* induisait la formation de bandes brunes dans le xylème présent au moment de l'inoculation. Ces tests avaient été effectués sur des troncs de « Cabernet Sauvignon » âgés de un an, qui étaient enracinés puis maintenus six mois en serre ou treize mois à l'extérieur.

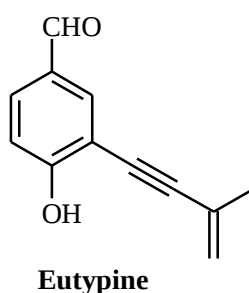
Les tests entrepris par Chiarappa sur des ceps âgés de sept ans, inoculés et laissés huit ans en culture au vignoble, aboutirent à l'obtention de bois nécrosé friable typique de l'esca. Le résultat de ce test montra également que ce champignon était capable de coloniser des vignes relativement jeunes sans l'aide de « parasite précurseur ».

L'étude des enzymes extracellulaires produites par ce champignon montrèrent que *Fomitiporia punctata* était incapable d'hydrolyser l'amidon. Par contre, ce mycète possède des activités endo-1,4- β -glucanase et β -glucosidase lui permettant de dégrader la cellulose. Ce champignon possède également toutes les enzymes nécessaires à la formation de la pourriture blanche par dégradation de la lignine : phénol oxydase, peroxydase et laccase [7, 8, 27]. *Fomitiporia punctata* est le seul des champignons inféodés au syndrome de l'esca à présenter une activité laccase.

I.5- Résultats antérieurs

I.5.1- Etude d'*Eutypa lata*

Eutypa lata est un ascomycète responsable de l'eutypiose, autre maladie grave de la vigne. Les études menées sur les milieux de culture de ce champignon ont abouti à l'isolement et la caractérisation d'un grand nombre de métabolites secondaires [28, 29], parmi lesquels une phytotoxine : l'eutypine.



La synthèse de ce composé [30] a permis d'obtenir des quantités suffisantes de produit pour évaluer son activité vis à vis de cellules de la plante hôte. Des tests réalisés sur protoplastes de vigne révélèrent l'importante toxicité de cette molécule.

La présence de ce composé a pu être mise en évidence dans le bois malade, les tiges, les inflorescences et la sève de cep infesté [31].

L'eutypine présente un caractère acide faible lié à son groupement hydroxyle, et un caractère lipophile lié à la présence de la chaîne acétylénique. Ceci lui permet de pénétrer rapidement dans les cellules de *Vitis vinifera* par diffusion passive [32], et de s'accumuler dans leur cytoplasme où elle se trouve sous forme déprotonée.

Le mécanisme d'action de l'eutypine n'est pas encore bien établi, mais il a été montré qu'elle découplait la phosphorylation oxydative réalisée au niveau de la membrane interne des mitochondries [33]. La phosphorylation oxydative est un des mécanismes permettant de fournir de

l'énergie à une cellule sous forme de molécules d'ATP. Dans ces conditions, on peut penser que l'eutypine induit un ralentissement de l'ensemble du métabolisme des cellules de vigne.

Dernièrement il a été montré que les cellules de *Vitis vinifera* synthétisaient une enzyme capable de détoxifier l'eutypine [34]. Cette enzyme, appelée eutypine réductase, est une réductase NADPH-dépendante. Elle transforme l'eutypine en eutypinol. L'activité de l'eutypine semble donc liée à la présence du groupement aldéhyde.

I.5.2- Etude de *Stereum hirsutum*

Stereum hirsutum est un basidiomycète isolé de la nécrose typique de l'esca (amadou).

Les études menées sur les milieux de culture de ce champignon ont abouti à l'isolement et la caractérisation d'une dizaine de métabolites secondaires [35]. La synthèse du stéréhirsutinal a permis d'établir précisément la structure de ce composé [36].

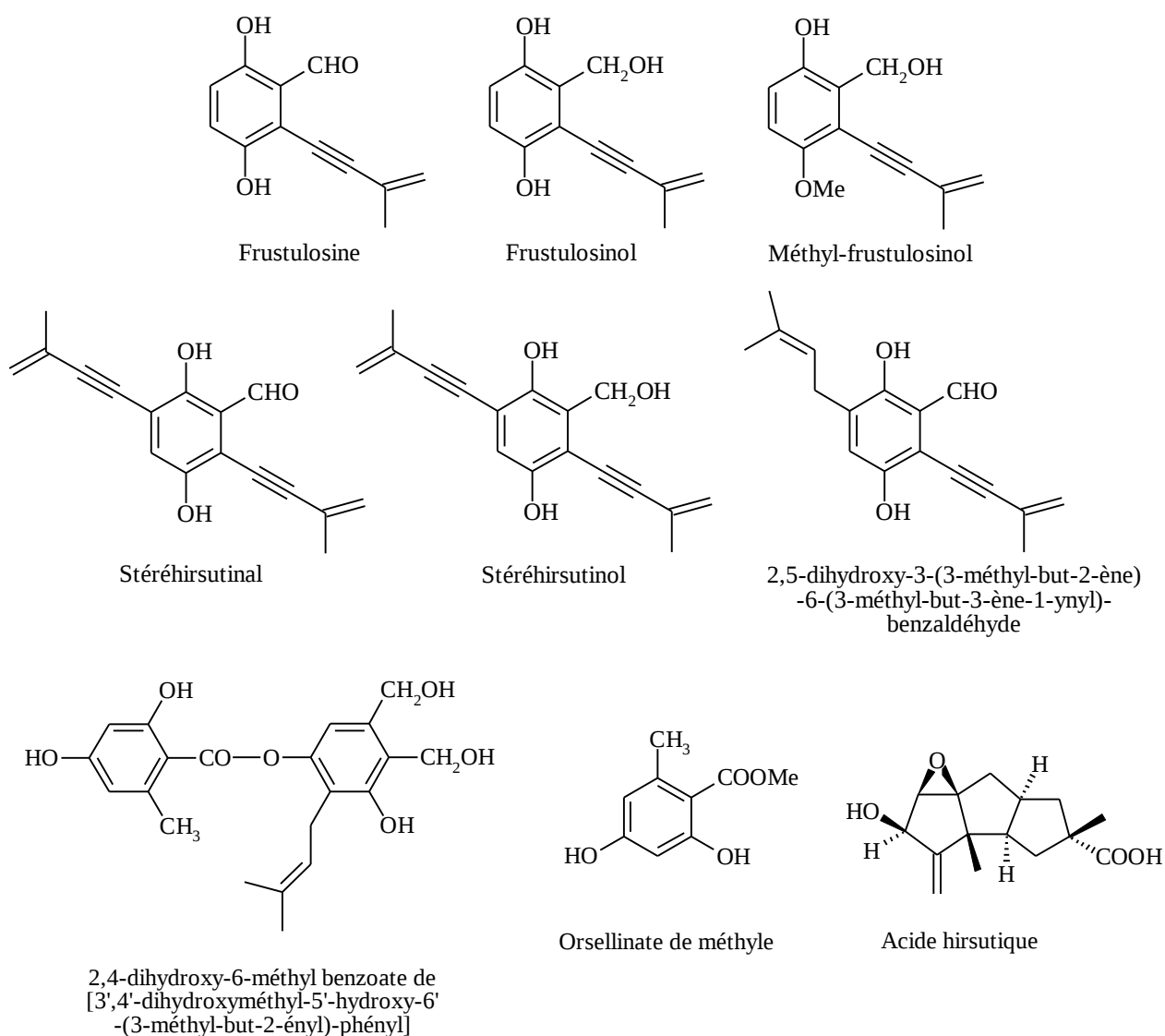


Schéma I.2 : Produits isolés de *Stereum hirsutum*

Les études menées sur ces composés ont permis de montrer que le stéréhirsutinal est une toxine présente dans le bois malade [37]. Sa toxicité vis à vis de cals de vigne est comparable à celle de l'eutypine.

L'eutypine réductase est capable de détoxifier cette molécule par réduction de son groupement aldéhyde, de la même façon que pour l'eutypine.

I.6- But du travail

L'objectif de ce travail a été d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires produits respectivement par *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium chlamydosporum* et *Fomitiporia punctata*. Dans un deuxième temps, nous avons soumis ces composés à des biotests pour évaluer leur toxicité. La dernière étape a consisté à rechercher ces métabolites dans du matériel végétal infesté afin de déterminer s'ils sont présents *in vivo*.

D'autre part, nous avons cherché à établir s'il existe une corrélation entre l'agressivité d'une souche d'*Eutypa lata* et la quantité d'eutypine qu'elle produit. Pour cela, nous avons dosé l'eutypine contenue dans des milieux de culture de souches d'*Eutypa lata* plus ou moins agressives.

Chapitre II

Milieux de culture

La croissance et le métabolisme d'un champignon dans un milieu de culture liquide artificiel passent par différentes phases [38] :

- la phase équilibrée : à ce stade l'organisme croît de façon exponentielle en consommant les nutriments essentiels à son développement. Peu de métabolites secondaires sont produits. Cette phase s'achève par l'épuisement d'un élément indispensable à la croissance du champignon (généralement de l'élément nitré ou phosphoré du milieu).
- la phase de stockage : la masse cellulaire continue d'augmenter par accumulation d'acides gras, de stéroïdes et de carbohydrates. C'est à partir de cette phase que la production de métabolites secondaires commence.
- la phase de maintenance : la biomasse est constante. La production de métabolites secondaires se poursuit jusqu'à l'épuisement de la source de carbone et le début du processus d'autolyse.

Afin d'obtenir des quantités maximales de métabolites secondaires, il nous faut déterminer le temps après lequel le processus d'autolyse commence. Pour cela nous avons fait varier le temps d'incubation des champignons dans leur milieu de culture. Chacun des milieux était ensuite extrait à l'acétate d'éthyle. Deux critères ont été retenus pour déterminer la durée optimale de culture :

- la masse d'extrait brut obtenu
- la composition qualitative de ces différents extraits (évaluée par HPLC)

II.1- *Phaeoacremonium chlamydosporum*

Quatre souches de ce champignon ont été étudiées. La première, nommée PP₁ F₉₁₋₅, vient de Provence (France), d'où elle fût isolée en 1991. La deuxième, PP₁ SO₄₅, isolée en 1996, provient d'une parcelle située à Morein (Pyrénées atlantiques, France). La troisième, PP₁ CO₁₀, est issue de Le Chay (Charentes maritimes, France) et fût isolée en 1996. Quant à la dernière, PP₁ SO₄, également isolée en 1996, elle est originaire de Léognan (Gironde, France).

Toutes ces souches furent purifiées et identifiées à la station de pathologie végétale de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Bordeaux, par le Dr Philippe Larignon.

Les extraits bruts des milieux de culture de ces quatre souches ont été chromatographiés par HPLC, en utilisant le même programme d'élution (figure II.1).

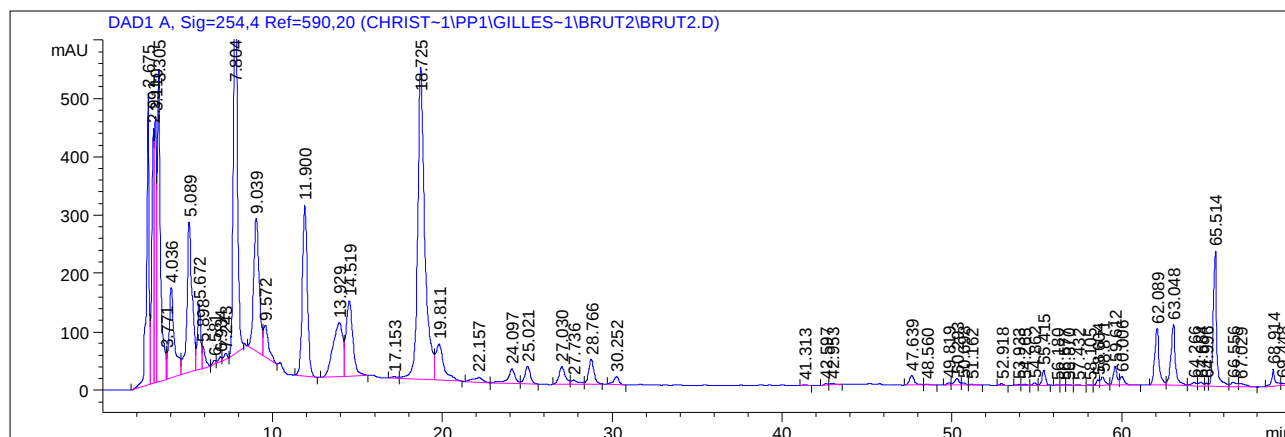


Figure II.1 : Chromatogramme HPLC d'un extrait brut de *P. Chlamydosporum*

II.1.1- Culture sur milieu solide

Afin de stocker et de conserver les différentes souches, nous les repiquons tous les mois dans des boîtes de Pétri sur une gélose de dextrose de pommes de terre (milieu PDA). Les boîtes sont conservées dans une chambre climatisée à 25°C et à l'obscurité. Dans ces conditions, il faut six semaines pour que le champignon occupe une surface de 7 cm².

II.1.2- Culture en milieu liquide

Pour les cultures en milieu liquide, nous avons utilisé un milieu riche en glucose dérivé de celui d'Eriksson et Petersson [39]. Il se compose de :

Glucose monohydrate	: 220 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	: 20 g
KH ₂ PO ₄	: 10 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	: 5 g
Solution de sels minéraux	: 10 ml
H ₂ O	: 10 l

La solution de sels minéraux renferme les composés suivants :

CaCl ₂ , 1 H ₂ O	: 7.4 g
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	: 0.66 g
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	: 0.5 g
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	: 0.1 g
FeCl ₃ , 6 H ₂ O	: 0.15 ml
Acide citrique	: 0.6 g
Thiamine	: 0.01 g
H ₂ O	: 1 l

Dix litres de ce milieu sont répartis dans quarante erlenmeyers à chicane de 500 ml. Les flacons sont ensuite obturés par un bouchon de coton hydrophile permettant la respiration, mais empêchant l'entrée d'éventuels micro-organismes contaminant. Le milieu est alors stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.

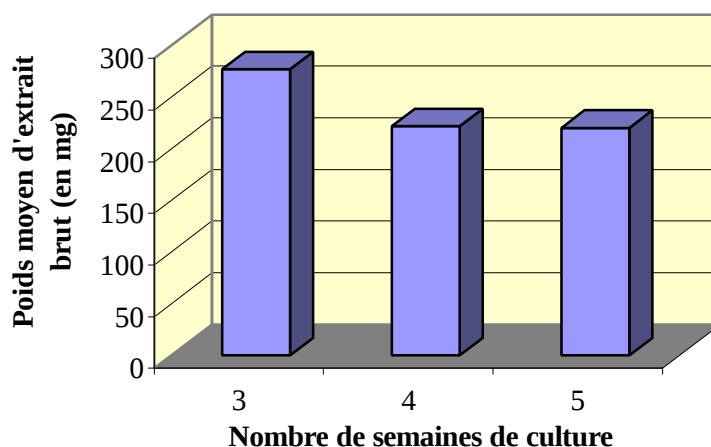
Pour procéder à l'inoculation, nous disposons les erlenmeyers sous un flux laminaire de façon à ce qu'ils restent en atmosphère stérile. Chaque flacon est inoculé par un quartier de mycélium prélevé d'une boîte de Pétri.

Les cultures sont ensuite agitées uniformément à 120 tours par minute dans une salle climatisée à 25°C et à l'obscurité.

II.1.3- Influence du temps de culture sur la masse d'extrait brut obtenue

Les cultures de *Phaeoacremonium chlamydosporum* ont été interrompues au bout de trois, quatre ou cinq semaines par filtration des milieux de culture sur célite. Le mycélium est détruit par autoclavage, et le filtrat récupéré est extrait deux fois à l'AcOEt. Après séchage de la phase organique sur MgSO₄ anhydre, évaporation du solvant et séchage une nuit sous vide de 10⁻³ bar, le poids d'extrait brut est déterminé.

Le graphe II.1 présente l'évolution du poids moyen d'extrait brut obtenu en fonction du nombre de semaines de culture :



Graphe II.1 : Poids moyen extrait brut obtenu en fonction du nombre de semaines de culture

Il apparaît que la plus grande quantité de métabolites est présente au bout de trois semaines de culture.

II.1.4- Influence du temps de culture sur la diversité des métabolites sécrétés

Une analyse qualitative de la composition de chaque extrait brut est réalisée par HPLC couplée à un détecteur ultraviolet. Une séparation des constituants du mélange en fonction de leur polarité est effectuée sur une colonne de silice en phase inversée de type RP-C18. Nous réalisons l'élution à l'aide de méthanol et d'eau, en augmentant progressivement la teneur en méthanol

(programme 1). Les chromatogrammes obtenus en fonction du temps de culture sont les suivants (figures II.2, II.3 et II.4) :

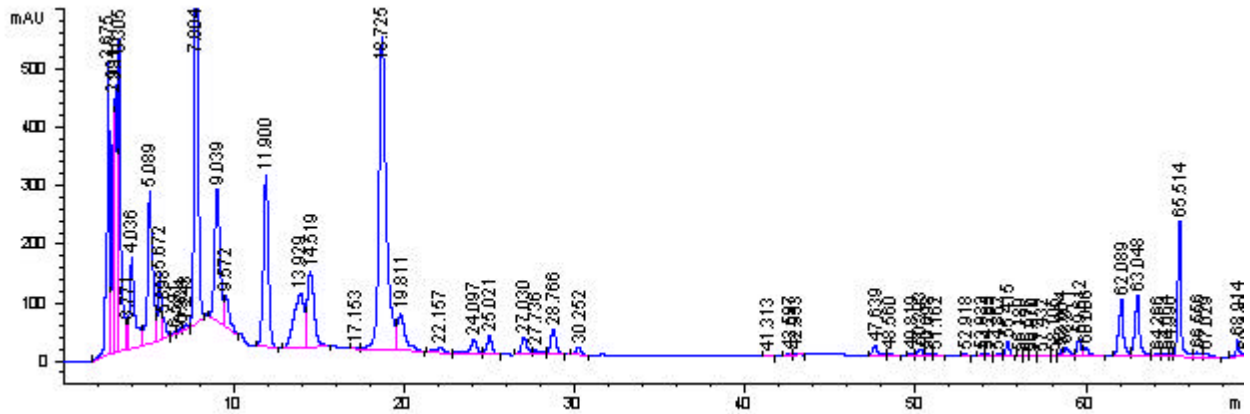


Figure II.2 : Chromatogramme HPLC d'un extrait brut de *P. Chlamydosporum* obtenu après 3 semaines de culture

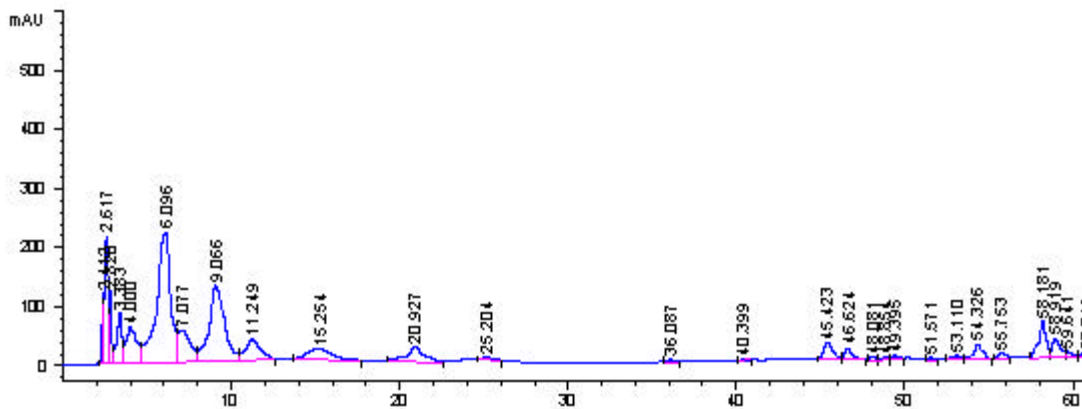


Figure II.3 : Chromatogramme HPLC d'un extrait brut de *P. Chlamydosporum* obtenu après 4 semaines de culture

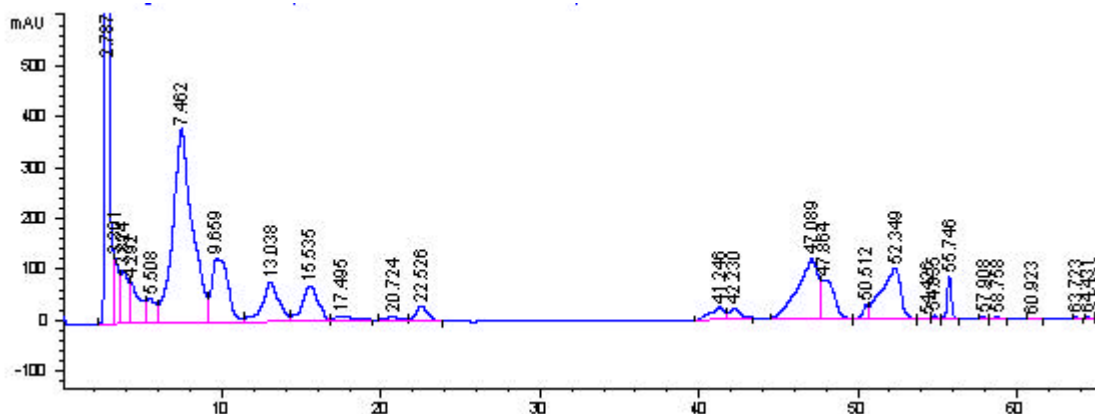


Figure II.4 : Chromatogramme HPLC d'un extrait brut de *P. Chlamydosporum* obtenu après 5 semaines de culture

II.1.5- Conclusion

Un biotest réalisé sur des plantules de tomate de la variété Bonny Best a permis de vérifier la toxicité de tous ces extraits bruts.

L'extrait brut des cultures de trois semaines est celui qui contient les plus grandes quantités et variété de composés.

De ce fait, nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur des cultures de cet âge. Puis nous avons étudié les milieux âgés de quatre et cinq semaines pour tenter d'isoler d'autres métabolites que ceux trouvés dans les cultures de trois semaines.

II.2- *Phaeoacremonium aleophilum*

Trois souches de ce champignon ont été étudiées. La première, appelée PP₂ (932940), provient de Blanquefort (Gironde, France), et fut isolée en 1985. La deuxième, PP₂ SO₂₄, est originaire de Montbazillac (24) où elle fut isolée en 1996. La dernière, PP₂ SO₄, isolée en 1996, est issue de Léognan (Gironde, France).

Toutes ces souches ont également été identifiées et purifiées par le Dr Philippe Larignon de l'INRA de Bordeaux.

II.2.1- Culture sur milieu solide

Tout comme pour *Phaeoacremonium chlamydosporum*, nous procédons au repiquage des souches de *Phaeoacremonium aleophilum* sur un milieu solide. Nous employons une gélose de dextrose de pommes de terre coulée dans des boîtes de Pétri. Nous réalisons cette opération tous les mois.

Phaeoacremonium aleophilum est un champignon sensible à la lumière. Les boîtes de Pétri inoculées sont donc directement transférées dans une chambre climatisée à 25°C, à l'obscurité. Cependant même dans ces conditions, la croissance de ce champignon reste très lente, beaucoup plus lente que celle de *Phaeoacremonium chlamydosporum*.

II.2.2- Culture en milieu liquide

Dans un premier temps, nous avons employé le milieu de culture dérivé d'Eriksson et Petersson [39]. Chaque erlenmeyer est inoculé par un morceau de mycélium prélevé dans une boîte de Pétri.

II.2.2.1- Influence du temps de culture sur la masse d'extrait brut obtenue

Les cultures sont arrêtées en séparant le mycélium du milieu de culture par filtration sur célite. Le filtrat récupéré est alors extrait deux fois à l'AcOEt. Après séchage de la phase organique sur MgSO₄ anhydre, et évaporation du solvant, le résidu est maintenu une nuit sous un vide de 10⁻³ bar. La masse d'extrait brut est ensuite déterminée.

Tout d'abord, nous avons interrompu la culture après quatre semaines d'incubation. A ce stade, le mycélium s'était très peu développé, sous forme de filaments plats de 5 cm de long sur 0,5 cm de large. Les spores étaient peu abondantes. Le milieu de culture était jaunâtre. La masse d'extrait brut récupéré ne dépassait pas les 80 mg pour 10 litres de milieu de culture, quantité insuffisante pour notre étude.

Nous avons ensuite allongé le temps de culture afin d'essayer d'augmenter la biomasse. Des résultats similaires, non satisfaisants, ont été obtenus pour des temps de culture de cinq, six, huit et neuf semaines.

II.2.2.2- Influence du temps de culture sur la variété des métabolites sécrétés

Nous avons procédé de la même façon que pour *Phaeoacremonium chlamydosporum*, en utilisant les mêmes conditions chromatographiques (colonne et programme d'élution identiques).

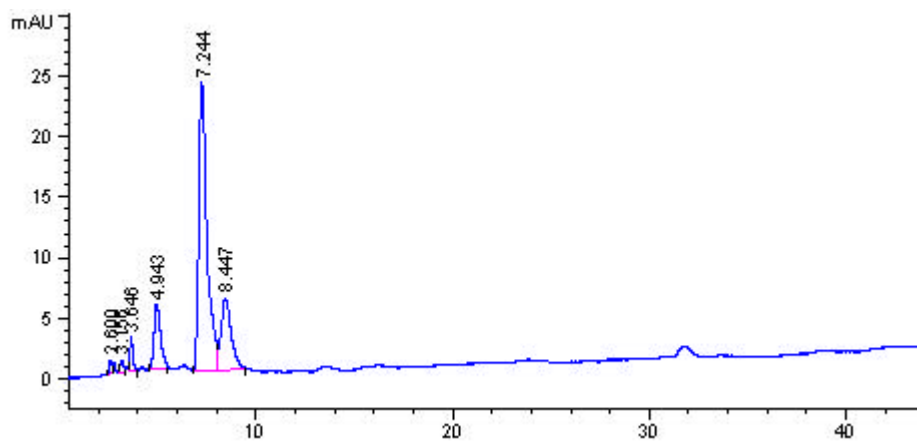


Figure II.5 : Chromatogramme HPLC d'un extrait brut de *P. aleophilum* obtenu après 4 semaines de culture

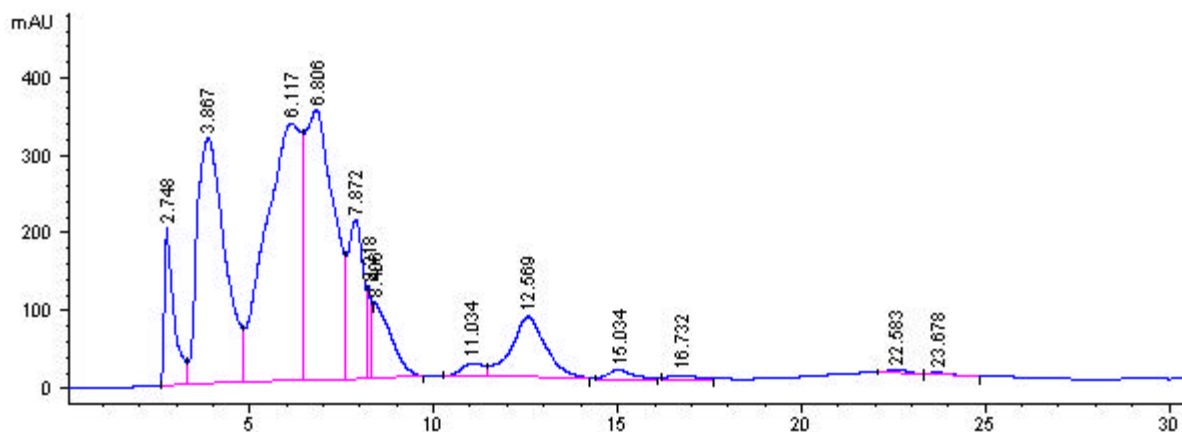


Figure II.6 : Chromatogramme HPLC d'un extrait brut de *P. aleophilum* obtenu après 5 semaines de culture

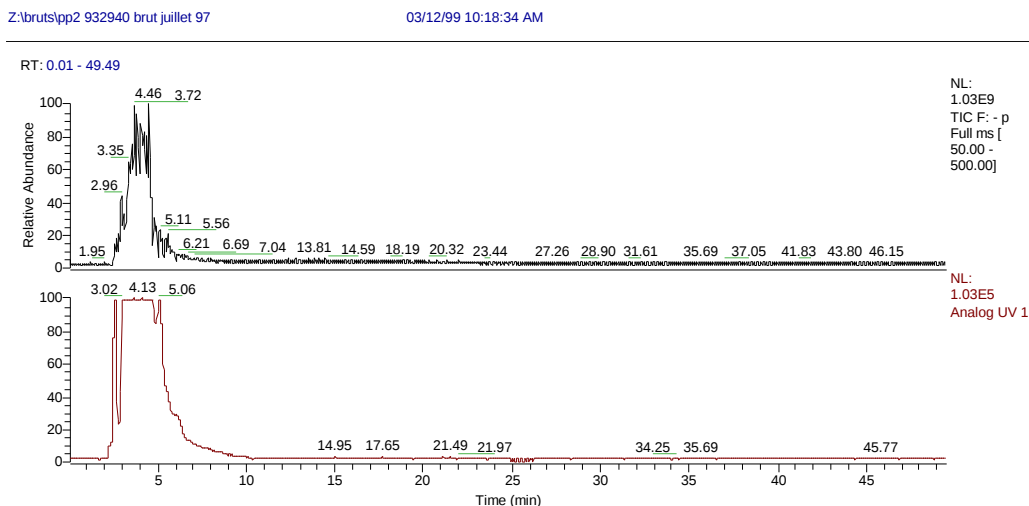


Figure II.7 : De haut en bas : Courant ionique total en ESI mode négatif, analogue UV (254 nm) d'un extrait brut de 8 semaines de *Phaeoacremonium aleophilum*

De cette étude, il ressort que quel que soit le temps de culture, les métabolites présents sont peu diversifiés au niveau de leur polarité.

II.2.2.3- Conclusion

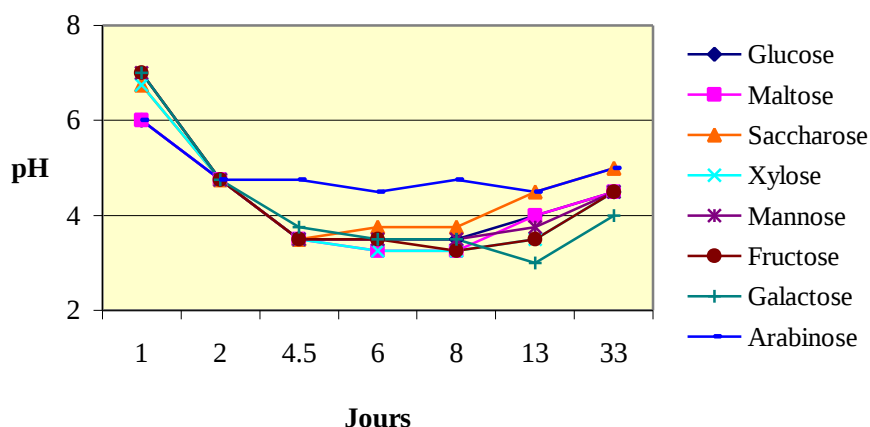
Le milieu dérivé de celui d'Eriksson et Petersson ne permet pas d'obtenir des quantités satisfaisantes d'extrait brut pour notre étude. Nous avons donc cherché un milieu plus adapté.

D'autre part, l'ensemble de ces milieux de culture présente une toxicité vis à vis des plantules de tomate.

II.2.3- Recherche d'un milieu adapté à la culture de *Phaeoacremonium aleophilum*

Notre but est d'isoler et d'identifier les composés issus du métabolisme de *Phaeoacremonium aleophilum*. Cette étude nécessite l'utilisation de milieux de culture de composition simple. Tout milieu complexe, susceptible de comporter des composés instables, devrait être évité. En effet, ces produits peuvent se dégrader sans pour autant avoir été métabolisés par le champignon.

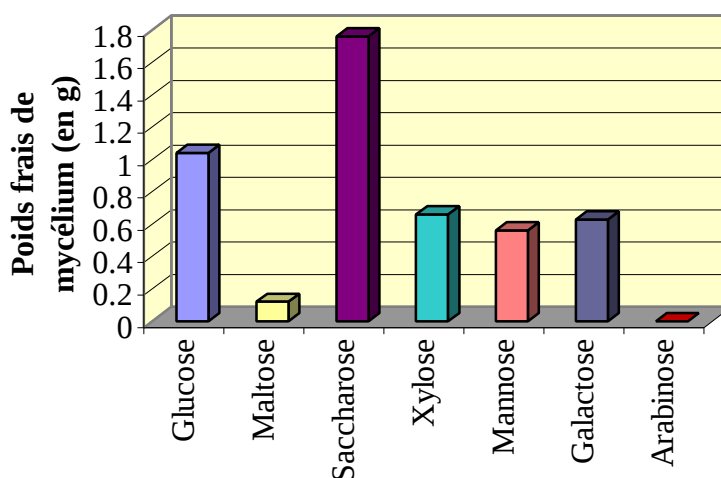
Afin de répondre à ces exigences, nous avons conservé comme modèle le milieu dérivé d'Eriksson et Petersson. Il ne contient qu'un sucre (le glucose) et des sels minéraux à l'état de traces. Nous avons simplement substitué le glucose par d'autres sucres à la même concentration. Sept sucres ont été testés : le maltose, le saccharose, le xylose, le mannose, le fructose, le galactose et l'arabinose. Le pH de chaque milieu a été ensuite suivi régulièrement (graphe II.2).



Graphe II.2 : Evolution du pH des milieux de culture en fonction du temps

Dès les premiers jours de culture, nous remarquons une baisse importante du pH. Ceci témoigne d'une importante production de composés acides.

Après trente trois jours de culture, le mycélium est devenu complètement noir (mélansé). Nous avons alors filtré les milieux. Le poids frais du mycélium récupéré pour chaque sucre a ensuite été déterminé (graphe II.3).



Graphe II.3 : Poids frais de mycélium (après 33 jours de culture) en fonction du sucre utilisé dans le milieu de culture

Nous constatons que la croissance *Phaeoacremonium aleophilum* est meilleure lorsque l'on utilise le glucose, ou mieux le saccharose, par rapport aux autres sucres testés. On peut expliquer cette amélioration par le fait que le saccharose est un disaccharide. Les champignons renferment des glycosidases capables de rompre la liaison entre le glucose et le fructose. Ainsi, *Phaeoacremonium aleophilum* dispose d'une plus grande quantité de sucre pour se développer que dans le cas des monosaccharides testés. Cependant, le développement du mycélium reste faible et insatisfaisant sur ce type de milieu.

Enfin, nous avons pu remarquer que tous ces milieux présentaient une toxicité vis à vis des plantules de tomate.

II.3- *Fomitiporia punctata*

Une seule souche de ce champignon a été étudiée. Elle nous a été fournie par le Professeur M. Minervini de l'Institut de Pathologie Végétale de l'Université de Milan.

II.3.1- Culture sur milieu solide

La souche est repiquée tous les 3 à 4 semaines dans des boîtes de Pétri sur un milieu constitué d'une gélose de dextrose de pommes de terre. Les boîtes sont ensuite transférées dans une chambre climatisée à 25 °C et maintenues à l'obscurité. Après 28 jours, le mycélium a recouvert l'ensemble de la surface de la boîte de Pétri.

II.3.2- Culture en milieu liquide

Pour les cultures en milieu liquide, nous avons utilisé un milieu à base de carottes.

Dix litres de ce milieu sont répartis dans quarante erlenmeyers à chicane de 500 ml. Les flacons sont ensuite obturés par un bouchon de coton hydrophile permettant la respiration, mais empêchant l'entrée d'éventuels micro-organismes contaminant. Le milieu est alors stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.

Pour procéder à l'inoculation, nous disposons les erlenmeyers sous un flux laminaire de façon à ce qu'ils restent en atmosphère stérile. Chaque flacon est inoculé par un quartier de mycélium prélevé d'une boîte de Pétri.

Les cultures sont ensuite agitées uniformément à 120 tours par minute.

II.3.3- Influence du milieu de culture sur la diversité des métabolites sécrétés

Une analyse qualitative de la composition de chaque extrait brut est réalisée par HPLC couplée à un détecteur ultraviolet. Une séparation des constituants du mélange en fonction de leur polarité est effectuée sur une colonne de silice en phase inversée de type RP-C18. Nous réalisons l'élution à l'aide de méthanol et d'eau, en augmentant progressivement la teneur en méthanol (programme 1). Les chromatogrammes obtenus en fonction du temps de culture sont les suivants :

milieu carottes + phellinus 2ème inje...

05/03/98 06:11:58 PM

milieu carottes + phellinus

milieu carottes avec phellinus 2ème injection, solution plus concentrée

RT: 0.01 - 67.67

NL:

1.03E5

Analog UV 1

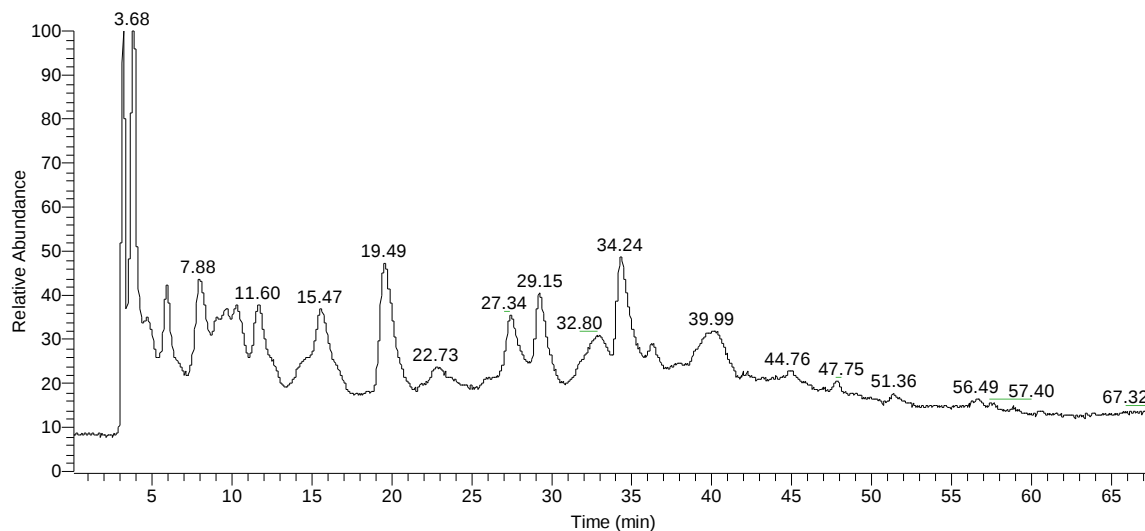


Figure II.8 : Chromatogramme HPLC d'un extrait brut de 4 semaines de *Fomitiporia punctata*

Z:\b2 phellinus esi neg t1
ESI MODE NEGATIF

06/20/98 03:43:24 PM

B2 PHELLINUS

RT: 0.01 - 75.02

NL:

2.15E4

Analog UV 1

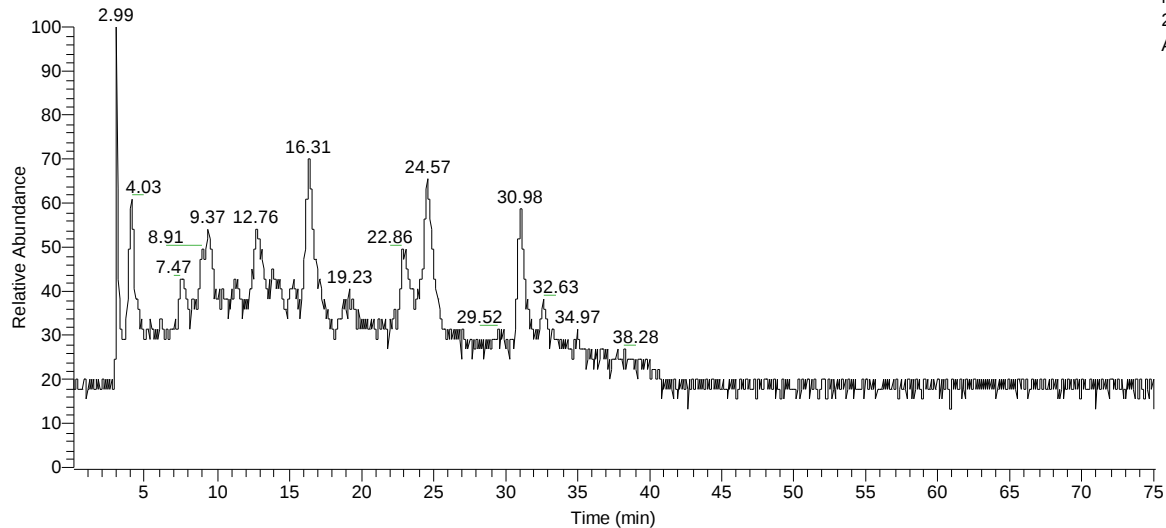


Figure II.9 : Chromatogramme HPLC d'un extrait brut de 5 semaines de *Fomitiporia punctata*

Nous avons également injecté un extrait du milieu à base de carottes non inoculé (figure II.10).

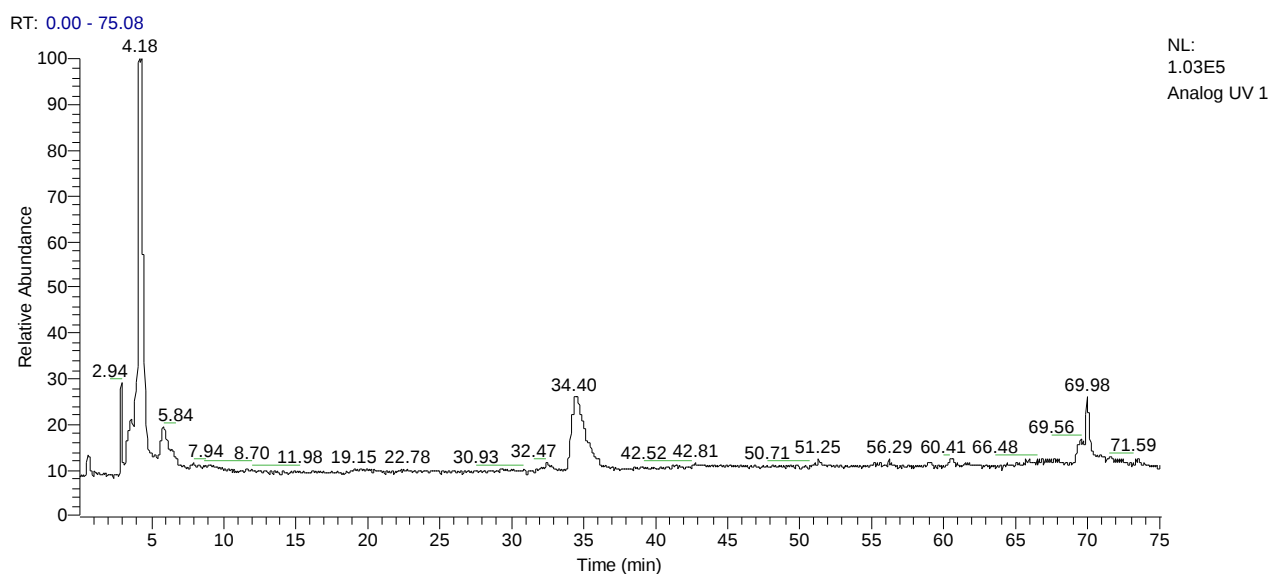


Figure II.10 : Chromatogramme HPLC d'un extrait de milieu à base de carottes non inoculé

L'extrait de milieu de culture de 4 semaines de *Fomitiporia punctata* renferme la plus grande diversité et quantité de métabolites. A 5 semaines de culture il semble que le champignon soit entré dans la phase d'autolyse. Nous avons donc effectué nos analyses sur des cultures âgées de 4 semaines.

D'autre part, il apparaît que la plupart des métabolites des milieux de culture inoculés résultent de la présence du champignon et non de la dégradation du milieu à base de carottes.

Chapitre III

Isolement et identification des métabolites

III.1- *Phaeoacremonium chlamydosporum*

III.1.1- Procédure d'extraction

Chacun des milieux de culture est filtré sur célite. Le filtrat est ensuite extrait à l'acétate d'éthyle (figure III.1).

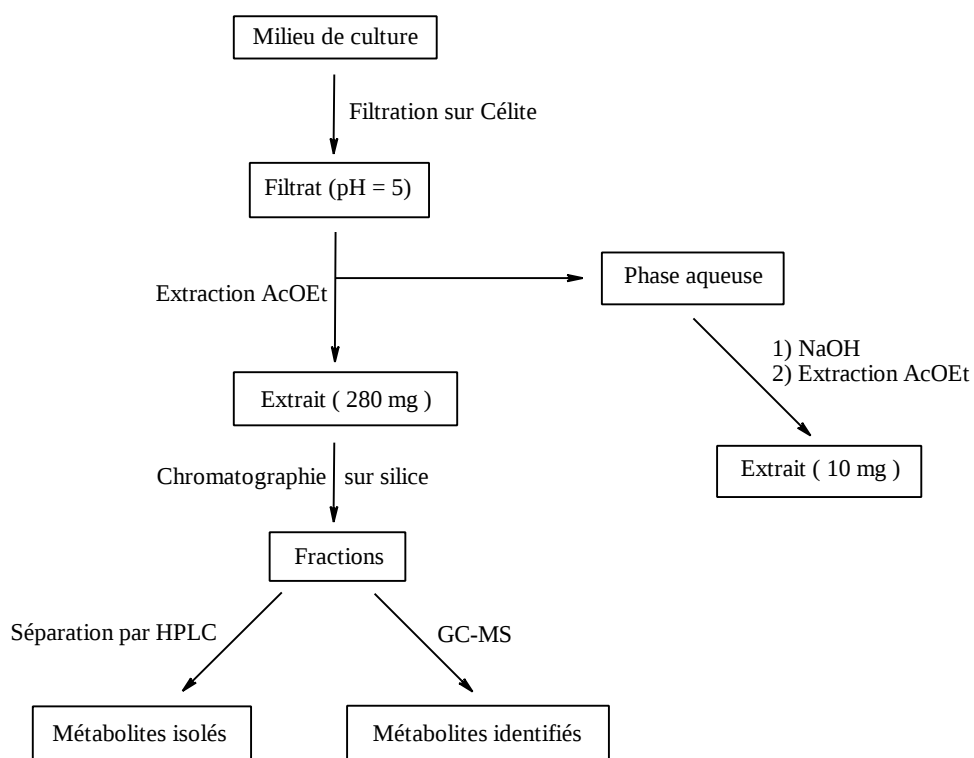
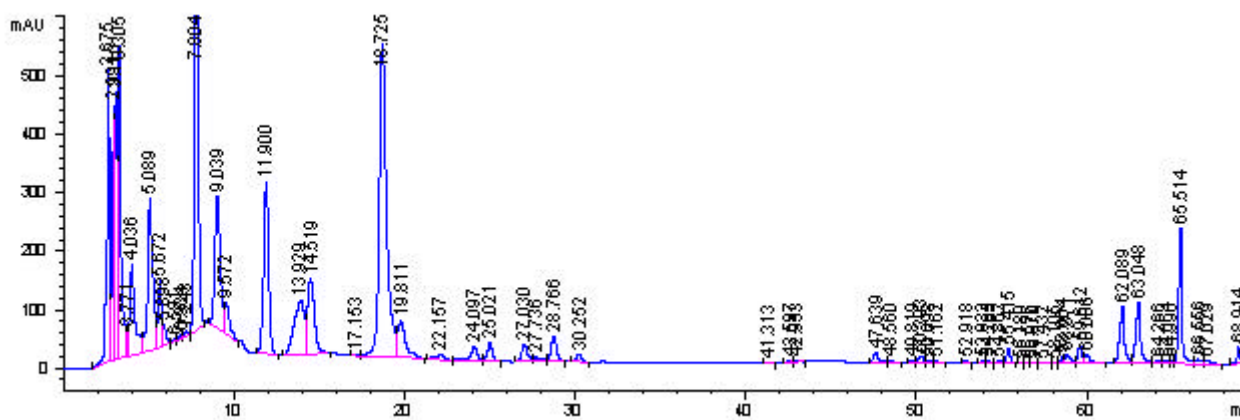


Figure III.1 : procédure générale d'extraction et de séparation des métabolites

Les extraits bruts ainsi obtenus sont alors chromatographiés en HPLC sur phase inverse (RP-C₁₈, 7 µm, 4 mm, 25 cm) en utilisant un gradient croissant de méthanol dans l'eau (figure III.2).



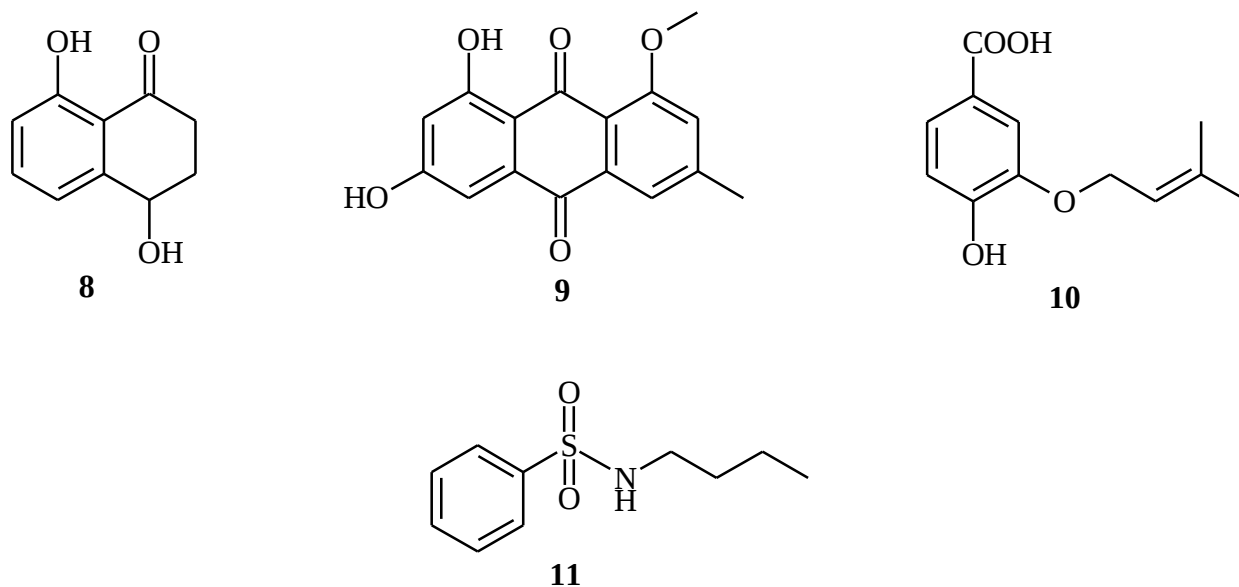
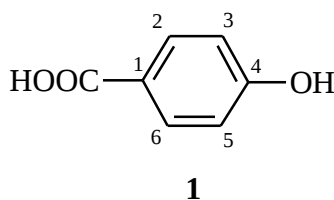


Figure III.3 : Produits isolés des milieux de culture de *Phaeoacremonium chlamydosporum*

III.1.2.1- Identification de l'acide 4-hydroxy-benzoïque



Formule brute : C₇H₆O₃

Poids moléculaire : 138.12 g.mol⁻¹

Masse de produit isolé : 1.4 mg

Analyse (Figures III.4-III.6):

¹H-RMN (400 MHz, Acétone-d₆) : 8.0 (2H, d, ³J = 8.8 Hz, H-2 et H-6), 7.0 (2H, d, ³J = 8.8 Hz, H-3 et H-5).

¹³C-RMN (100 MHz, Acétone-d₆) : 166.8 (C=O), 161.9 (C-4), 132.1 (C-2 et C-6), 122.1 (C-1), 115.3 (C-3 et C-5).

DEPT 135 (100 MHz, Acétone-d₆) : 132.1 (C-2 et C-6), 115.3 (C-3 et C-5).

MS, EI, 70 eV (m/z, I%) : 138 (M⁺, 80), 121 (100), 93 (28), 65 (42).

Les données du spectre ¹H-RMN (figure III.4) nous révèlent la présence d'un cycle benzénique substitué en *para* (système AA'BB'). Le spectre DEPT 135 indique que trois signaux sur le spectre ¹³C-RMN (figure III.5) correspondent à des carbones quaternaires. Celui à 166.8 ppm met en évidence la présence d'un groupement acide α,β-insaturé. Le spectre de masse (figure III.6) nous informe que cette molécule a un poids moléculaire de 138 g.mol⁻¹. Sa fragmentation en impact électronique confirme la structure proposée (figure III.7).

Toutes ces données, identiques à celles obtenues pour le produit commercial, indiquent que ce composé est l'acide 4-hydroxy-benzoïque.

Ce composé a déjà été isolé des milieux de culture d'autres champignons : *Phycomyces blakesleanus* [40], zygomycète producteur de β-carotène ; *Ophiostoma crassivaginata* [41], agent pathogène responsable de la maladie des taches bleues des trembles ; *Guignardia laricina*, champignon responsable de la rouille des pousses de mélèzes [42]; *Valsa ceratosperma*, cryptogame responsable de la maladie du chancre du pommier [43].

L'acide *p*-hydroxy-benzoïque provoque une réaction de couleur intense avec FeCl₃. Cette complexation des ions Fe³⁺ pourrait être à l'origine de la décoloration du bois dans le cadre de la maladie des taches bleues du tremble [41].

Il présente une activité antimicrobienne envers de nombreux microorganismes comme *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ou pv. *tobaci*. [44] et *Cladosporium phlei* [45].

Ce composé est également un inhibiteur de la catéchol oxydase de raisin, dont dépend le brunissement enzymatique de ces fruits [46]. A une concentration de 1 mM, il inhibe l'activité de la phénylalanine ammonia-liase de levure (*Rhodotorula glutinis*) [47].

L'acide *p*-hydroxy-benzoïque modifie *in vitro* la vitesse de décarboxylation de l'acide indole-3-acétique catalysée par la peroxydase de raifort. En absence d'autre cofacteur, il active fortement cette réaction. Alors qu'en présence d'un autre cofacteur, il tend à inhiber faiblement cette oxydation [48].

L'acide *p*-hydroxy-benzoïque agit comme un agent reliant les composés polysaccharidiques de la paroi cellulaire [49, 50].

Enfin, il est connu pour accélérer la réaction d'oxydation du NADH par l'oxygène moléculaire, et modifier sa dynamique, réaction catalysée par une peroxydase [51].

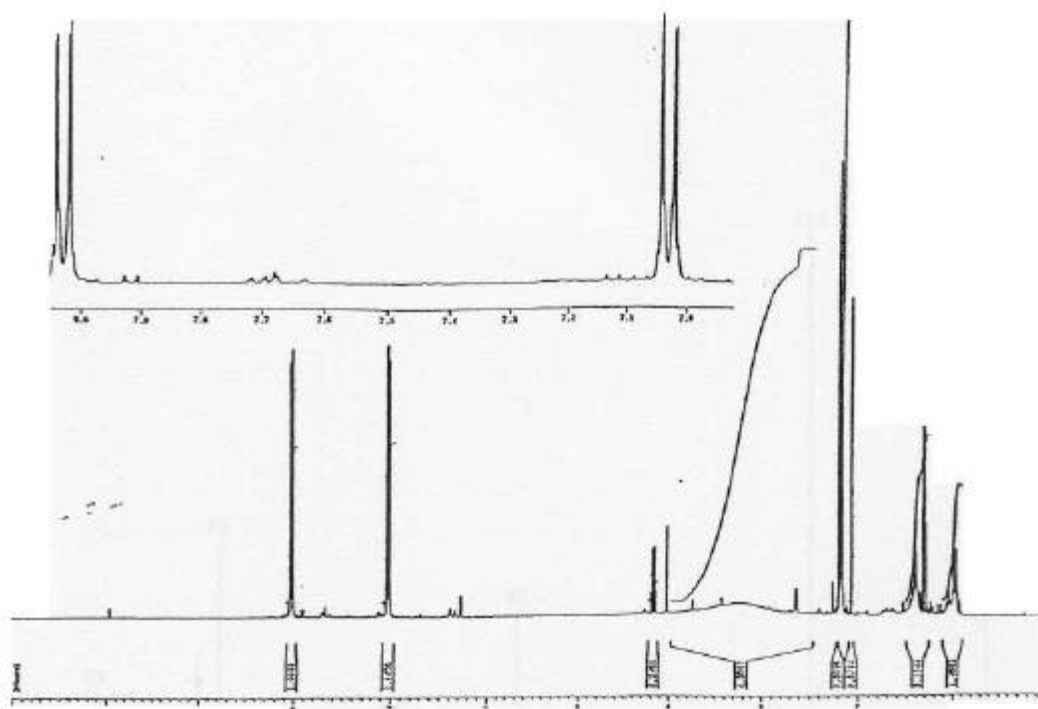


Figure III.4 : Spectre ^1H -RMN de **1** (400 MHz, Acétone- d_6)

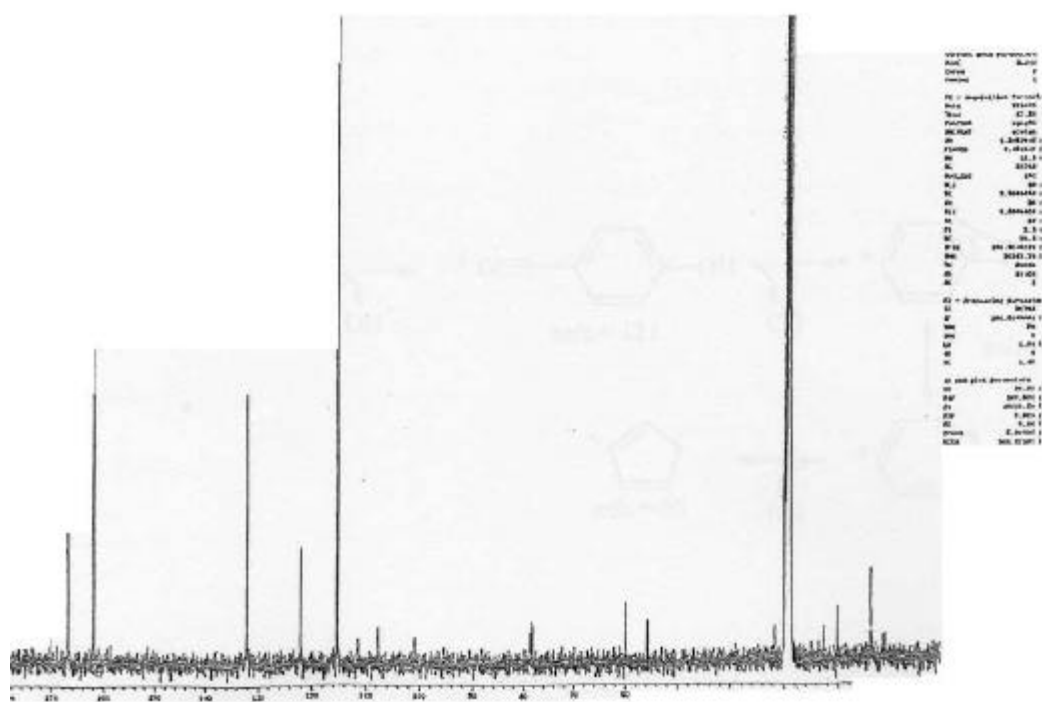


Figure III.5 : Spectre ^{13}C -RMN de **1** (100 MHz, Acétone- d_6)

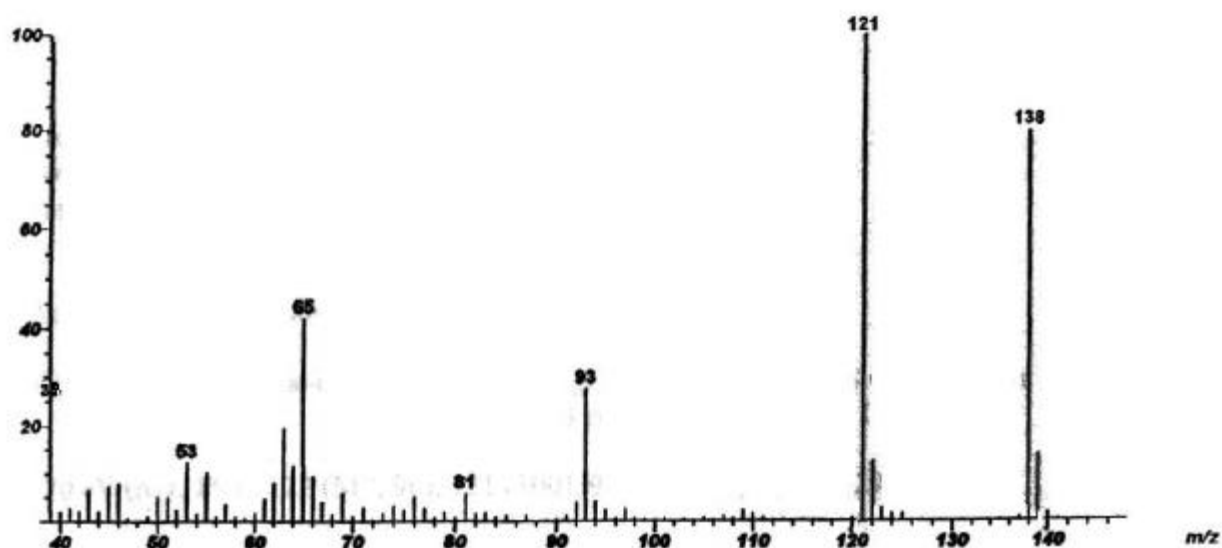


Figure III.6 : Spectre de masse de 1 (EI, 70 eV)

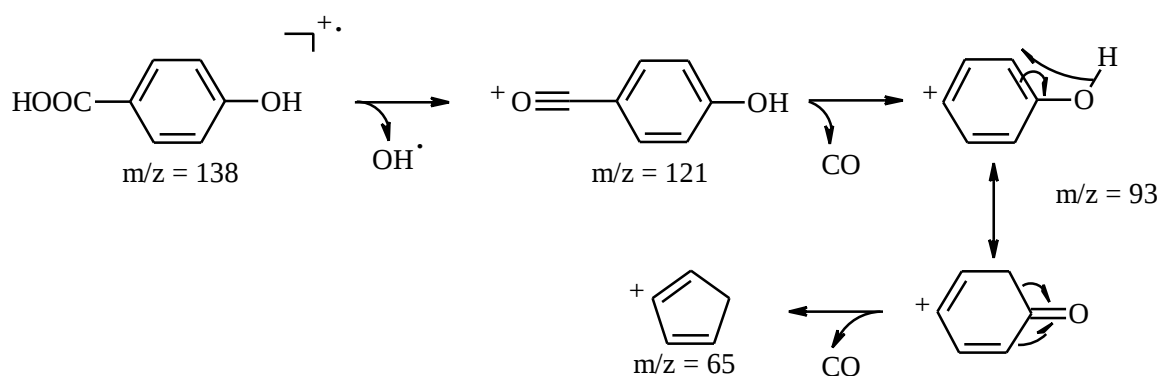
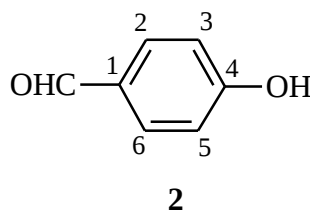


Figure III.7 : Fragmentation du produit 1

III.1.2.2- Identification du 4-hydroxy-benzaldéhyde



Formule brute : $C_7H_6O_2$

Poids moléculaire : $122.12 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse de produit isolé : 1.7 mg

Analyse (Figures III.8-III.9) :

^1H -RMN (400 MHz, Acétone- d_6) : 9.97 (1H, s, CHO), 7.9 (2H, d, $^3J = 8.6 \text{ Hz}$, H-2 et H-6), 7.1 (2H, d, $^3J = 8.6 \text{ Hz}$, H-3 et H-5), 3.22 (s large, OH)

MS, EI, 70 eV (m/z, I%) : 122 (M^+ , 90), 121 (100), 93 (47), 65 (82), 40 (29)

Le spectre ^1H -RMN (figure III.8) comporte un système AA'BB' caractéristique d'un noyau aromatique disubstitué en *para*. Le singulet à 9.97 ppm révèle la présence d'un groupement aldéhyde. Le faible et large signal à 3.22 ppm correspond à un proton porté par un hétéroatome. Le spectre de masse (figure III.9) montre que le poids moléculaire de cette molécule est de 122 g.mol^{-1} . Tous ces éléments permettent de conclure que la formule brute du composé est $C_7H_6O_2$. La fragmentation en impact électronique confirme la structure proposée (figure III.10).

Ces données correspondent bien à celles obtenues pour le produit commercial.

Ce composé a déjà été isolé de différents champignons : *Ophiostoma crassivaginata* [41], agent pathogène responsable de la maladie des taches bleues des trembles; *Eutypa lata* [52], champignon parasite de la vigne; *Ceratocystis ips* et *C. huntii*, impliqués dans la maladie des taches bleues des pins [53]; *Phycomyces blakesleeanus*, zygomycète producteur de β -carotène [40]; et *Streptomyces rimosus* [54].

Le *p*-hydroxy-benzaldéhyde provoque une réaction de couleur intense avec FeCl_3 . Cette complexation des ions Fe^{3+} pourrait être à l'origine de la décoloration du bois dans le cadre de la maladie des taches bleues du tremble [41].

Il est également capable d'inhiber faiblement la conductivité de l'eau dans des tiges de jeunes plants de pin [53].

Ce composé est un inhibiteur faible de la tyrosinase (aussi connue sous le nom de polyphénol oxydase). Cette enzyme catalyse l'oxydation de ses substrats phénoliques en o-quinones, ensuite polymérisées en pigments de couleur marron, rouge ou noir [55].

Cet aldéhyde est également un inhibiteur de la cyclic AMP phosphodiesterase [56].

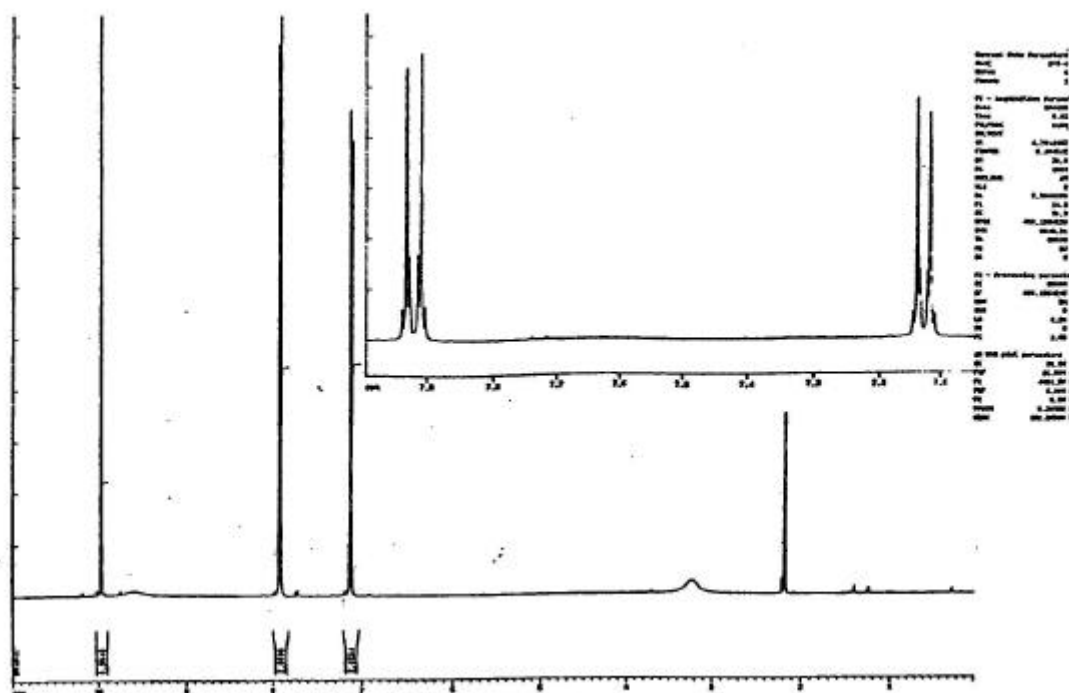
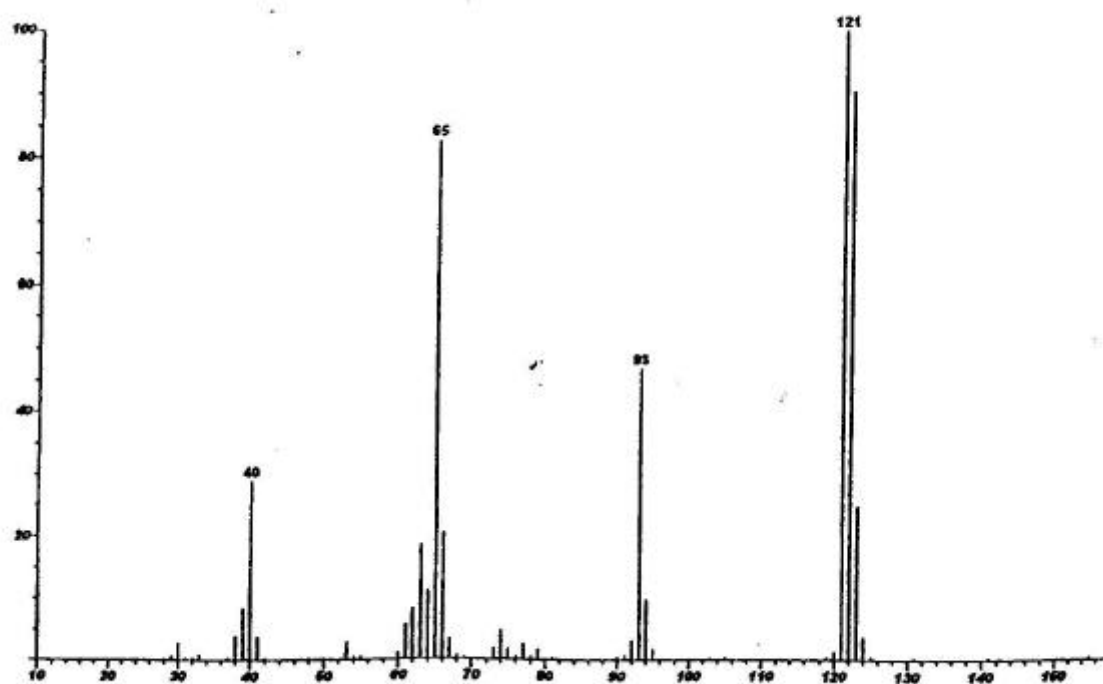
Figure III.8 : Spectre ¹H-RMN de 2 (Acétone-d₆)

Figure III.9 : Spectre de masse de 2 (EI, 70 eV)

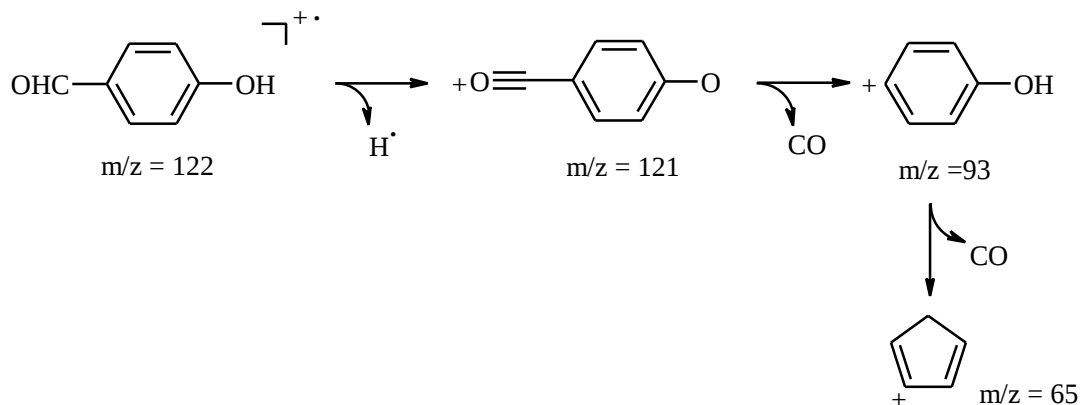
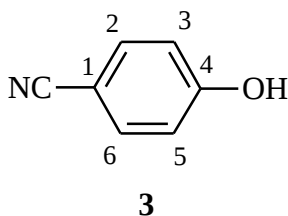


Figure III.10 : Fragmentation du produit 2

III.1.2.3- Identification du 4-hydroxy-benzonitrile



Formule brute : C_7H_5NO

Poids moléculaire : $119.12 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse de produit isolé : 1 mg

Analyse (Figures III.11-III.13) :

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) : 7.5 (2H, d, $^3J = 8.9 \text{ Hz}$, H-2 et H-6), 6.9 (2H, d, $^3J = 8.9 \text{ Hz}$, H-3 et H-5), 6.2 (s large, 1H, OH)

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) : 159.6 (C-4), 134.2 (C-6 et C-2), 119.1 ($\underline{\text{CN}}$), 116.3 (C-5 et C-3), 103.9 (C-1)

MS, EI, 70 eV (m/z , I%) : 119 (M^+ , 62), 91 (20), 92 (6), 63 (14), 64 (35), 33 (28), 29 (100)

FT-IR (KBr) : 3269, 2235, 1608, 1587, 1512

Toutes ces données ont été comparées à celles obtenues pour le produit commercial.

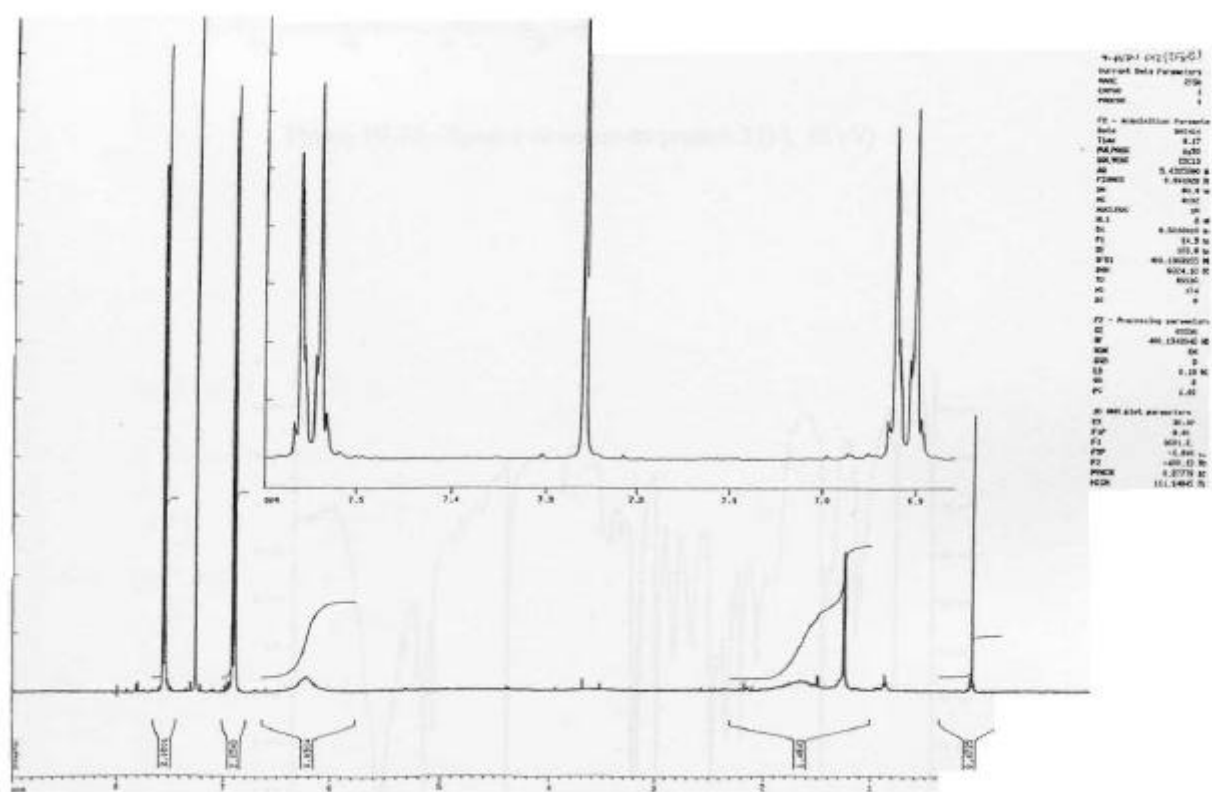


Figure III.11 : Spectre ^1H -RMN du produit **3** (400 MHz, CDCl_3)

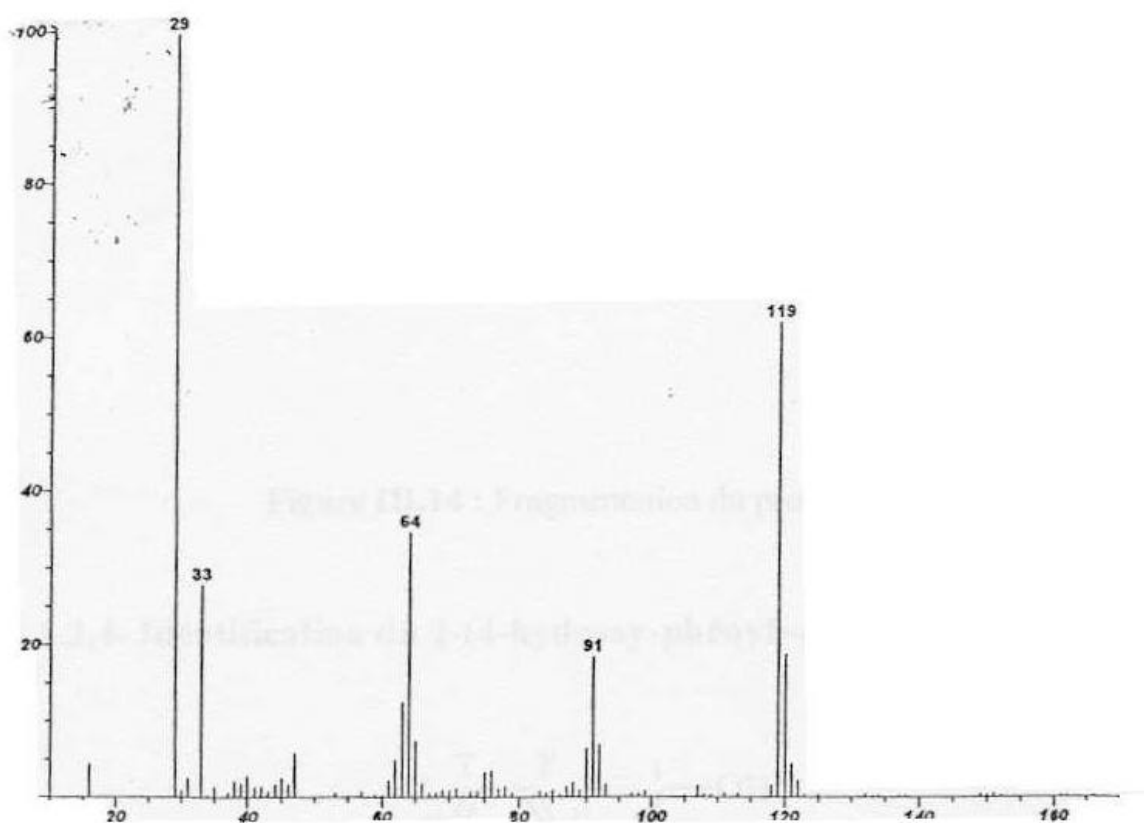


Figure III.12 : Spectre de masse du produit 3 (EI, 70 eV)

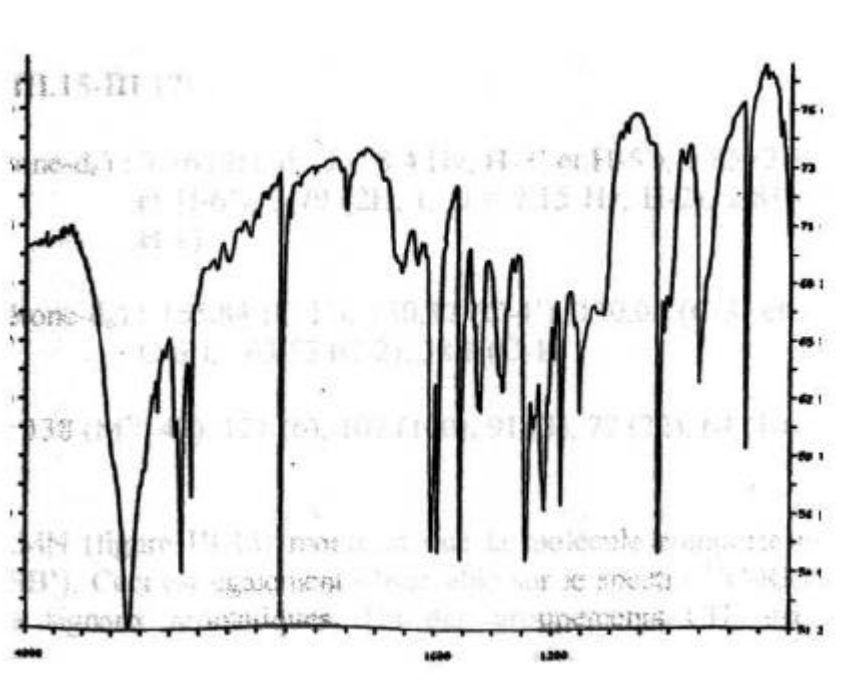


Figure III.13 : Spectre IR du produit 3 (KBr)

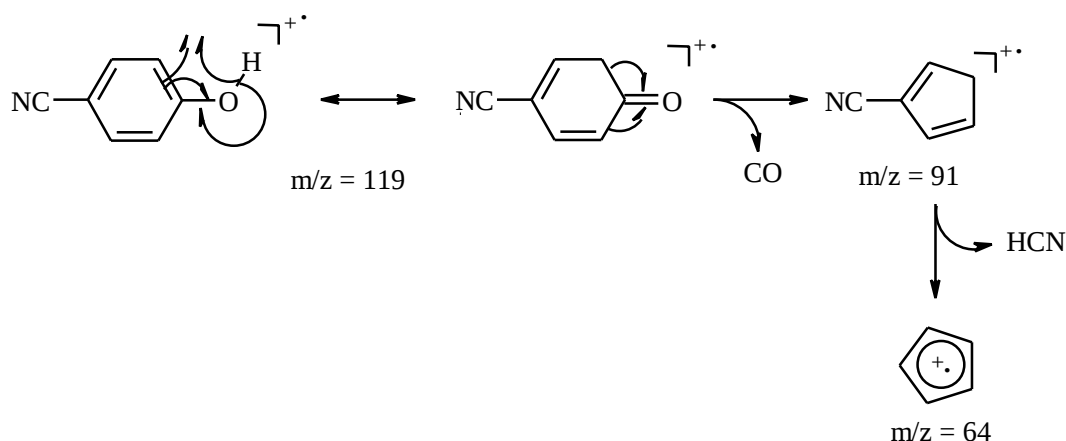
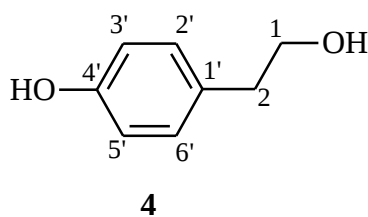


Figure III.14 : Fragmentation du produit 3

III.1.2.4- Identification du 2-(4-hydroxy-phényl)-éthanol (ou tyrosol)



Formule brute : $C_8H_{10}O_2$

Poids moléculaire : $138.17 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse de produit isolé : $< 1 \text{ mg}$

Analyse (Figures III.15-III.17) :

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Acétone- d_6) : 7.16 (2H, d, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, H-3' et H-5'), 6.85 (2H, d, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, H-2' et H-6'), 3.79 (2H, t, $^3J = 7.15 \text{ Hz}$, H-2), 2.81 (2H, t, $^3J = 7.15 \text{ Hz}$, H-1)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Acétone- d_6) : 155.84 (C-1'), 130.37 (C-4'), 130.05 (C-3' et C-5'), 115.2 (C-2' et C-6'), 63.53 (C-2), 38.8 (C-1)

MS, EI, 70 eV (m/z, I%) : 138 (M^+ , 43), 121 (6), 107 (100), 91 (3), 77 (22), 64 (10)

Les spectres $^1\text{H-RMN}$ (figure III.15) montrent que la molécule comporte un noyau aromatique disubstitué (système AA'BB'). Ceci est également observable sur le spectre $^{13}\text{C-RMN}$ (figure III.16) qui ne comporte que quatre signaux aromatiques. Un des groupements CH_2 est fortement déblindé ($\delta = 3.79 \text{ ppm}$) ce qui suggère qu'il est directement lié à un hétéroatome tel que l'oxygène. Ce CH_2 est couplé à un autre CH_2 dont le déplacement chimique (2.81 ppm) indique qu'il est lié au noyau benzénique. Le spectre de masse (figure III.17) nous indique un poids moléculaire de 138 g.mol^{-1} et confirme la structure proposée (figure III.18). Ce composé est plus communément appelé tyrosol.

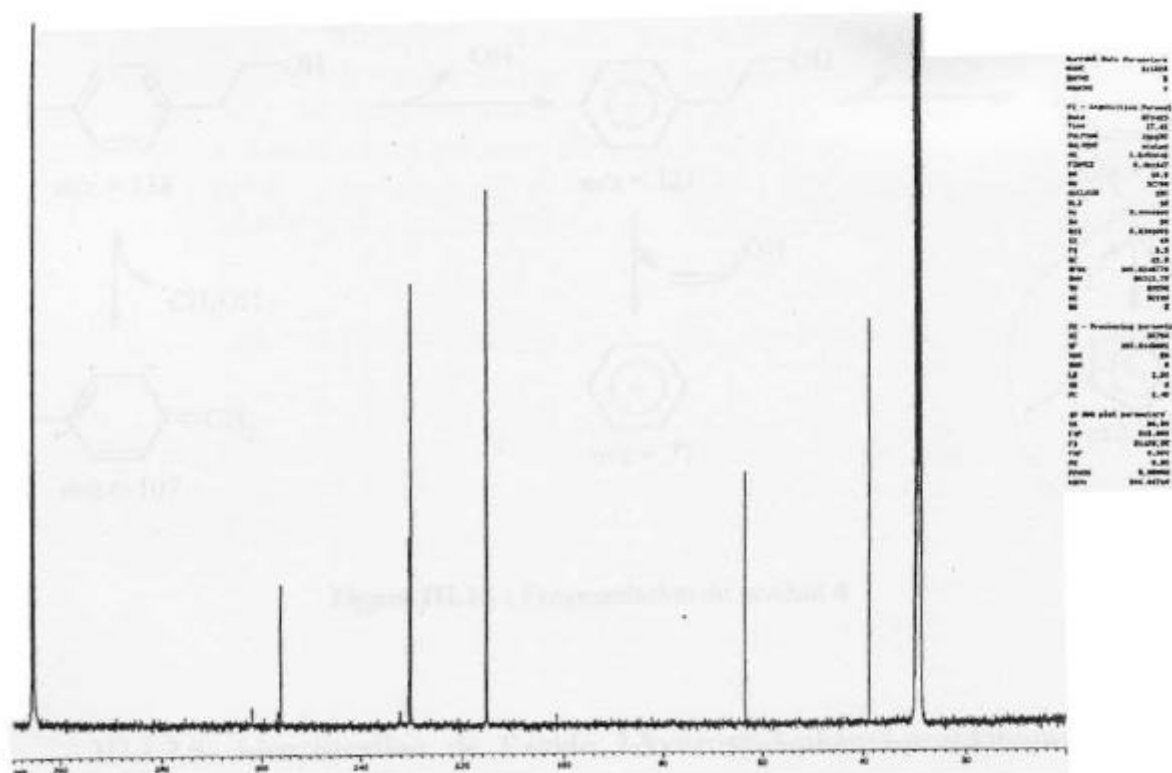


Figure III.16 : Spectre ^{13}C -RMN du produit 4 (100 MHz, Acétone- d_6)

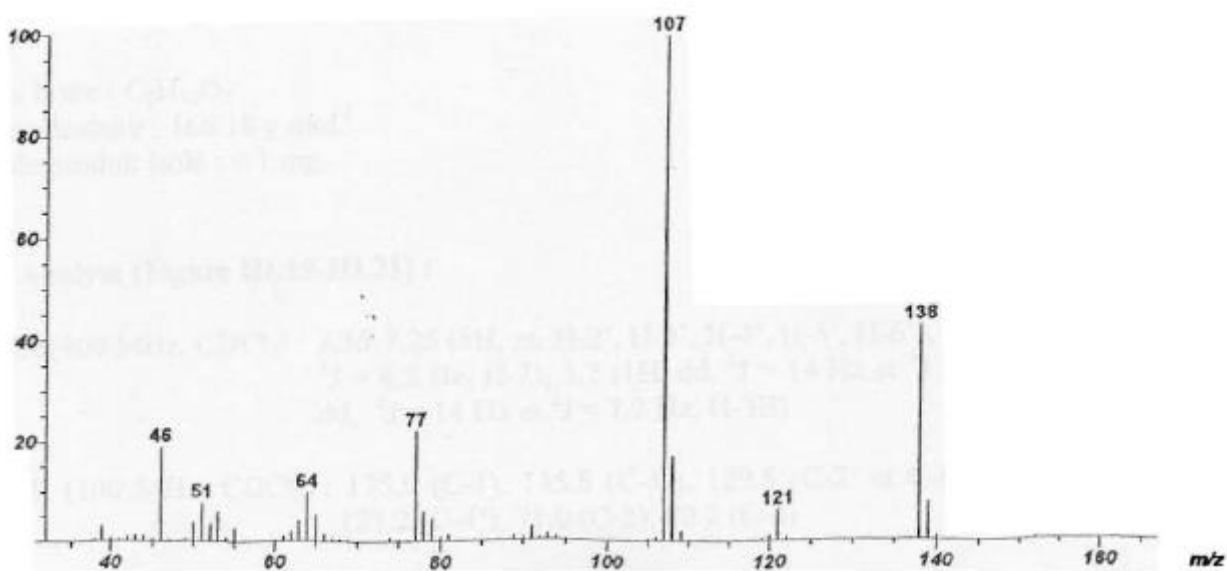


Figure III.17 : Spectre de masse du produit 4 (EI, 70 eV)

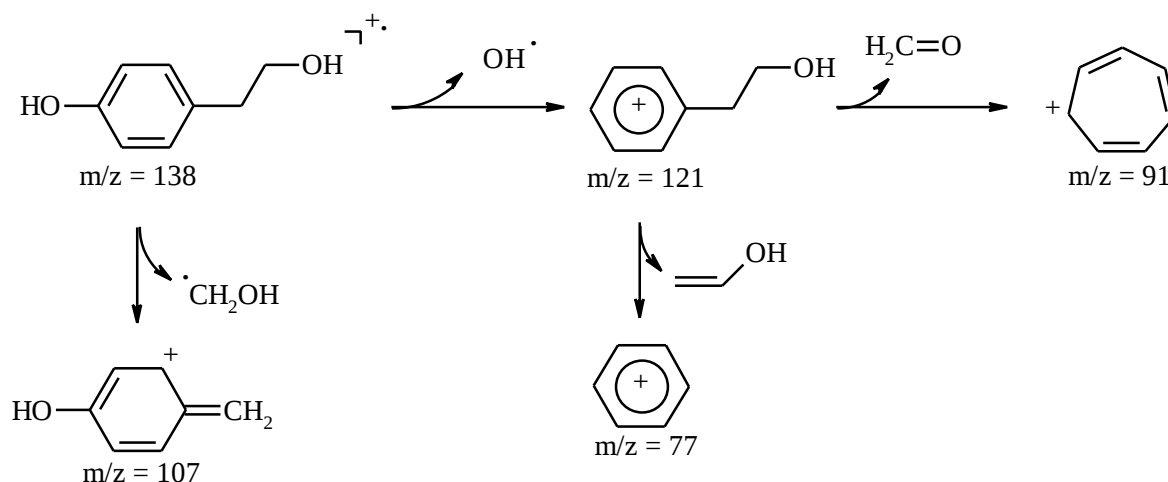
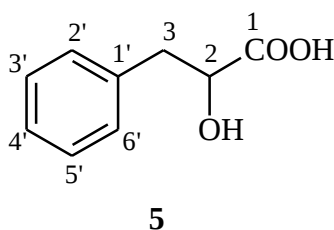


Figure III.18 : Fragmentation du produit 4

III.1.2.5- Identification de l'acide 2-hydroxy-3-phényl-propionique (ou Acide 3-phényl-lactique)



Formule brute : $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$

Poids moléculaire : $166.18 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse de produit isolé : $< 1 \text{ mg}$

Analyse (Figure III.19-III.21) :

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : 7.35-7.25 (5H, m, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 4.5 (1H, dd, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$ et $^3J = 4.2 \text{ Hz}$, H-2), 3.2 (1H, dd, $^2J = 14 \text{ Hz}$ et $^3J = 4.2 \text{ Hz}$, H-3A), 3.0 (1H, dd, $^2J = 14 \text{ Hz}$ et $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, H-3B)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : 175.9 (C-1), 135.8 (C-1'), 129.5 (C-2' et C-6'), 128.7 (C-3' et C-5'), 127.2 (C-4'), 71.0 (C-2), 40.2 (C-3)

DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) : 129.5 (C-2' et C-6'), 128.7 (C-3' et C-5'), 127.2 (C-4'), 70.98 (C-2), 40.17 (C-3)

MS, EI, 70 eV (m/z , I%) : 166 (M^+ , 5), 148 (18), 121 (3), 103 (5), 91 (100), 84 (6), 77 (6), 65 (5), 29 (3)

Le spectre ^1H -RMN (figure III.19) nous révèle la présence d'un cycle aromatique monosubstitué caractérisé par un multiplet de 5 protons entre 7.25 et 7.35 ppm. Trois protons forment un système ABX. Les protons A et B ont une constante de couplage vicinale de 14 Hz. Le proton X est très déblindé ($\delta = 4.5$ ppm), ce qui suggère sa proximité d'un groupement électro-attracteur et/ou d'un hétéroatome électronégatif tel que l'oxygène. Les spectres ^{13}C -RMN (figure III.20) et DEPT 135 indiquent que la molécule comporte deux carbones quaternaires : un correspond au carbone substitué du cycle aromatique ($\delta = 135.8$ ppm), l'autre à un carbonyle de groupement acide ($\delta = 175.9$ ppm). Le spectre de masse (figure III.21) indique que le poids moléculaire est de 166 g.mol^{-1} , et confirme la structure proposée (figure III.22).

Ces données comparées à celles de la littérature [62, 63, 64] correspondent à l'acide 3-phényl-lactique.

Ce produit a déjà été isolé de *Ceratocytis clavigera*, un des champignons impliqués dans la maladie des taches bleues du pin [53]. L'acide 3-phényl-lactique est également connu pour ses propriétés d'inhibiteur d'enzymes oxydantes [65].

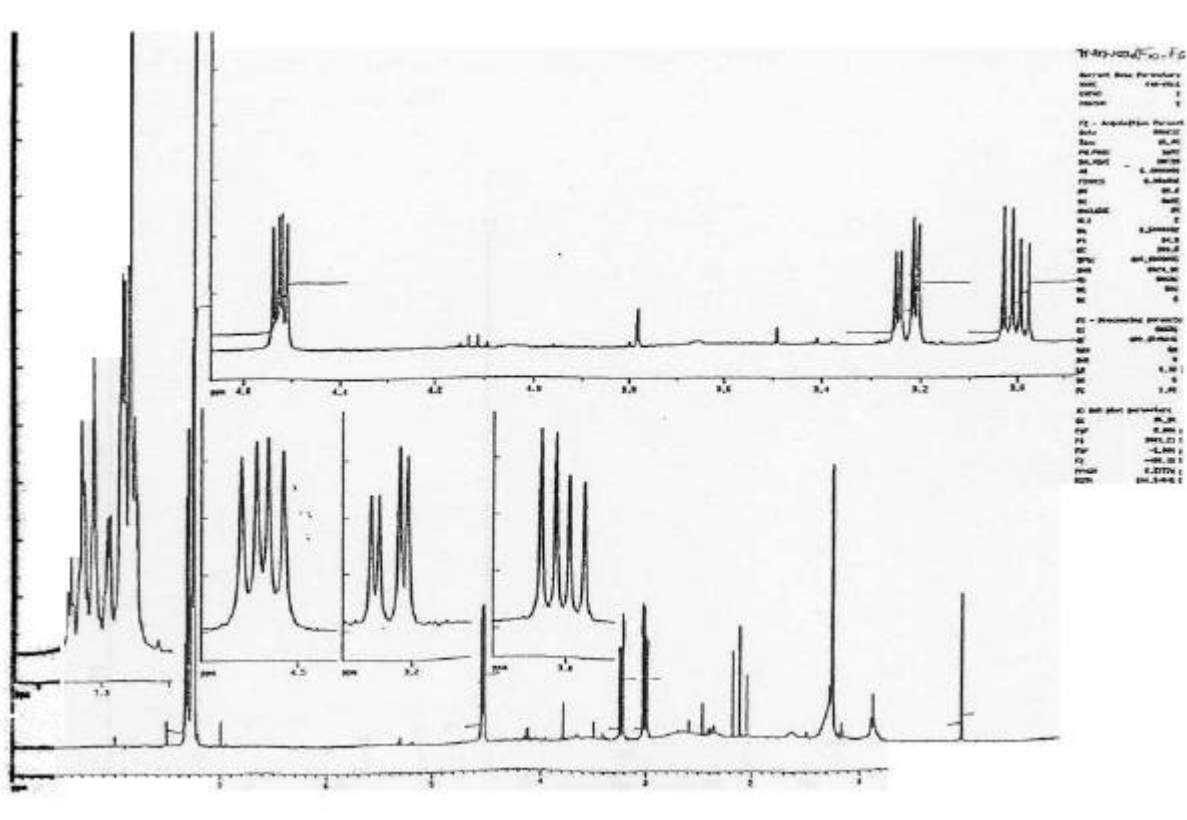


Figure III.19 : Spectre ^1H -RMN du produit 5 (400 MHz, CDCl_3)

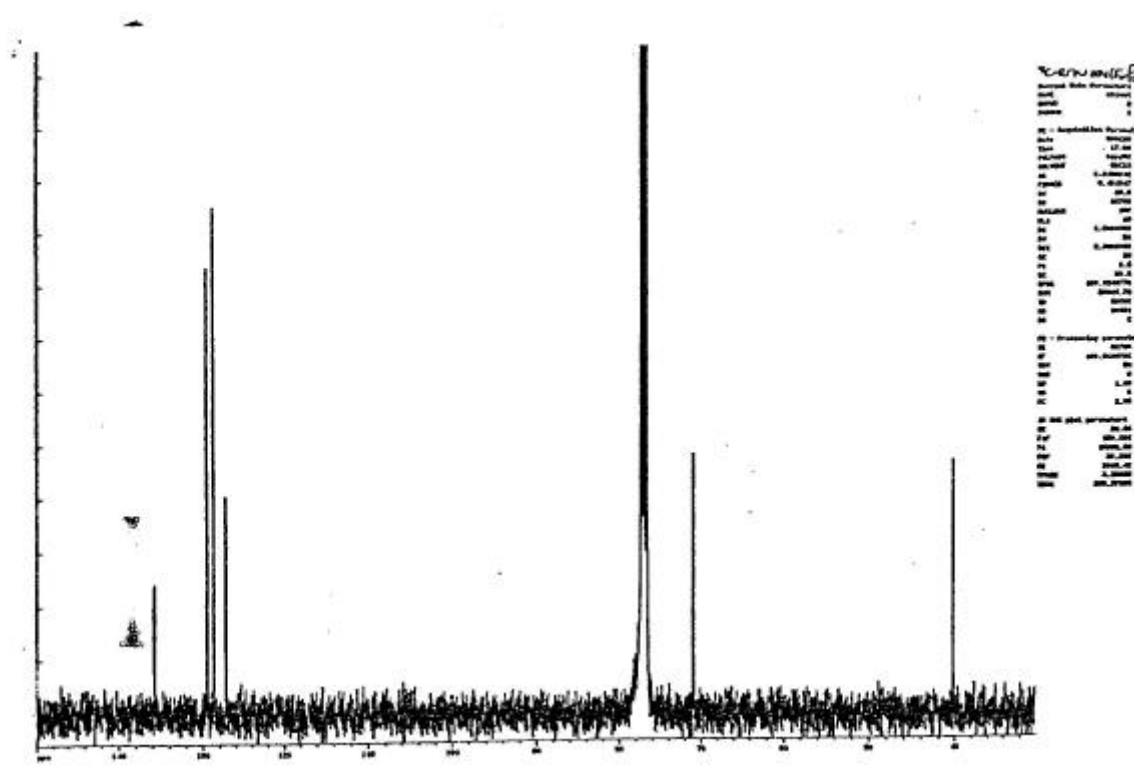
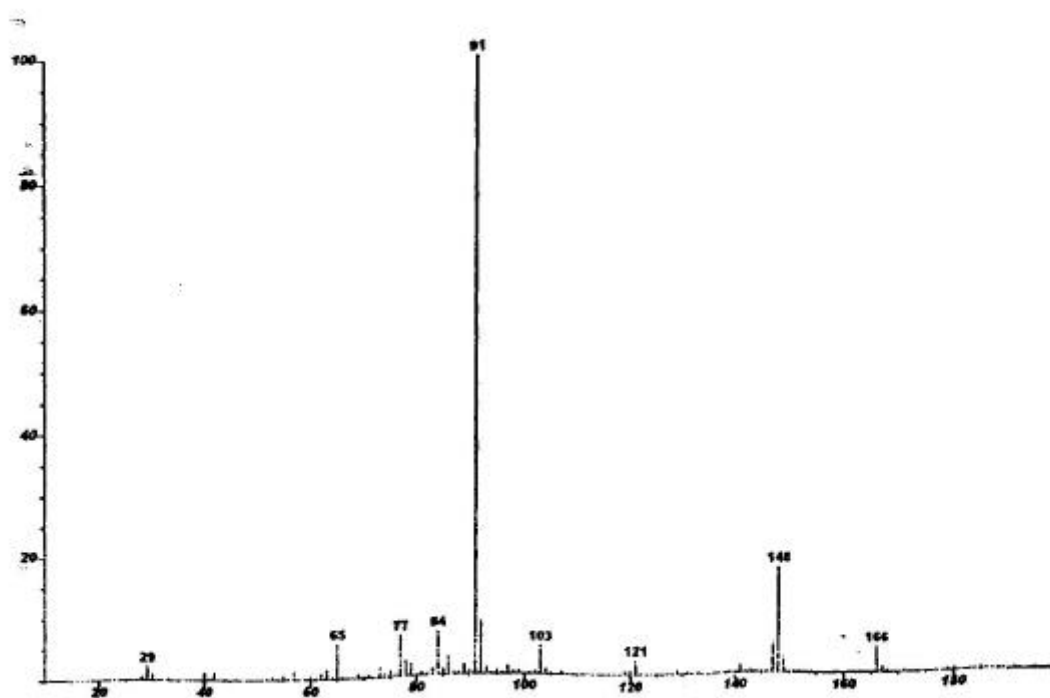
Figure III.20 : Spectre ^{13}C -RMN du produit 5 (100 MHz, CDCl_3)

Figure III.21 : Spectre de masse du produit 5 (EI, 70 eV)

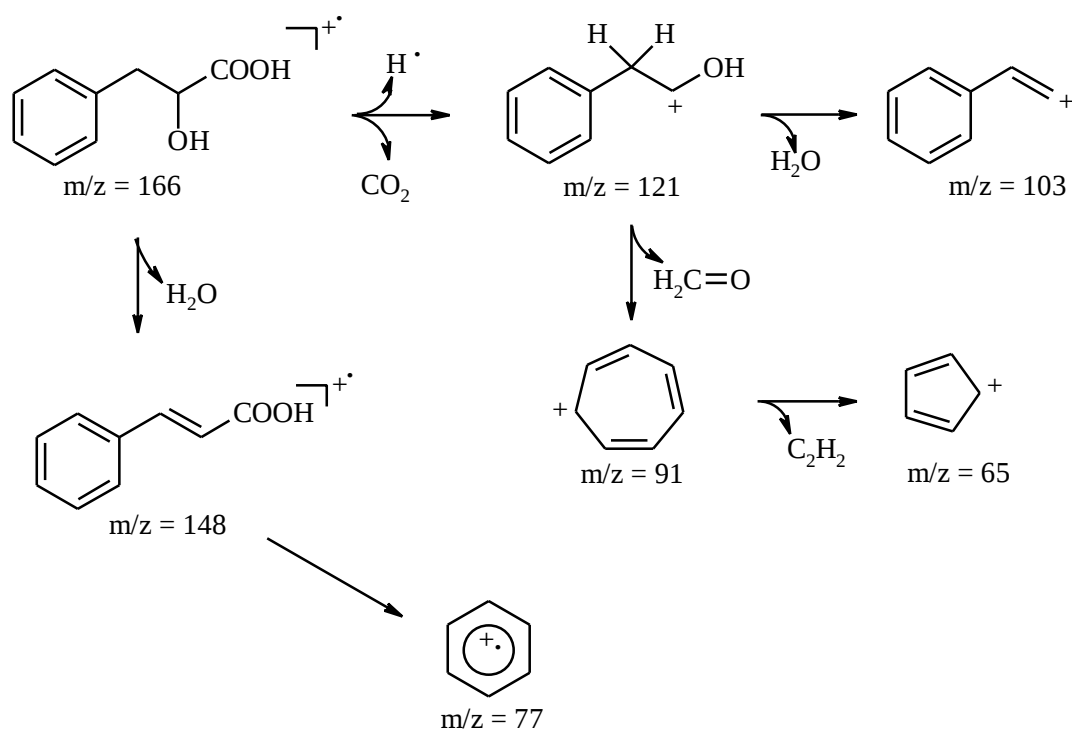
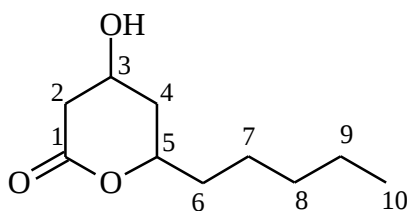


Figure III.22 : Fragmentation du produit 5

III.1.2.6- Identification du 4-hydroxy-6-pentyl-tétrahydro-pyran-2-one (ou 3-hydroxy-5-décanolide)



6

Formule brute : $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$ Poids moléculaire : $186.25 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse de produit isolé : 1.2 mg

Analyse (Figures III.23-III-25) :

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) : 4.72-4.65 (1H, m, H-5), 4.42-4.38 (1H, m, H-3), 2.74 (1H, dd, $^3J = 5.1 \text{ Hz}$, $^2J = 17.6 \text{ Hz}$, H-2), 2.60 (1H, ddd, $^4J = 1.7 \text{ Hz}$, $^3J = 3.8 \text{ Hz}$, $^2J = 17.6 \text{ Hz}$, H-2), 1.96 (1H, dddd, $^4J = 1.7 \text{ Hz}$, $^3J = 3.4 \text{ Hz}$, $^3J = 4.2 \text{ Hz}$, $^2J = 14.5 \text{ Hz}$, H-4), 1.74 (1H, ddd, $^3J = 3.2 \text{ Hz}$, $^3J = 12 \text{ Hz}$, $^2J = 14.5 \text{ Hz}$, H-4), 1.65-1.53

(2H, m, H-6), 1.52-1.43 (2H, m, H-7), 1.42-1.32 (2H, m, H-8), 1.31 (2H, m, H-9), 0.9 (3H, t, $^3J = 6.9$ Hz, H-10)

^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) : 170.2 (C-1), 75.7 (C-5), 62.9 (C-3), 38.6 (C-2), 36.0 (C-4), 35.4 (C-6), 31.5 (C-8), 24.5 (C-7), 22.5 (C-9), 13.9 (C-10)

DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) : 75.7 (C-5), 62.9 (C-3), 38.6 (C-2), 36.0 (C-4), 35.4 (C-6), 31.5 (C-8), 24.5 (C-7), 22.5 (C-9), 13.9 (C-10)

MS, EI, 70 eV (m/z, I%) : 187 ($\text{M}^+ + 1$, 1), 168 (2), 150 (3), 115 (90), 97 (100), 89 (48), 73 (75), 69 (20), 55 (59), 42 (95)

Les nombreux signaux observés entre 0.8 et 1.7 ppm sur le spectre ^1H -RMN (figure III.23) témoignent de la présence d'une chaîne aliphatique à 11 protons. Le spectre ^{13}C -RMN (figure III.24) montre la présence d'un groupement carbonyle ($\delta = 170.2$ ppm). Le spectre DEPT 135 révèle la présence de 6 groupements CH_2 , d'un CH_3 et de deux CH. Le spectre de masse indique que le poids moléculaire de cette molécule peut être 187 ou 186 g.mol^{-1} (figure III.25). Cependant, le déplacement chimique de l'un des CH ($\delta = 4.42$ -4.38 ppm), en ^1H -RMN, indique qu'il est porteur d'un groupement hydroxyle. De ce fait, la formule brute du composé est $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$. La fragmentation en impact électronique confirme la structure proposée (figure III.26).

Ce composé a déjà été isolé de *Cephalosporium recifei* [66], et de *Aureobasidium* sp. [67].

D'autre part, une autre pyranone, la 6-pentyl- α -pyranone, a été isolée de différentes espèces de *Trichoderma* [166]. Ce métabolite présente des propriétés antibiotiques et fortement antifongiques [164]. Ce composé peut être obtenu par déshydratation et déshydrogénation de la 4-hydroxy-6-pentyl-tétrahydro-pyran-2-one. Il a été montré qu'une corrélation existe entre la quantité de 6-pentyl- α -pyrone produite et la capacité des souches de *Trichoderma* à inhiber la croissance des souches de *Botrytis cinerea* [165].

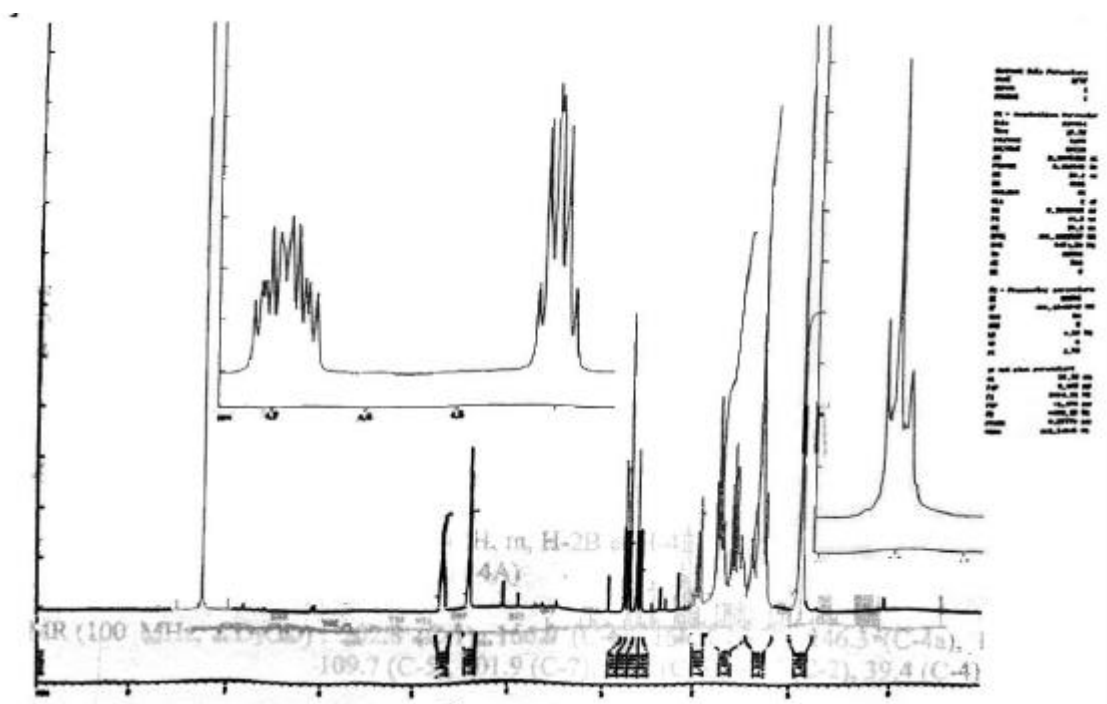


Figure III.23 : Spectre ^1H -RMN du produit 6 (400 MHz, CDCl_3)



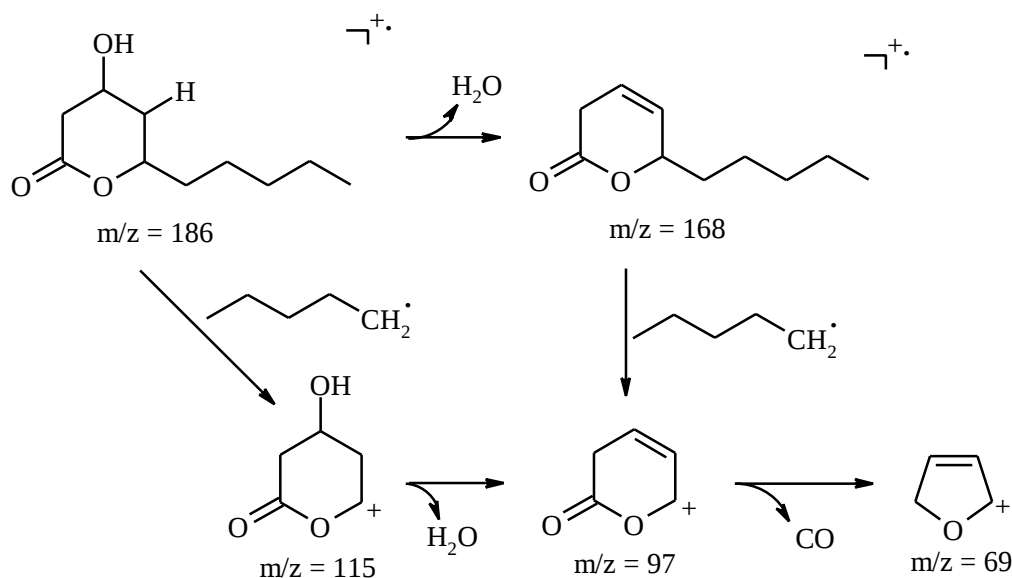
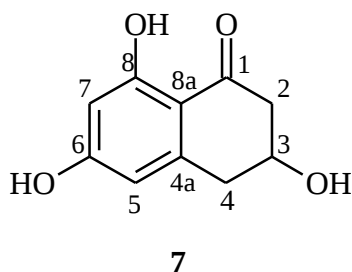


Figure III.26 : Fragmentation du produit 6

III.1.2.7- Identification de la 3,6,8-trihydroxy-3,4-dihydro-(2H)-naphtalen-1-one (ou Scytalone)



Formule brute : $C_{10}H_{10}O_4$

Poids moléculaire : $194.13 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse de produit isolé : $< 1 \text{ mg}$

Analyse (Figures III.27-III.30) :

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) : 6.3 (1H, dt, $^4J = 1 \text{ Hz}$, $^4J = 2.3 \text{ Hz}$, H-5), 6.2 (1H, d, $^4J = 2.3 \text{ Hz}$, H-7), 4.3 (1H, sept., $^3J = 3.8 \text{ Hz}$, H-3), 3.2 (1H, dd, $^3J = 3.8 \text{ Hz}$, $^2J = 16 \text{ Hz}$, H-2A), 2.9 (2H, m, H-2B et H-4B), 2.7 (1H, ddd, $^4J = 1 \text{ Hz}$, $^3J = 3.8 \text{ Hz}$, $^2J = 17 \text{ Hz}$, H-4A)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) : 202.8 (C-1), 166.9 (C-6), 166.8 (C-8), 146.3 (C-4a), 112.0 (C-8a), 109.7 (C-5), 101.9 (C-7), 67.2 (C-3), 47.7 (C-2), 39.4 (C-4)

DEPT 135 (100 MHz, CD_3OD) : 101.9 (C-7), 109.7 (C-5), 67.2 (C-3), 47.7 (C-2), 39.4 (C-4)

MS, EI, 70 eV (m/z, I%) : 194 (M⁺, 98), 176 (72), 150 (100), 148 (20), 122 (20), 121 (17)

Dans le spectre ¹H-RMN (figure III.27), deux protons aromatiques apparaissent couplés entre eux avec une constante de couplage de 2.3 Hz. Ces deux hydrogènes sont donc positionnés en *mé*ta sur le cycle. Les spectres ¹³C-RMN (figure III.28) et DEPT 135 (figure III.29) nous indiquent la présence de six carbones quaternaires dont un carbonyle ($\delta = 202.8$ ppm), de deux méthylènes et de trois CH. Le spectre proton fait apparaître deux systèmes ABX, les protons A et B des deux systèmes étant couplés avec le même hydrogène X. Le proton X est très déblindé ($\delta = 4.3$ ppm), ce qui indique qu'il est proche d'un hétéroatome électronégatif. Le spectre de masse (figure III.30) révèle que le poids moléculaire de ce composé est de 194 g.mol⁻¹ et confirme la structure proposée (figure III.31).

Ces données sont en accord avec celles de la littérature [68, 69, 70]. Ce composé est également appelé scytalone.

La scytalone a également été isolée des milieux de culture de différents champignons : *Ceratocystis minor* [71]; *Verticillium dahliae* [72]; *Scytalidium sp.* [73]; *Phialophora labergii* [73]; *Colletotrichum lagenarium* [74]; *Wangiella dermatitidis* [75]; *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea* et var. *Platani*, champignons pathogènes respectivement du caféier et du platane [70]; *Stagnospora sp.*, champignon pathogène du liseron [68]. Cette molécule est un intermédiaire dans la biosynthèse de la mélanine [76].

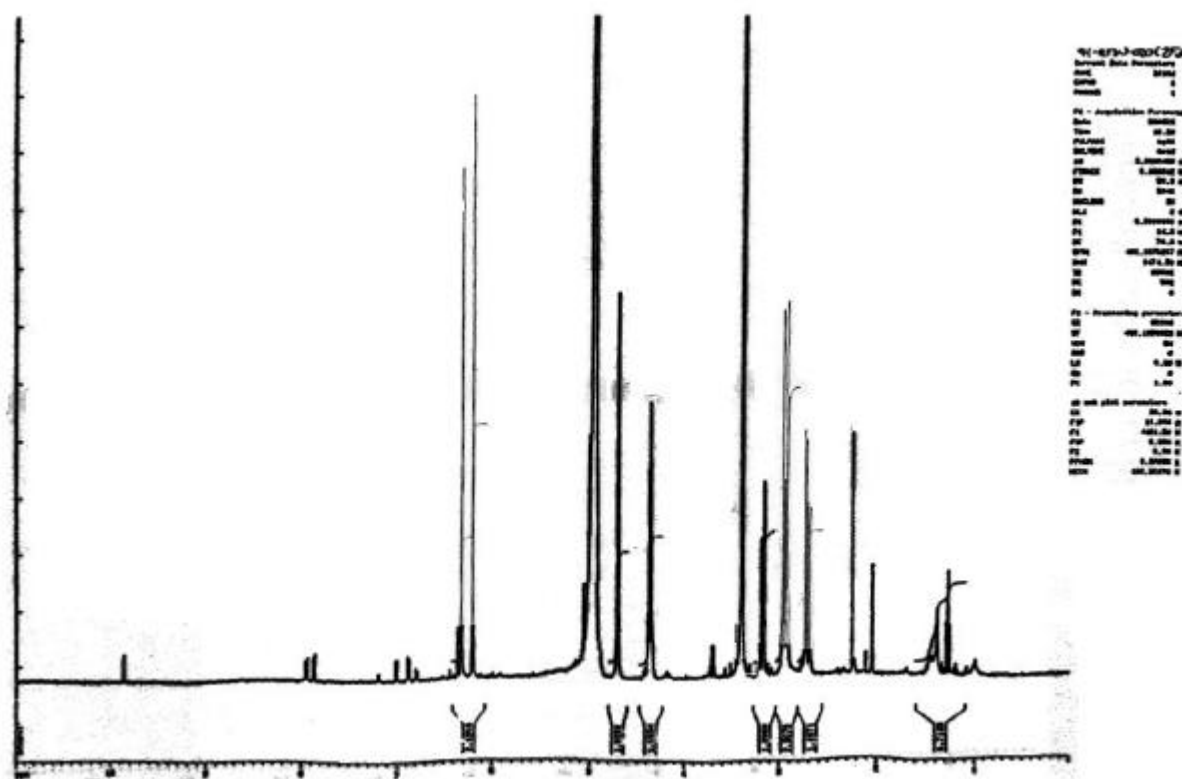
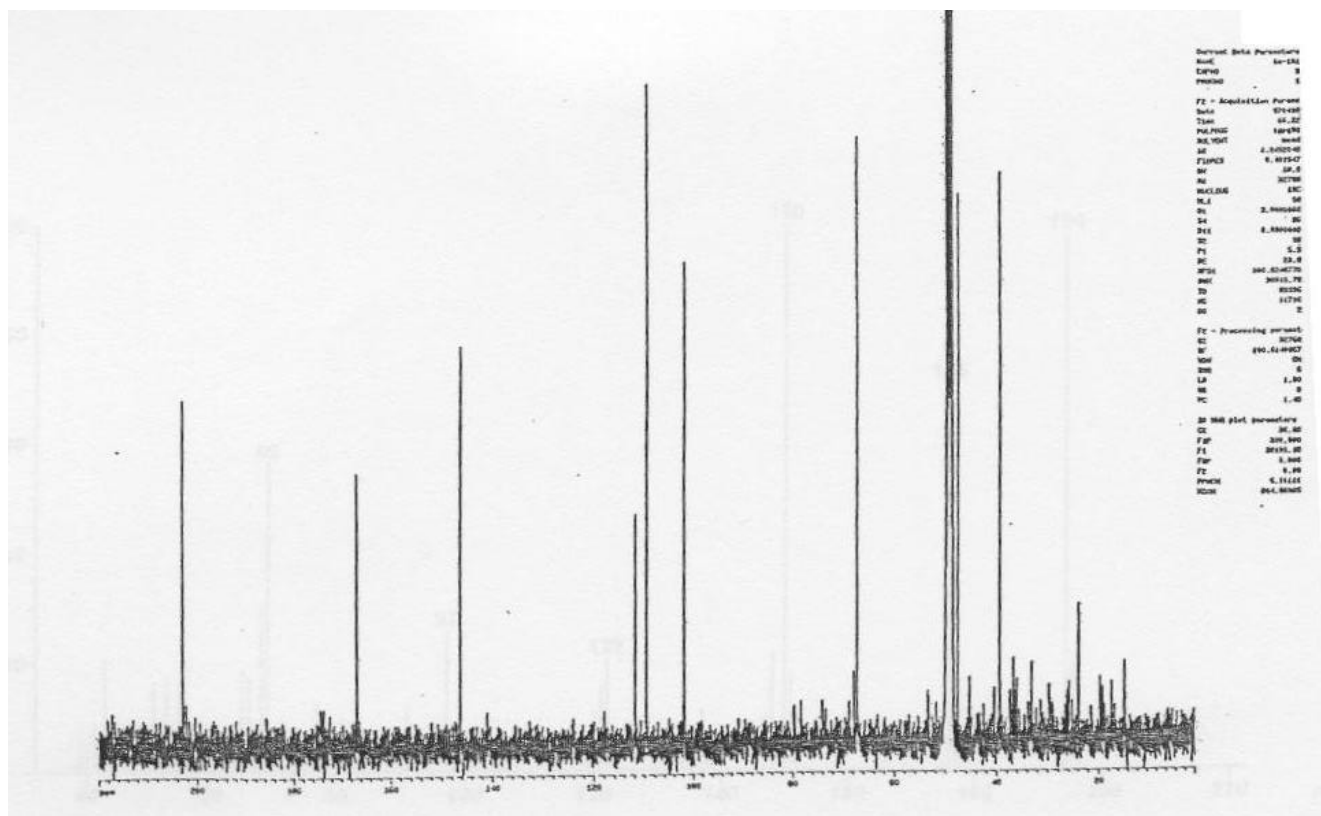
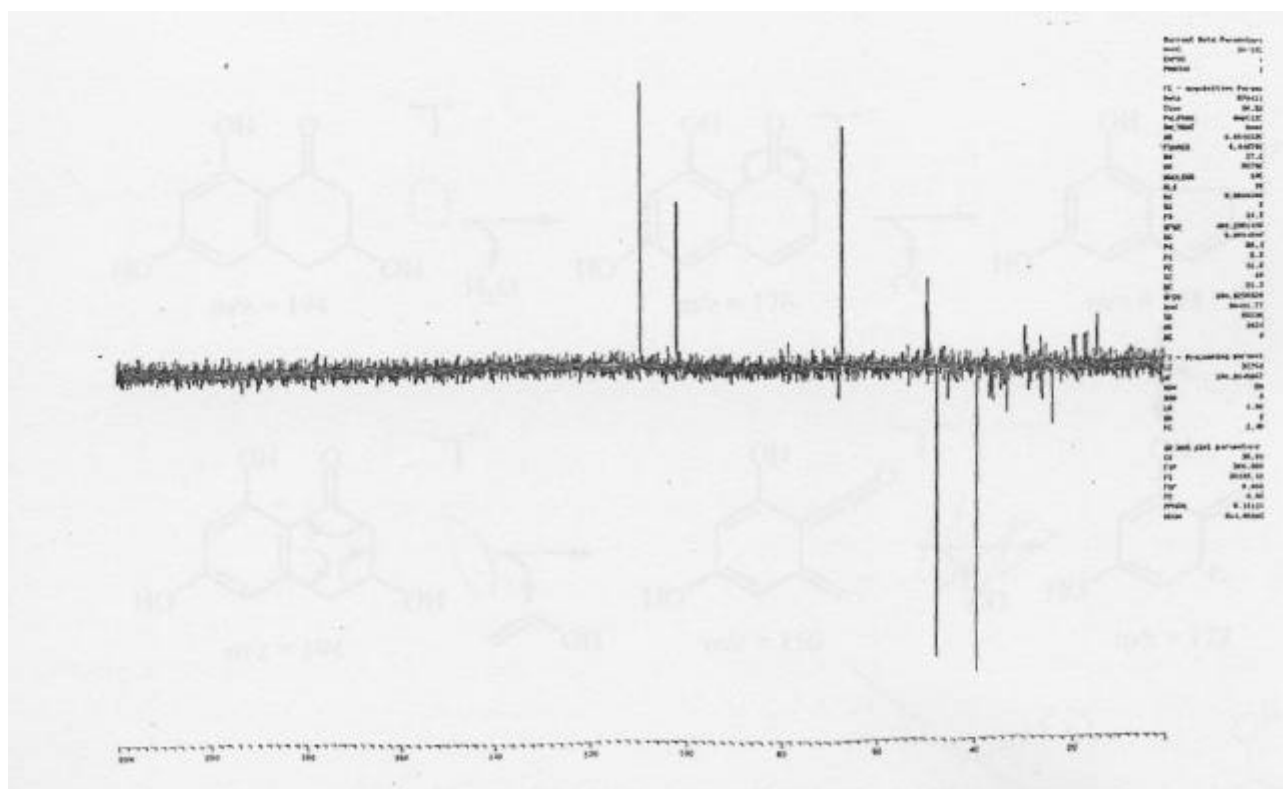


Figure III.27 : Spectre ¹H-RMN du produit 7 (400 MHz, CD₃OD)

Figure III.28 : Spectre ^{13}C -RMN du produit 7 (100MHz, CD_3OD)Figure III.29 : Spectre DEPT 135 du produit 7 (100MHz, CD_3OD)

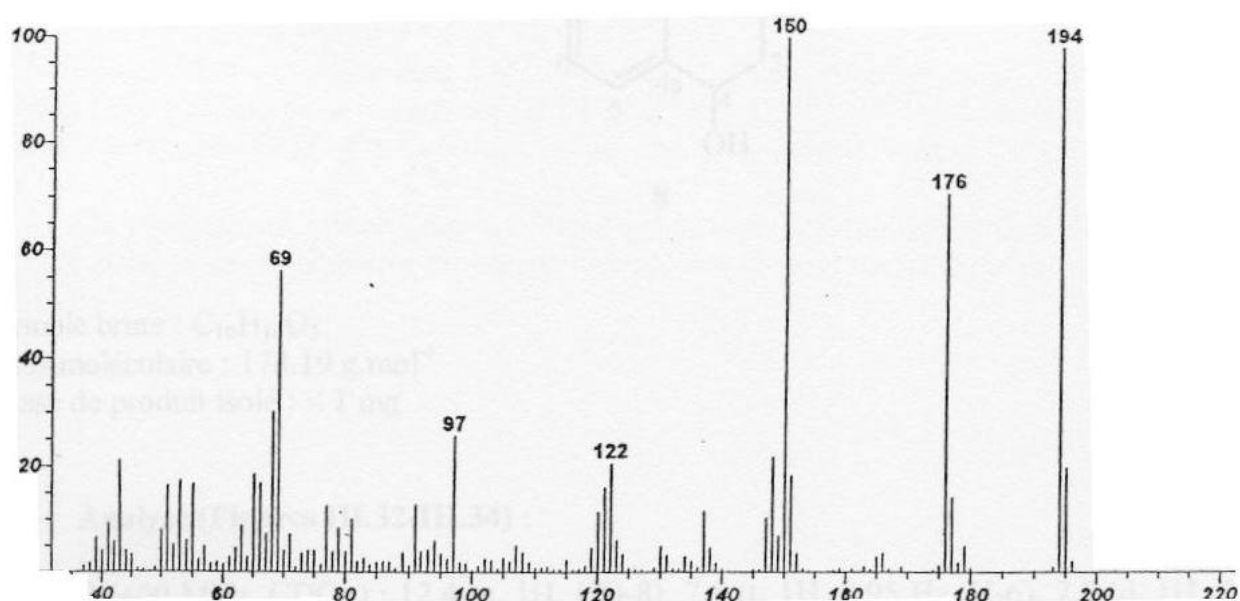


Figure III.30 : Spectre de masse du produit 7 (EI, 70 eV)

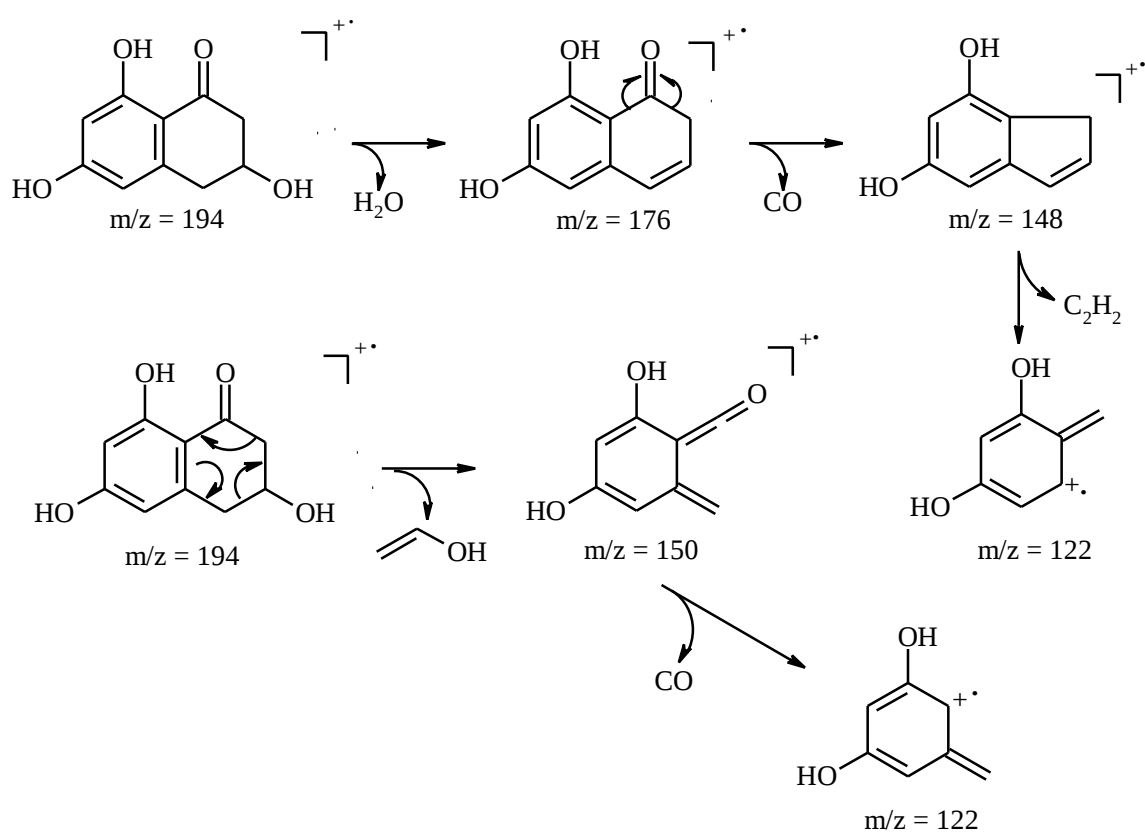
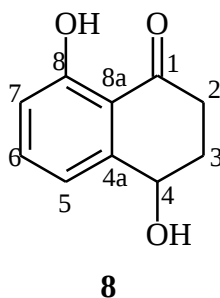


Figure III.31 : Fragmentation du produit 7

III.1.2.8- Identification de la 4,8-dihydroxy-3,4-dihydro-2H-naphtalen-1-one (ou Isosclérone)



Formule brute : $C_{10}H_{10}O_3$

Poids moléculaire : $178.19 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse de produit isolé : $< 1 \text{ mg}$

Analyse (Figures III.32-III.34) :

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : 12.4 (s, 1H, HO-8), 7.5 (t, 1H, 7.95 Hz, H-6), 7.0 (d, 1H, 7.45 Hz, H-5), 6.9 (dd, 1H, 0.73 et 8.43 Hz, H-7), 4.9 (dd, 1H, 3.66 et 7.32 Hz, H-4ax), 3.0 (m, 1H, H-2ax), 2.65 (m, 1H, H-2éq), 2.3 (m, 1H, H-3éq), 2.2 (m, 1H, H-3ax)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : 204.2 (C-1), 162.75 (C-8), 145.8 (C-4a), 137.0 (C-6), 117.8 (C-5), 117.3 (C-7), 115.25 (C-8a), 67.7 (C-4), 34.55 (C-2), 31.2 (C-3)

DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) : 137 (C-6), 117.8 (C-5), 117.3 (C-7), 67.7 (C-4), 34.5 (C-2), 31.2 (C-3)

MS, EI, 70 eV (m/z, I%) : 179 ($M^+ + 1$, 39), 178 (M^+ , 100), 161 (24), 160 (19), 150 (25), 149 (15), 132 (22), 122 (28), 121 (81), 104 (11), 93 (13), 77 (19), 65 (24)

Le spectre $^1\text{H-RMN}$ (figure III.32) montre la présence de trois protons aromatiques vicinaux à $\delta = 6,9 \text{ ppm}$ (H_7), $\delta = 7 \text{ ppm}$ (H_5) et $\delta = 7.5 \text{ ppm}$ (H_6). Le signal à $\delta = 12.4 \text{ ppm}$ révèle l'existence d'un proton phénolique chélaté. Le spectre $^{13}\text{C-RMN}$ (figure III.33) indique qu'il y a un groupement carbonyle à $\delta = 204.2 \text{ ppm}$. Le spectre DEPT 135 nous informe de la présence de deux CH_2 . Les protons de chacun de ces CH_2 ne sont pas équivalents, comme l'indiquent les quatre signaux à $\delta = 3 \text{ ppm}$, $\delta = 2.65 \text{ ppm}$, $\delta = 2.3 \text{ ppm}$ et $\delta = 2.2 \text{ ppm}$ sur le spectre $^1\text{H-RMN}$. Le spectre HETCOR-SR nous révèle que les protons à $\delta = 3 \text{ ppm}$ et $\delta = 2.65 \text{ ppm}$ sont portés par le même carbone à $\delta = 34.55 \text{ ppm}$, alors que ceux à $\delta = 2.3 \text{ ppm}$ et $\delta = 2.2 \text{ ppm}$ sont portés par celui à $\delta = 31.2 \text{ ppm}$. Le spectre COSY montre que les protons portés par le carbone à $\delta = 34.55 \text{ ppm}$ sont couplés entre eux et avec les protons portés par le carbone voisin à $\delta = 31.2 \text{ ppm}$. Les protons portés par le carbone à $\delta = 34.55 \text{ ppm}$ sont également couplés avec le proton à $\delta = 4.9 \text{ ppm}$. Le carbone lié au proton à $\delta = 4.9 \text{ ppm}$ a un déplacement chimique de $\delta = 67.7 \text{ ppm}$, ce qui suggère qu'il soit porteur d'un hétéroatome électronégatif tel que l'oxygène. Le spectre de masse (figure III.34) indique que le poids moléculaire de cette molécule est de 178 g.mol^{-1} .

Etant donné que cette molécule comporte dix carbones, sa formule brute est : $C_{10}H_{10}O_3$. La fragmentation du produit **8** en impact électronique confirme la structure proposée (figure III.35).

Ces données sont en accord avec celles de la littérature [77, 78]. Ce composé est également appelé isosclérone.

Cette molécule a été identifiée dans le milieu de culture de *Phaeoacremonium aleophilum* [167]. Des tests biologiques réalisés sur des feuilles de vigne ont permis d'établir sa toxicité vis à vis de la plante hôte.

L'isosclérone a également été isolée de différents champignons : *Penicillium diversum* var. *aureum* [77]; *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) De Bary [79]; *Diplogelanispora grovesii* Cailleux [80]; *Scolettrichum graminis* [81]; et *Guignardia laricina*, pathogène du mélèze [42].

Ce composé est connu pour stimuler l'élongation racinaire des graines de riz à une concentration de 1-10 ppm, et pour inhiber la croissance des racines et des jeunes plants de riz à une concentration de 100 ppm [79].

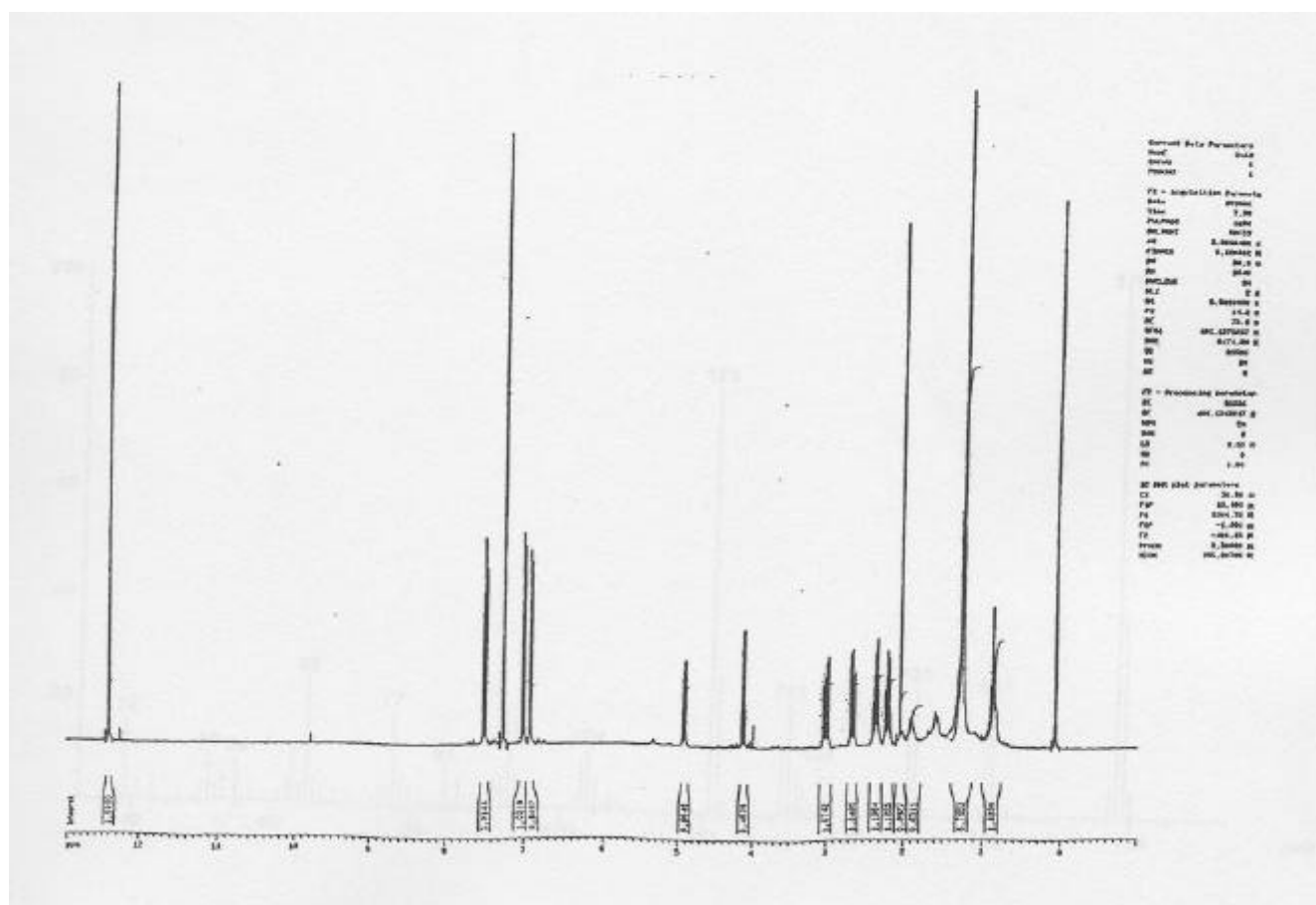


Figure III.32 : Spectre ^1H -RMN du produit **8** (400 MHz, CDCl_3)

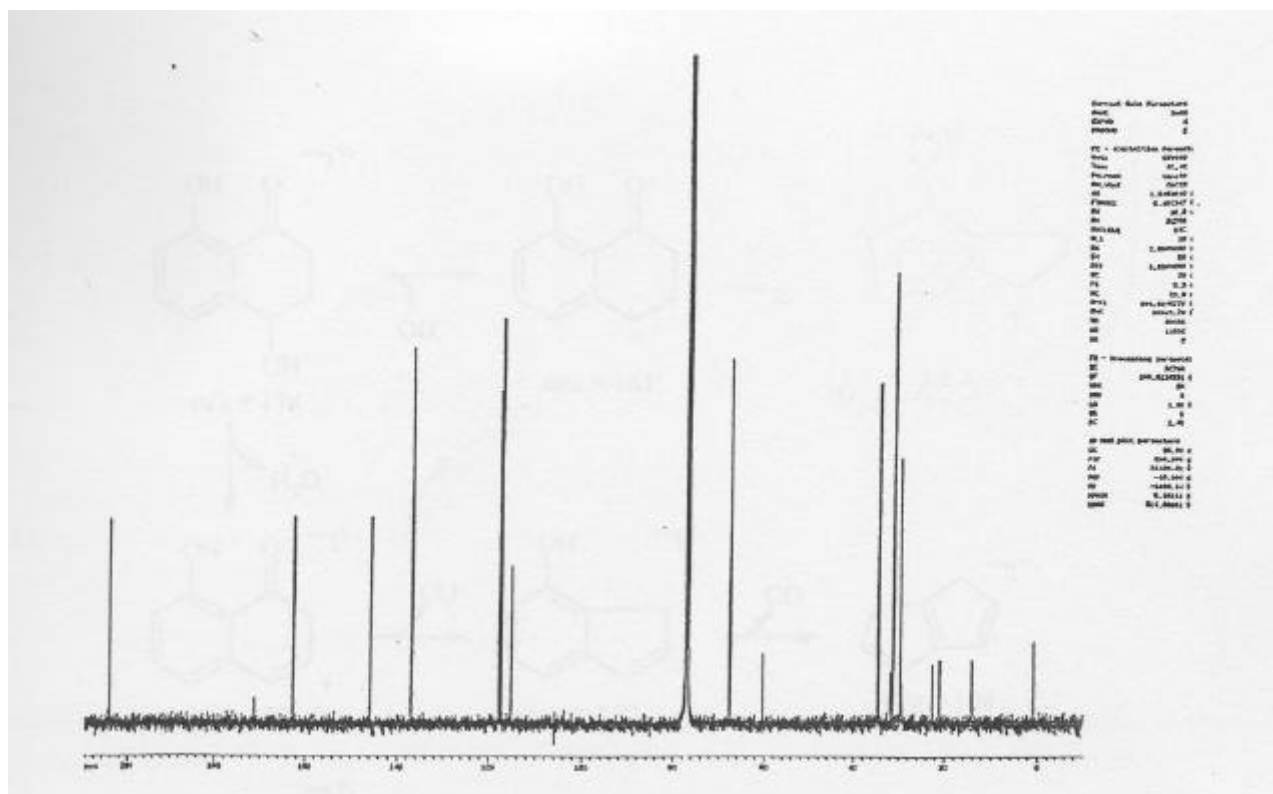


Figure III.33 : Spectre ^{13}C -RMN du produit **8** (100 MHz, CDCl_3)

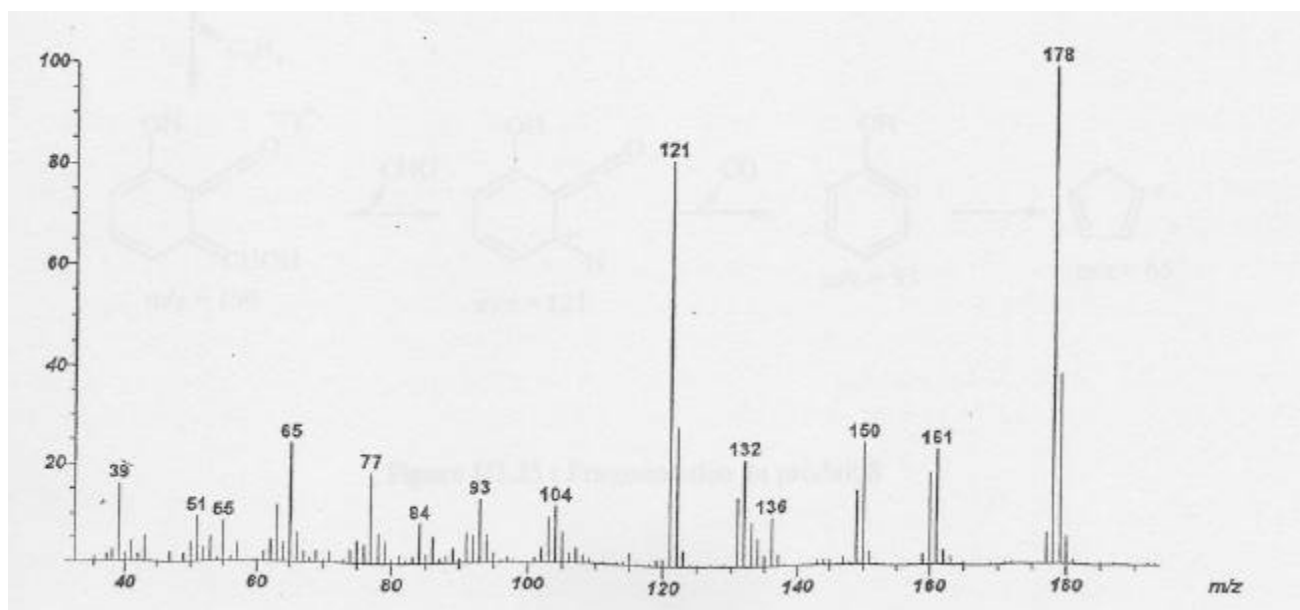


Figure III.34 : Spectre de masse du produit **8** (EI, 70 eV)

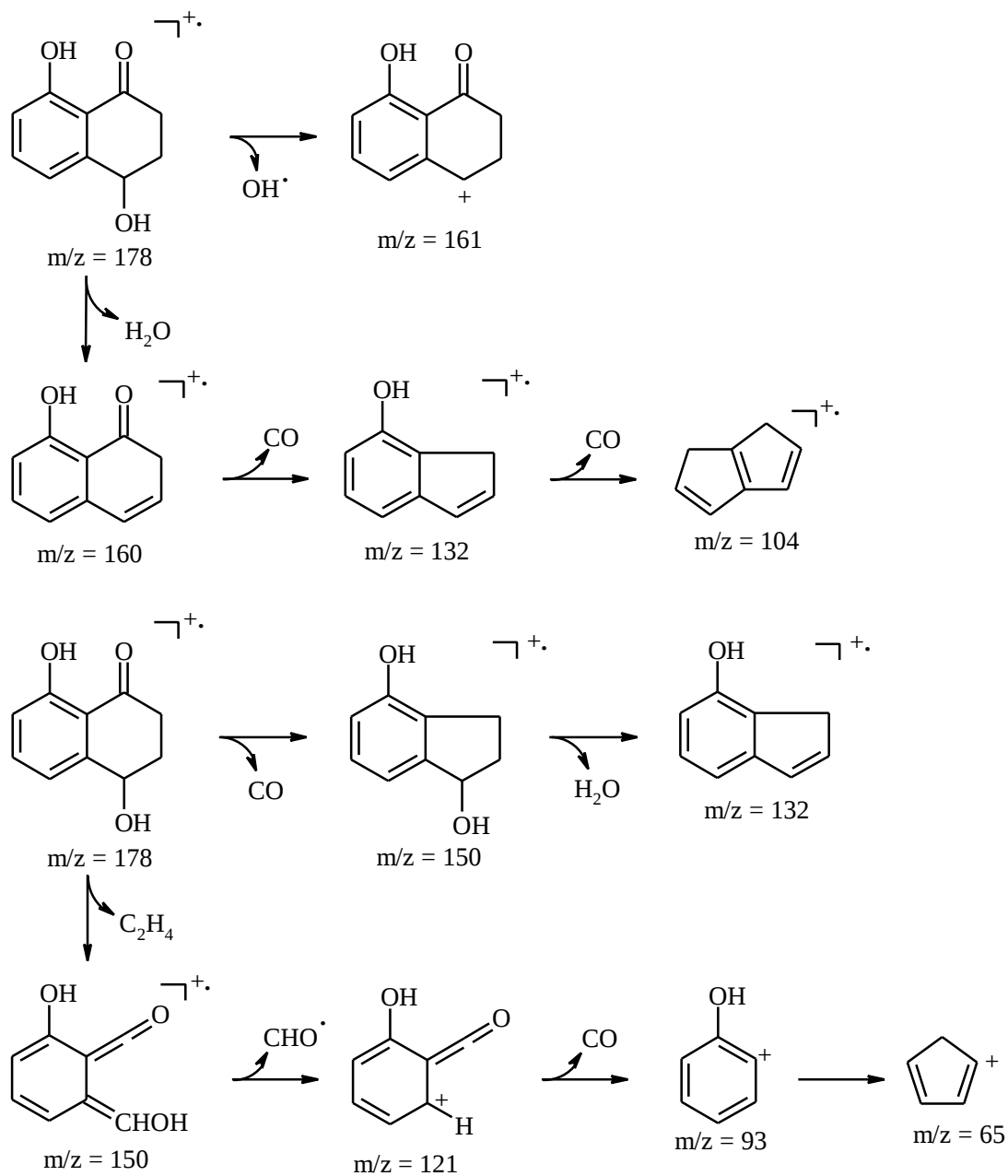
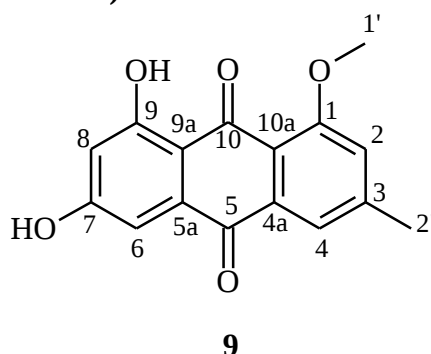


Figure III.35 : Fragmentation du produit 8

III.1.2.9- Identification de la 1,3-dihydroxy-8-méthoxy-6-méthyl-anthraquinone (ou 1-O-méthyl-émodyne)



Formule brute : $C_{16}H_{12}O_5$

Poids moléculaire : $284.27 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse de produit isolé : $< 1 \text{ mg}$

Analyse (Figures III.36-III.38) :

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : 13.6 (s, 1H, (C-9)-OH), 7.8 (br. s, 1H, H-4), 7.55 (br. s, 1H, H-2), 7.3 (d, 1H, 2.46 Hz, H-5), 6.75 (d, 1H, 2.46 Hz, H-7), 4.65 (br. s, (C-7)-OH), 4.1 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 2.6 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)

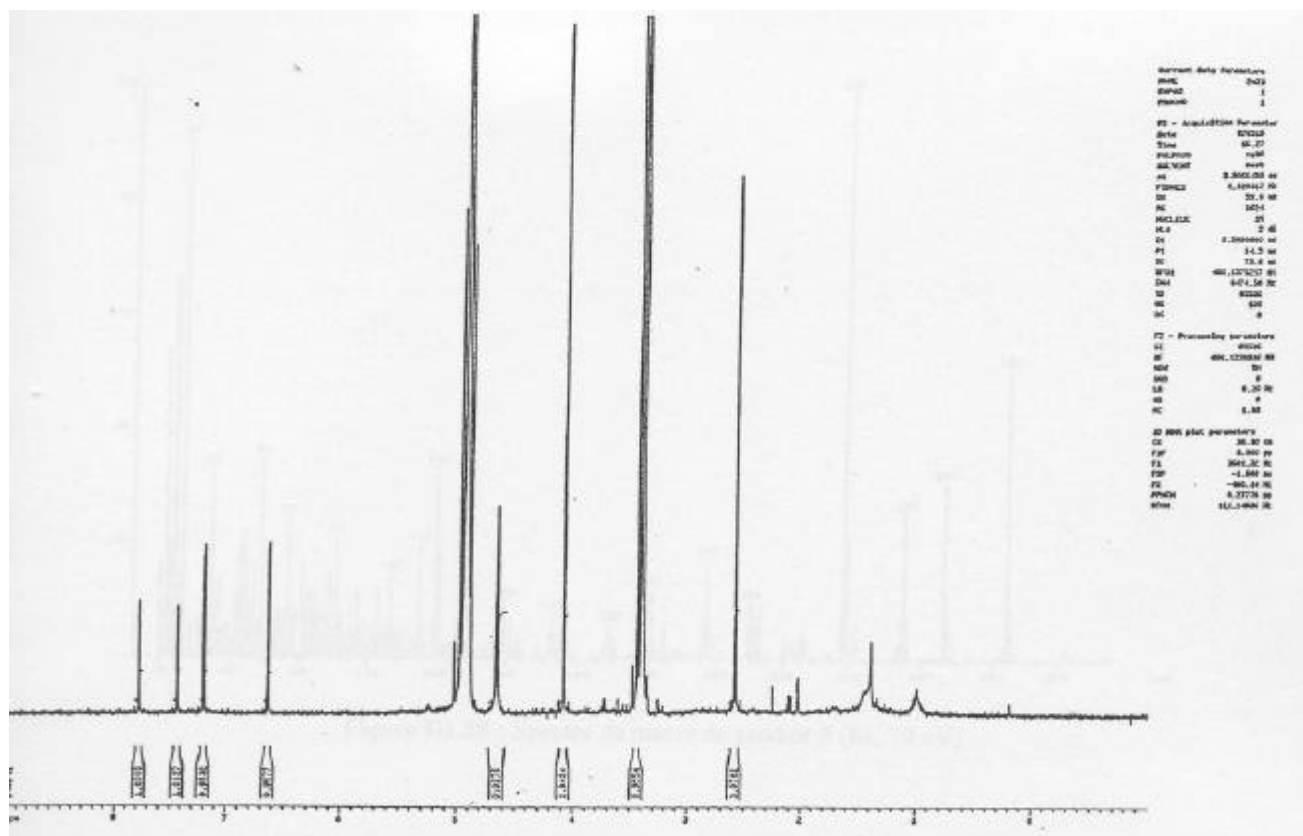
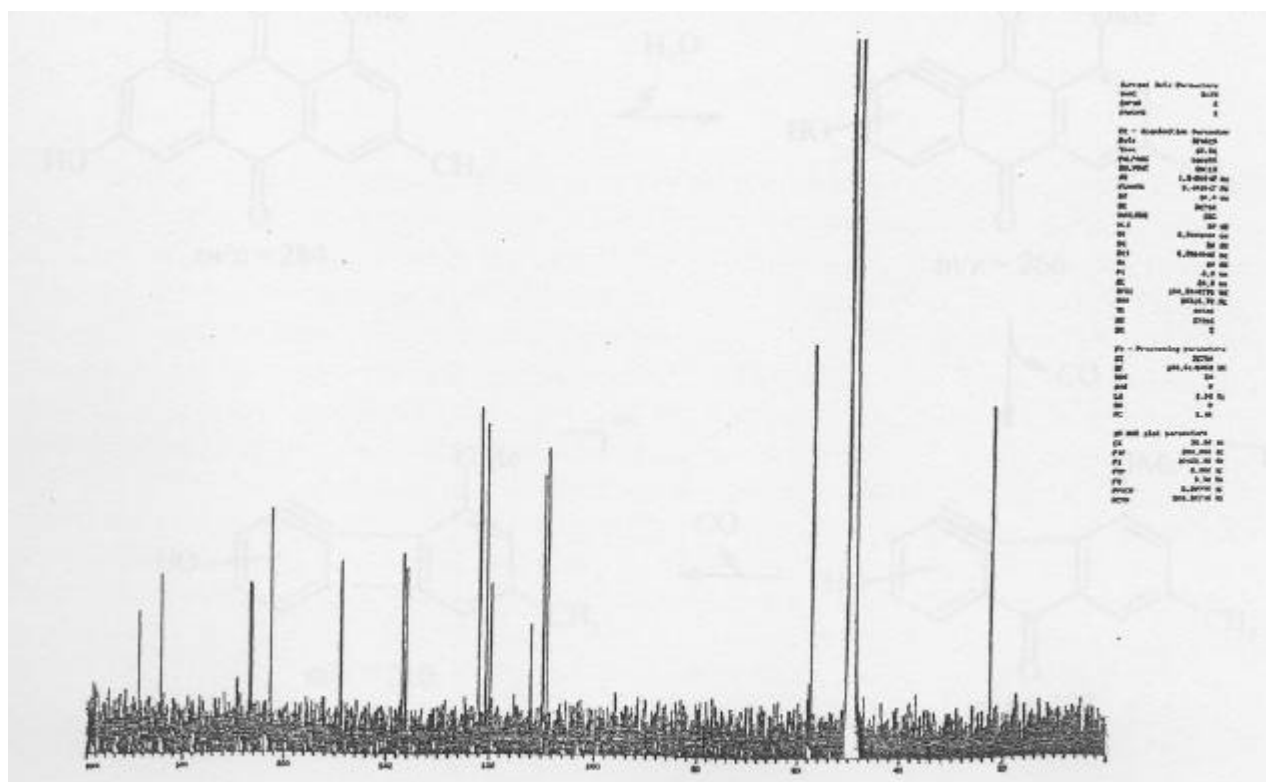
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : 188.8 (C-9), 184.4 (C-10), 166.8 (C-6), 166.5 (C-8), 162.65 (C-1), 148.9 (C-3), 136.85 (C-5a), 136.2 (C-4a), 121.95 (C-2), 120.7 (C-4), 119.7 (C-1a), 112.0 (C-8a), 109.7 (C-5), 108.9 (C-7), 49.6 ($-\text{OCH}_3$), 22.4 ($-\text{CH}_3$)

MS, EI, 70 eV (m/z, I%): 284 (M^+ , 51), 266 (32), 255 (25), 238 (100), 210 (10), 197 (18), 181 (13), 128 (32), 120 (34), 115 (20), 91 (21), 77 (25)

Cette substance est de couleur jaune intense. Les spectres $^1\text{H-RMN}$ (figure III.36) et COSY mettent en évidence la présence de quatre protons aromatiques couplés deux à deux, avec des constantes de couplage faibles caractéristiques de protons en position *méto*. Le signal à 13.6 ppm indique la présence d'un groupement phénolique chélaté. Le spectre $^{13}\text{C-RMN}$ (figure III.37) montre que la molécule se compose de 16 carbones, dont deux carbones quaternaires à $\delta = 188.8 \text{ ppm}$ et $\delta = 184.4 \text{ ppm}$ correspondant à des carbonyles α,β -insaturés et 6 carbones aromatiques. Nous sommes donc en présence de deux cycles aromatiques tétrasubstitués. L'un des substituants est un groupement méthoxy ($\delta = 4.1 \text{ ppm}$), un autre est un groupe méthyle ($\delta = 2.6 \text{ ppm}$). Le spectre de masse (figure III.38) indique que le poids moléculaire de ce composé est 284 g.mol^{-1} , ce qui nous permet d'établir sa formule brute : $C_{16}H_{12}O_5$. La fragmentation de ce composé en impact électronique est en accord avec la structure proposée (figure III.39)

Toutes ces données correspondent à celles obtenues dans la littérature [82]. Il s'agit de la 1,3-dihydroxy-8-méthoxy-6-méthyl-antraquinone, encore appelée : 1-O-méthyl-émodyne.

Ce composé est connu pour inhiber des protéines tyrosine kinases, enzymes catalysant la phosphorylation des résidus tyrosine de protéines [83]. Ces enzymes jouent un rôle important en physiologie cellulaire, en particulier dans la prolifération et la différenciation cellulaires.

Figure III.36 : Spectre ^1H -RMN du produit **9** (400 MHz, CDCl_3)Figure III.37 : Spectre ^{13}C -RMN du produit **9** (100 MHz, CDCl_3)

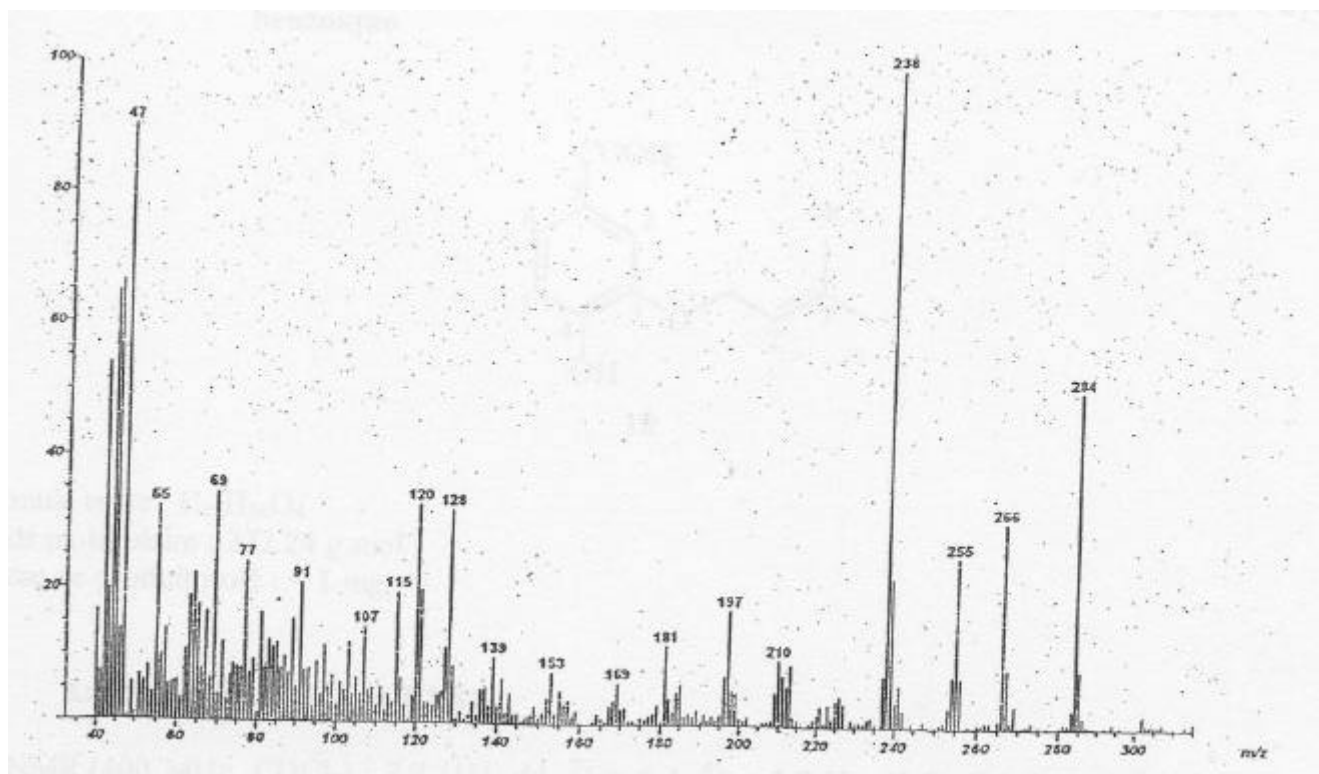


Figure III.38 : Spectre de masse du produit 9 (EI, 70 eV)

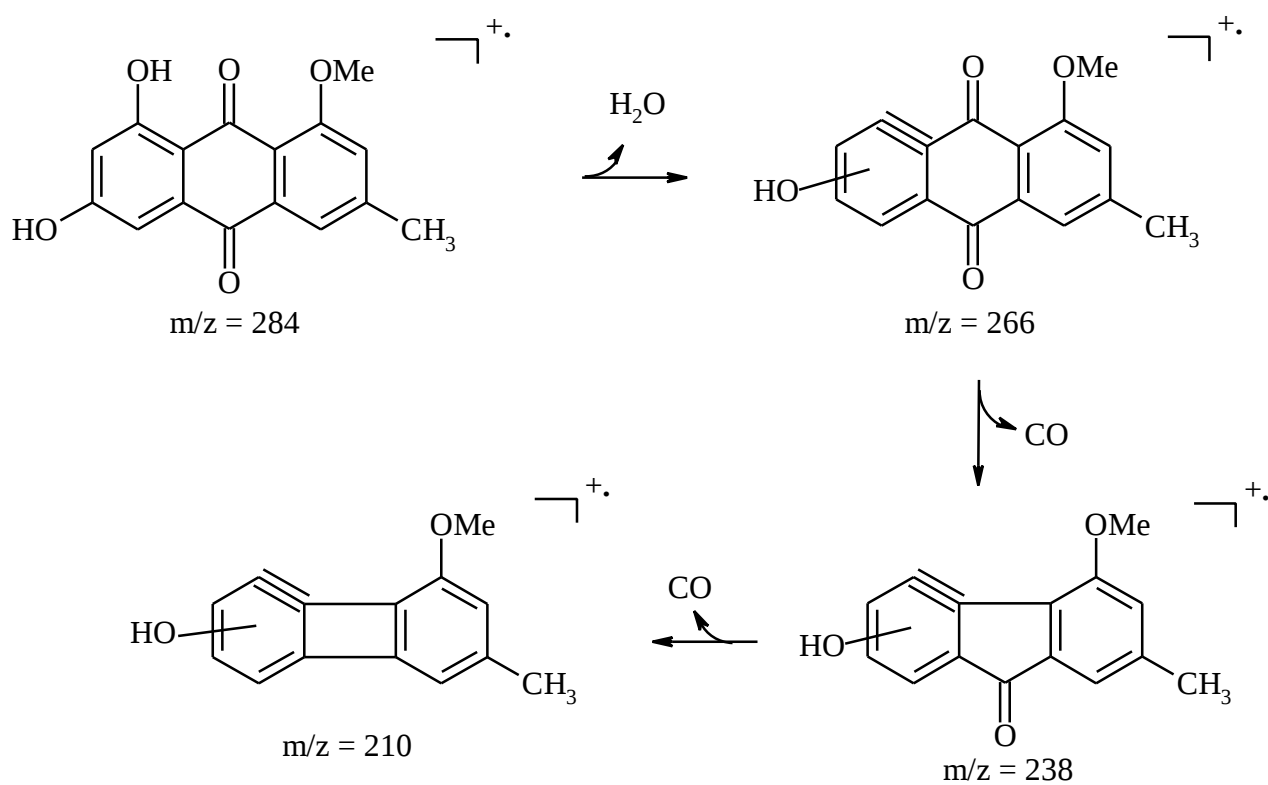
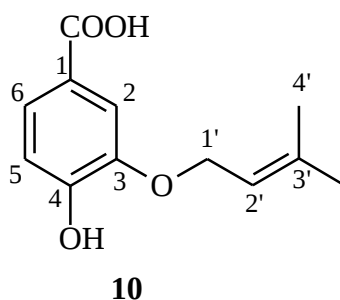


Figure III.39 : Fragmentation du produit 9

III.1.2.10- Identification de l'acide 4-hydroxy-3-(3-méthylbut-2-enyloxy)-benzoïque



Formule brute : $C_{12}H_{14}O_4$

Poids moléculaire : $222.24 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse de produit isolé : $< 1 \text{ mg}$

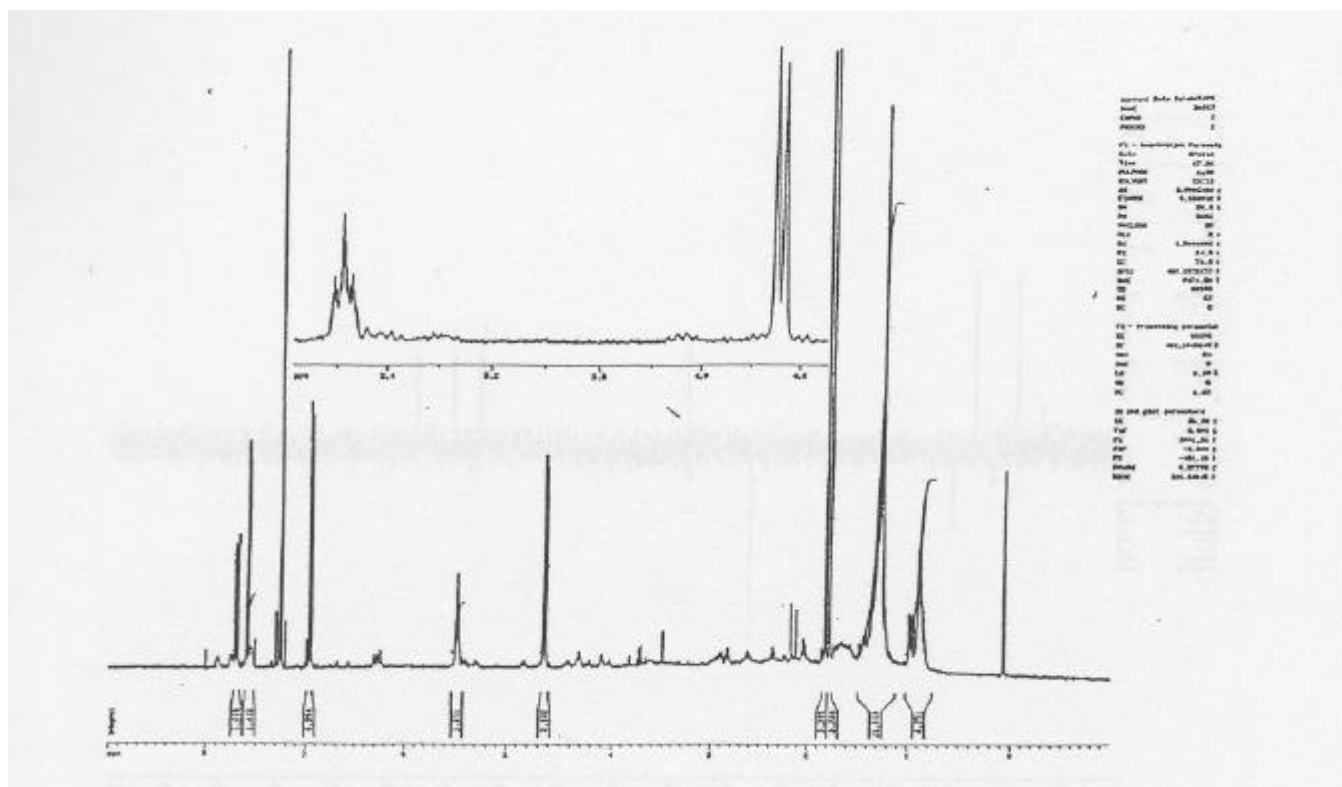
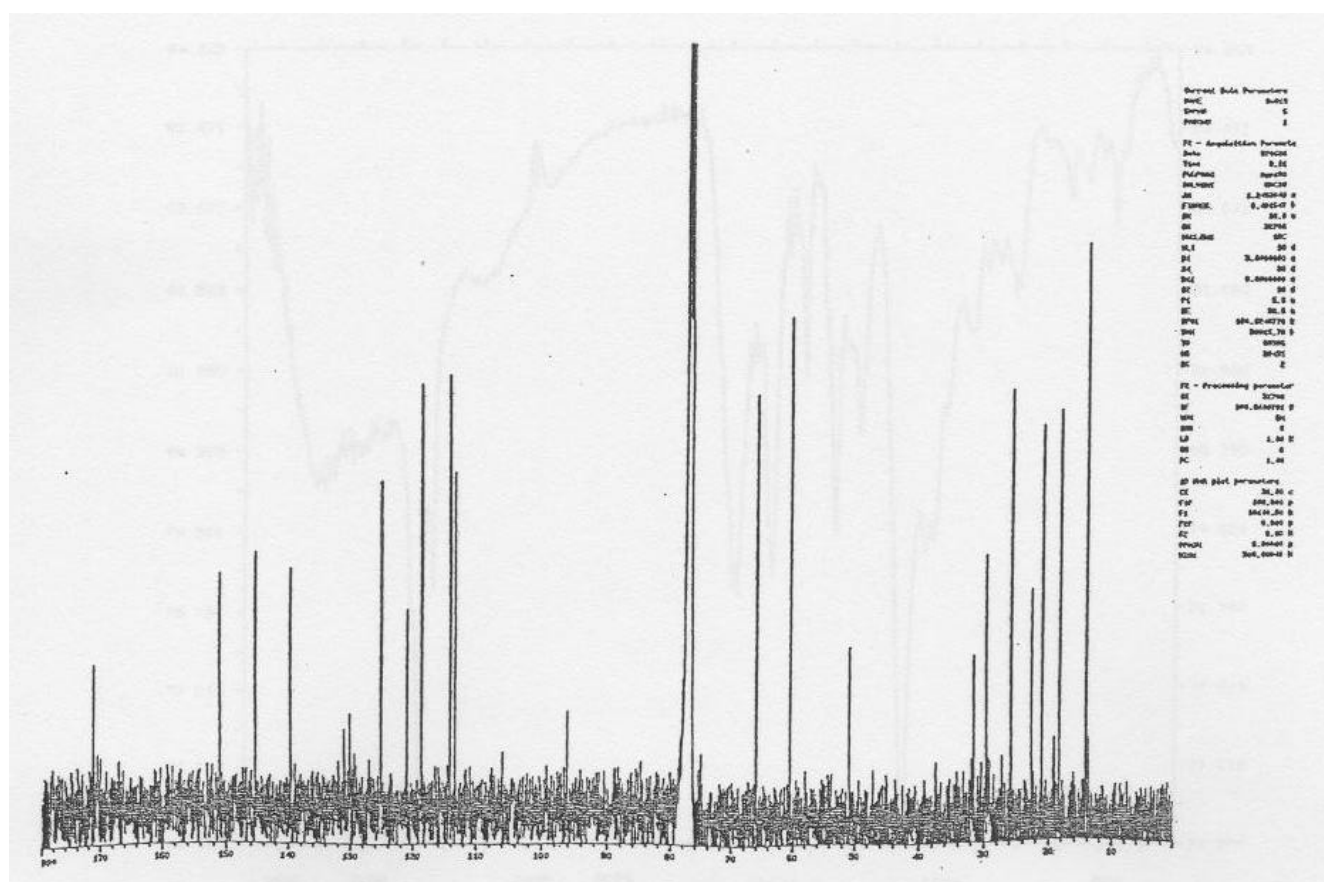
Analyse (Figures III.40-III-44) :

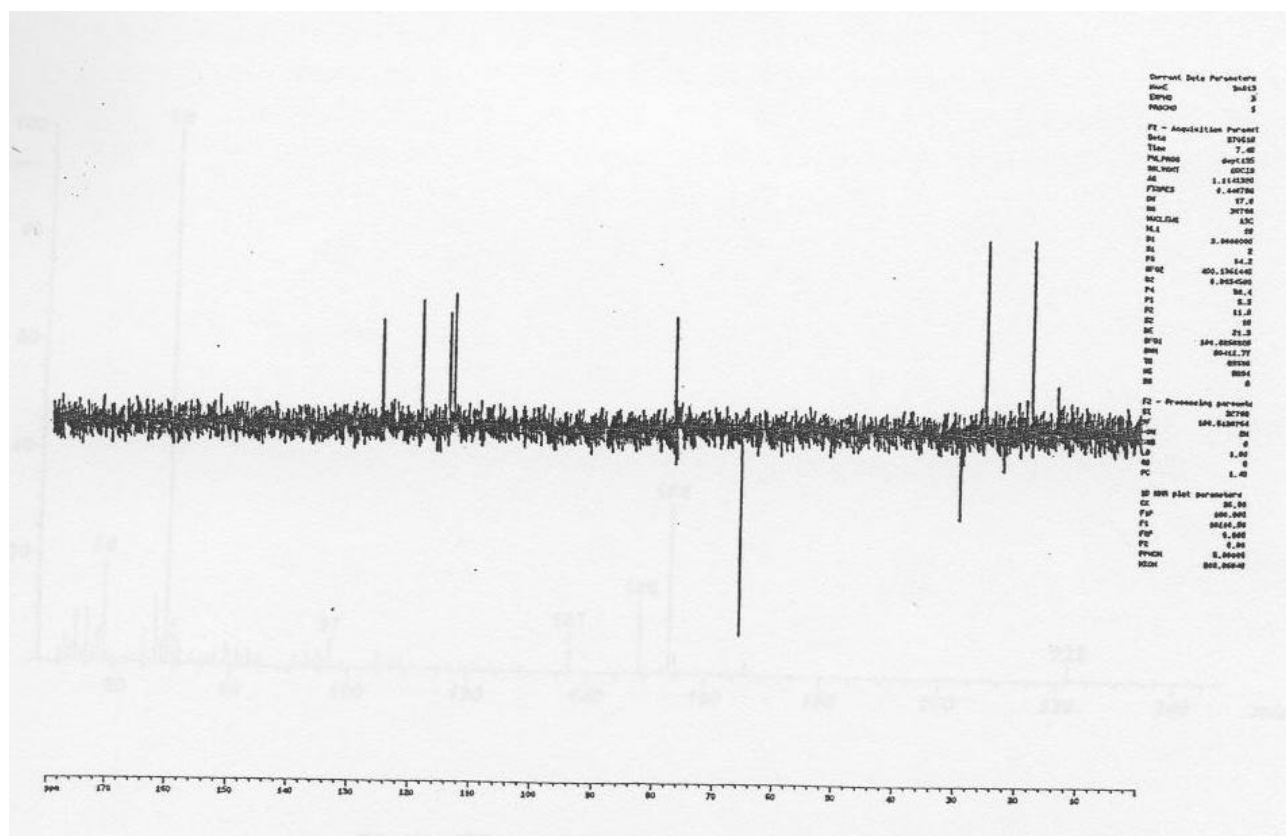
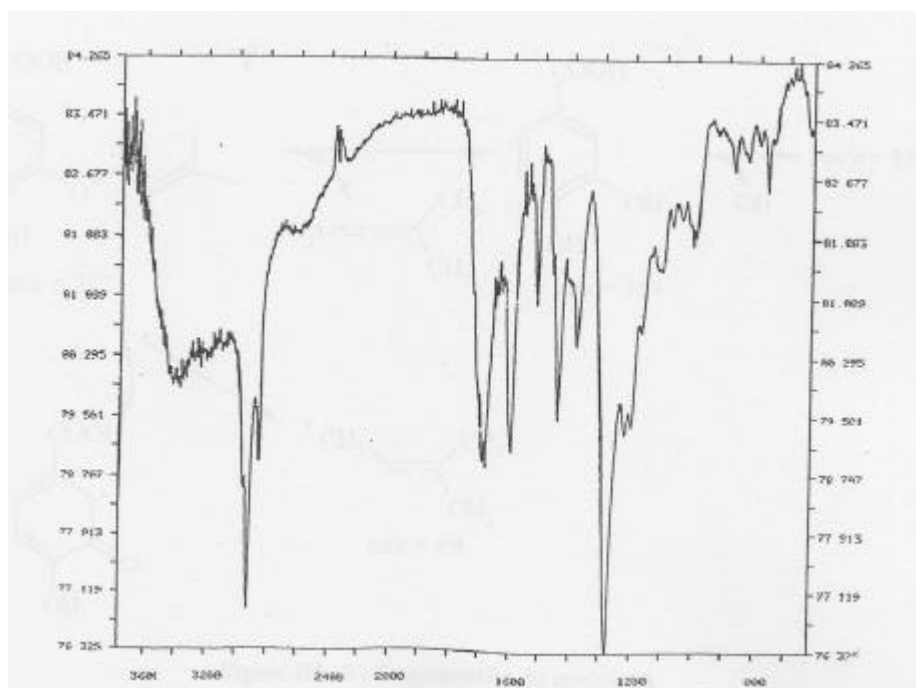
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : 7.7 (1H, dd, $^3J = 6.4$, $^4J = 1.9$ Hz, H-6), 7.6 (1H, d, $^4J = 1.9$ Hz, H-2), 6.95 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 5.5 (1H, m, H-3'), 4.6 (2H, d, H-2', $J = 7$ Hz), 1.8 (3H, s, H-6'), 1.77 (3H, s, H-5')

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : 171.2 (COOH), 151.1 (C-4 ou C-3), 145.3 (C-3 ou C-4), 139.6 (C-1), 125.1 (C-6), 118.6 (C-2), 114.1 (C-5), 113.4 (C-3'), 65.9 (C-2'), 60.4 (C-4'), 25.8 (C-6'), 18.2 (C-5')

MS, EI, 70 eV (m/z , I%) : 222 (M^+ , 3), 154 (32), 149 (14), 137 (8), 97 (6), 69 (100)

Le spectre $^1\text{H-RMN}$ (figure III.40) nous indique la présence d'un cycle aromatique trisubstitué. Le proton à $\delta = 6.95$ ppm est couplé au proton à $\delta = 7.7$ ppm avec une constante de couplage correspondant à des protons en *ortho* sur le noyau benzénique ($^3J = 8.3$ Hz). Le proton à $\delta = 7.7$ ppm est également couplé au proton à $\delta = 7.6$ ppm, mais avec une constante de couplage faible ($^4J = 1.9$ Hz) indiquant que ces hydrogènes sont en *méta* l'un de l'autre. Deux singulets à $\delta = 1.8$ ppm et $\delta = 1.77$ ppm indiquent la présence de deux groupements méthyles. La multiplicité du signal à $\delta = 5.5$ ppm montre que le proton est non seulement couplé au CH_2 à $\delta = 4.6$ ppm, mais aussi aux deux méthyles. Le CH_2 à $\delta = 4.6$ ppm est très déblindé ce qui suggère sa proximité d'un hétéroatome électronégatif. Les spectres $^{13}\text{C-RMN}$ (figure III.41) et DEPT 135 (Figure III.42) nous indiquent que la molécule comporte 12 carbones, dont 5 quaternaires. Le signal à $\delta = 171.2$ ppm suggère la présence d'un groupement acide, ce qui est confirmé par la présence d'une bande à 1652 cm^{-1} dans le spectre IR (figure III.43), correspondant à la vibration d'une liaison C=O d'acide aromatique. Le spectre de masse (figure III.44) nous indique que la masse moléculaire de ce composé est 222 g.mol^{-1} , et donc sa formule brute : $C_{12}H_{14}O_4$. La fragmentation du produit **10** par impact électronique est en accord avec la structure proposée (figure III.45).

Figure III.40 : Spectre ^1H -RMN du produit **10** (400 MHz, CDCl_3)Figure III.41 : Spectre ^{13}C -RMN du produit **10** (100 MHz, CDCl_3)

Figure III.42 : Spectre DEPT 135 du produit **10** (100 MHz, CDCl₃)Figure III.43 : Spectre IR du produit **10**

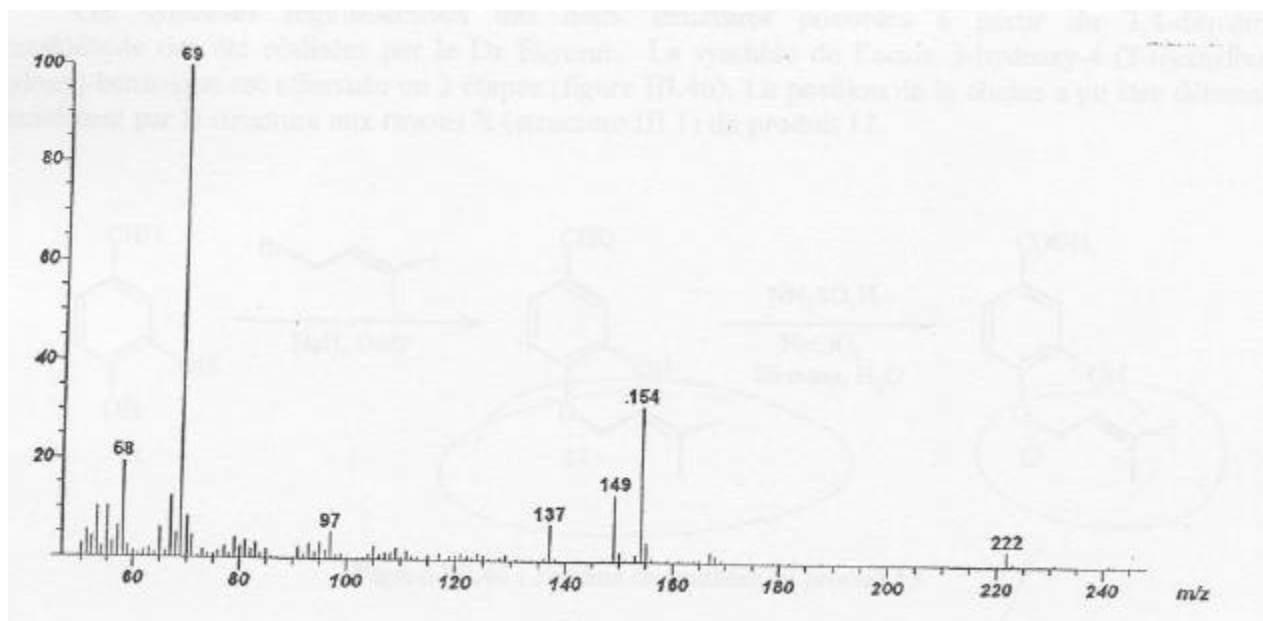


Figure III.44 : Spectre de masse du produit 10

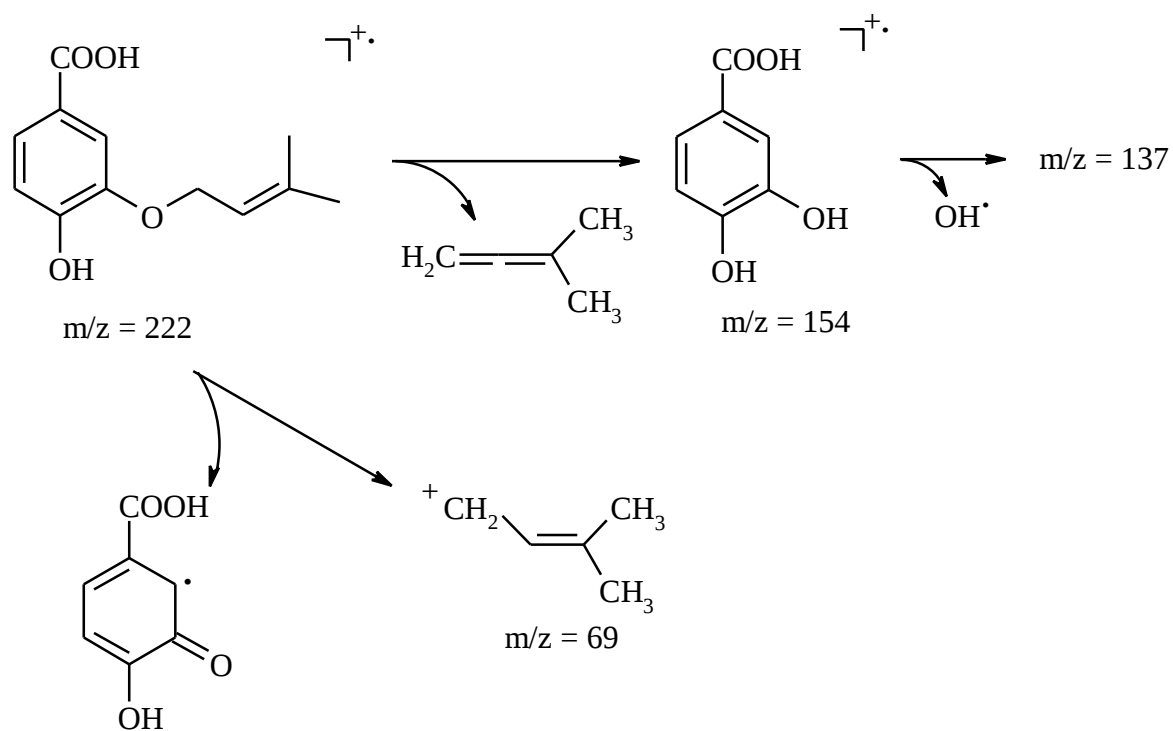


Figure III.45 : Fragmentation du produit 10

Lors de l'identification, toutes ces données ne nous permettaient pas de déterminer la position relative de chacun des substituants. Cette molécule n'ayant jamais été décrite dans la littérature, nous avons dû recourir à la synthèse de ce composé pour définir sa structure.

Les synthèses régiosélectives des deux structures possibles à partir du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde **12** ont été réalisées par le Dr Fkyerat. La synthèse de l'acide 3-hydroxy-4-(3-méthylbut-2-enyloxy)-benzoïque **14** est effectuée en 2 étapes (figure III.46). La position de la chaîne a pu être déterminée précisément par la structure aux rayons X (structure III.1) du produit **13**.

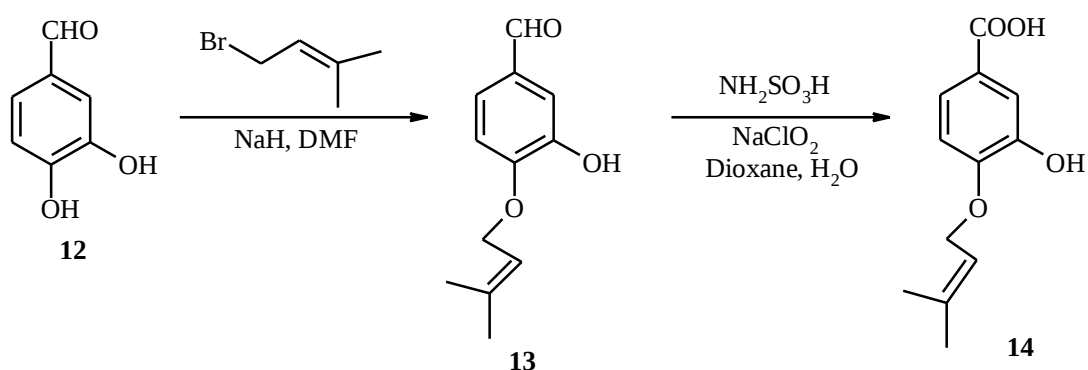
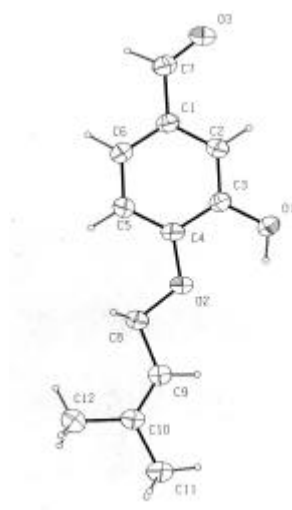


Figure III.46 : Schéma de synthèse du produit **14**



Structure III.1 : Structure du produit **13** aux rayons X

La synthèse de l'acide 4-hydroxy-3-(3-méthylbut-2-enyloxy)-benzoïque **10** se fait en 6 étapes de la manière suivante (figure III.47) :

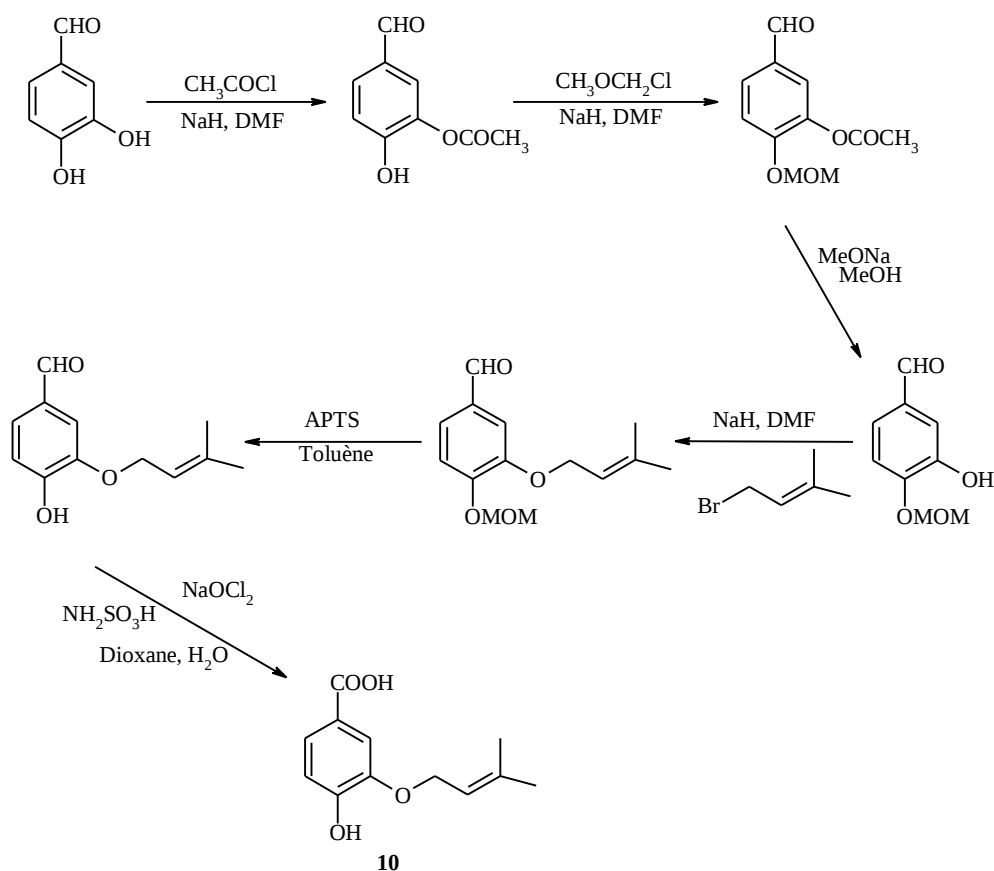
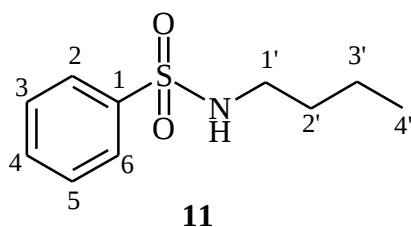


Figure III.47 : Schéma de synthèse du produit **10**

Seules les données spectroscopiques du composé **10** correspondent à celles du produit isolé du milieu de culture de *Phaeoacremonium chlamydosporum*. Ce nouveau produit naturel est donc l'acide 4-hydroxy-3-(3-méthylbut-2-enyloxy)-benzoïque.

III.1.2.11- Identification du N-butyl-benzène-sulfonamide



Formule brute : $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$

Poids moléculaire : 213 g.mol^{-1}

Masse de produit isolé: 2.1 mg

Analyse (Figures III.48-III.50):

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : 7.9 (2H, d, H-2 et H-6), 7.6 (1H, tt, H-4), 7.5 (2H, t, H-3 et H-5), 4.6 (1H, br. t, -NH-), 2.95 (2H, q, H-1'), 1.4 (2H, quint., H-2'), 1.3 (2H, sext., H-3'), 0.85 (3H, t, H-4')

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : 140.0 (C_1), 132.5 (C), 129.0 (C), 127.0 (C), 42.9 (C_1'), 31.6 (C_2'), 19.6 (C_3'), 13.5 (C_4')

MS, EI, 70 eV (m/z, I%) : 214 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 9), 213 (M^+ , 6), 170 (76), 158 (10), 141 (69), 77 (100), 51 (23)

MS, DCI, NH_3 , 70 eV (m/z) : 231 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$), 214 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 170, 141, 94, 77, 51

Les spectres $^1\text{H-RMN}$ (figure III.48) et $^{13}\text{C-RMN}$ (figure III.49) mettent en évidence la présence d'un cycle benzénique monosubstitué et d'une chaîne aliphatique à 4 carbones. Le spectre HETCOR-SR montre que le proton à $\delta = 4.6$ ppm n'est pas lié à un carbone mais à un hétéroatome, tel que l'azote, auquel pourrait être fixé le CH_2 à $\delta = 2.95$ ppm. Les spectres de masse EI (figure III.50) et DCI montrent que cette molécule a un poids moléculaire de 213 g.mol^{-1} , ce qui confirme la présence d'un atome d'azote. La fragmentation en impact électronique du composé **11** est en accord avec la structure proposée (figure III.51). Toutes ces données spectroscopiques nous amènent à penser que ce composé comporte une fonction sulfonamide.

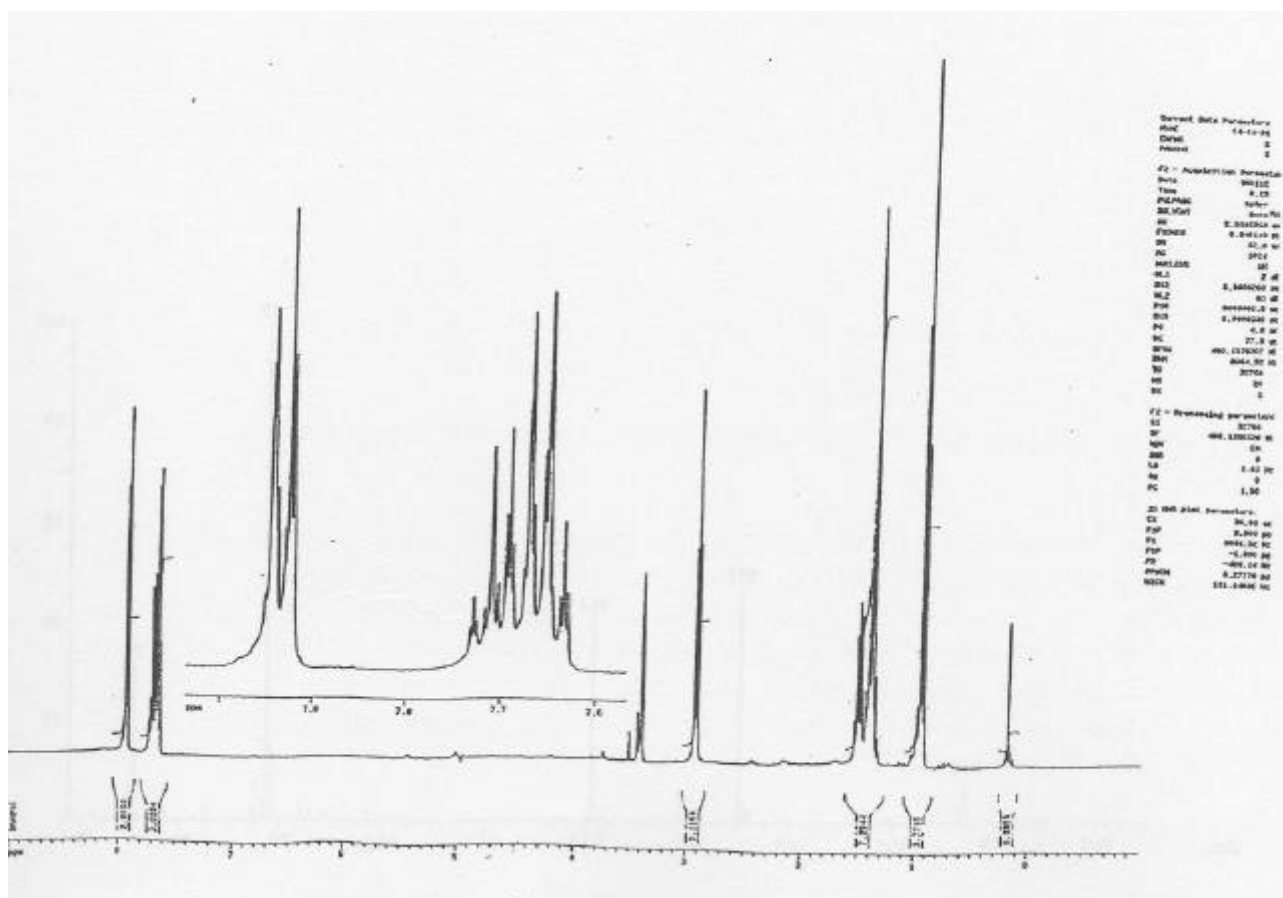
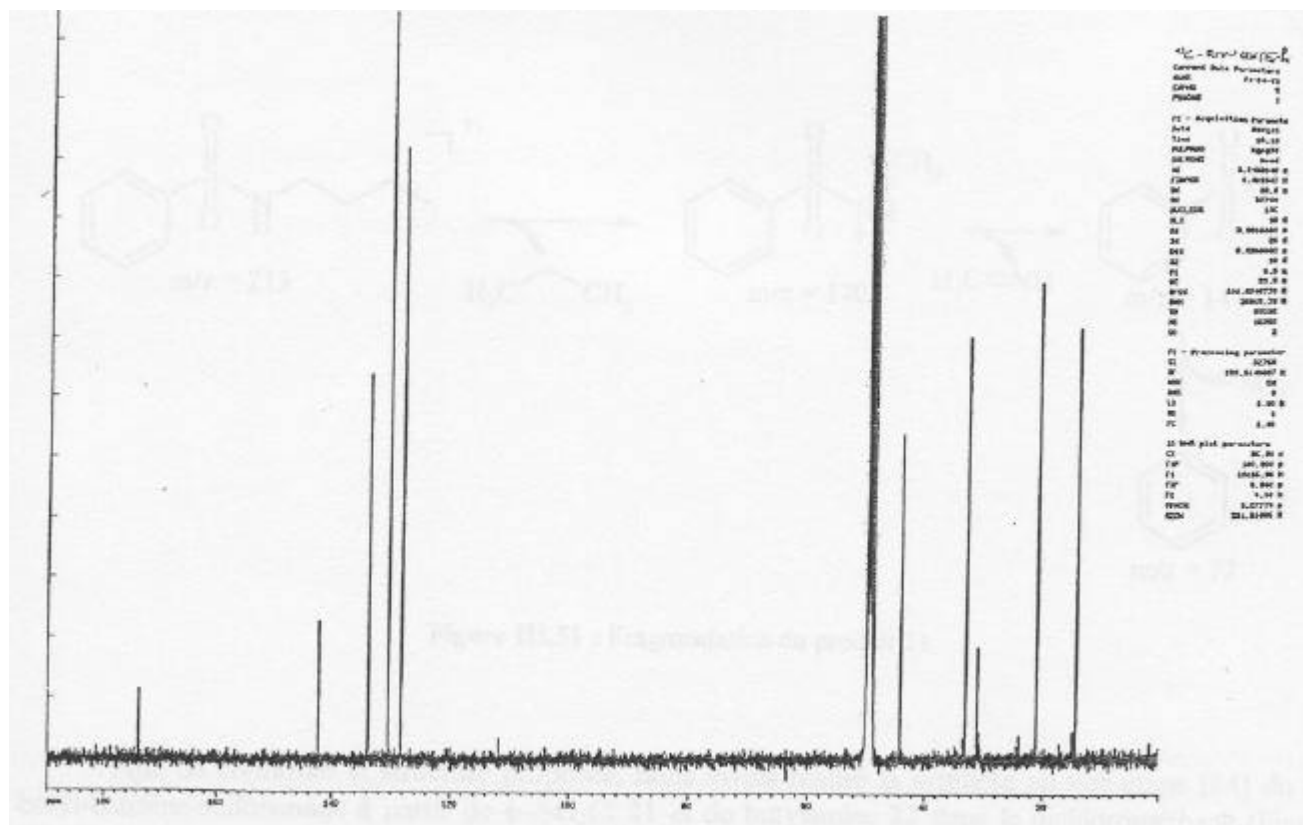
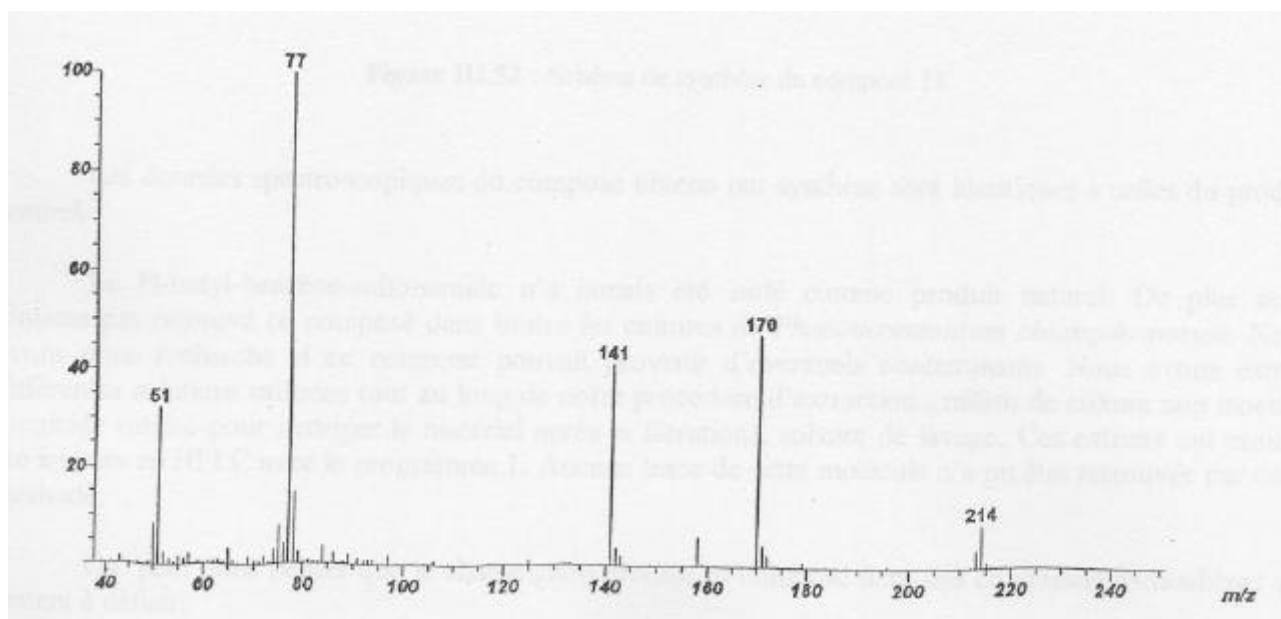


Figure III.48 : Spectre $^1\text{H-RMN}$ du produit **11** (400 MHz, CDCl_3)

Figure III.49 : Spectre ^{13}C -RMN du produit **11** (100 MHz, CDCl_3)Figure III.50 : Spectre de masse du produit **11** (EI, 70 eV)

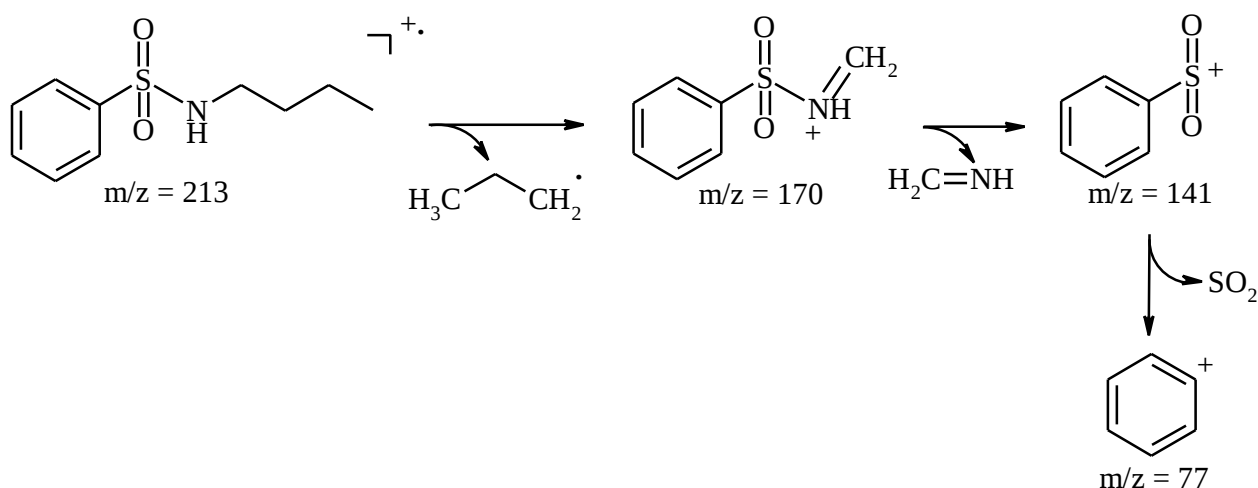


Figure III.51 : Fragmentation du produit 11

Afin de confirmer la structure proposée, nous avons réalisé la synthèse en une étape [84] du N-butyl-benzène-sulfonamide à partir de chlorure de benzène sulfonyle 15 et de butylamine 16 dans le dichlorométhane (Figure III.52).

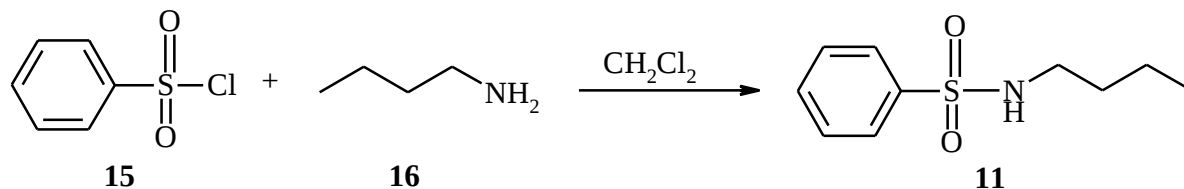


Figure III.52 : Schéma de synthèse du composé 11

Les données spectroscopiques du composé obtenu par synthèse sont identiques à celles du produit naturel.

Le N-butyl-benzène-sulfonamide n'a jamais été isolé comme produit naturel. De plus nous n'avons pas retrouvé ce composé dans toutes les cultures de *Phaeoacremonium chlamydosporum*. Nous avons donc recherché si ce composé pouvait provenir d'éventuels contaminants. Nous avons extrait différentes solutions utilisées tout au long de notre procédure d'extraction : milieu de culture non inoculé, fongicide (utilisé pour nettoyer le matériel après la filtration), solvant de lavage. Ces extraits ont ensuite été injectés en HPLC avec le programme 1. Aucune trace de cette molécule n'a pu être retrouvée par cette méthode.

On peut donc penser que le champignon produit ce composé dans des conditions particulières qui restent à définir.

III.2- *Phaeoacremonium aleophilum*

III.2.1- Procédure d'extraction

Nous avons suivi la même procédure que celle décrite pour *P. chlamydosporum*.

III.2.2- Métabolites isolés et identifiés

Quatre composés ont été isolés des milieux de culture de *Phaeoacremonium aleophilum*. Leur structure est représentée dans la figure III.53.

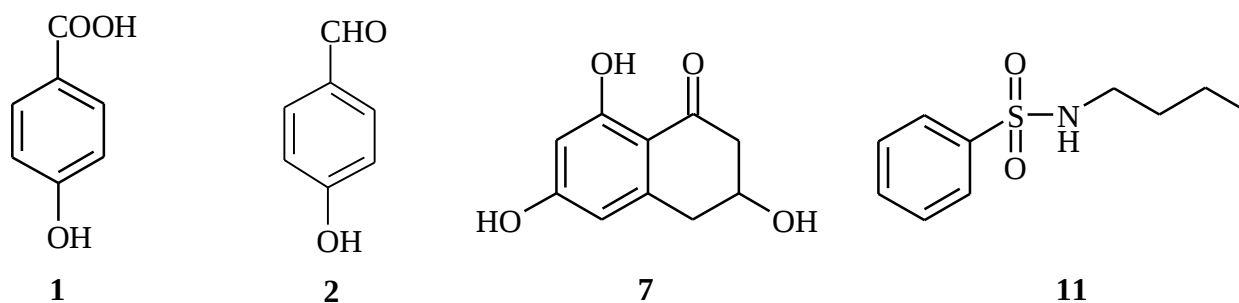


Figure III.53 : Produits isolés de *Phaeoacremonium aleophilum*

Les données spectroscopiques de ces molécules ont déjà été décrites en détail dans le paragraphe I. Par conséquent, dans cette partie consacrée à *P. aleophilum*, seuls les spectres des composés isolés des milieux de culture de ce champignon seront présentés.

III.2.2.1- Identification de l'acide 4-hydroxy-benzoïque

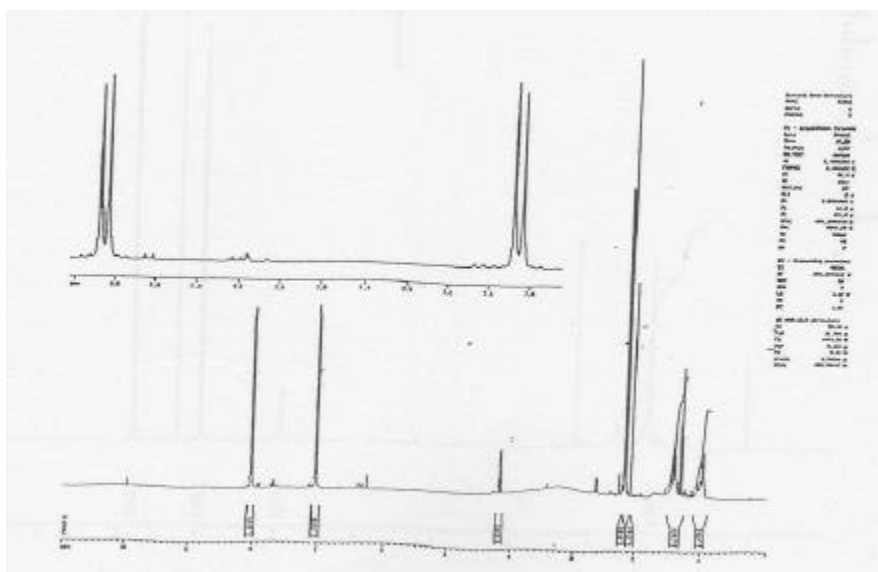
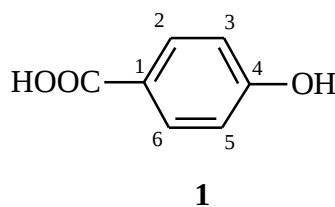


Figure III.54 : Spectre ^1H -RMN du produit **1** (400 MHz,)



Chemical structure of 2,6-dihydroxybenzoic acid (salicylic acid) with carbon atoms numbered 1 to 6. The carboxylic acid group is at position 1, and hydroxyl groups are at positions 2 and 6.

[illegible]

Figure III.56 : Spectre ^1H -RMN du produit **2** (400 MHz, CDCl_3)

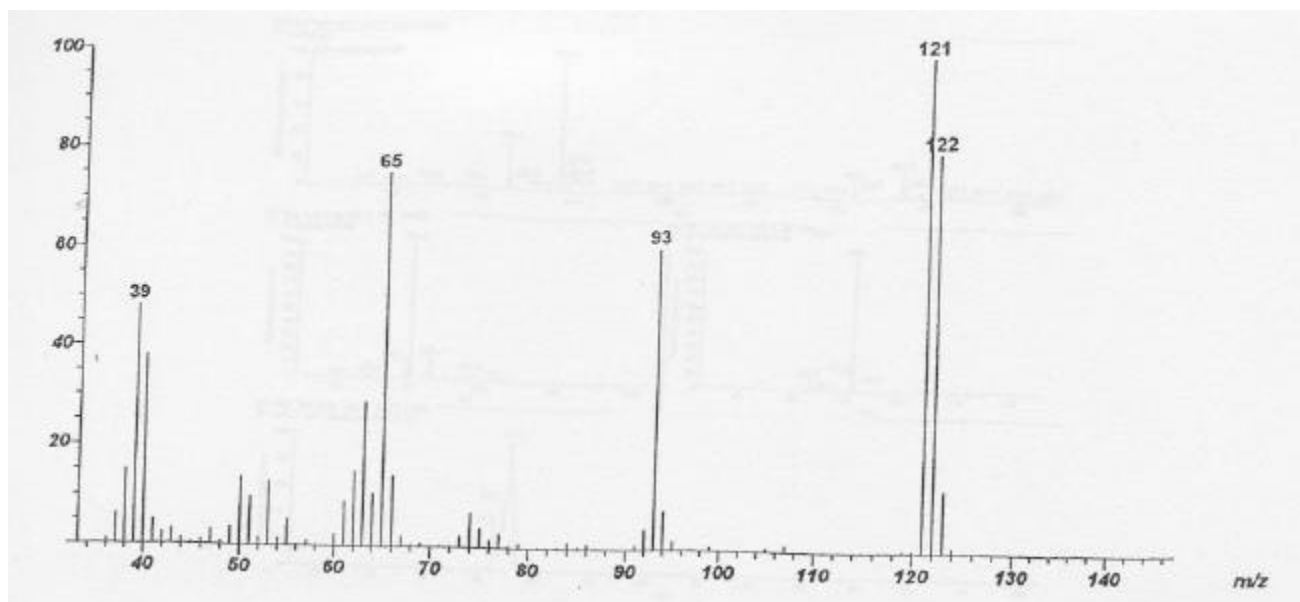


Figure III.57 : Spectre de masse du produit 2 (EI, 70 eV)

III.2.2.3- Identification de la 3,6,8-trihydroxy-3,4-dihydro-(2H)-naphtalen-1-one (ou Scytalone)

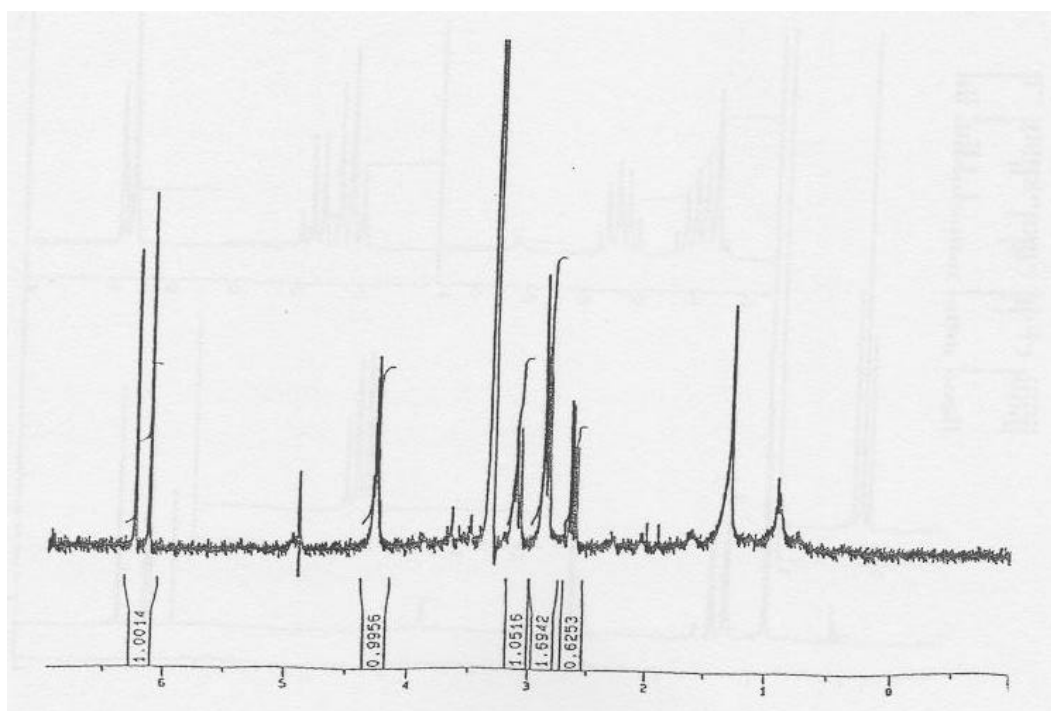
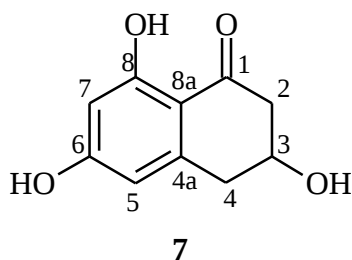


Figure III.58 : Spectre ^1H -RMN du produit 7 (400 MHz, CD_3OD)

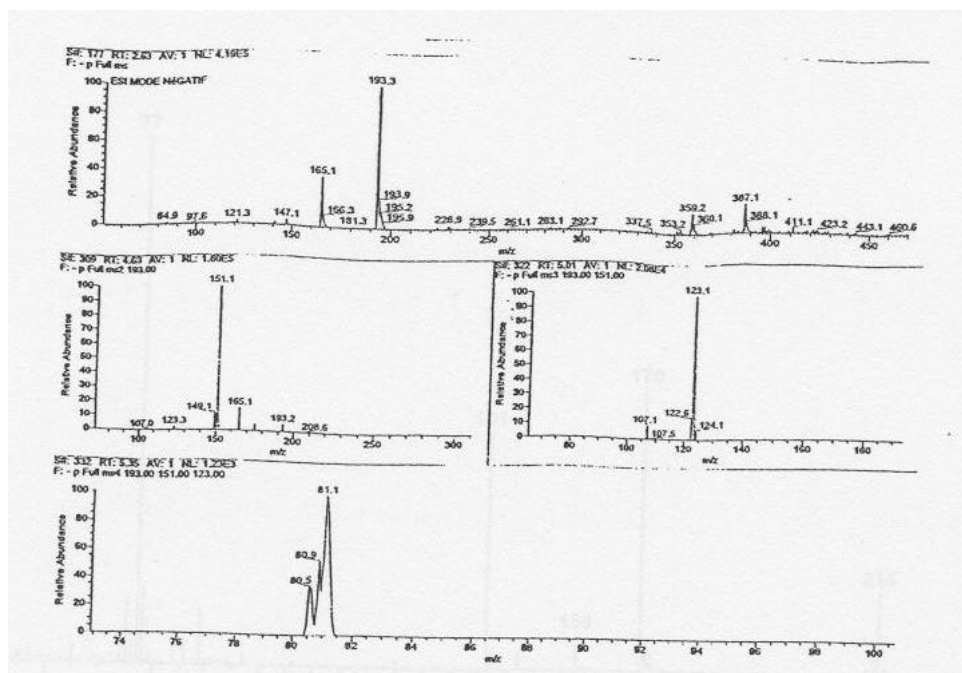
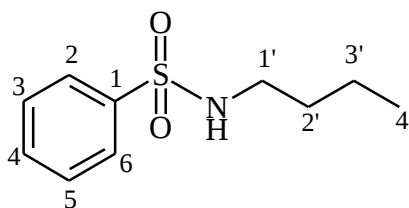
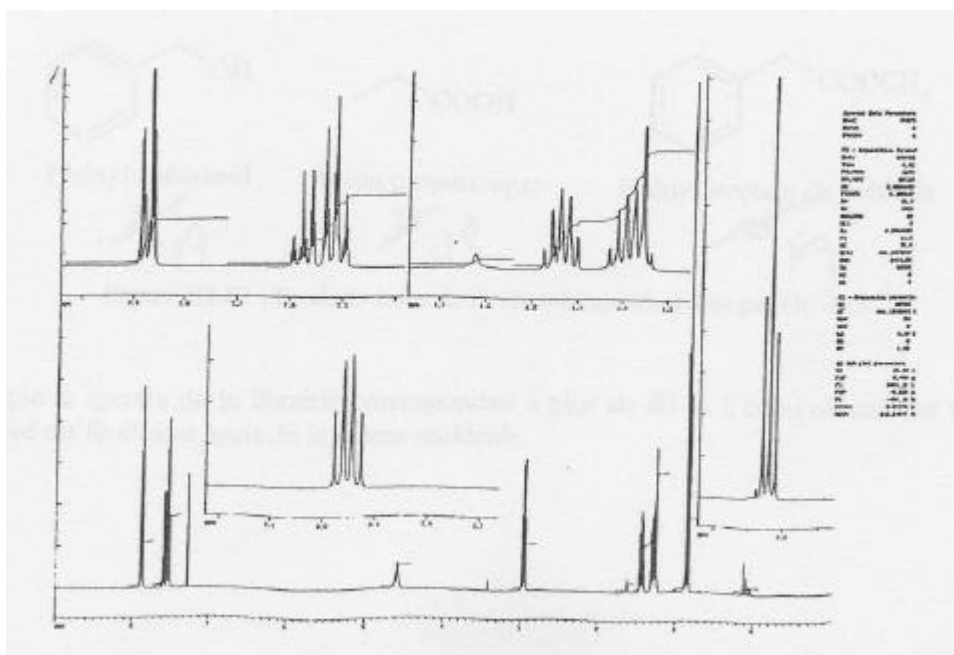


Figure III.59 : ESI-MS (mode négatif) du produit 7

III.2.2.4- Identification du N-butyl-benzène-sulfonamide



11

Figure III.60 : Spectre ^1H -RMN du produit 11 (400 MHz, CDCl_3)

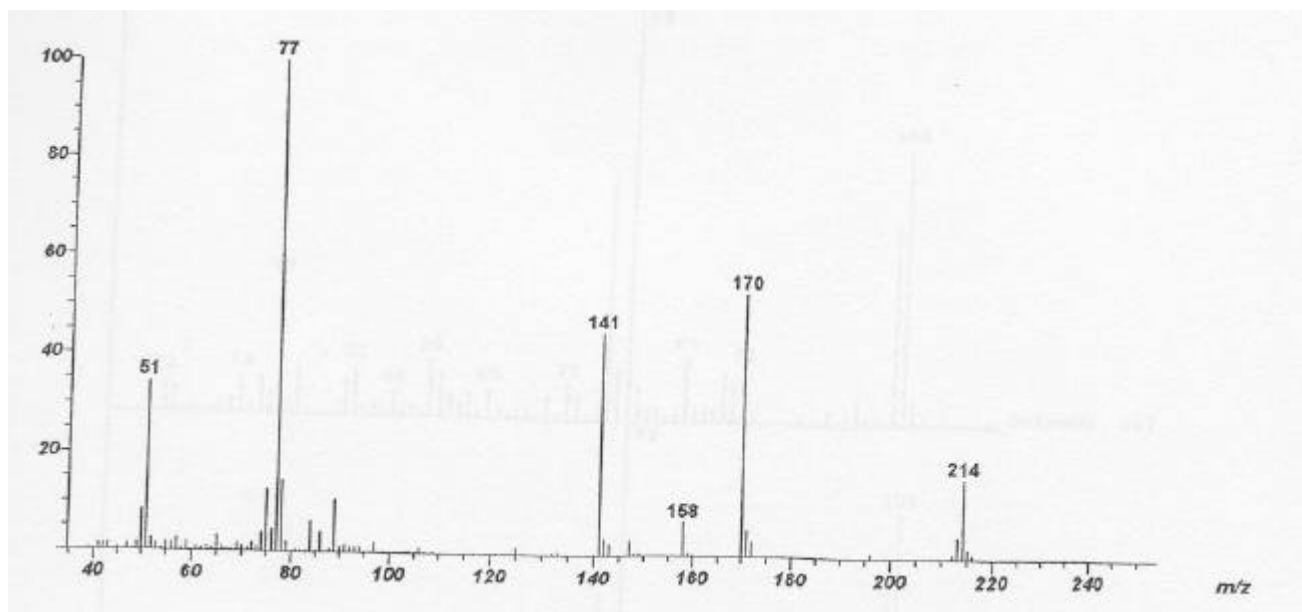
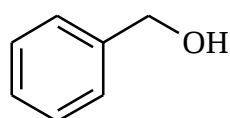


Figure III.61 : Spectre de masse du produit **11** (EI, 70 eV)

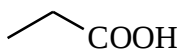
III.2.3- Métabolites identifiés par GC-MS

Des fractions issues d'extraits bruts de milieu de culture de *P. aleophilum* ont été étudiées en GC-MS. Trois composés ont été identifiés en utilisant cette technique (figure III.62), en comparant leur spectre de masse obtenu en impact électronique avec ceux contenus dans la librairie Wiley (figures III.63, III.64 et III.65).



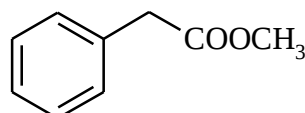
Phényl-méthanol

17



Acide propanoïque

18



Phényl-acétate de méthyle

19

Figure III.62 : Produits issus de *P. aleophilum* identifiés par GC-MS

Lorsque le spectre de la librairie correspondait à plus de 80 % à celui obtenu par GC-MS, nous avons considéré qu'ils étaient issus de la même molécule.

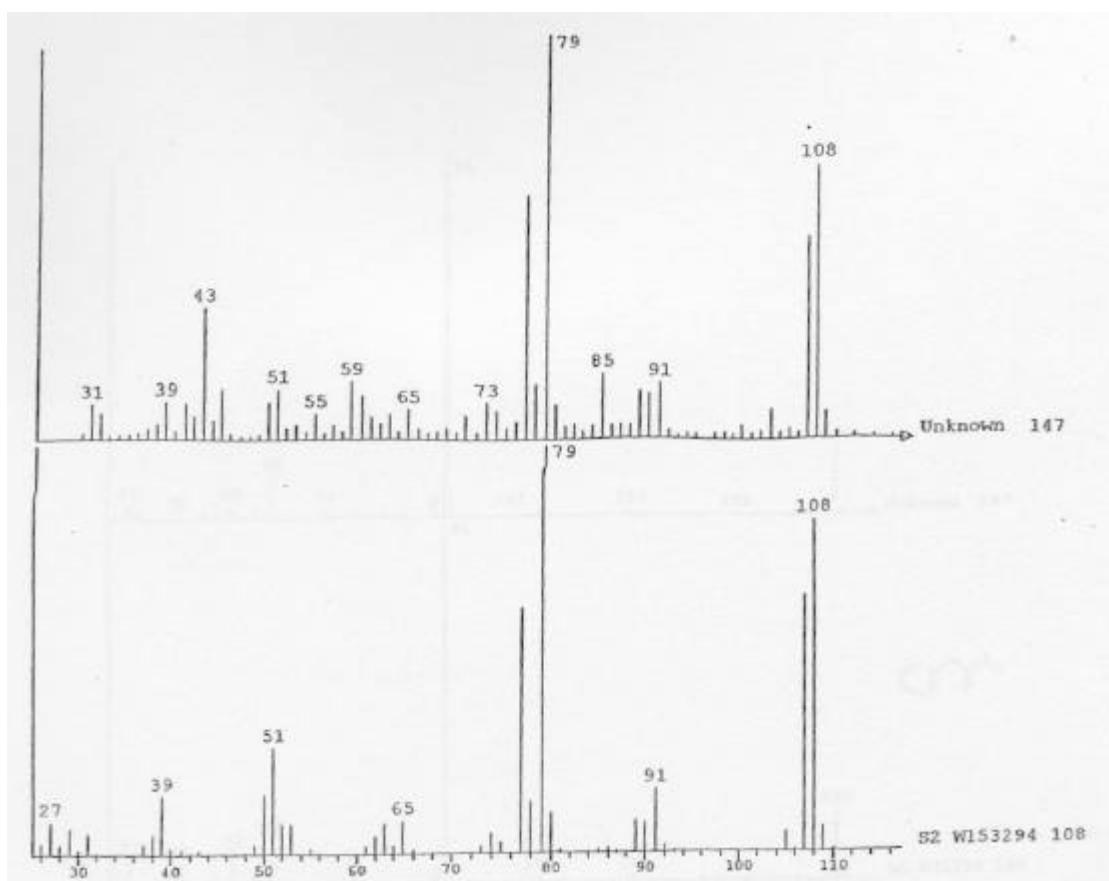


Figure III.63 : De haut en bas : Spectre EI (70eV) du produit contenu dans une fraction d'extrait brut de *P. aleophilum*, Spectre du produit **17** dans la librairie Wiley

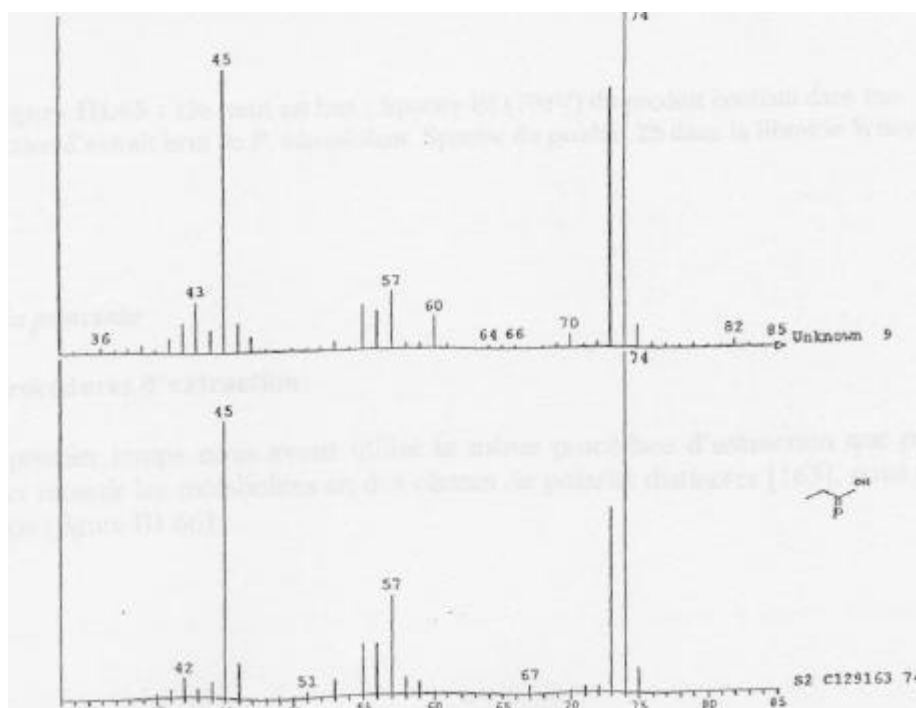


Figure III.64 : De haut en bas : Spectre EI (70eV) du produit contenu dans une fraction d'extrait brut de *P. aleophilum*, Spectre du produit **18** dans la librairie Wiley

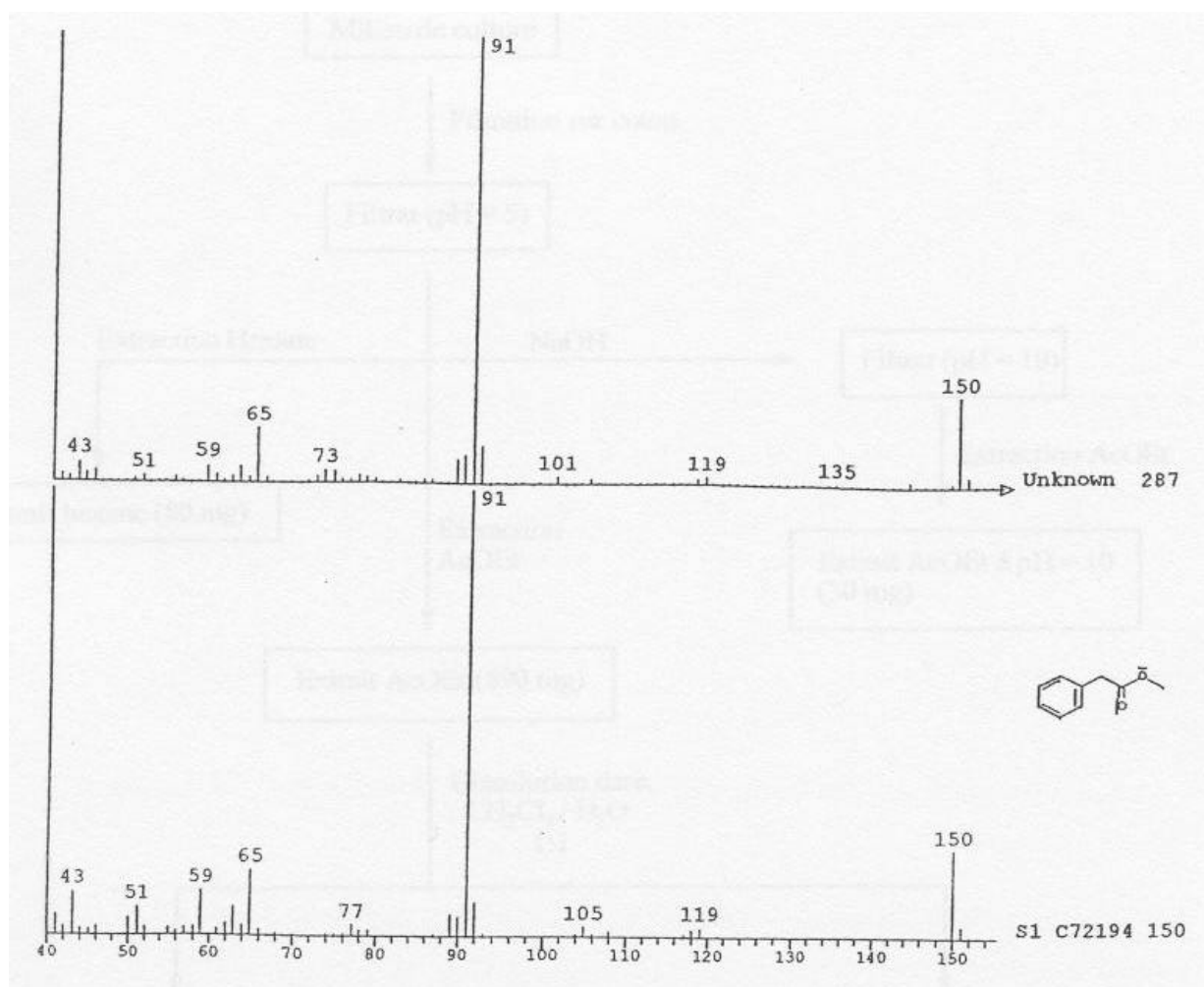


Figure III.65 : De haut en bas : Spectre EI (70eV) du produit contenu dans une fraction d'extrait brut de *P. aleophilum*, Spectre du produit **19** dans la librairie Wiley

III.3- *Fomitiporia punctata*

III.3.1- Procédures d'extraction

Dans un premier temps nous avons utilisé la même procédure d'extraction que précédemment. Puis afin de mieux répartir les métabolites en des classes de polarité distinctes [163], nous avons modifié notre méthodologie (figure III.66).

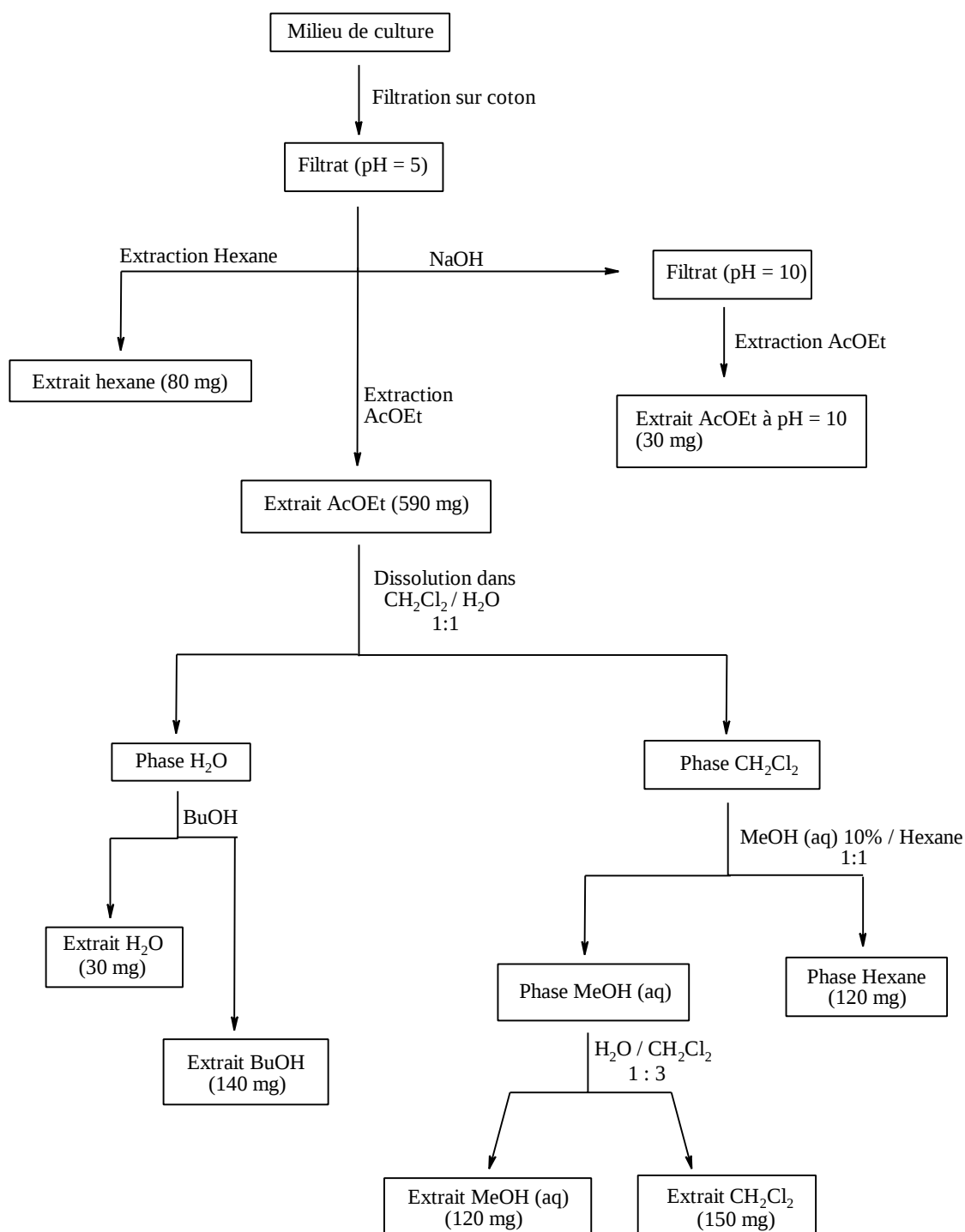


Figure III.66 : Procédure générale d'extraction à partir de 24 litres de milieu de culture de *F. punctata*

III.3.2- Métabolites isolés et identifiés

Six métabolites ont été isolés des milieux de culture de ce champignon. Leur structure est présentée dans la figure III.67.

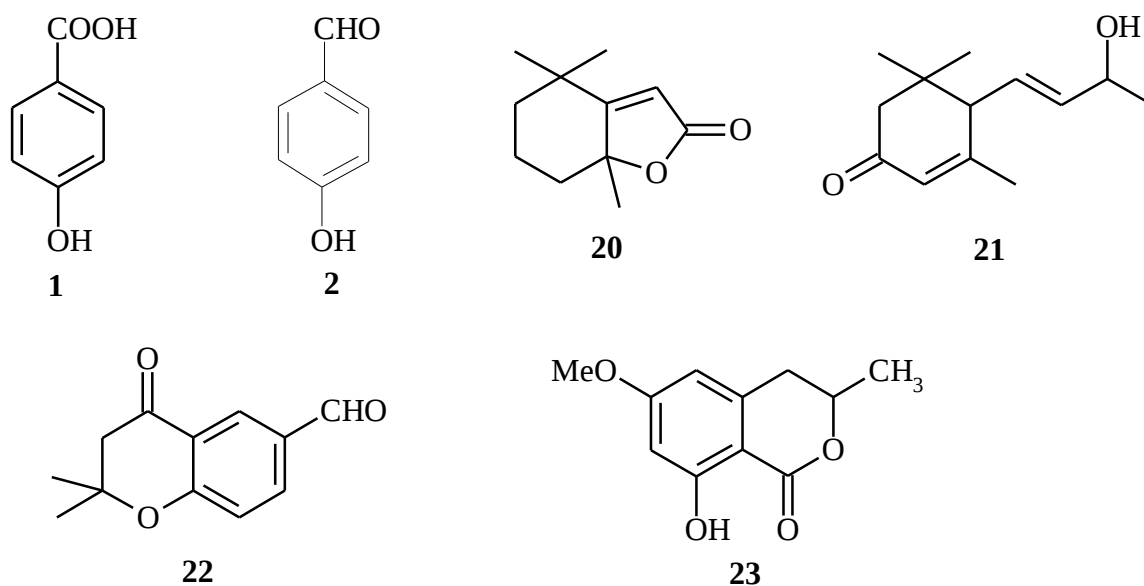


Figure III.67: Produits isolés des milieux de culture de *Fomitiporia punctata*

III.3.2.1- Identification de l'acide 4-hydroxy-benzoïque

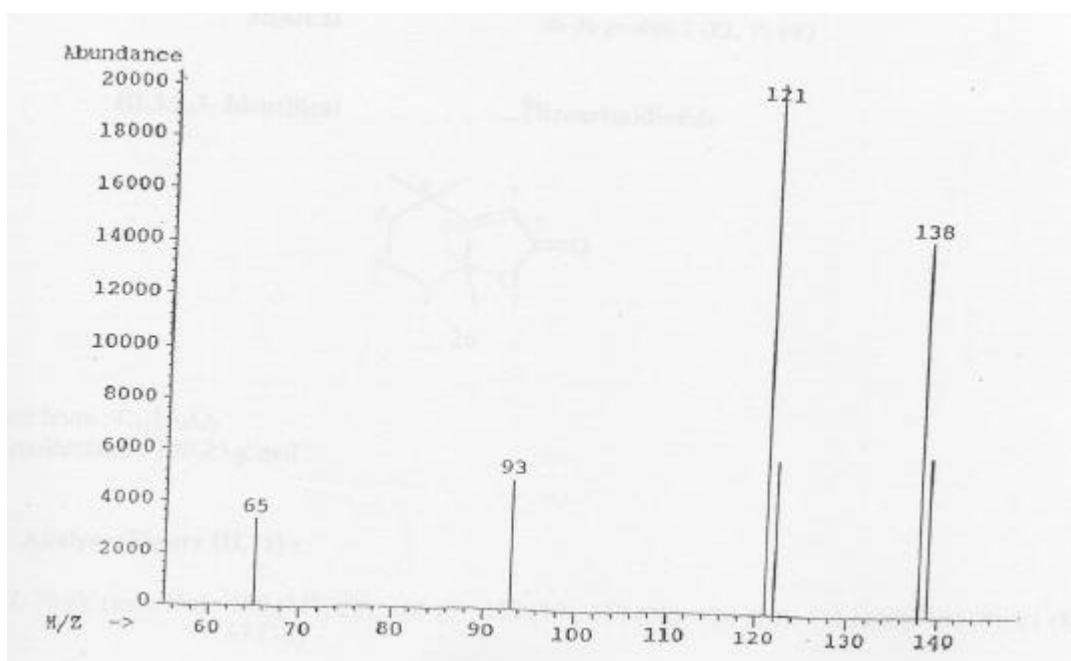
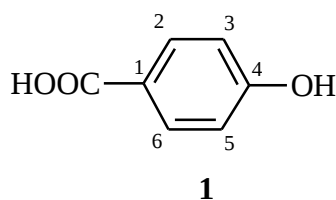
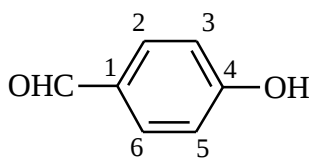


Figure III.68: Spectre de masse du produit 1

III.3.2.2- Identification du 4-hydroxy-benzaldéhyde



2

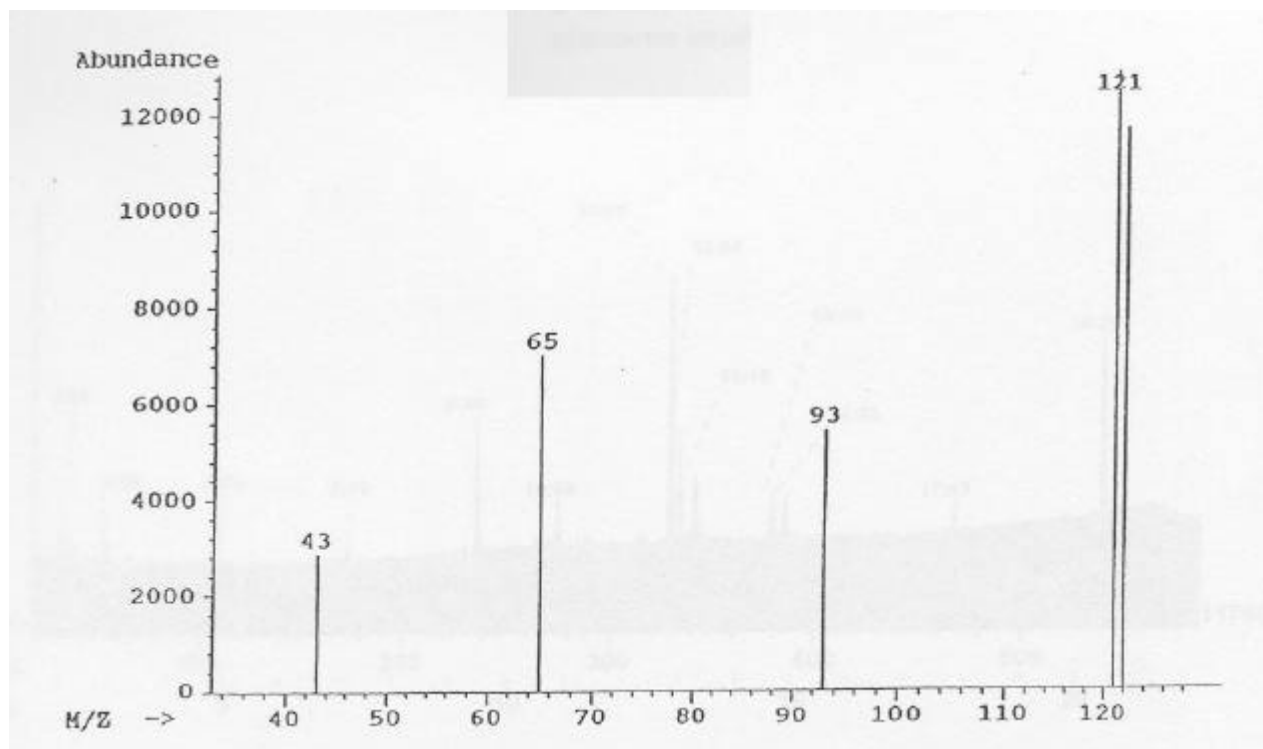
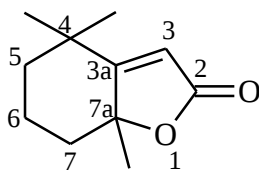


Figure III.69: Spectre de masse du produit 2 (EI, 70 eV)

III.3.2.3- Identification du (+/-)-dihydroactinidiolide



20

Formule brute : $C_{11}H_{16}O_2$

Poids moléculaire : $180.25 \text{ g.mol}^{-1}$

Analyse (Figure III.71) :

MS, EI, 70 eV (m/z, I%) : 180 (M^+ , 25), 165 (5), 152 (10), 137 (38), 124 (12), 111 (100), 95 (10), 81 (8), 67 (30)

Une des fractions d'un extrait de milieu de culture de *Fomitiporia punctata* a été injectée en GC-MS (figure III.70). Les spectres de masse ainsi obtenus (spectres EI, 70 eV) ont été comparés à ceux contenus dans la librairie Wiley. Parmi toutes les substances présentes, une possédait un spectre similaire à environ 60% au spectre de la dihydroactinidiolide (figure III.71). Le pourcentage de similitude était néanmoins insuffisant pour conclure sur l'identité de ce composé.

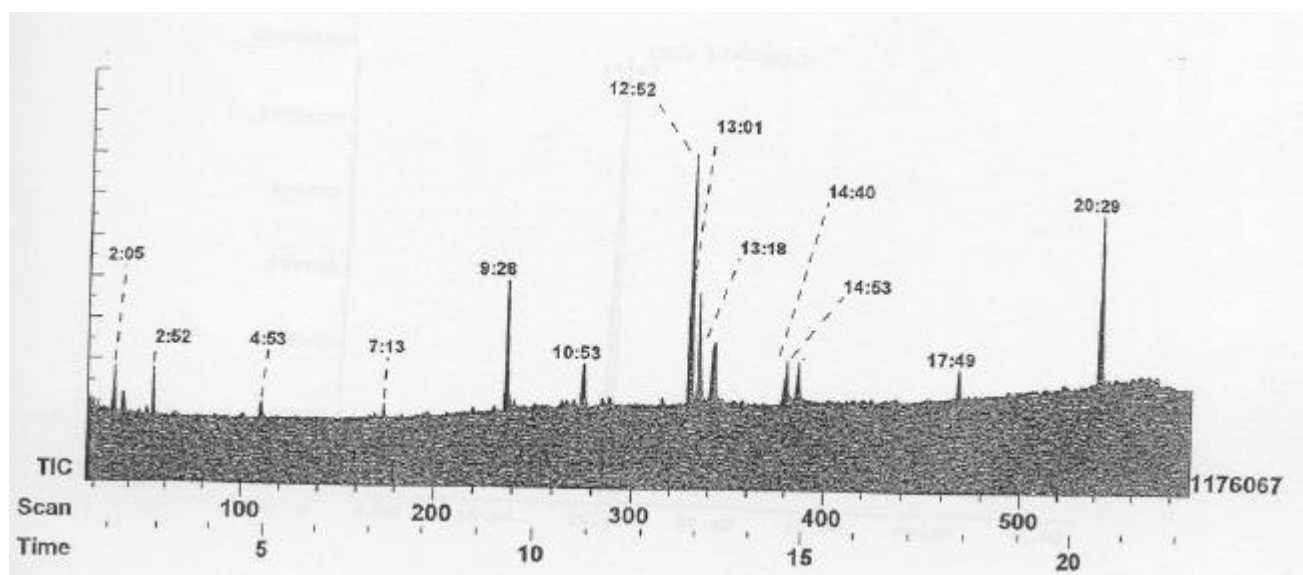


Figure III.70 : Courant ionique total de la fraction d'un extrait de milieu de culture de *F. punctata* injectée en GC-MS

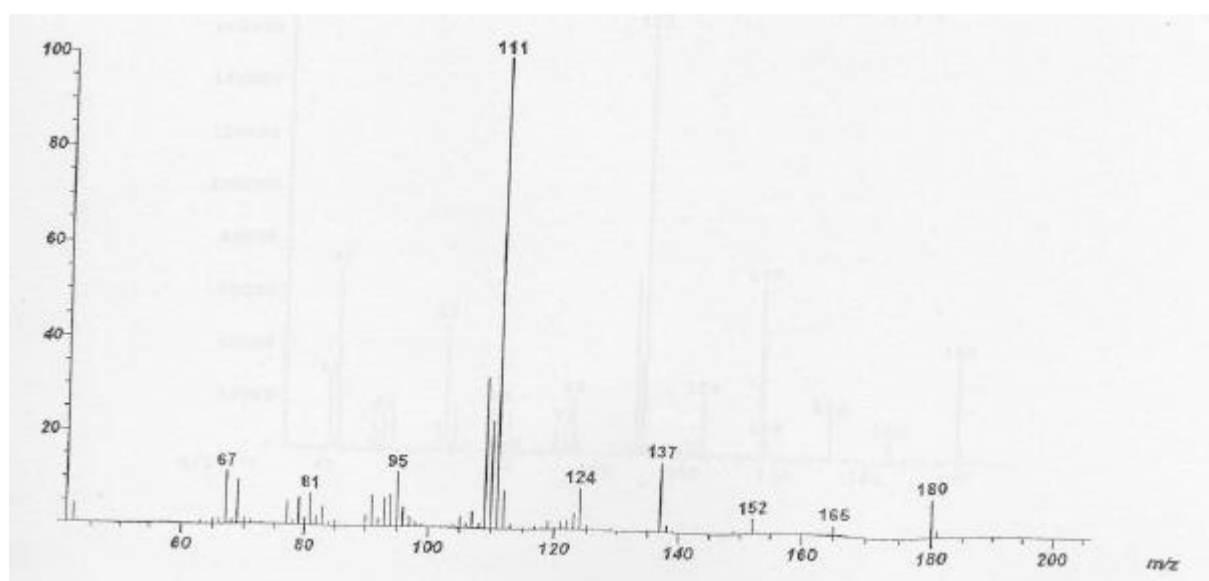


Figure III.71 : Spectre de masse (EI, 70 eV) de la substance à RT = 9 min 28 s

Après que ce composé ait été synthétisé [160], nous avons injecté à nouveau en GC-MS le produit de synthèse (figure III.72) et la fraction contenant la substance naturelle (figure III.73). Leur temps de rétention et leur spectre de masse étaient identiques. Nous avons pu ainsi démontrer que la dihydroactinidiolide était présente dans le milieu de culture de *Fomitiporia punctata*.

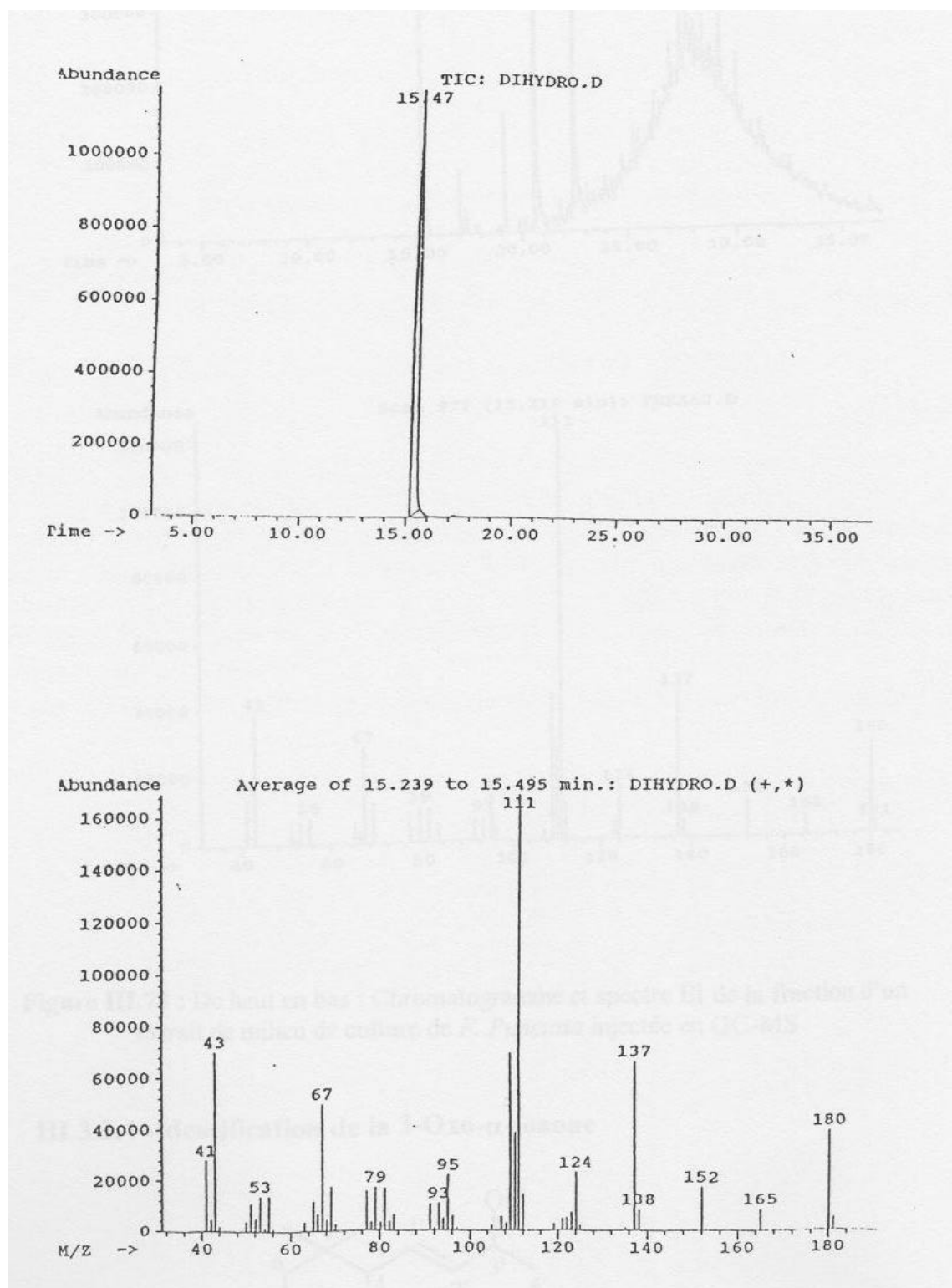


Figure III.72 : De haut en bas : Chromatogramme et spectre EI de la dihydroactinidiolide synthétique injectée en GC-MS

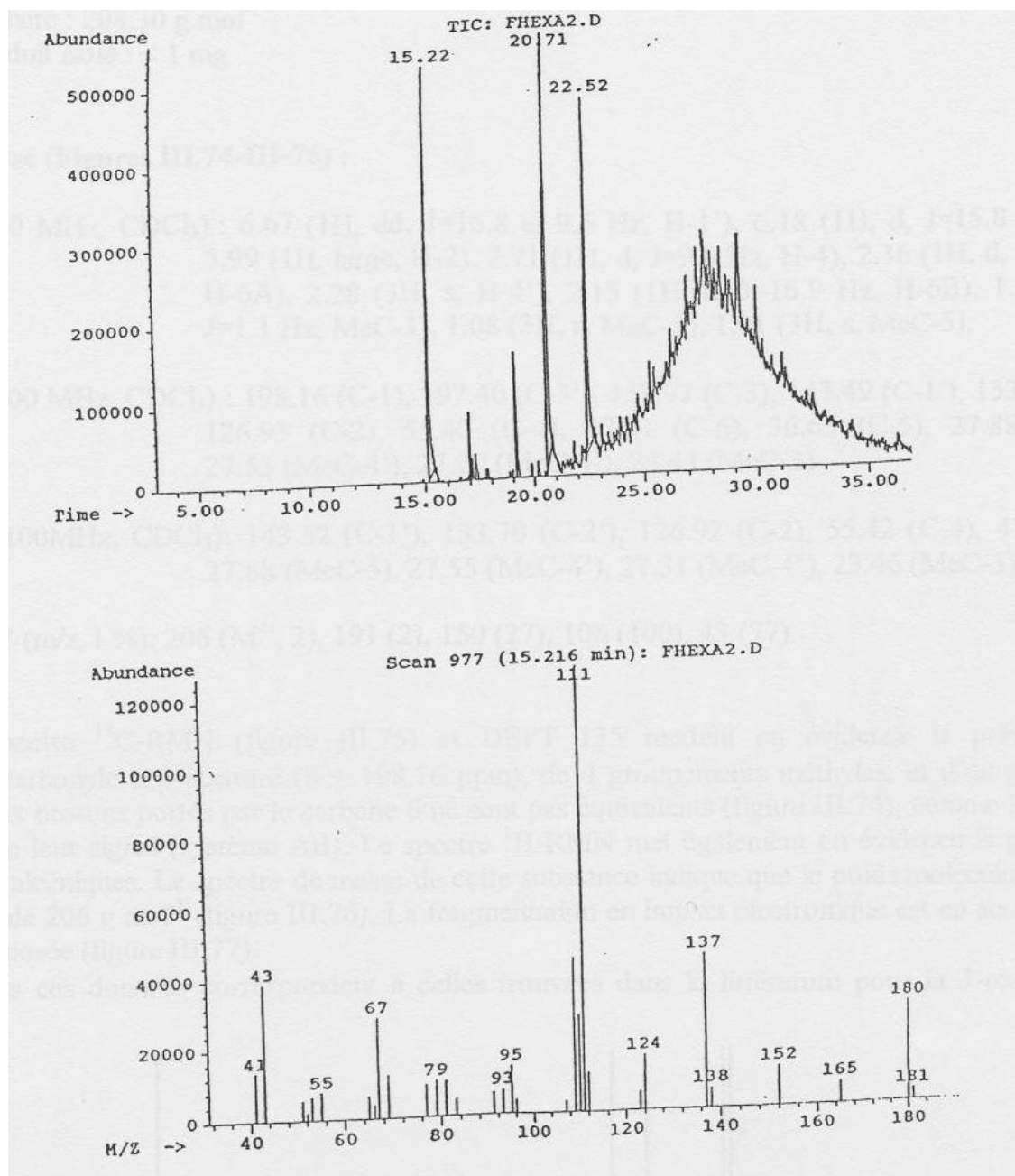
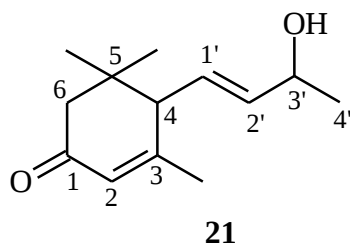


Figure III.73 : De haut en bas : Chromatogramme et spectre EI de la fraction d'un extrait de milieu de culture de *F. Punctata* injectée en GC-MS

III.3.2.4- Identification de la 3-Oxo- α -ionone



Formule brute : $C_{13}H_{20}O_2$

Poids moléculaire : $208.30 \text{ g.mol}^{-1}$

Masse de produit isolé : $< 1 \text{ mg}$

Analyse (Figures III.74-III-76) :

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) : 6.67 (1H, dd, $J=15.8$ et 9.6 Hz , H-1'), 6.18 (1H, d, $J=15.8 \text{ Hz}$, H-2'), 5.99 (1H, large, H-2), 2.71 (1H, d, $J=9.6 \text{ Hz}$, H-4), 2.36 (1H, d, $J=17.1 \text{ Hz}$, H-6A), 2.28 (3H, s, H-4'), 2.15 (1H, d, $J=16.9 \text{ Hz}$, H-6B), 1.90 (3H, d, $J=1.1 \text{ Hz}$, MeC-3), 1.08 (3H, s, MeC-5), 1.01 (3H, s, MeC-5).

^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) : 198.16 (C-1), 197.40 (C-3'), 158.97 (C-3), 143.49 (C-1'), 133.70 (C-2'), 126.93 (C-2), 55.42 (C-4), 47.31 (C-6), 36.65 (C-5), 27.88 (MeC-5), 27.53 (MeC-4'), 27.29 (MeC-4'), 23.44 (MeC-3).

DEPT 135 (100MHz, CDCl_3): 143.52 (C-1'), 133.70 (C-2'), 126.92 (C-2), 55.42 (C-4), 47.30 (C-6), 27.88 (MeC-5), 27.55 (MeC-4'), 27.31 (MeC-4'), 23.46 (MeC-3).

MS, EI, 70eV (m/z, I %) : 206 (M^+ , 2), 191 (2), 150 (27), 108 (100), 43 (77).

Le spectre ^{13}C -RMN (figure III.75) et DEPT 135 mettent en évidence la présence d'un groupement carbonyle α,β -insaturé ($\delta = 198.16 \text{ ppm}$), de 4 groupements méthyles, et d'un groupement CH_2 . Les deux protons portés par le carbone 6 ne sont pas équivalents (figure III.74), comme le montre la multiplicité de leur signal (système AB). Le spectre ^1H -RMN met également en évidence la présence de trois protons alcéniques. Le spectre de masse de cette substance indique que le poids moléculaire de cette molécule est de 206 g.mol^{-1} (figure III.76). La fragmentation en impact électronique est en accord avec la structure proposée (figure III.77).

Toutes ces données correspondent à celles trouvées dans la littérature pour la 3-oxo- α -ionone [85.].

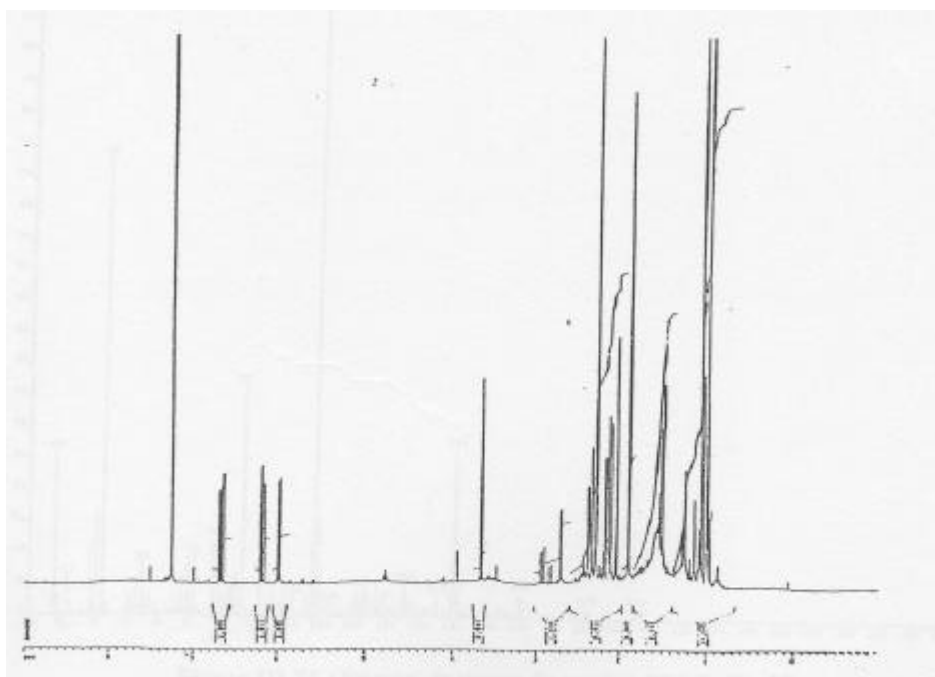


Figure III.74 : Spectre ^1H -RMN du produit **21** (400 MHz, CDCl_3)

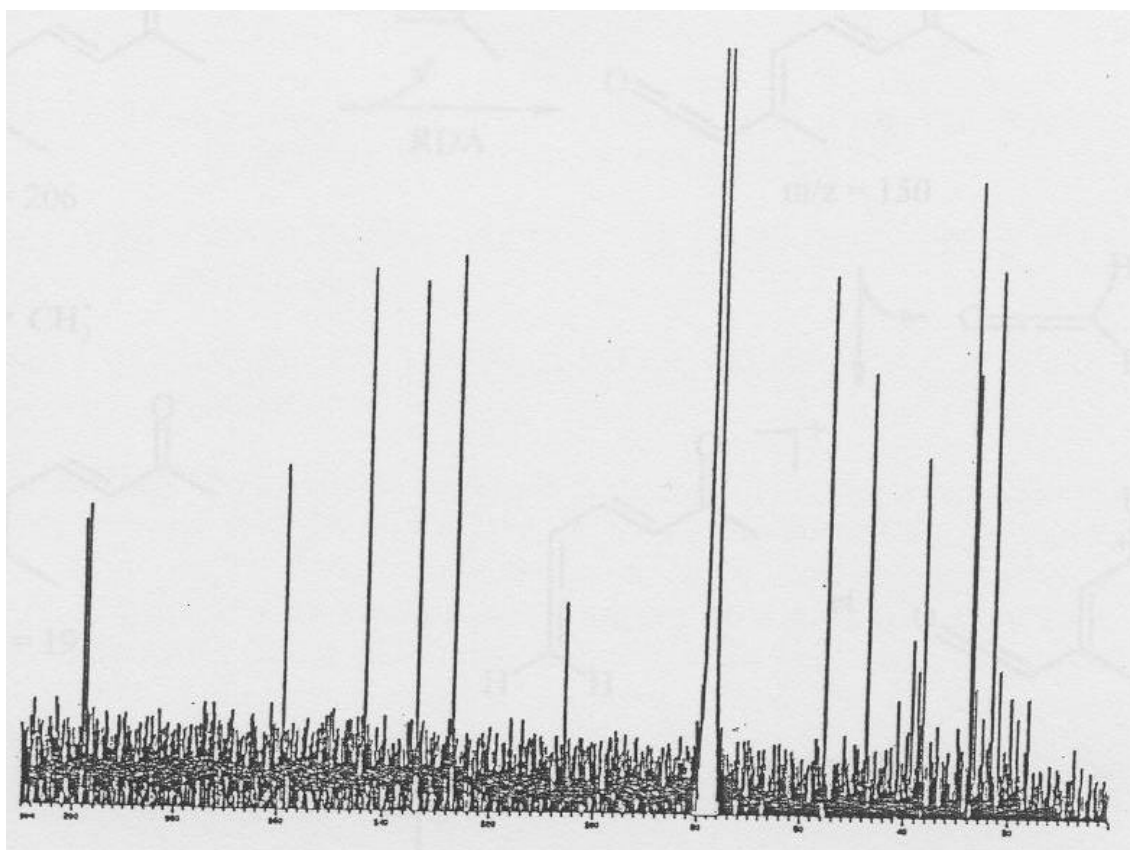


Figure III.75 : Spectre ^{13}C -RMN du produit **21** (100 MHz, CDCl_3)

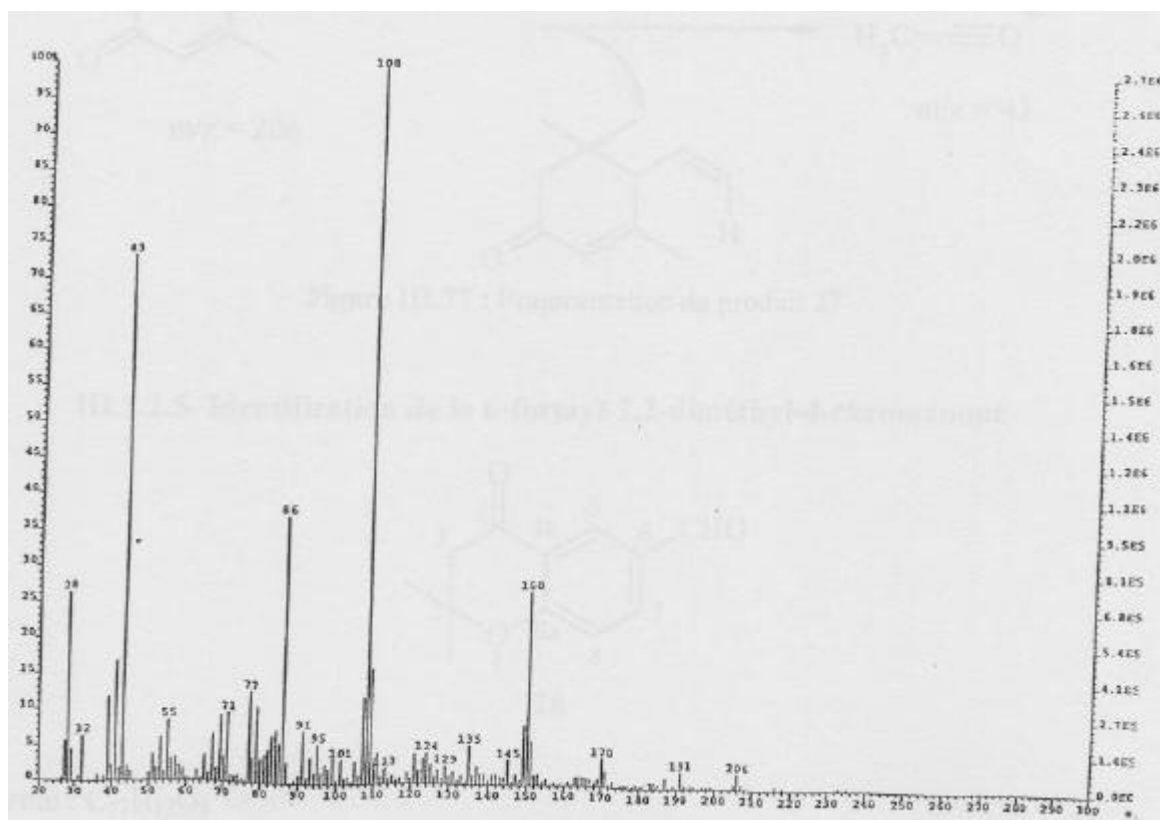


Figure III.76 : Spectre de masse du produit **21** (EI, 70 eV)

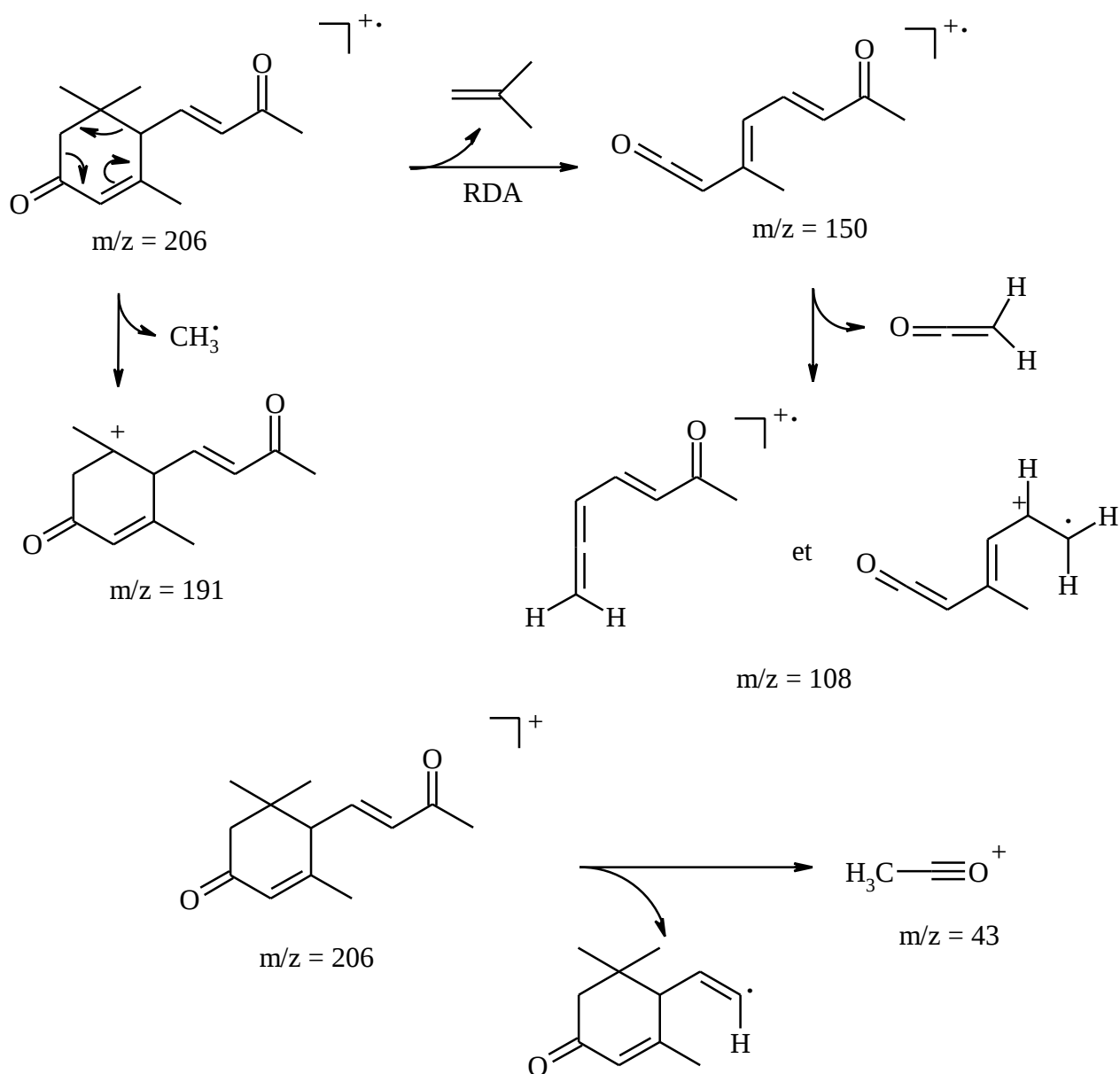
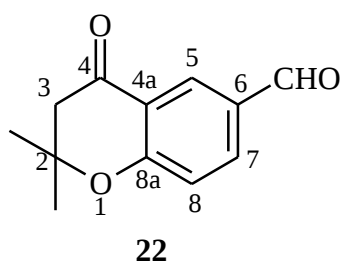


Figure III.77 : Fragmentation du produit 21

III.3.2.5- Identification de la 2,2-diméthyl-6-formyl-4-chromanone


 Formule brute : $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$

 Poids moléculaire : $204.23 \text{ g.mol}^{-1}$

 Masse de produit isolé : $< 1 \text{ mg}$

Analyse (Figures III.78-III.80) :

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): 9.93 (1H, d, $^4J=0.53$ Hz, $-\text{CHO}$), 8.36 (1H, d, $^4J=2.21$ Hz, H-5), 8.04 (1H, dd, $^3J=8.68$ Hz, $^4J=2.18$ Hz, H-7), 7.06 (1H, d, $^3J=8.81$ Hz, H-8), 2.79 (2H, s, H-3), 1.51 (6H, s, Me-C-2).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) : 191.27 (C-4), 190.21 ($-\text{CHO}$), 134.81 (C-7), 131.28 (C-5), 119.68 (C-8), 60.39 (C-2), 48.53 (C-3), 26.63 (Me-C-2).

APT (125 MHz, CDCl_3) : 190.64 ($-\text{CHO}$), 135.23 (C-7), 131.70 (C-5), 120.10 (C-8), 48.95 (C-3), 27.05 (Me-C-2).

MS, EI, 70eV (m/z, I %) : 204 (M^+ , 22), 189 (57), 149 (40), 148 (32), 119 (22), 91 (7), 77 (8), 55 (7), 43 (55).

Le spectre ^1H -RMN (figure III.78) montre la présence d'un noyau aromatique trisubstitué, d'un proton aldéhydique, de deux méthyles équivalents, et d'un groupement CH_2 légèrement déblindé. Le spectre ^{13}C -RMN (figure III.79) indique la présence de deux groupements carbonyle. Le carbone quaternaire à $\delta = 60.39$ ppm est assez déblindé, ce qui suggère qu'il soit à côté d'un hétéroatome comme l'oxygène. Le spectre de masse (figure III.80) indique que le poids moléculaire de cette substance est de 204 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. La formule brute de ce composé est donc : $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$. La fragmentation en impact électronique (figure III.81) est en accord avec la structure proposée.

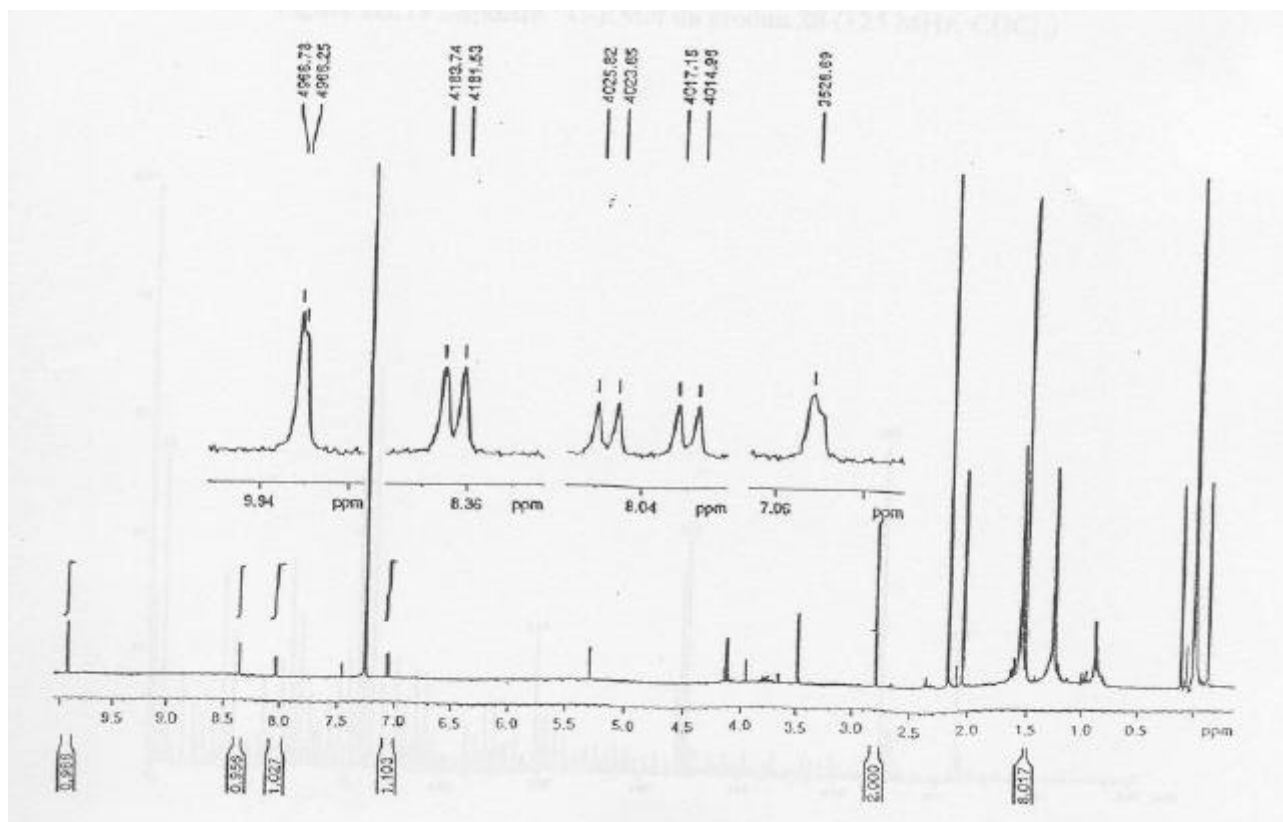


Figure III.78 : Spectre ^1H -RMN du produit 22 (500 MHz, CDCl_3)

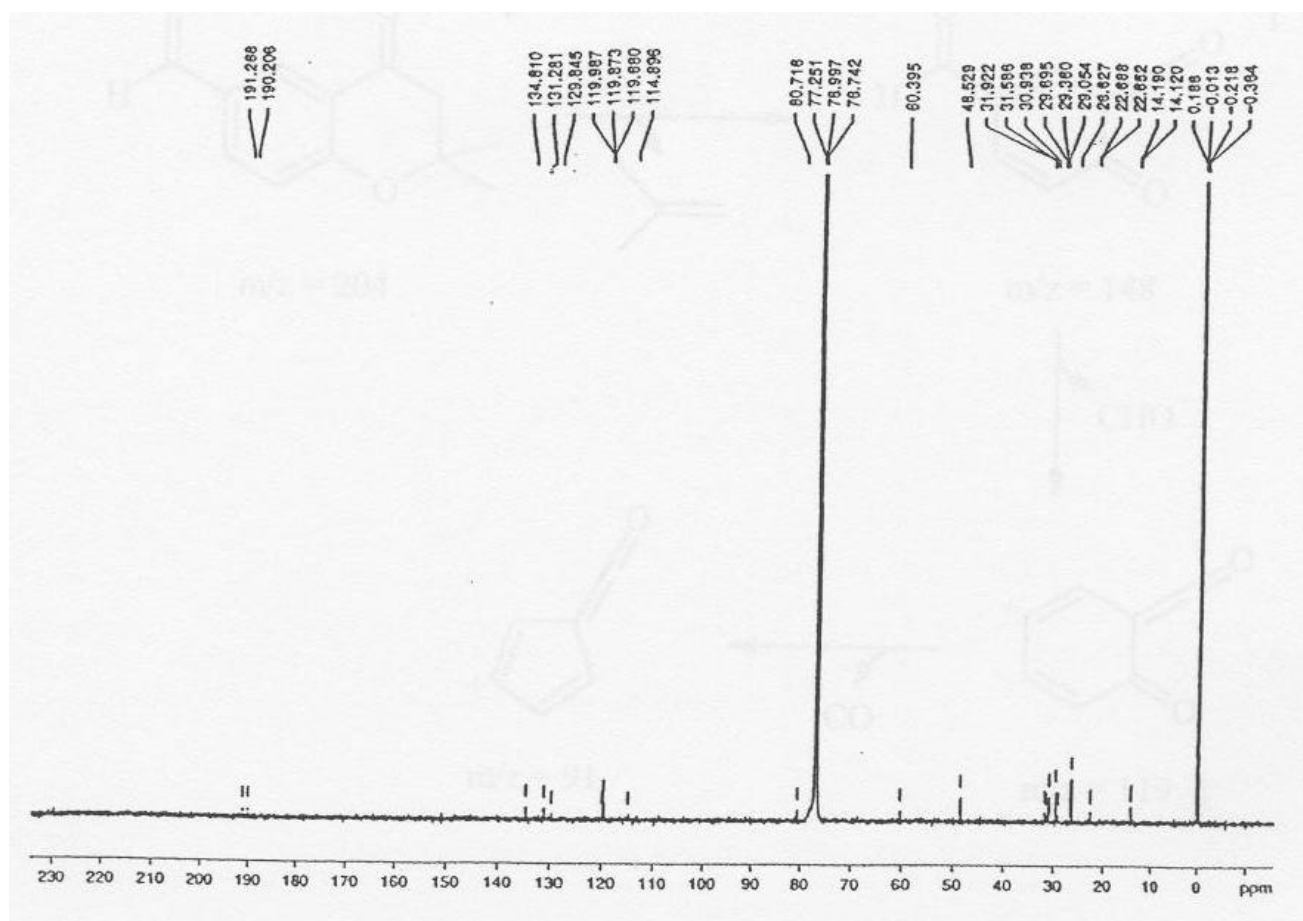


Figure III.79 : Spectre ¹³C-RMN du produit 22 (125 MHz, CDCl₃)

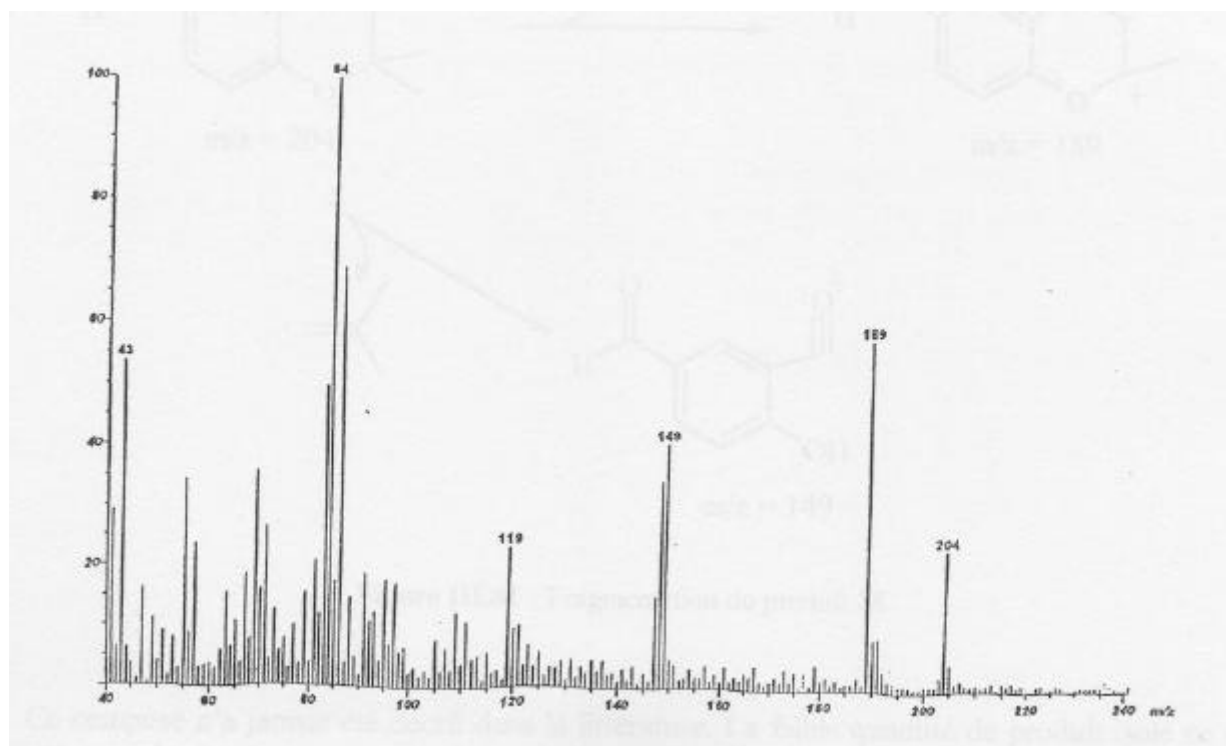


Figure III.80 : Spectre de masse du produit 22 (EI, 70 eV)

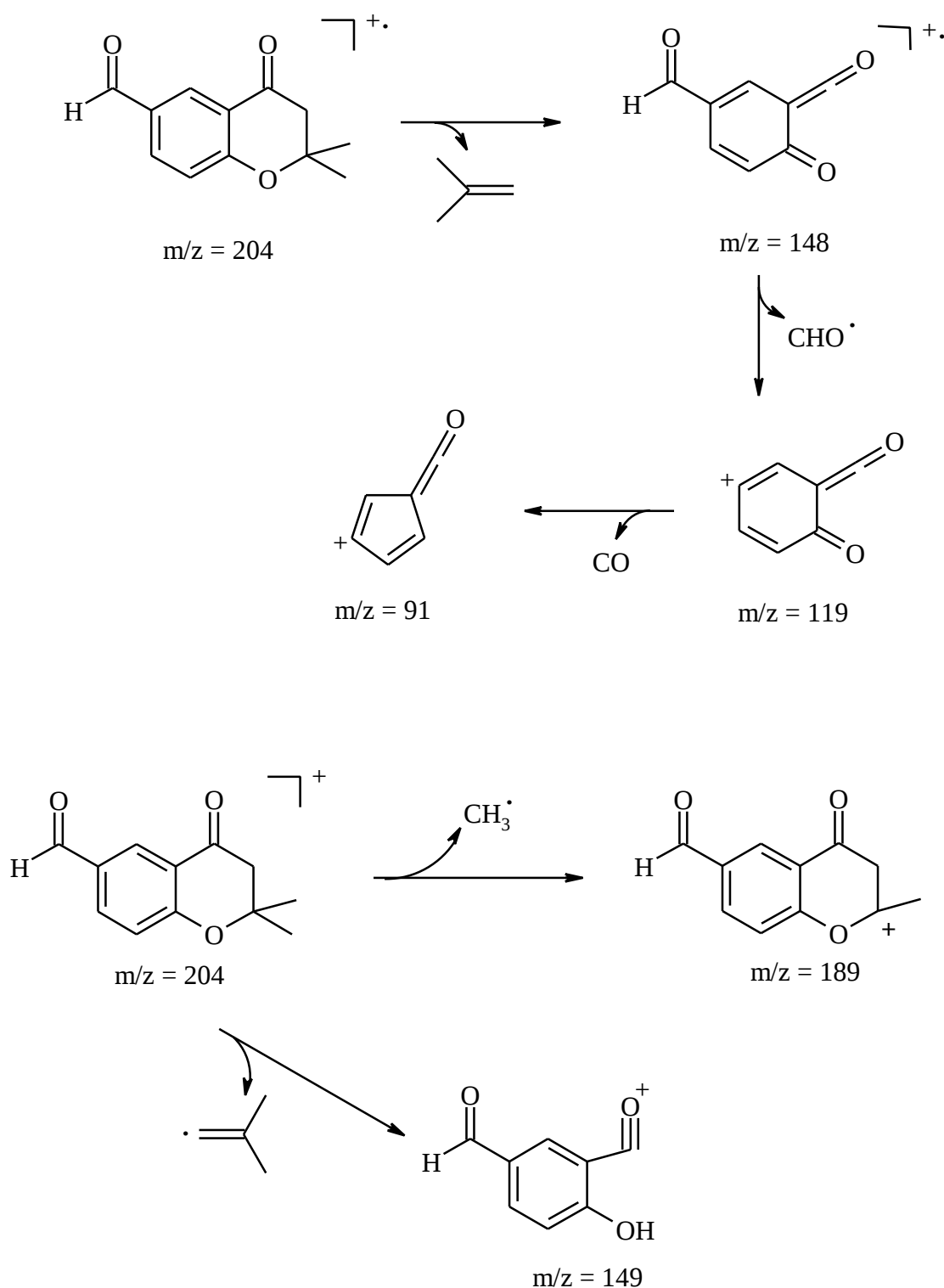


Figure III.81 : Fragmentation du produit 22

Ce composé n'a jamais été décrit dans la littérature. La faible quantité de produit isolé ne permet d'observer tous les carbones quaternaires sur le spectre ^{13}C -RMN. Nous avons donc essayé de le synthétiser (figure III.82) afin de pouvoir comparer les déplacements chimiques de la molécule

synthétisée avec ceux du produit naturel. Nous avons pour cela utilisé une méthode classique de préparation des chromanones [86,161].

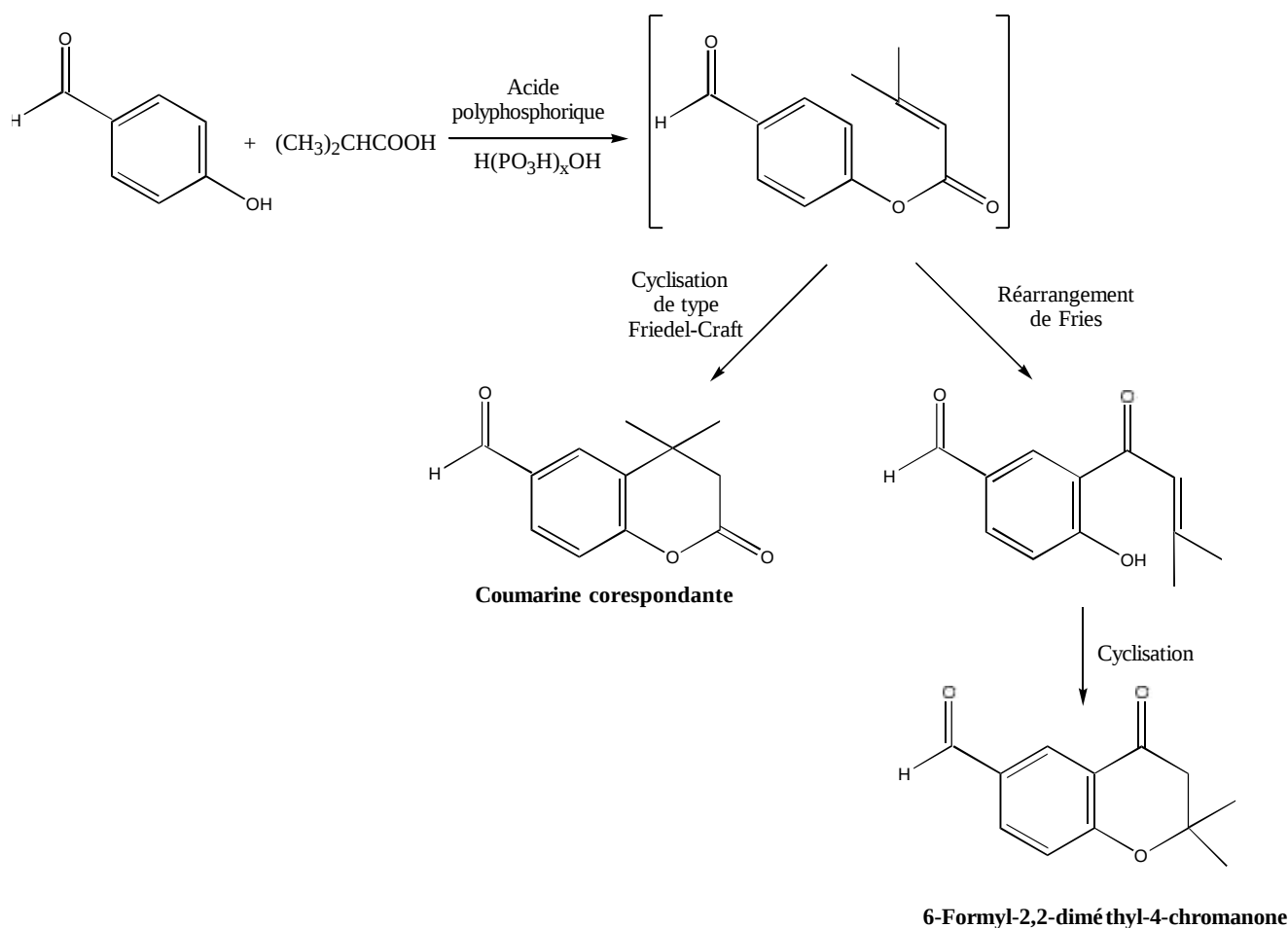
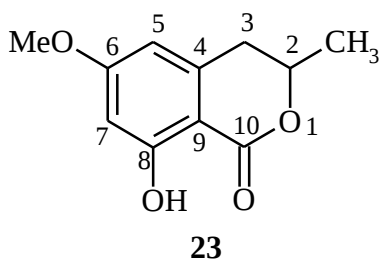


Figure III.82 : Schéma de synthèse de la 2,2-diméthyl-6-formyl-4-chromanone

Cette synthèse n'a malheureusement pas conduit à la formation du produit attendu. Après la réaction, on récupère le produit de départ. Nous n'avons donc pas pu confronter les données spectroscopiques du produit naturel à celle du produit de synthèse.

III.3.2.6- Identification de la 8-hydroxy-6-méthoxy-2-méthyl-isochroman-1-one (ou 6-méthoxy-melléine)



Formule brute : $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$

Poids moléculaire : $208.22 \text{ g.mol}^{-1}$

Analyse (Figures III.83-III.85) :

^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) : 11.25 (1H, s, -OH), 6.37 (1H, d, $^4J = 2.39$ Hz, H-7), 6.25 (1H, dt, $^4J = 2.39$ Hz, $^4J = 1$ Hz, H-5), 4.67 (1H, qt, $^3J = 6.3$ Hz, $^3J = 2$ Hz, H-2), 3.82 (3H, s, MeO-), 2.86 (2H, m, H-3), 1.51 (3H, d, $^3J = 6.33$ Hz, Me-C-2)

^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) : 169.8 (C-10), 165.74 (C-6), 164.55 (C-8), 140.86 (C-4), 101.53 (C-9), 106.13 (C-5), 99.38 (C-7), 75.46 (C-2), 55.52 ($-\text{OCH}_3$), 34.82 (C-3), 20.68 ($-\text{CH}_3$)

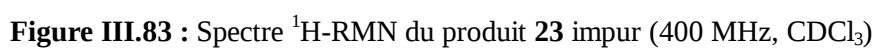
DEPT 135 (100 MHz, CDCl_3) : 106.13 (C-5), 99.38 (C-7), 75.46 (C-2), 55.52 ($-\text{OCH}_3$), 34.82 (C-3), 20.68 ($-\text{CH}_3$)

MS, EI, 70eV (m/z, I %) : 208 (M^+ , 100), 190 (16), 179 (11), 164 (84), 147 (7), 136 (14), 119 (11)

Le spectre ^1H -RMN (figure III.83) nous indique la présence d'un groupement phénolique chélaté ($\delta = 11.25$ ppm). Deux protons aromatiques sont couplés entre eux ($\delta = 6.37$ ppm, et $\delta = 6.25$ ppm) avec une constante de couplage de 2.39 Hz. Cette faible valeur de constante de couplage révèle que ces deux protons sont en position *mé*ta. La multiplicité du signal à $\delta = 6.25$ ppm indique que ce proton est faiblement couplé à deux autres hydrogènes. Le spectre COSY nous indique que ces deux protons sont ceux du signal à $\delta = 2.86$ ppm. Le spectre proton met également en évidence la présence d'un groupement méthyle ($\delta = 1.51$ ppm) couplé à l'hydrogène du signal à $\delta = 4.67$ ppm. Le spectre COSY montre que ce proton est couplé aux deux hydrogènes à $\delta = 2.86$ ppm. Le spectre ^{13}C -RMN (figure III.84) révèle la présence d'un groupement carbonyle α,β -insaturé. Le spectre de masse (figure III.85) indique que cette substance a un poids moléculaire de 208 g.mol^{-1} . La fragmentation de ce composé en impact électronique (figure III.86) confirme la structure proposée.

Toutes ces données sont en accord avec celles trouvées dans la littérature [162]. Ce composé est encore appelé 6-méthoxy-melléine.

Ce composé est une phytoalexine produite par les tissus des racines de carottes, en réponse à l'attaque d'un champignon pathogène [87, 88, 89, 90, 91, 92]. Cette molécule a également été isolée du milieu de culture de différents champignons : *Sporomia bipartis* Cain [93]; *Streptomyces mobaraensis* [94]; *Ceratocystis minor* (Hedgcock) Hunt, champignon impliqué dans la maladie des tâches bleues du pin [60]; *Lachnum papyraceum* (Karst.) Karst [95]; et *Coniothyrium sp.* [96].



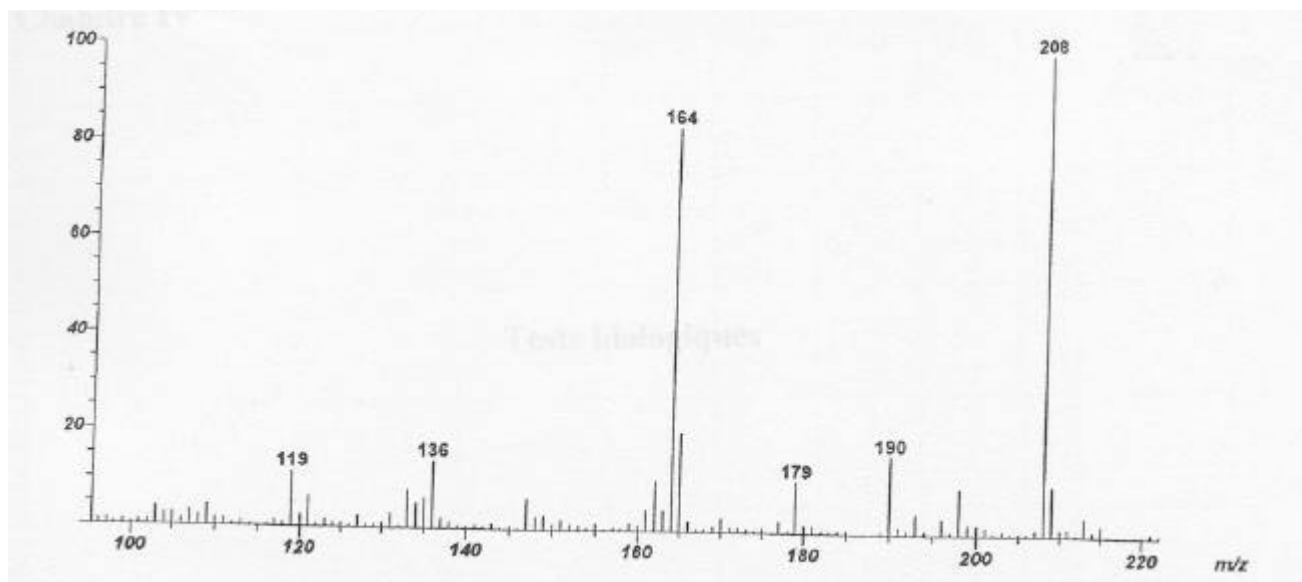


Figure III.85 : Spectre de masse du produit **23** (EI, 70 eV)

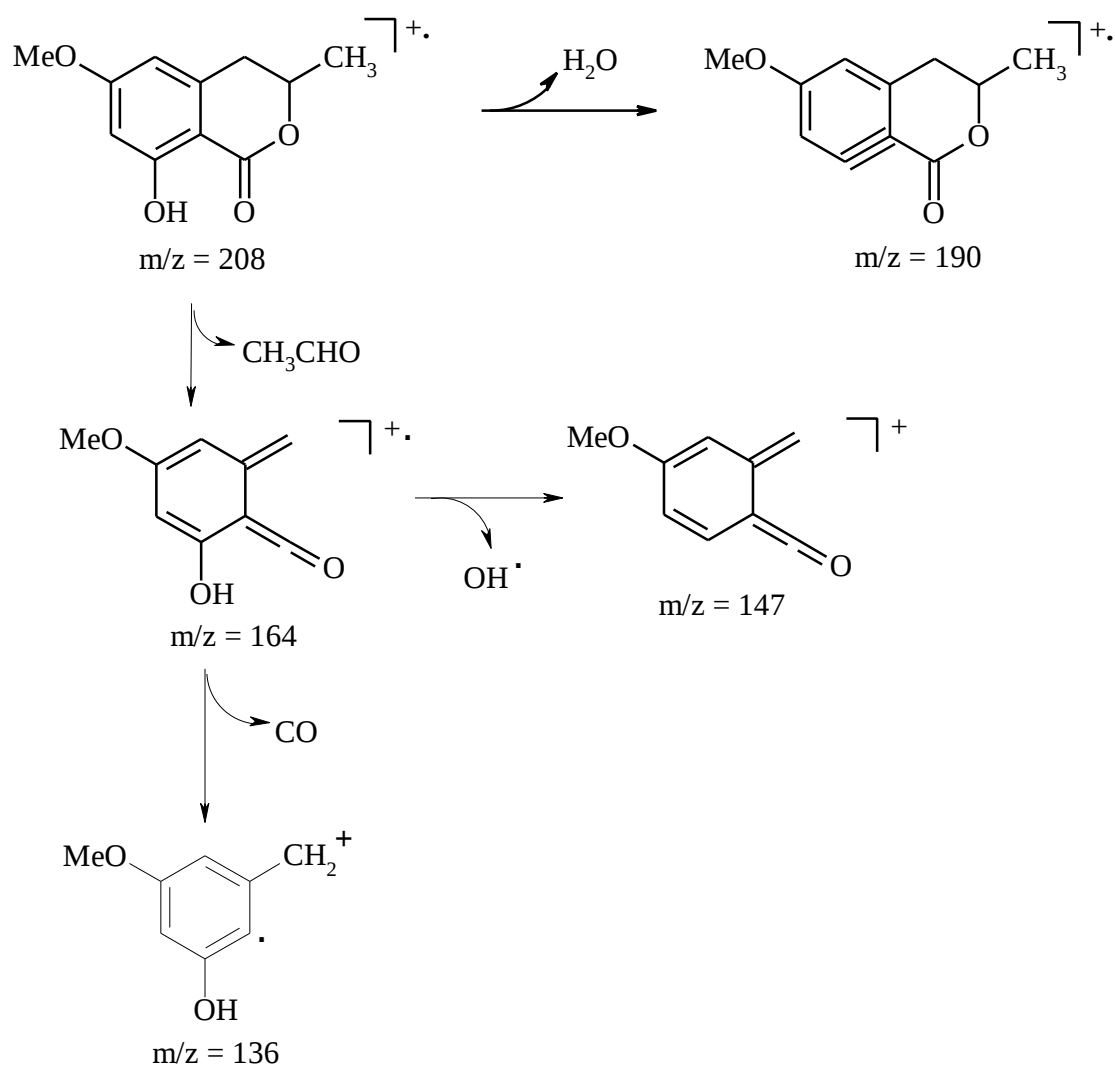


Figure III.86 : Fragmentation du produit **23**

Chapitre IV

Tests biologiques

Les métabolites isolés de *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium chlamydosporum* et *Fomitiporia punctata* en quantité suffisante ont été soumis à différents tests biologiques afin d'évaluer leur toxicité.

Les tests furent réalisés sur plantules de tomate de la variété Bony Best, sur feuille de vigne, sur cals et/ou sur protoplastes de vigne.

IV.1- Tests sur plantules de tomate (cv. Bony Best)

Ces tests sont réalisés sur des plantules de tomate de 6 à 8 cm, pesant entre 85 et 100 mg, et possédant deux cotylédons et deux feuilles.

Les échantillons à tester sont déposés dans des piluliers de 2,5 ml, puis séchés 24 heures sous vide. Ils sont alors dissous dans de l'eau distillée additionnée de 1 à 2 % d'acétone ou de méthanol. Les plantules sont débarrassées de leurs racines sous l'eau, et plongées dans les différentes solutions à tester.

Les piluliers témoins ne renferment que de l'eau distillée additionnée de 1 à 2 % d'acétone ou de méthanol.

L'état de chaque plantule est relevé au cours du temps (tableau IV.1)

Ces tests font apparaître deux modes d'action distincts selon les molécules :

- Certains composés induisent un flétrissement des feuilles et des cotylédons préalablement à la mort du plant. C'est le cas entre autre du 4-hydroxy benzaldéhyde (photo IV.1).
- D'autres molécules provoquent une nécrose de la tige, suivie d'un flétrissement des feuilles et des cotylédons, et enfin de la mort de la plantule. C'est le cas de l'acide 4-hydroxy benzoïque (photo IV.2).

Molécule testée	Concentration en mM	5h	10h	24h	30h	48h
1-O-Méthyl émodine	< 1.76 ($< 0.5 \text{ mg.ml}^{-1}$)	0	0	0	0	0
4-hydroxy benzaldéhyde	10	0	x	M	M	M
	1	0	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	0	0
Acide 4-hydroxy benzoïque	10	0	*	**	M	M
	1	0	*	*	**	**
	0.1	0	*	*	*	**
Tyrosol	10	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	0.1	0	0	0	0	0
Isosclérone	1	0	0	x	x	x
	0.1	0	0	0	0	0
Scytalone	< 2.5 ($< 0.5 \text{ mg.ml}^{-1}$)	0	0	0	0	0
Acide 4-hydroxy-3-(3-méthylbut-2-ényloxy)- benzoïque	2.25	0	0	0	0	0
Acide phényl lactique	10	0	*	**	**	***
	1	0	*	*	**	**
	0.1	0	0	0	0	0
N-Butyl benzène sulfonamide	10	+	++	M	M	M
	5	0	+	M	M	M
	3	0	0	+	M	M
Témoin	/	0	0	0	0	0

Tableau IV.1 : Activité de différents métabolites sur des plantules de tomate de la variété Bony Best

Légende

- (0) : Aucun effet visible
(x) : Léger flétrissement des cotylédons et des feuilles
(xx) : Flétrissement important des cotylédons et des feuilles
(*) : Début de nécrose de la tige
(**) : Nécrose plus marquée de la tige
(***) : Tige entièrement nécrosée
M : Mort de la plantule



Photo IV.1 : Effet du 4-hydroxy benzaldéhyde à différentes concentrations sur des plantules de tomate après 30 heures de test



Photo IV.2 : Effet de l'acide 4-hydroxy benzoïque à différentes concentrations sur des plantules de tomate après 30 h de test

Les résultats de ce test montrent que sur les neuf métabolites testés, quatre sont capables d'induire la mort des plantules de tomate à une concentration de 10 mM : le 4-hydroxy-benzaldéhyde, l'acide 4-hydroxy-benzoïque, l'acide 3-phényl-lactique et le N-butyl-benzène-sulfonamide. Ce dernier est le plus foudroyant, et celui qui agit à la plus basse concentration. Son seuil d'activité est comparable à ceux de l'eutypine et du stéréhirsutinal précédemment testés par la même méthode [37].

D'autre part, on peut noter que l'isosclérone à 1 mM provoque un léger flétrissement des cotylédons et des feuilles de la plantule de tomate.

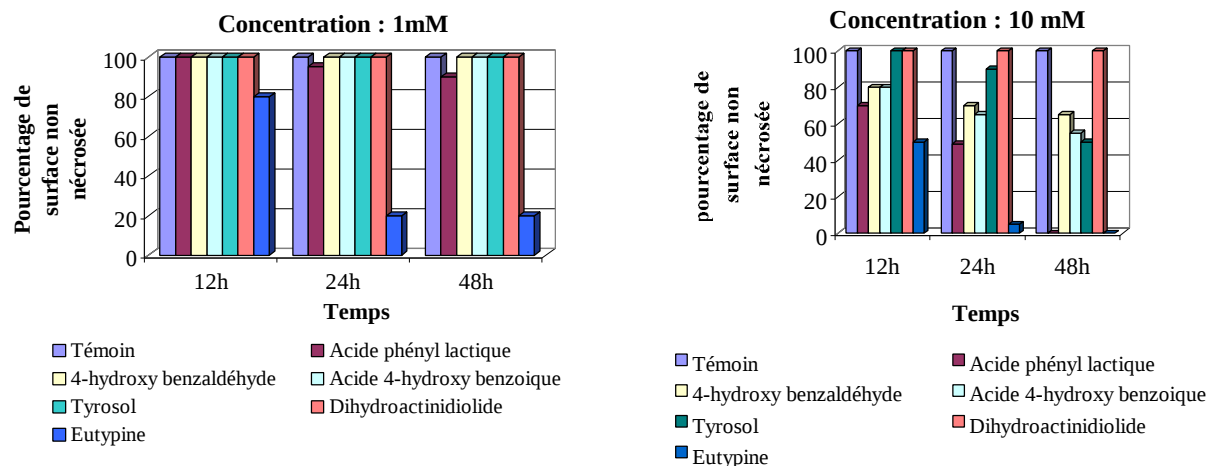
Ce test réalisé sur plantule de tomate permet d'avoir une idée de la toxicité des différents métabolites produits. Il présente l'avantage d'être rapide et faisable en toute saison directement au laboratoire. Cependant, d'autres tests ont été effectués afin d'évaluer la toxicité de ces composés vis à vis de la plante hôte des parasites : la vigne.

IV.2- Tests sur des carrés de feuilles de ceps de vigne

Ce test suit la procédure décrite par N. Burki [69], lequel s'inspirait des travaux de Ho Park et al [97], et de Sugawara et al [98]. Ces tests consistaient à entailler les tissus végétaux avant de les soumettre aux métabolites à expérimenter.

Une quantité connue de chaque composé à tester est dissoute dans 1 ml d'eau distillée contenant 2% d'éthanol. L'échantillon témoin ne contient que de l'eau distillée contenant 2 % d'éthanol.

Des feuilles de vigne sont alors découpées sous l'eau en petits carrés de 1 cm² et plongées dans des solutions de métabolite à 1 mM ou 10 mM. On détermine ensuite le pourcentage de surface non nécrosée au cours du temps (graphes IV.1).



Graph IV.1 : Pourcentage de surface de feuille non nécrosée en fonction de la concentration de différents métabolites

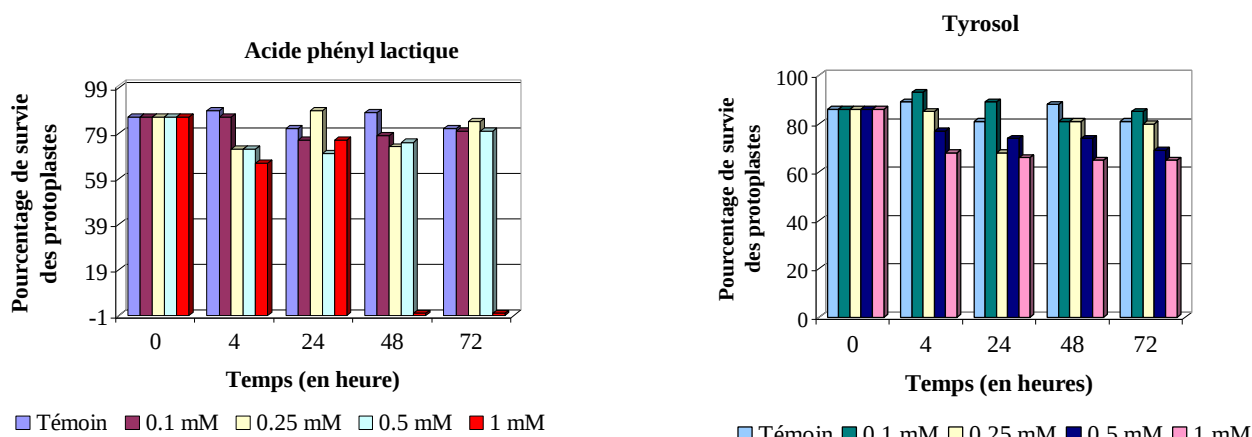
Ce test montre que ces métabolites sont moins agressifs que l'eutypine. Seul l'acide phényl lactique à 10 mM est capable d'induire une nécrose totale de la feuille en 48 h. L'acide 4-hydroxy benzoïque, le 4-hydroxy benzaldéhyde et le tyrosol ont une action très lente à 10 mM. D'autre part, le tyrosol est le seul composé à provoquer une nécrose rouge-brun. Quant au dihydroactinidiolide, il ne présente aucune activité toxique.

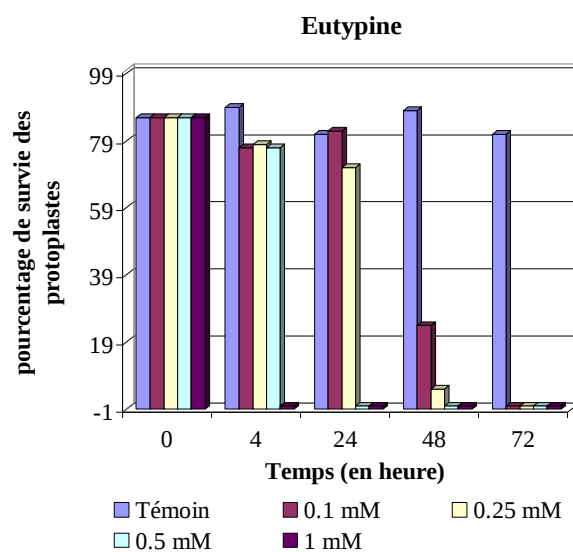
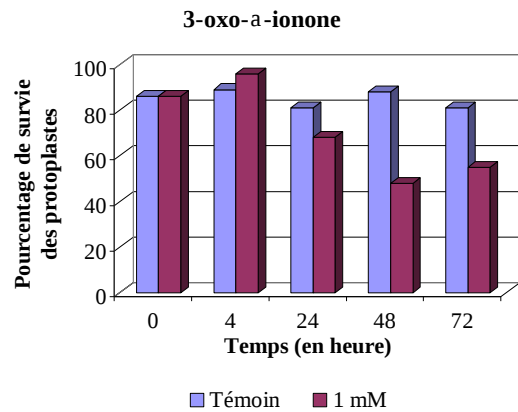
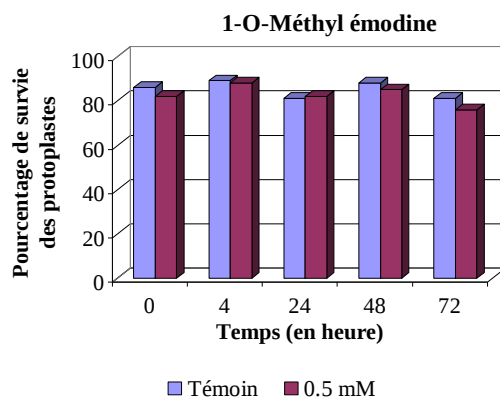
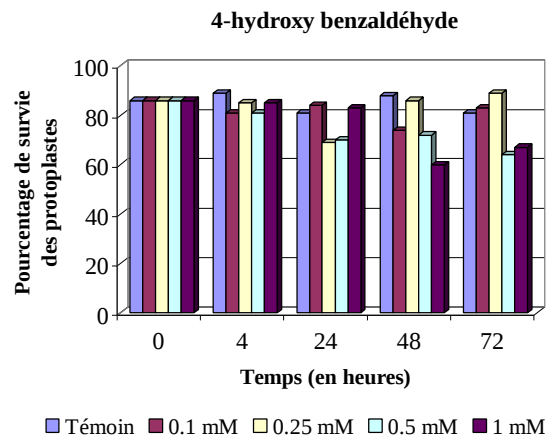
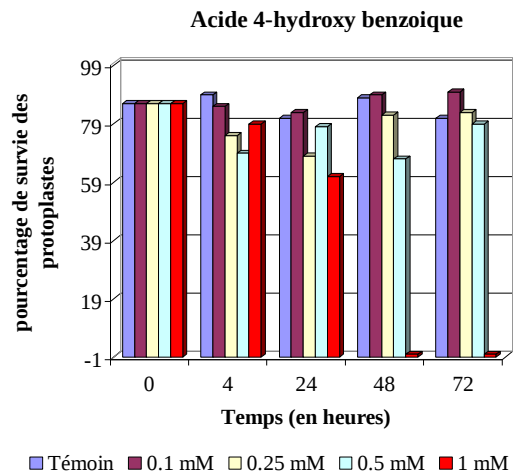
IV.3- Tests sur protoplastes de vigne

Ces tests ont été réalisés à Epernay aux laboratoires de recherche de LVMH par A. Bonomelli. Les protoplastes sont issus de cépage Ugni blanc.

Chaque molécule testée est dissoute dans un mélange de 50% d'eau et de 50% d'acétone. La concentration finale d'acétone dans le milieu de culture des protoplastes est de 0,5%. Six métabolites ont été testés à différentes concentrations et comparés à l'eutypine. Chaque test a été effectué au moins deux fois pour tous les composés sauf la 1-O-méthyl émodine et la 3-oxo- α -ionone.

L'activité des composés est évaluée par détermination du pourcentage de survie des protoplastes en fonction du temps (graphes IV.2).



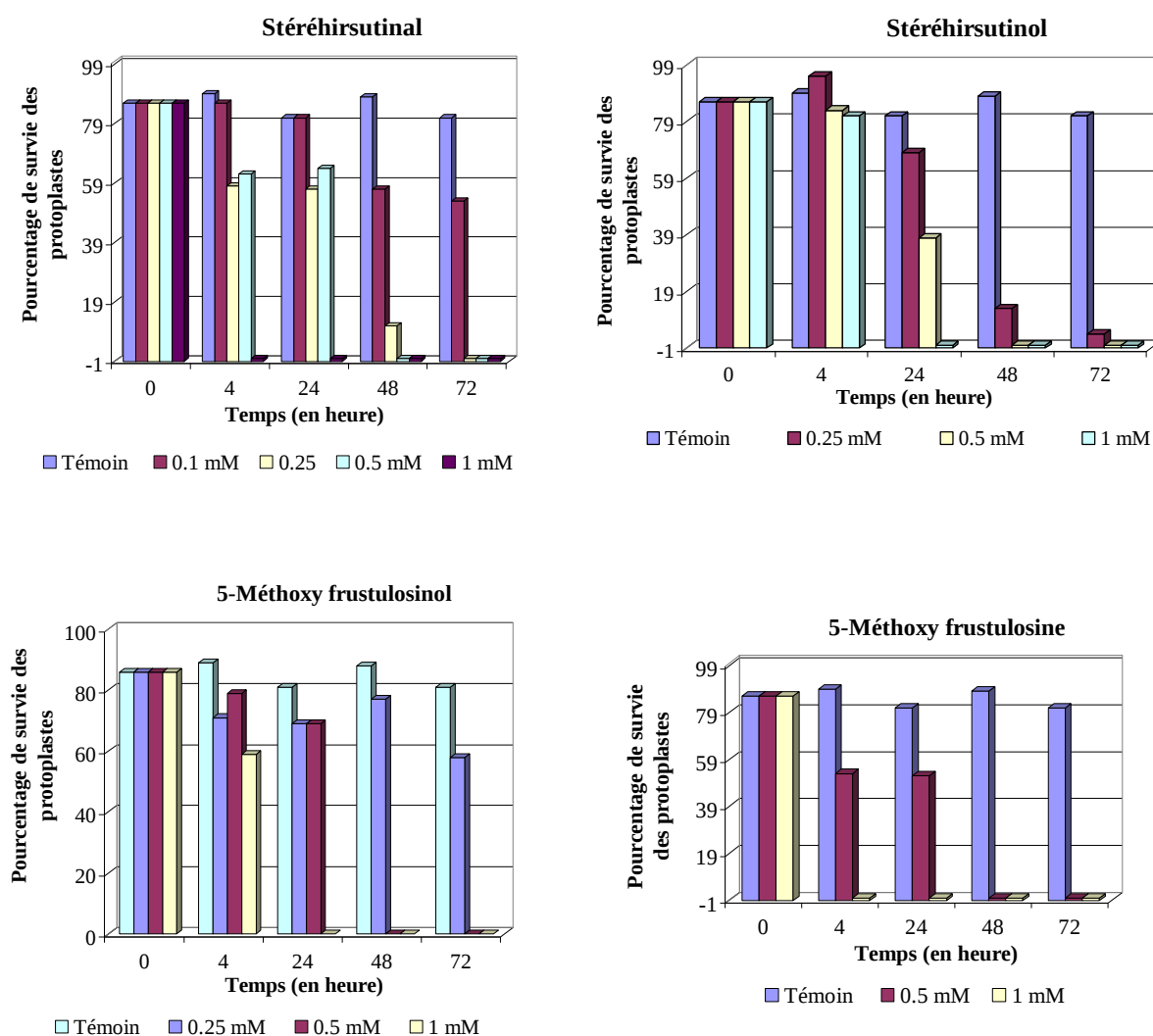


Graphes IV.2 : Effet de différents métabolites sur des protoplastes de vigne de cépage Ugni blanc

L'isosclérone a également été testée deux fois sur des protoplastes de cépage Ugni blanc. Les résultats du premier test montraient qu'elle induisait la mort des protoplastes à une concentration de 1 mM. Cependant le deuxième test n'a pas permis de confirmer ce résultat.

Ces tests montrent que les métabolites testés sont beaucoup moins toxiques que l'eutypine. Seuls l'acide phényl lactique et l'acide 4-hydroxy benzoïque sont capables de provoquer la mort des protoplastes à une concentration de 1 mM. Les autres molécules testées n'ont apparemment aucune activité toxique.

Des composés isolés de *Stereum hirsutum* ont également été soumis à ce test (graphes IV.3).



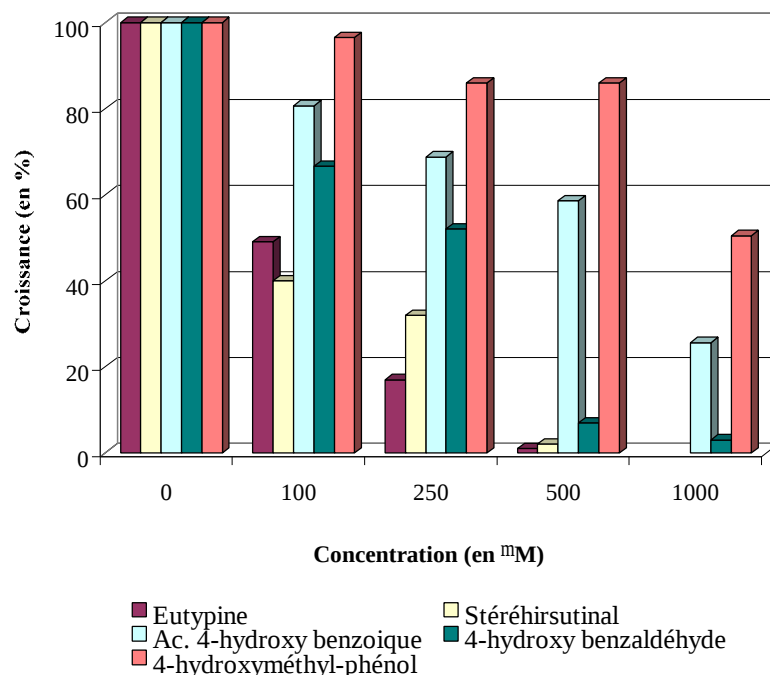
Graphes IV.3 : Effet de différents métabolites (ou dérivés) produits par *Stereum hirsutum* sur des protoplastes de vigne de cépage Ugni blanc

Tous ces composés présentent une activité toxique équivalente à celle de l'eutypine vis à vis des protoplastes de vigne. D'autre part, la présence d'un groupement aldéhyde semble accroître la toxicité de ces composés. En effet, alors que le stéréhirsutinal à 1mM induit la mort de l'ensemble des protoplastes en 4 heures, il faut attendre 24 heures pour avoir le même effet avec le stéréhirsutinal à 1 mM (de même pour la 5-méthoxy-frustulosine et le 5-méthoxy-frustulosinol).

IV.4- Tests sur cals de vigne

Ces tests ont été réalisés au sein du pôle de biotechnologie végétale de l'INP-ENSAT de Toulouse par le Dr J.-P. Roustan.

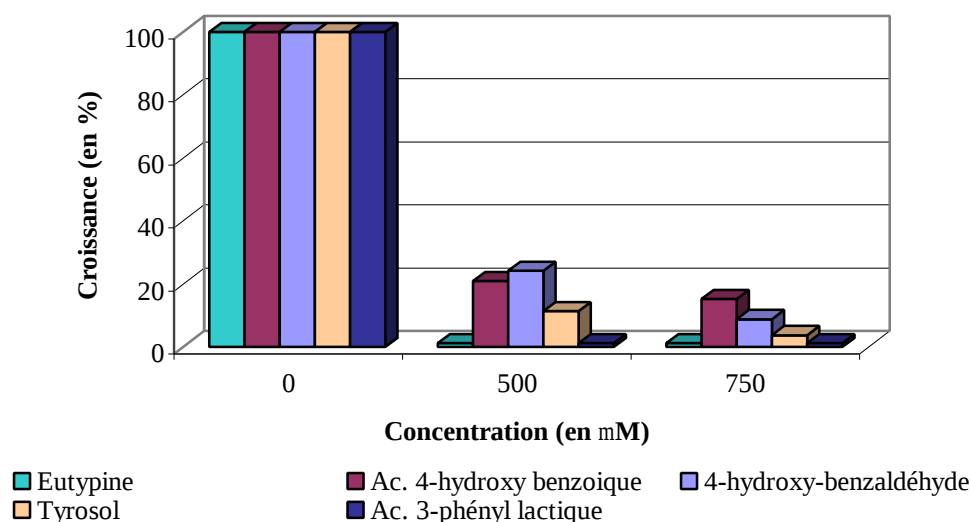
Dans la première série de tests réalisée, les cals de *Vitis vinifera* cv. Gamay ont été cultivés sur milieu de culture standard en présence des métabolites apportés à des concentrations allant de 0 à 500 μM . Après 28 jours de culture, la croissance des tissus est estimée en déterminant la masse fraîche des cals. La croissance des cals est alors exprimée en pourcentage par rapport au tissu témoin cultivé en absence de toxine (graphe IV.4).



Graphe IV.4 : Influence de différents métabolites sur la croissance des cals de *Vitis vinifera* cv. Gamay

Ce test montre que l'eutypine, le stéréohirsutinal et le 4-hydroxy benzaldéhyde ont une toxicité comparable vis à vis des cals de vigne. Le remplacement du groupement aldéhyde du 4-hydroxy benzaldéhyde par un groupement acide diminue fortement l'activité de ce composé.

Une deuxième série de tests a été réalisée sur des cals de *Vitis vinifera* cv Gamay suivant la même procédure que précédemment. Deux concentrations de substances à expérimenter ont été testées : 500 μM et 750 μM (graphe IV.5).



Graphé IV.5 : Influence de différents métabolites sur la croissance des cals de *Vitis vinifera* cv. Gamay

Cette deuxième série de tests confirme l'activité du 4-hydroxy-benzaldéhyde et de l'acide 4-hydroxy-benzoïque. D'autre part, on peut constater que l'acide 3-phényl-lactique présente une toxicité comparable à celle de l'eutypine vis à vis des cals de vigne.

IV.5- Conclusion

Les tests réalisés sur plantules de tomate ont permis de montrer que les composés toxiques agissaient suivant deux modes d'action distincts, comme l'eutypine et le stéréhirsutinal [37] :

- Composés provoquant un flétrissement des feuilles : eutypine, 4-hydroxy-benzaldéhyde et isosclérone
- Composés provoquant une nécrose des tiges : stéréhirsutinal, acide 4-hydroxy-benzoïque et acide 3-phényl-lactique

D'autre part, le N-butyl-benzène-sulfonamide apparaît très agressif vis à vis de ces plantules.

Les tests effectués sur feuille de vigne confirment la toxicité du 4-hydroxy-benzaldéhyde, de l'acide 4-hydroxy-benzoïque, et de l'acide 3-phényl-lactique vis à vis de cellules de la plante hôte. Il montre l'activité toxique du tyrosol. De ces quatre métabolites, l'acide 3-phényl-lactique est celui qui agit à la plus faible concentration.

Les tests menés sur protoplastes de vigne, de cépage Ugni blanc, révèlent à nouveau la toxicité de l'acide 4-hydroxy-benzoïque et de l'acide 3-phényl-lactique vis à vis de cellules de la plante hôte, à des concentrations de 1 mM. Le 4-hydroxy-benzaldéhyde à 1mM ne présente aucune activité vis à vis des protoplastes.

Les tests réalisés sur cals de vigne, de cépage Gamay, montrent que l'acide 3-phényl-lactique, le 4-hydroxy-benzaldéhyde, le tyrosol et l'acide 4-hydroxy-benzoïque inhibent la croissance des cals de vigne. La toxicité de l'acide 3-phényl-lactique à une concentration de 500 μ M est comparable à celle de l'eutypine à la même concentration. D'autre part, le 4-hydroxy-benzaldéhyde semble capable de nuire aux cellules de la plante hôte. On peut penser que l'absence

d'activité de ce métabolite vis à vis de protoplastes de vigne résulte soit de l'emploi de ce composé à des concentrations trop faibles, soit d'une sensibilité moindre du cépage Ugni blanc à ce composé.

Un certain nombre de tests entrepris sur la 1-O-méthyl-émidine, la scytalone, l'acide 4-hydroxy-3-(3-méthylbut-2-ényloxy)-benzoïque, la dihydroactinidiolide et la 3-oxo- α -ionone, semblent indiquer que ces composés ne présentent aucune activité toxique. Cependant, l'ensemble des tests n'a pu être réalisé sur ces métabolites, en raison des faibles quantités disponibles. Les synthèses d'acide 4-hydroxy-3-(3-méthylbut-2-ényloxy)-benzoïque et d'isosclérone devraient permettre à l'avenir de poursuivre leur étude.

Chapitre V

Etude du matériel végétal

La dernière étape de notre étude est la recherche dans les diverses parties de la plante des métabolites secondaires sécrétés par les champignons impliqués dans le syndrome de l'esca. Elle permet d'établir, d'une part, si ces métabolites sont produits *in vivo*, et d'autre part, s'ils sont capables de diffuser vers des parties non infectées de la plante via la sève brute par exemple.

Des extraits de bois, de sève et de feuilles malades ont été étudiés et comparés aux extraits de matériel végétal sain correspondant. La complexité de la composition chimique de ce matériel végétal nous a conduit à utiliser l'HPLC comme méthode de séparation des constituants du mélange. Cet appareil fut couplé à un spectromètre de masse. Ce détecteur présente deux avantages : il est non seulement très sensible, mais fournit aussi des informations structurales permettant d'identifier précisément un composé.

V.1- Description du spectromètre de masse utilisé

V.1.1- L'ionisation par électrospray [101, 102]

L'électrospray est une technique permettant de transférer des ions d'une solution vers une phase gazeuse (figure V.1). Ce processus se subdivise en trois étapes :

- Nébulisation d'une solution en gouttelettes chargées électriquement
- Diminution de la taille des gouttelettes chargées
- Production d'ions en phase gazeuse à partir des minuscules gouttelettes chargées

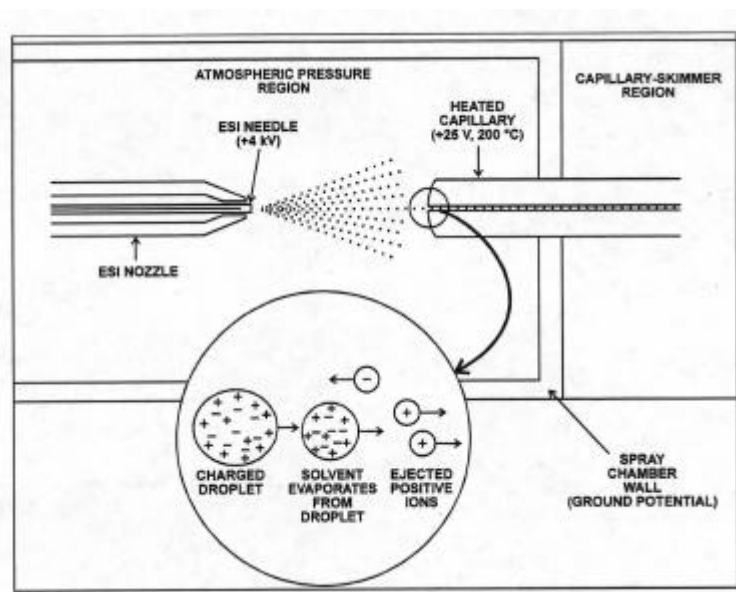


Figure V.1 : Schéma d'une source électrospray (Documentation Finnigan)

V.1.1.1- Principes

➤ Formation de gouttelettes polychargées

Le processus de formation d'un électrospray consiste à appliquer un haut champ électrique à l'extrémité du capillaire par lequel est introduite la solution. Dans la figure V.2, le potentiel appliqué à l'extrémité du capillaire est plus important que celui de la contre-électrode. Dans ce cas, sous l'action du champ électrique, les ions positifs contenus dans la solution se déplacent vers le ménisque du liquide, alors que les ions négatifs viennent se décharger sur les parois du capillaire.

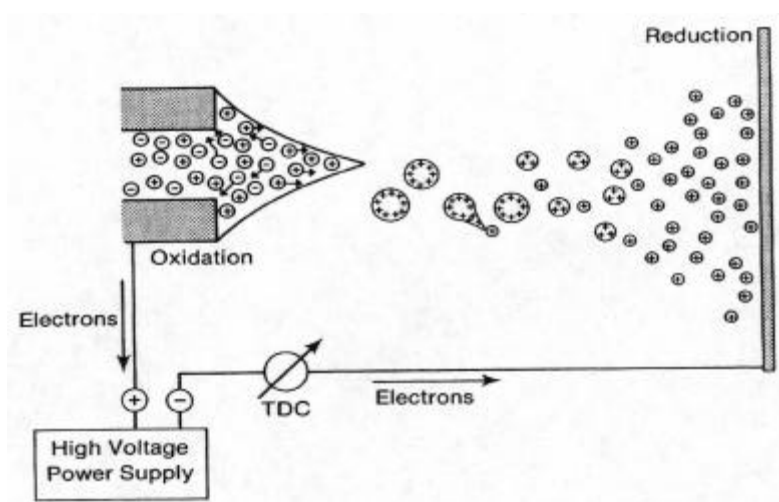


Figure V.2 : Schéma de l'action d'un champ électrique sur les ions présents en solution [102]

La répulsion électrostatique entre les charges positives entraîne une expansion de la surface du liquide et la formation du cône de Taylor. Lorsque la force de répulsion entre les charges positives devient plus importante que la force de tension de surface du liquide, de fines gouttelettes chargées quittent la surface et se déplacent vers la contre-électrode (figure V.3).

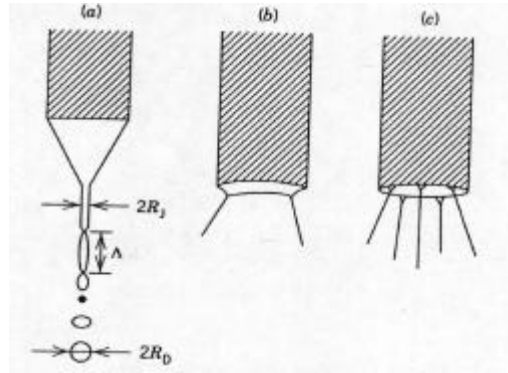


Figure V.3 : Formation des gouttelettes polychargées :

(a) Extension de l'extrémité du cône en jet (R_j : rayon du jet ; R_D : rayon de la gouttelette)

(a) $\rightarrow$ (b) $\rightarrow$ (c) : Augmentation du voltage du spray: passage en multijet
[102]

Un mécanisme similaire s'applique pour la formation de gouttelettes chargées négativement. Cette fois-ci, le potentiel appliqué à l'extrémité du capillaire est moins important que celui de la contre-électrode. Ce sont donc les ions négatifs qui migrent vers la surface du liquide.

➤ Diminution de la taille des gouttelettes chargées

Lors de leur déplacement vers la contre-électrode, les gouttelettes chargées se retrouvent dans un courant de gaz à pression atmosphérique. Elles subissent alors :

- une réduction de taille par évaporation du solvant qu'elles contiennent
- une déformation sous l'action de forces résultant de leur déplacement à travers un gaz

Par conséquent, la densité de charge à la surface des gouttelettes augmente. Au delà de la limite de stabilité de Rayleigh, les forces de répulsion coulombiennes deviennent supérieures aux forces de tension de surface (forces cohésives). Les gouttelettes se désagrègent alors et donnent naissance à de nouvelles gouttelettes polychargées, plus petites (figure V.4).

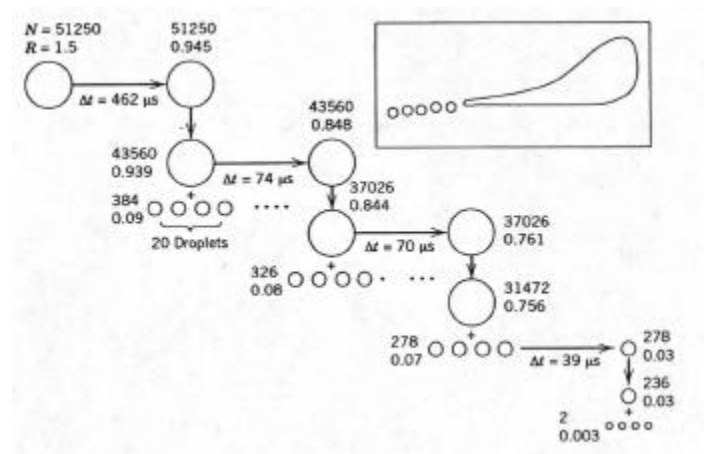


Figure V.4 : Schéma des fissions successives des gouttelettes polychargées

N : nombre de charges élémentaires sur la gouttelette

R : rayon de la gouttelette en μm

Δt : temps nécessaire pour que la gouttelette ait la taille requise à la réalisation d'une fission

[103]

➤ **Mécanisme de formation d'ions en phase gazeuse à partir des petites gouttelettes polychargées**

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation d'ions en phase gazeuse à partir de petites gouttelettes polychargées.

☞ **Mécanisme proposé par Dole :**

Selon Dole, la fission successive des gouttelettes polychargées aboutit à la formation de gouttelettes extrêmement petites, qui ne renferment plus qu'un seul ion. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes conduit à la production d'un ion en phase gazeuse.

☞ **Mécanisme proposé par Iribarne et Thomson :**

Suivant ce mécanisme, le rayon des gouttelettes polychargées diminue jusqu'à une taille donnée à partir de laquelle les ions sont directement éjectés en phase gazeuse.

Ce processus d'éjection des ions en phase gazeuse devient prédominant, par rapport aux fissions coulombiennes, quand le rayon des gouttelettes est inférieur à 10 nm (figure V.5).

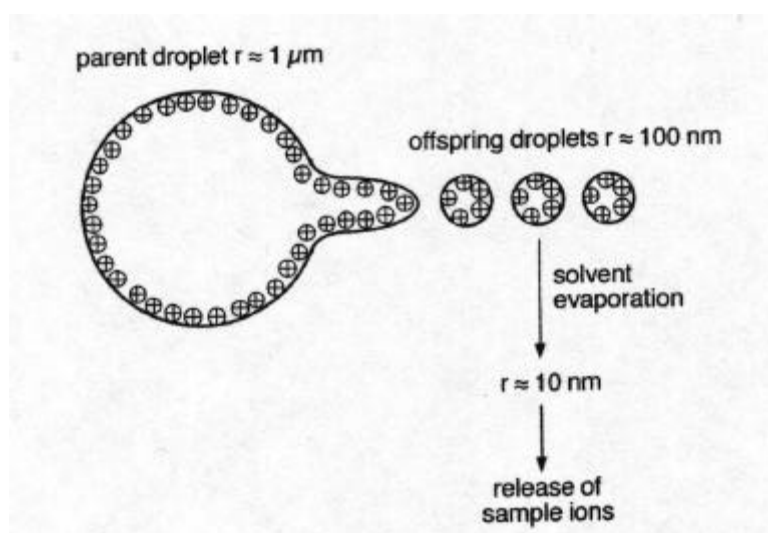


Figure V.5 : Schéma du mécanisme proposé par Iribarne et Thomson (« processus d'évaporation d'ion ») [101]

V.1.1.2- Aspects pratiques

L'électrospray est une technique d'ionisation très douce. En effet, la désolvatation des ions est réalisée progressivement par l'énergie thermique à température ambiante. De ce fait, peu d'énergie est fournie au système, et la fragmentation des molécules est ainsi évitée. Cette technique permet d'analyser par spectrométrie de masse des composés très polaires et/ou labiles.

Par conséquent, un spectre de masse ESI se compose de pics caractérisant des ions moléculaires. Ces ions moléculaires peuvent être déprotonés (ESI mode négatif), protonés (ESI mode positif), ou former des adduits avec différents sels en particulier lors d'utilisation de tampons. Pour obtenir des informations structurales sur un composé il devient nécessaire d'effectuer de la MS/MS, et donc de disposer d'un analyseur permettant de réaliser de la spectrométrie de masse en tandem.

D'autre part, l'efficacité de l'ionisation par électrospray est liée au flux utilisé pour injecter la solution dans la source. L'ionisation par électrospray (et par suite la sensibilité de détection) est

optimale pour des flux inférieurs à 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. L'utilisation de tels flux en HPLC sur des colonnes traditionnelles entraînerait une augmentation non négligeable des temps de rétention. Afin de pallier à ce problème, un split de 1/10^{ème} post-colonne est réalisé.

L'électrospray est une technique permettant de transférer des ions présents en solution vers une phase gazeuse. L'efficacité d'ionisation d'un composé peut donc être augmentée par l'injection post-colonne de réactifs appropriés, comme des solutions d'acides ou de bases volatiles permettant d'ajuster le pH de la solution injectée (solutions de NH_3 , de CH_3COOH , etc...). Une autre possibilité est d'utiliser directement ces solutions diluées comme phases mobiles pour l'HPLC.

V.1.2- La trappe ionique

La trappe ionique est un analyseur à balayage. Elle est constituée de trois électrodes hyperboliques : une circulaire couverte de deux calottes. Les ions pénètrent dans la trappe par une calotte et ressortent par l'autre (figure V.6). L'analyse de masse a lieu dans la cavité ainsi formée.

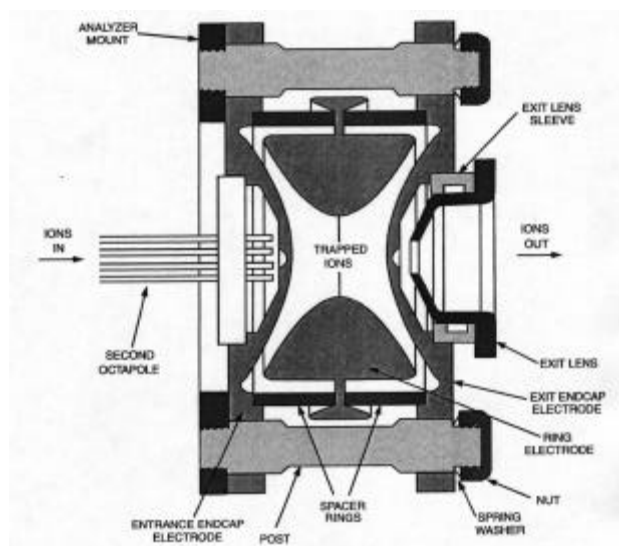


Figure V.6 : Schéma d'une trappe ionique (Documentation Finnigan)

Les ions présents dans la trappe sont soumis à l'influence d'un champ électrique total constitué d'un champ alternatif et d'un champ constant. Ce champ total résulte de l'application sur l'électrode circulaire d'une tension Φ_0 et sur les calottes d'une tension inverse $-\Phi_0$. Les ions se retrouvent alors captifs (« trappés ») sur une trajectoire en forme de huit à trois dimensions (figure V.7).

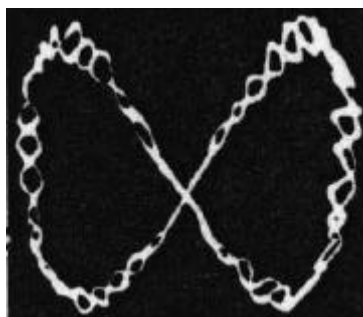


Figure V.7 : Trajectoire suivie par des ions dans un champ quadripolaire de type ion trap (Documentation Finnigan MAT)

Au sein de la trappe les ions se repoussent mutuellement, et de ce fait, ont tendance à accroître le volume qu'ils occupent. Une pression de gaz inerte (hélium) est donc appliquée afin de maintenir les ions sur une trajectoire de petite dimension. Ce gaz sert aussi de gaz de collision pour réaliser de la MS^n sur un ion donné.

L'augmentation successive de l'amplitude de la radio-fréquence déstabilise la trajectoire des ions de masse croissante. Les ions sont alors expulsés de la trappe ionique en fonction de leur masse.

V.1.3- Techniques d'analyse utilisées

Notre étude consiste à rechercher des métabolites dans des extraits de matériel végétal. Ces extraits sont des mélanges complexes dans lesquels les composés recherchés peuvent n'être présents qu'à l'état de trace. Nous avons donc employé des techniques permettant d'obtenir une grande sensibilité de détection : SIM, SRM et CRM.

➤ SIM : Selected Ion Monitoring

Au cours de ce mode de balayage, les ions formés dans la source sont stockés dans la trappe ionique. Seuls les ions de masses sélectionnées sont expulsés de l'analyseur et détectés afin de fournir le spectre de masse en mode SIM.

Comme seuls les ions de masses sélectionnées sont suivis, le mode SIM fournit généralement une sensibilité plus importante que le mode de balayage de l'ensemble de la gamme des masses (Full scan mode).

➤ SRM : Selected Reaction Monitoring

Ce mode de balayage se déroule en deux étapes.

Dans une première étape, les ions formés dans la source sont stockés dans la trappe ionique. Tous les ions sont alors expulsés de l'analyseur à part les ions parents de masse sélectionnée. Ces derniers sont excités afin qu'ils rentrent en collision avec les molécules d'hélium présentes dans la trappe. Ces collisions provoquent la fragmentation des ions parents en quelques ions fils.

Dans la deuxième étape, les ions fils produits sont stockés dans l'analyseur de masse. Les ions fils de masse sélectionnée sont alors expulsés de la trappe et détectés afin de fournir le spectre de masse en mode SRM.

Comme le mode SIM, le mode SRM permet l'analyse rapide de composés à l'état de trace dans des mélanges complexes avec une sensibilité plus importante que le mode de balayage de l'ensemble de la gamme des masses (Full scan mode).

➤ CRM : Consecutive Reaction Monitoring

Ce mode de balayage se déroule au moins en trois étapes.

Dans la première étape, les ions formés dans la source sont stockés dans la trappe ionique. Les ions de masse sélectionnée sont gardés captifs dans l'analyseur, et les autres ions en sont expulsés. L'ion parent ainsi sélectionné est alors excité et entre en collision avec les molécules d'hélium présentes dans la trappe. Ces collisions provoquent la fragmentation de l'ion parent en quelques ions fils.

Dans la deuxième étape, les ions fils produits sont stockés dans l'analyseur. Les ions fils de masse sélectionnée sont maintenus dans la trappe, et les autres ions fils en sont expulsés. L'ion fils ainsi sélectionné devient parent à son tour pour l'étape suivante de l'analyse de masse. Cet ion fils sélectionné est excité et entre en collision avec les molécules d'hélium. Ces collisions provoquent la fragmentation de cet ion et produit de nouveaux ions fils.

Dans la troisième étape, les nouveaux ions fils sont stockés dans l'analyseur. Et les processus précédents peuvent être répétés jusqu'à n fois (avec $n \leq 7$).

Les ions fils finalement produits sont stockés dans l'analyseur de masse. Les ions fils de masses sélectionnées sont alors expulsés de la trappe et détectés afin de fournir le spectre de masse en mode CRM MSⁿ.

V.2- Caractéristiques en LC-ESI-MS des produits recherchés

Afin de mettre au point les conditions d'ionisation des composés en électrospray, nous les avons injectés directement en ESI-MS. Les meilleurs résultats furent obtenus, de manière générale, en mode négatif avec addition d'une solution de NH₃ 5%. Les masses des ions pseudo-moléculaires ainsi obtenus sont indiqués dans le tableau V.1.

Une énergie de collision a ensuite été appliquée à chaque ion pseudo-moléculaire. Les ions fils obtenus en MS² pour chaque composé sont présentés dans le tableau V.1.

D'autre part, nous avons injecté tous les composés en LC-ESI-MS en utilisant le programme standard (programme 1) pour déterminer leurs temps de rétention respectifs.

MOLECULE	RT (min)	ESI(-)-MS ion pseudo-moléculaire (uma)	ESI(-)-MS/MS ions fils (uma)
Acide phényl-lactique	3	165	147
Acide 4-hydroxy benzoïque	4.5-5.5	137	93
4-Hydroxy benzaldéhyde	7-8	121	\
Scytalone	8.2	193	149, 151
Isosclérone	12	177	159
Acide 4-hydroxy-3-isoprényloxy-benzoïque	20.7	221	177, 152
1-O-Méthyl-émodyne	45.8	283	268, 240
Stéréohirsutinal	54.5	265	250, 237, 221
Eutypine	28	185	157, 145, 143
Tyrosol	6	137	119, 107, 93

Tableau V.1 : Résultats des expériences de LC-ESI-MS et LC-ESI-MS² effectuées sur 9 composés

De simples expériences de LC-ESI-MS furent entreprises sur d'autres produits. Les résultats sont présentés dans le tableau V.2.

MOLECULE	RT (min)	ESI(-)-MS ion pseudo-moléculaire (uma)
3-Hydroxy-5-décanolide	24.9	185
N-Butyl-benzène-sulfonamide	27.9	212
Frustulosine	39.2	201
Frustulosinol	15	203
Méthyl-frustulosinol	27.7	217
Stéréhirsutanol	38.4	267
2,5-dihydroxy-3-(3-méthyl-but-2-ène)-6-(3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl)-benzaldéhyde	58.7	269
2,4-dihydroxy-6-méthyl benzoate de [3,4-dihydroxyméthyl-5-hydroxy-6-(3-méthyl-but-2-ényl)-phényle]	40.6	387
Orsellinate de méthyle	27.2	181
Eulatinol	30	187

Tableau V.2 : Résultats des expériences de LC-ESI-MS sur 10 composés

Pour analyser les différents échantillons de matériel végétal, nous avons utilisé le même programme HPLC que précédemment. Or, pour une ionisation optimale en électrospray, le flux de solvant employé ne devrait pas dépasser $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Nous avons donc réalisé un split de 1/10^{ème} post-colonne. Cinq microlitres d'une solution de NH_3 à 5% fut également injectée post-colonne afin d'améliorer l'ionisation des produits en solution.

V.3- Origine du matériel végétal

L'ensemble du matériel végétal nous a été fourni par le Dr Larignon du laboratoire de pathologie végétale de l'INRA de Bordeaux.

Nous avons reçu trois ceps infectés :

- ➔ Le premier était de cépage Ugni-Blanc et provenait de Vaux-Rouillac. Ce cep était atteint d'esca, mais la microflore qu'il contenait n'a pas été déterminée.
- ➔ Le deuxième présentait des symptômes foliaires. Des souches de *Phaeoacremonium chlamydosporum* et de *Phaeoacremonium aleophilum* ont été isolées de ce cep.
- ➔ Le troisième ne présentait pas de symptômes foliaires. *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeoacremonium chlamydosporum* étaient présents dans les tissus du bois.

La sève de cep malade et celle de cep sain étudiées ont été prélevées au printemps à Saint-Preuil dans le vignoble charentais. Elles provenaient de cépages Ugni-Blanc.

Enfin, nous avons reçu des feuilles présentant les symptômes caractéristiques de l'esca issues de ceps malades. Des feuilles ne présentant aucun symptôme et provenant de ceps apparemment sains ont également fait l'objet d'une étude.

V.4- Etude du bois

V.4.1- Bois malade ne présentant pas de symptômes foliaires

V.4.1.1- Préparation des échantillons

Le tronc du cep infecté a été réduit en sciure, puis extrait à l'éther dans un soxhlet pendant 24 heures. L'extrait brut ainsi obtenu a été étudié en LC-ESI-MS. Les métabolites recherchés peuvent n'être présents qu'à des concentrations très faibles. Nous avons donc fractionné cet extrait brut et analysé chacune des fractions obtenues.

L'extrait brut est dissout dans une solution aqueuse contenant 20% de méthanol. Il est fractionné à l'aide de différents solvants de polarité croissante : hexane, dichloro-méthane, acétate d'éthyle et butanol. Chacune des fractions obtenues est alors injectée en LC-ESI-MS.

V.4.1.2- Analyse de l'extrait brut

L'analyse de l'extrait brut en LC-ESI-MS permet de mettre en évidence la présence de deux métabolites : le 4-hydroxy benzaldéhyde et l'acide 4-hydroxy-benzoïque. En effet, la recherche en mode SIM de l'ion 121 fait apparaître un pic à 8 minutes, temps de rétention (RT) correspondant à celui du 4-hydroxybenzaldéhyde (figure V.8).

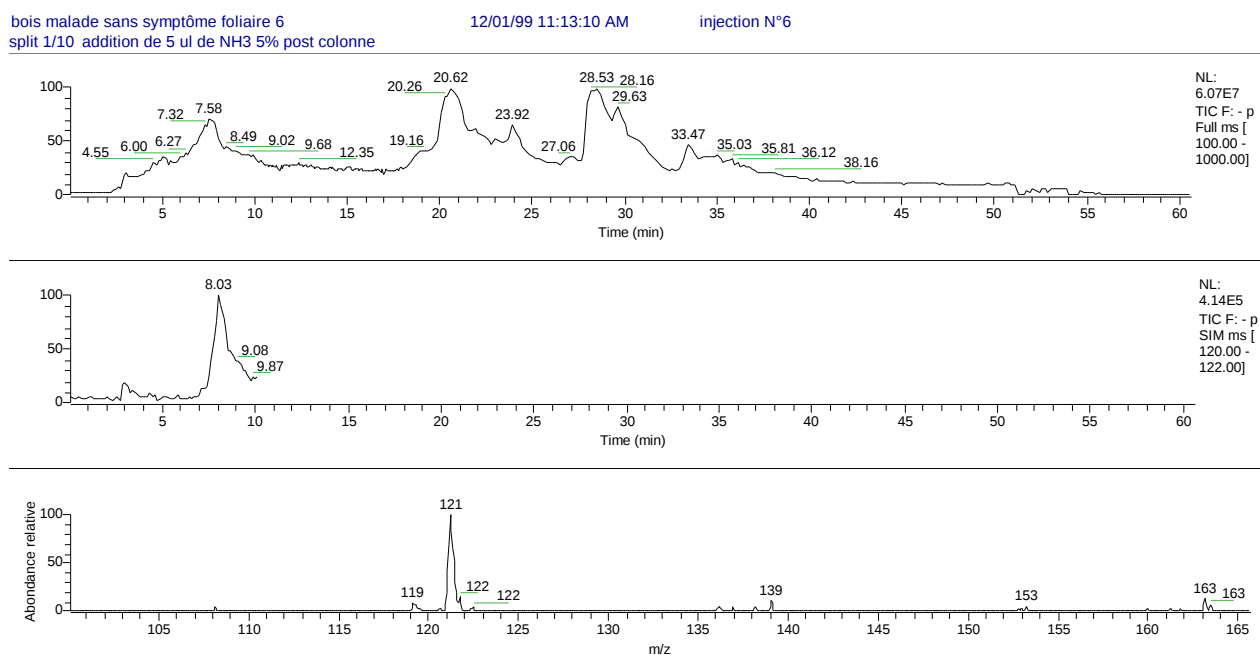


Figure V.8 : De haut en bas : Courant ionique total de l'extrait brut, Courant ionique en mode SIM [ion : 121], Spectre de masse à RT = 8 minutes

D'autre part, la MS² de l'ion 137 présent à un temps de rétention de 5 minutes engendre l'ion fils 93, caractéristique de l'acide 4-hydroxy-benzoïque (figure V.9).

bois malade sans symptôme foliaire 6
split 1/10 addition de 5 ul de NH3 5% post colonne

12/01/99 11:13:10 AM

injection N°6

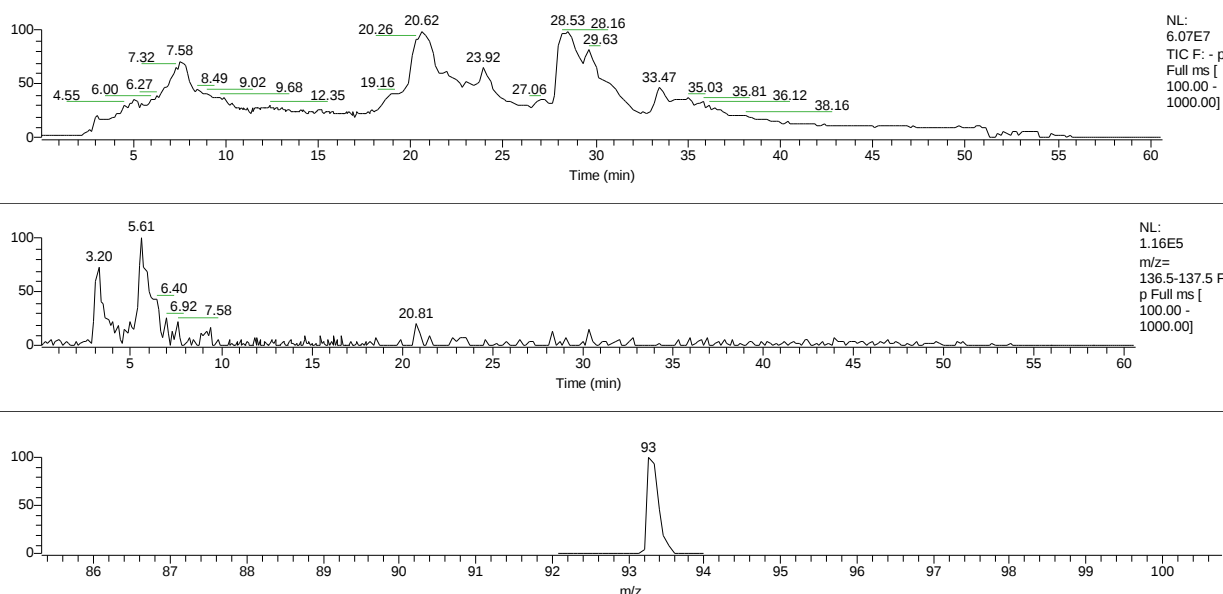


Figure V.9 : De haut en bas : Courant ionique total de l'extrait brut, Présence de l'ion 137 dans le courant ionique total, Spectre MS² [ion parent : 137] à RT = 5.6 minutes

V.4.1.3- Analyse des fractions de l'extrait brut

V.4.1.3.1- Analyse de la fraction AcOEt

L'étude de la fraction AcOEt permet de confirmer la présence de 4-hydroxy-benzaldéhyde (figure V.10) et d'acide 4-hydroxy-benzoïque (figure V.11).

bois malade sans symptôme foliaire fr...
addition de 5 ul NH3 5% post colonne split 1/10

12/22/99 04:18:37 PM

Fraction AcOEt

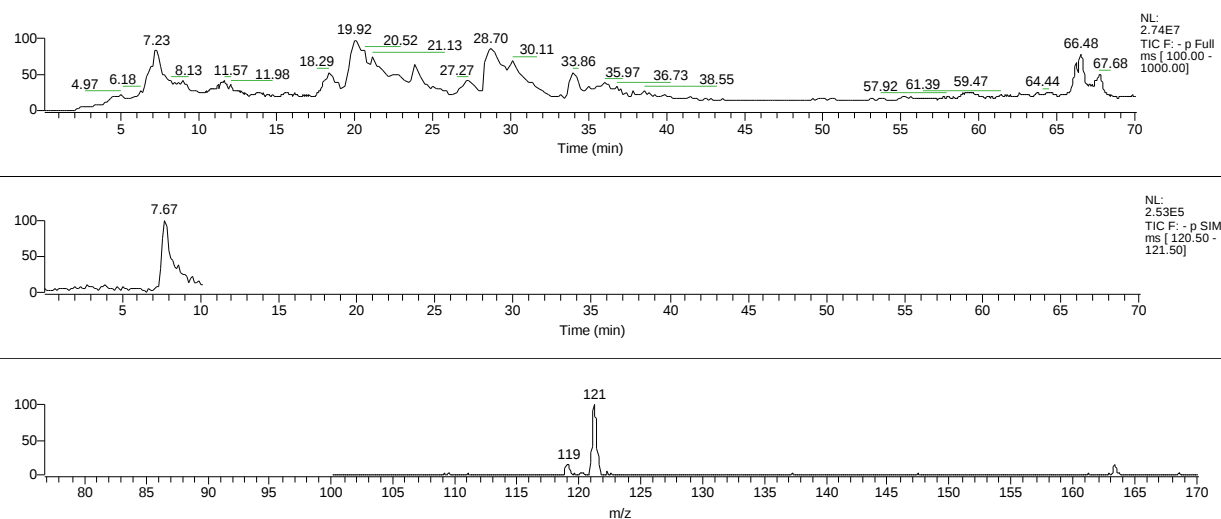
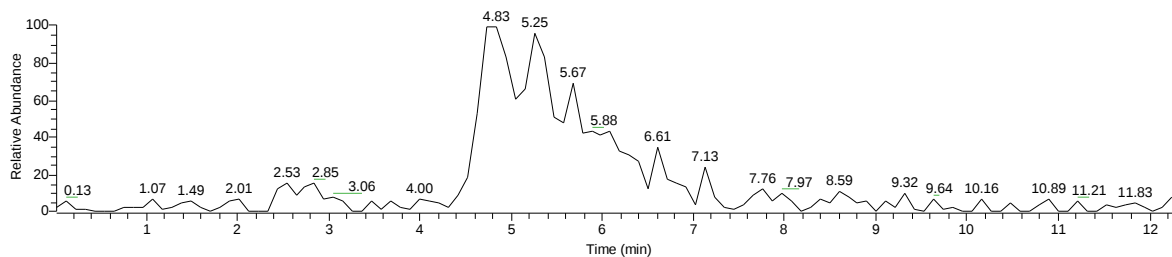


Figure V.10 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction AcOEt, Courant ionique en mode SIM [ion : 121], Spectre MS à RT = 7.6 minutes

Bois malade sans symptôme foliaire Fr...

03/15/00 02:11:31 PM

RT: 0.01 - 12.34



NL: 3.84E4
TIC F: - p
SIM ms [136.50 - 137.50]

S#: 228 RT: 4.76 AV: 1 NL: 9.85E2
F: - p Full ms2 137.00 [65.00 - 150.00]

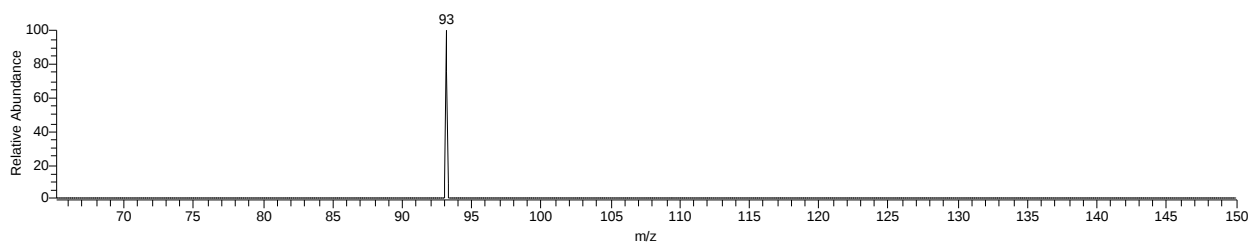


Figure V.11 : De haut en bas : Courant ionique en mode SIM [ion : 137] de la fraction AcOEt, Spectre MS² [ion : 137] à RT = 4.8 minutes

Nous avons refractionné cette fraction par chromatographie sur colonne de silice. Les différentes fractions obtenues sont alors analysées en LC-MS.

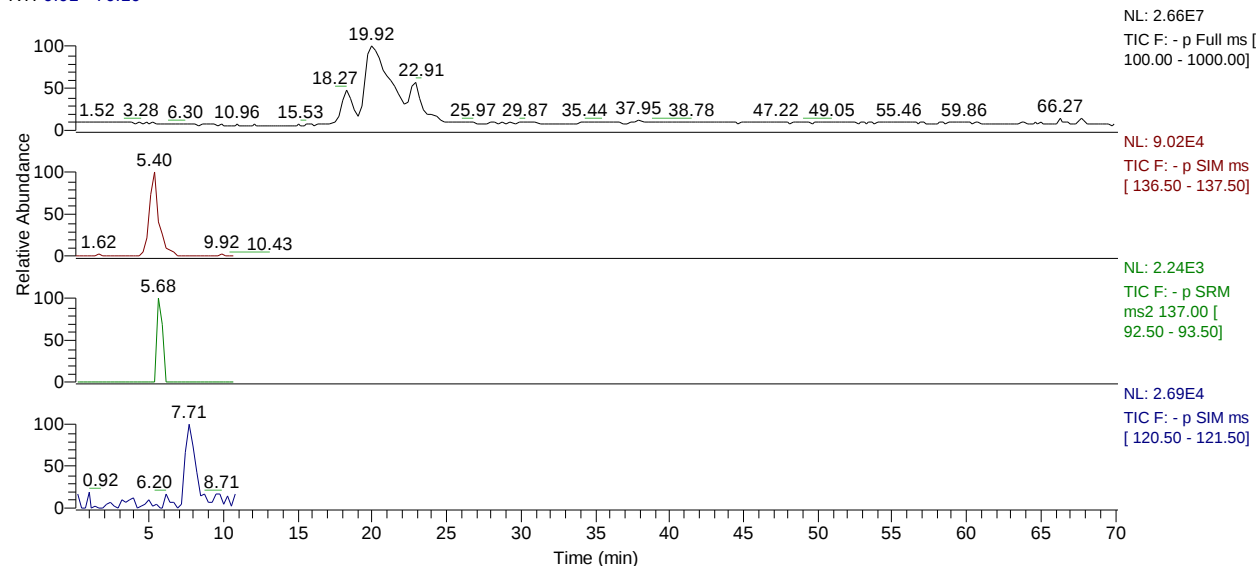
L'analyse de la fraction 2 montre la présence de 4-hydroxy-benzaldéhyde et d'acide 4-hydroxy-benzoïque (figure V.12).

bois malade sans sympt ext AcOEt Fr2
split 1/10 addition de 5 ul de NH3 5%

02/03/00 02:44:31 PM

fraction 2

RT: 0.01 - 70.10



NL: 2.66E7
TIC F: - p Full ms [100.00 - 1000.00]

NL: 9.02E4
TIC F: - p SIM ms [136.50 - 137.50]

NL: 2.24E3
TIC F: - p SRM
ms2 137.00 [92.50 - 93.50]

NL: 2.69E4
TIC F: - p SIM ms [120.50 - 121.50]

Figure V.12 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction 2, Courant ionique total en mode SIM [ion : 137], Courant ionique en mode SRM [ion parent : 137, ion fils : 93], Courant ionique en mode SIM [ion : 121]

V.4.1.3.2- Analyse des autres fractions

L'analyse des fractions CH_2Cl_2 , hexane et butanol n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'autres métabolites secondaires.

V.4.2- Bois malade présentant des symptômes foliaires

V.4.2.1- Préparation des échantillons

Le tronc du cep infecté a été réduit en sciure, puis extrait à l'éther dans un soxhlet pendant 24 heures.

L'extrait brut est dissout dans une solution aqueuse contenant 20% de méthanol. Après injection directe en LC-MS, cet extrait est fractionné à l'aide de différents solvants de polarité croissante : hexane, dichloro-méthane, acétate d'éthyle et butanol. Chacune des fractions obtenues est alors injectée en LC-ESI-MS.

V.4.2.2- Analyse de l'extrait brut

L'analyse de l'extrait brut met en évidence la présence de 4-hydroxy-benzaldéhyde. La fragmentation de l'ion 137 présent à 5.3 minutes génère l'ion fils 93, ce qui indique la présence d'acide 4-hydroxy-benzoïque (figure V.13).

Bois malade avec symptôme foliaire ex...

03/15/00 03:37:07 PM

RT: 0.01 - 64.14

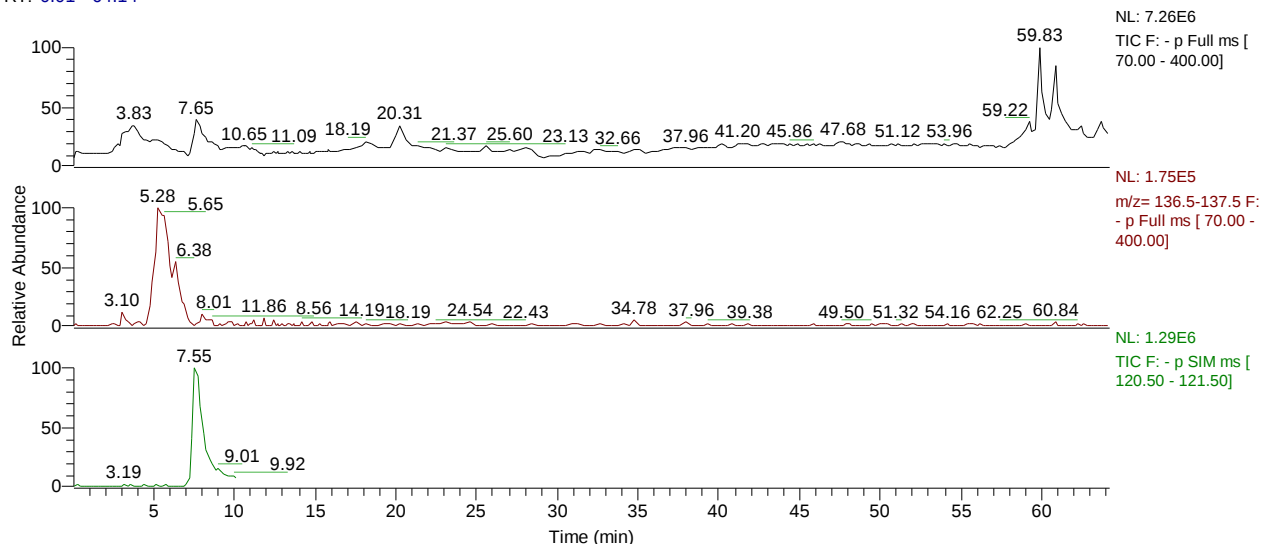
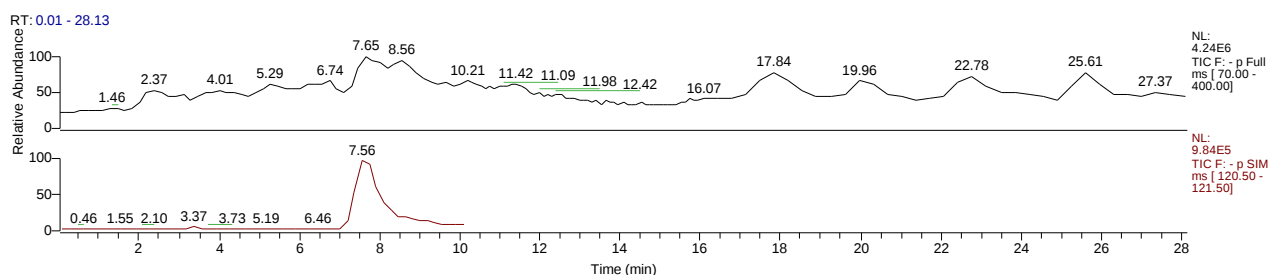


Figure V.13 : De haut en bas : Courant ionique total de l'extrait brut, Présence de l'ion 137 dans le courant ionique total, Courant ionique en mode SIM [ion : 121]

V.4.2.3- Analyse des fractions de l'extrait brut

V.4.2.3.1- Etude de la fraction CH_2Cl_2

L'analyse de la fraction CH_2Cl_2 permet de confirmer la présence de 4-hydroxy-benzaldéhyde (figure V.14).



S#: 329 RT: 7.47 AV: 1 NL: 1.60E5
F: - p Full ms [70.00 - 400.00]

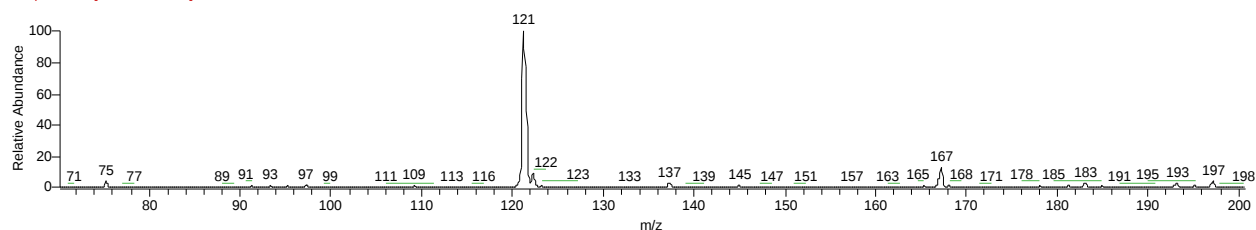
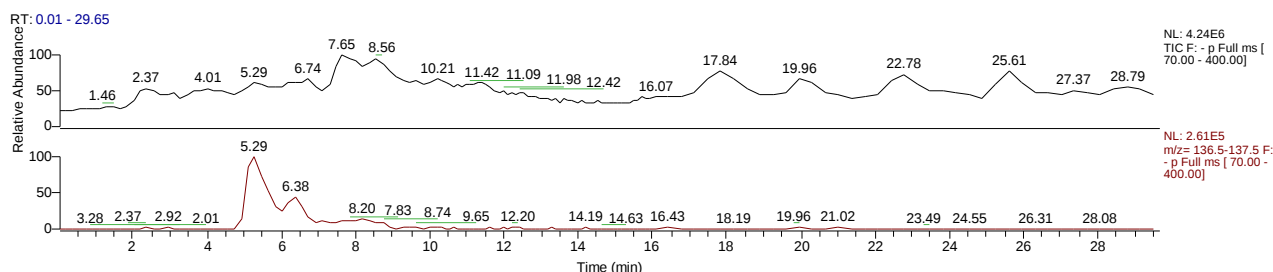


Figure V.14 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction CH_2Cl_2 , Courant ionique en mode SIM [ion : 121], Spectre MS à RT = 8.2 minutes

Dans cette fraction, la fragmentation de l'ion 137 à 5,3 minutes engendre l'ion fils 93, ce qui confirme la présence de l'acide 4-hydroxy-benzoïque (figure V.15)



S#: 252 RT: 5.72 AV: 1 NL: 1.19E3
F: - p SRM ms2 137.00 [92.50 - 93.50]

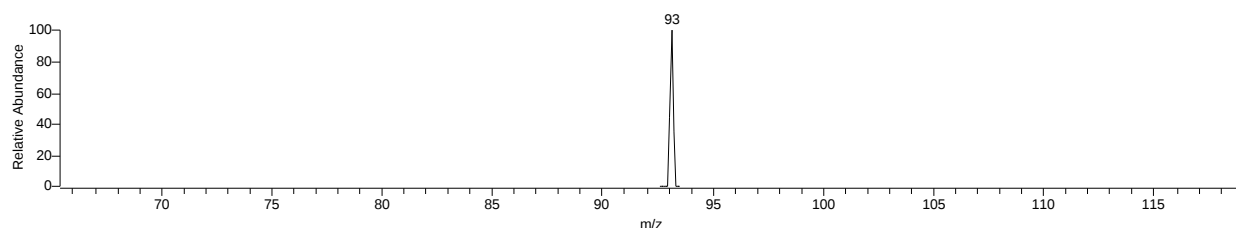


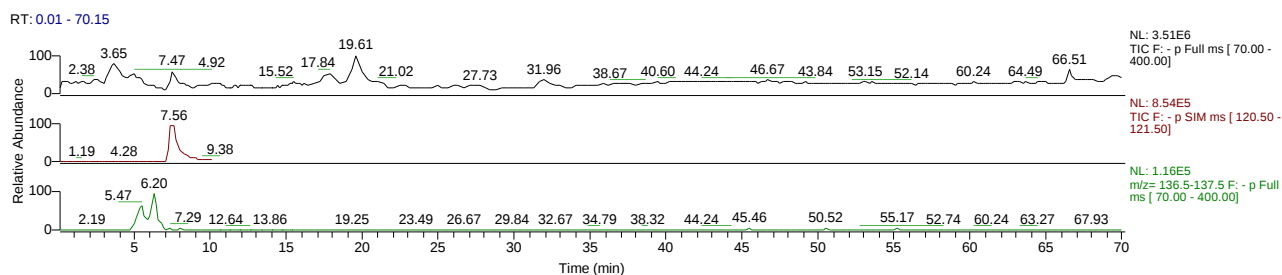
Figure V.15 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction CH_2Cl_2 , Présence de l'ion 137 dans le courant ionique total, Spectre MS^2 [ion parent : 137] à RT = 5.5 minutes

V.4.2.3.2- Etude de la fraction AcOEt

L'analyse de la fraction AcOEt montre la présence de 4-hydroxy-benzaldéhyde et d'acide 4-hydroxy-benzoïque (figure V.16).

Bois malade présentant les symptômes ...

03/16/00 11:43:39 AM



S#: 268 RT: 6.08 AV: 1 NL: 6.33E2
F: - p SRM ms2 137.00 [92.50 - 93.50]

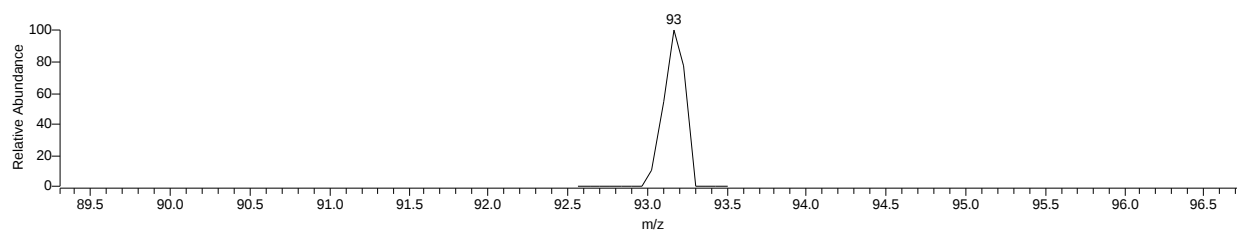


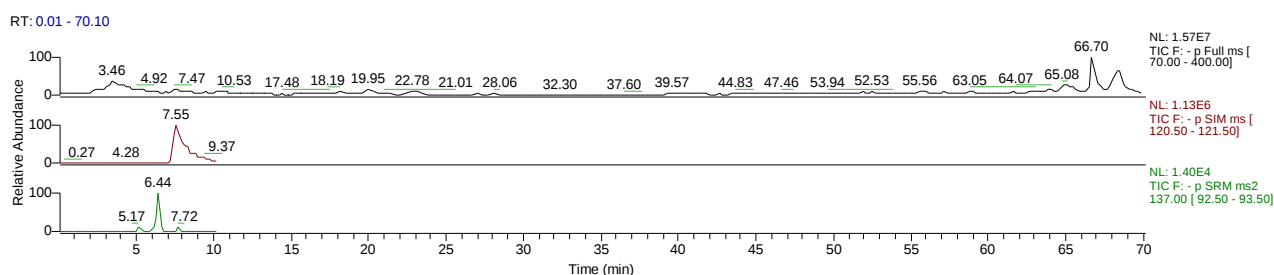
Figure V.16 : Courant ionique total de la fraction AcOEt, Courant ionique en mode SIM [ion : 121], Présence de l'ion 137 dans le courant ionique total, Spectre MS² [ion parent : 137]

V.4.2.3.3- Etude de la fraction butanol

L'analyse de la fraction butanol montre à nouveau la présence de 4-hydroxy-benzaldéhyde et d'acide 4-hydroxy-benzoïque (Figure V.17).

Bois malade présentant les symptômes ...

03/16/00 03:12:13 PM



S#: 236 RT: 5.35 AV: 1 NL: 6.11E2
F: - p SRM ms2 137.00 [92.50 - 93.50]

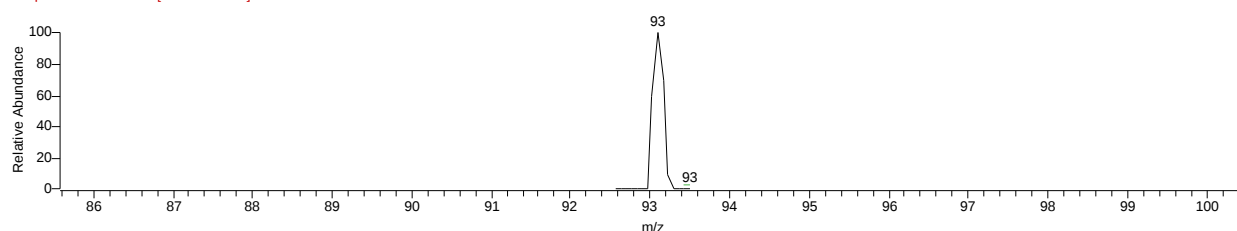


Figure V.17 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction butanol, Courant ionique en mode SIM [ion : 121], Présence de l'ion 137 dans le courant ionique total, Spectre MS² [ion parent : 137] à RT = 5.35 minutes

V.4.3- Bois malade provenant de Vaux-Rouillac

V.4.3.1- Préparation des échantillons

Le bois réduit en sciure est extrait à l'éther dans un soxhlet pendant 24 heures. L'extrait brut est ensuite fractionné par chromatographie sur colonne de silice. Chaque fraction est alors analysée par LC-ESI-MS.

V.4.3.2- Analyse des différentes fractions

L'analyse de la fraction 10 nous permet de mettre en évidence la présence du 4-hydroxy-benzaldéhyde et de l'acide 4-hydroxy-benzoïque (figure V.18).

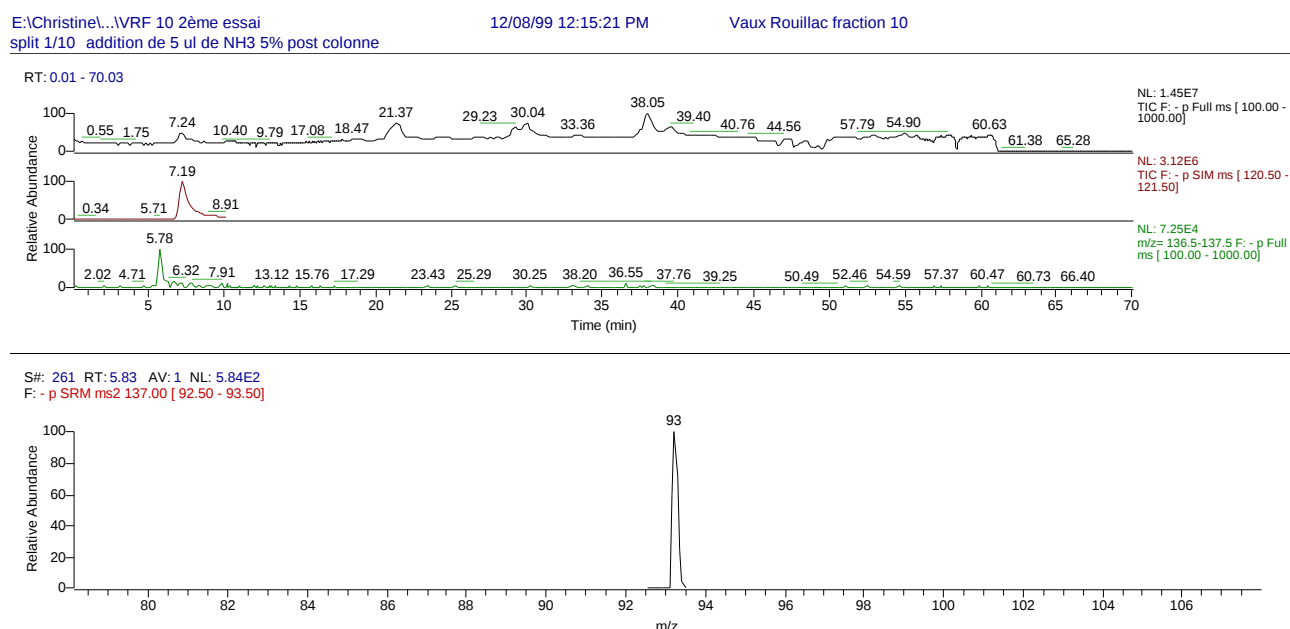


Figure V.18 : Courant ionique total de la fraction VRF10, Courant ionique en mode SIM [ion : 121], Présence de l'ion 137 dans le courant ionique total, Spectre MS^2 [ion parent : 137] à RT = 5.8 minutes

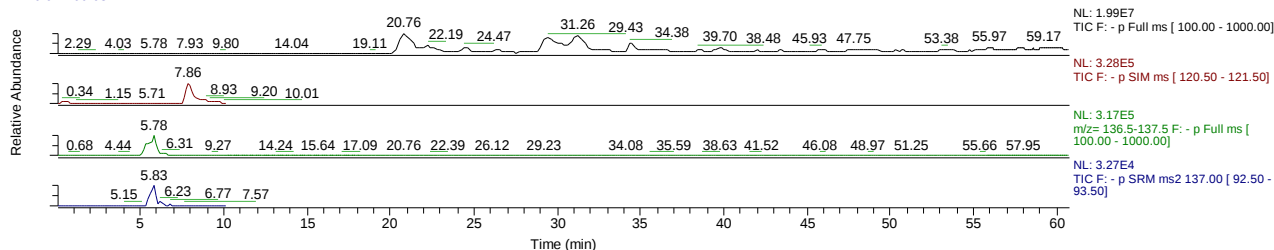
L'étude de la fraction 12 confirme la présence de 4-hydroxy-benzaldéhyde et d'acide 4-hydroxy-benzoïque (figure V.19).

E:\Christine\HP 1100\bois\Vr f 12
addition de 5 ul NH3 5% post colonne split 1/10

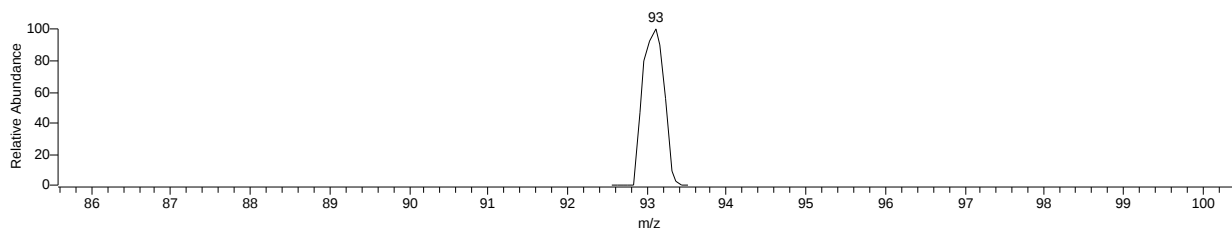
12/22/99 03:03:38 PM

VAUX ROUILLAC Fraction 12

RT: 0.01 - 60.68



S#: 261 RT: 5.83 AV: 1 NL: 6.80E3
F: - p SRM ms2 137.00 [92.50 - 93.50]



Fraction V.19 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction 12, Courant ionique en mode SIM [ion : 121], Présence de l'ion 137 dans le courant ionique total, Courant ionique en mode SRM [ion parent : 137, ion fils : 93], Spectre MS² [ion parent : 137] à 5.8 minutes

D'autre part, la recherche dans le courant ionique total des ions 177 et 193 fait apparaître une grande abondance de ces ions aux temps de rétention respectifs de l'isosclérone et de la scytalone (figure V.20)

E:\Christine\HP 1100\bois\Vr f 12
addition de 5 ul NH3 5% post colonne split 1/10

12/22/99 03:03:38 PM

VAUX ROUILLAC Fraction 12

RT: 0.01 - 60.68

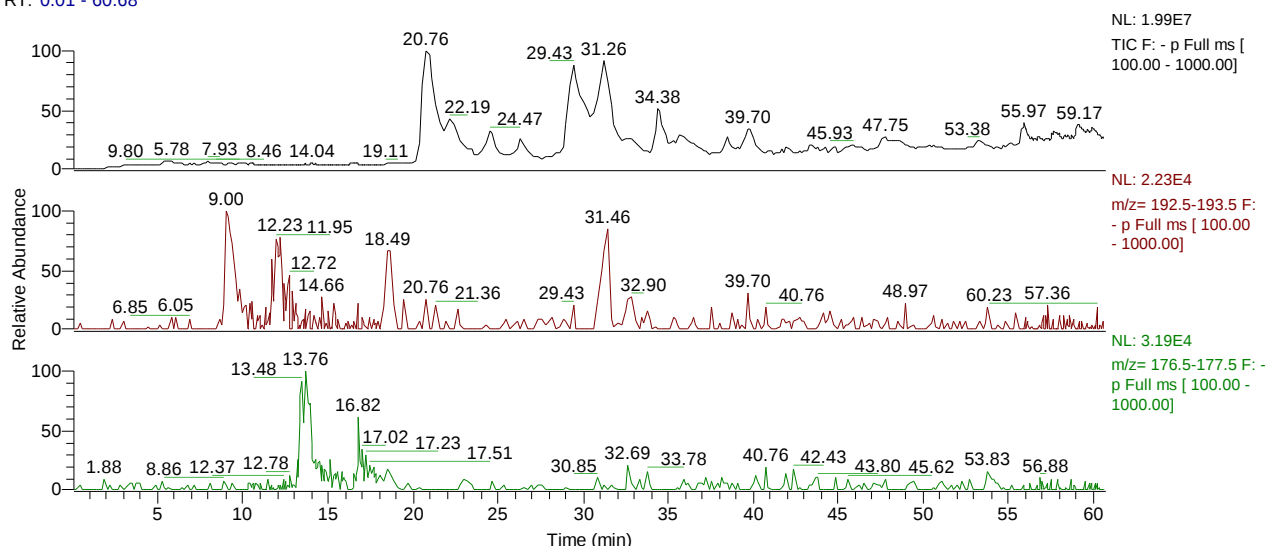


Figure V.20 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction 12, Présence de l'ion 193 dans le courant ionique total, Présence de l'ion 177 dans le courant ionique total

Cependant, les SRM réalisées sur ces deux ions avec respectivement comme ions fils 159 et 151 ne donnent aucun résultat positif. Il est donc difficile d'affirmer que les ions 177 et 193 proviennent de l'une ou l'autre de ces molécules.

Par contre, la recherche de l'ion 283 dans le courant ionique total montre une grande abondance de cet ion à un temps de rétention correspondant à celui de la 1-O-méthyl-émodyne. La présence de cette molécule est confirmée par la SRM MS² réalisée en sélectionnant ses deux ions fils 240 et 268 (figure V.21), la CRM MS³ (figure V.22) et les spectres MS² obtenus en fragmentant l'ion 283 (figure V.23). Les différences de temps de rétention observées entre la figure V.21 et la figure V.22 résultent de la variation de pression en tête de colonne par utilisation de deux pompes HPLC différentes (HP1100 et Rhéos 4000).

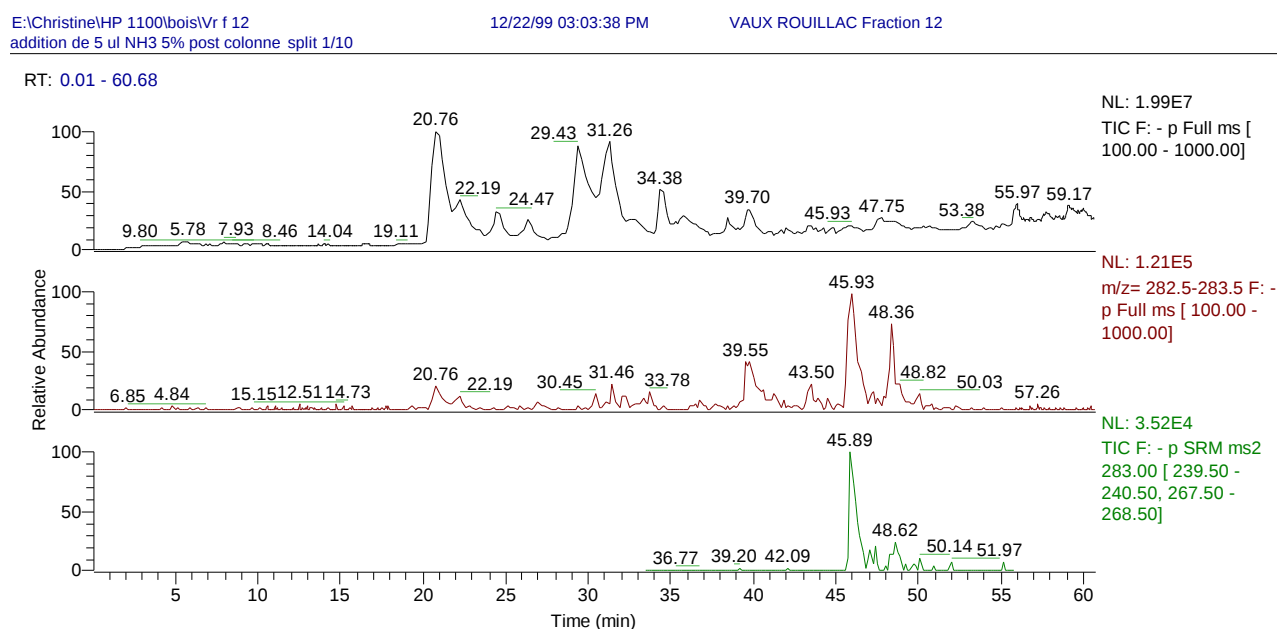


Figure V.21 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction VR F12, Présence de l'ion 283 dans le courant ionique total, Courant ionique en mode SRM [ion parent : 283, ions fils : 240 et 268]

E:\Christine\...\VR F 12 ESSAI 2
split 1/10 - addition de 5 ul de NH3 5% post colonne

12/10/99 10:06:37 AM

VAUX ROUILLAC Fraction 12

RT: 0.00 - 70.04

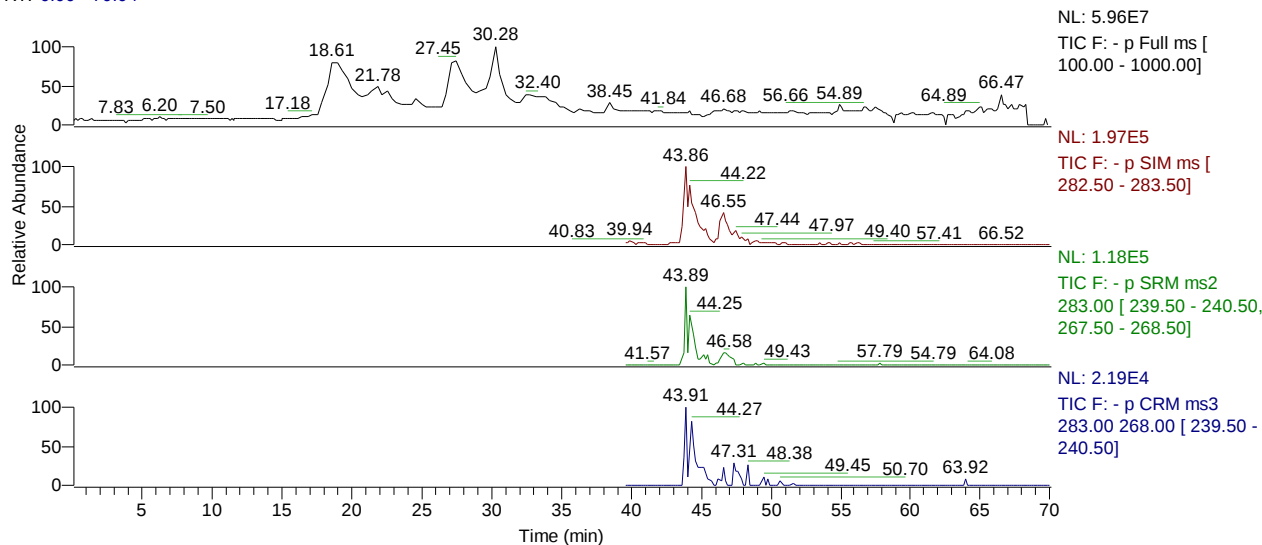


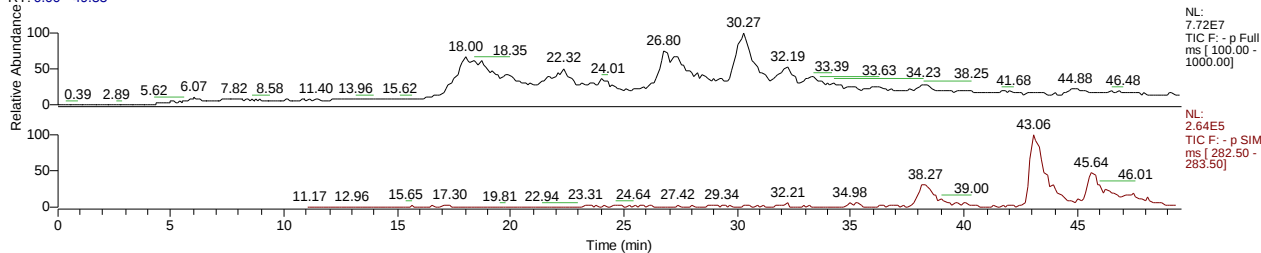
Figure V.22 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction VR F12, Courant ionique en mode SIM [ion : 283], Courant ionique en mode SRM [ion parent : 283, ion fils : 240 et 268], Courant ionique en mode CRM MS³ [ion parent : 283, ion fils parent : 268, ion petit-fils : 240]

E:\Christine\...\VRF 12 ESSAI 4
split 1/10 - addition de 5 ul de NH3 5% post colonne

12/13/99 05:38:38 PM

Vaux Rouillac fraction 12

RT: 0.00 - 49.55



S#: 1754 RT: 43.23 AV: 1 NL: 1.08E4
F: - p Full ms2 283.00 [75.00 - 300.00]

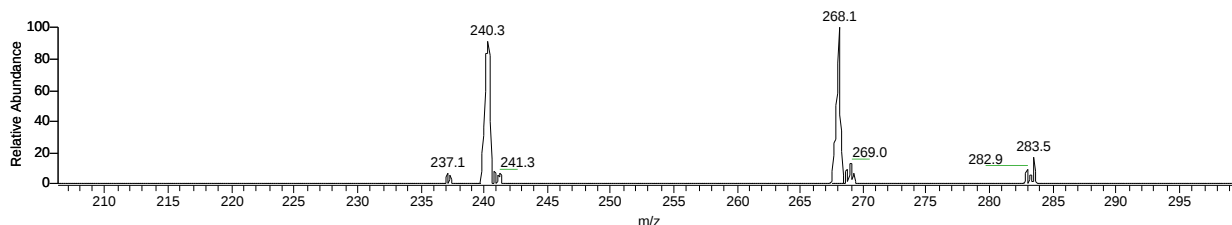


Figure V.23 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction VR F12, Courant ionique en mode SIM [ion : 283], Spectre MS² [ion parent : 283] à RT = 43.2 minutes

V.4.4- Etude du bois sain

L'étude du bois sain montre la présence de l'acide 4-hydroxy-benzoïque et du 4-hydroxy-benzaldéhyde (figure V.24).

E:\Christine\HP 1100\bois2\Bois sain

03/26/00 05:10:43 PM

RT: 0.01 - 56.78

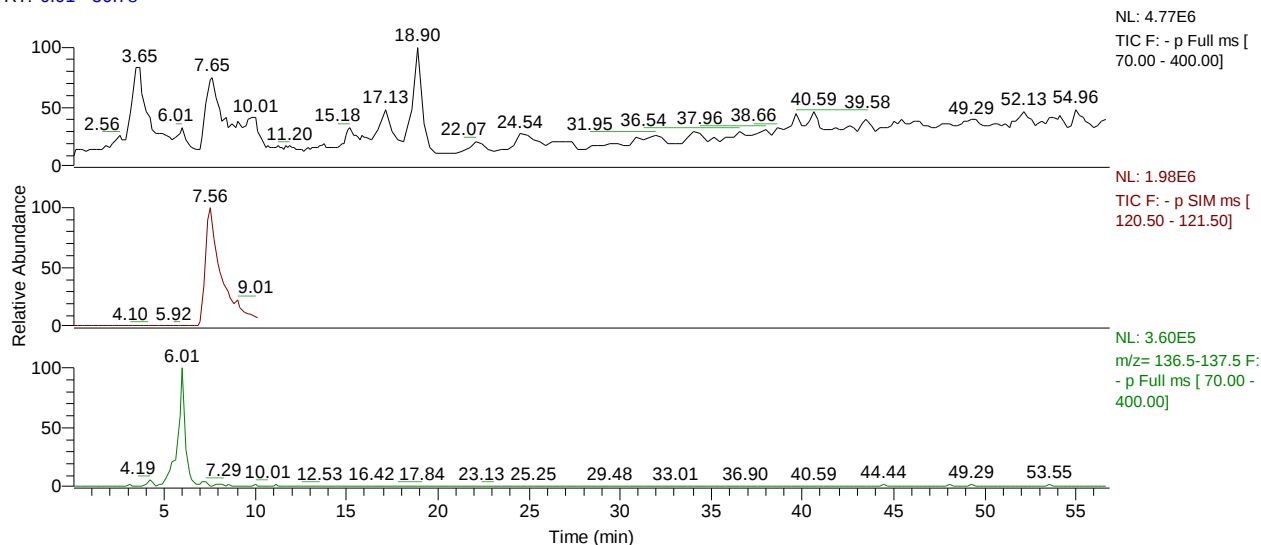


Figure V.24 : De haut en bas : Courant ionique total de l'extrait de bois sain, Courant ionique en mode SIM [ion : 121], Présence de l'ion 137 dans le courant ionique total

Aucun autre métabolite n'a pu être détecté dans le bois sain.

V.5- Etude des feuilles

V.5.1- Etude des feuilles présentant des symptômes d'esca

Les feuilles ont été extraites à l'acétate d'éthyle. L'extrait brut a ensuite été fractionné sur une colonne de silice. Les fractions ainsi obtenues ont toutes été étudiées en LC-ESI-MS.

La recherche des différents métabolites dans la fraction la plus polaire a permis de montrer la présence d'acide 3-phényl-lactique, de 4-hydroxy-benzaldéhyde et d'acide 4-hydroxy-benzoïque (figure V.25).

Feuilles malades extrait AcOEt fracti...

04/06/00 11:28:42 AM

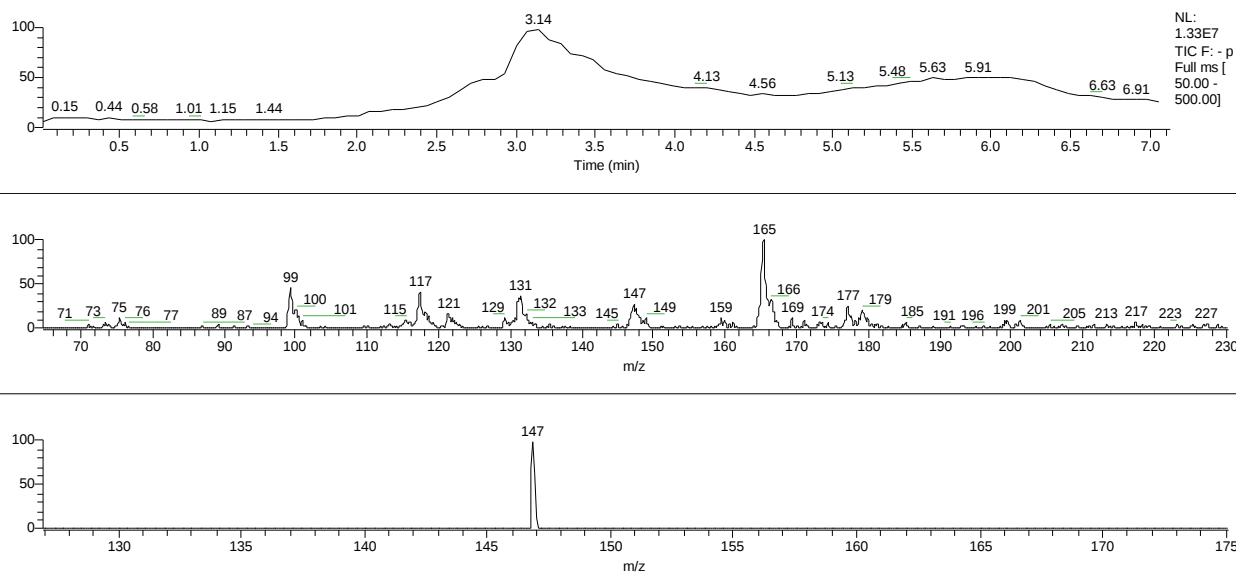


Figure V.25 : De haut en bas : Courant ionique total de la fraction la plus polaire,
Spectre Full MS à RT = 2.7 minutes, Spectre MS² [ion parent : 165] à
RT = 2,8 minutes

Aucun autre métabolite n'a pu être mis en évidence dans cette fraction. L'étude des autres fractions n'a donné aucun résultat.

V.5.2- Etude des feuilles ne présentant aucun symptôme

Seuls l'acide 4-hydroxy-benzoïque et le 4-hydroxy-benzaldéhyde ont pu être détectés dans l'extrait de feuilles saines.

V.6- Etude de la sève

Deux échantillons de 400 ml de sève ont été prélevés au printemps par le Dr Larignon. L'un provenait d'un cep apparemment sain, l'autre d'un cep présentant des symptômes de la maladie. Les extraits bruts de ces deux échantillons ont été étudiés par LC-ESI-MS. Aucun métabolite n'a pu être détecté dans ces deux extraits.

V.7- Conclusion

Cette étude par LC-ESI-MS a permis de montrer la présence de 4-hydroxy-benzaldéhyde et d'acide 4-hydroxy-benzoïque dans les extraits de bois malade et de feuilles présentant des symptômes. Ces deux composés ont également été détectés dans les extraits de bois sain et de feuilles ne présentant pas de symptômes.

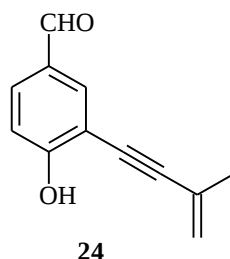
Deux autres métabolites ont été retrouvés : l'acide 3-phényl lactique dans des extraits de feuilles présentant des symptômes, et la 1-O-méthyl-émodyne dans un des extraits de bois malade. Ces deux produits n'ont pas été retrouvés dans les extraits de matériel végétal sain.

Chapitre VI

Recherche et dosage de l'eutypine dans des lyophilisats de milieux de culture d'*Eutypa lata* par LC-ESI-MS²

VI.1- But de l'étude

L'analyse des métabolites produits par *Eutypa lata* a conduit à la caractérisation d'une toxine l'eutypine **24** [28]. Sa toxicité vis à vis de *Vitis vinifera* résulte de la présence du groupement aldéhyde [34].



Notre but est de déterminer s'il existe une corrélation entre l'agressivité d'une souche d'*Eutypa lata* et la quantité d'eutypine qu'elle produit. Pour cela nous avons recherché et dosé l'eutypine dans des lyophilisats de milieux de culture obtenus par incubation de souches plus ou moins agressives d'*Eutypa lata*.

VI.2- Matériel de départ

Le classement des souches d'*Eutypa lata* en souches agressive ou non agressive a été réalisé à l'INRA de Montpellier par le Dr Péros (tableau VI.1). Il résulte de l'observation de l'intensité de l'activité toxique de ces souches sur des plants de vigne élevés en serre.

Souche	Origine géographique		Année d'isolement	Agressives	Non agressives
	Pays	Commune (Dept.)			
AM78	France	Aigues-Mortes (34)	1992	AM 78-1	AM 78-4
CM96	France	Chambolle-Musigny (21)	1993	CM 96-7	CM 96-3
FD93	France	Faye-d'Anjou (49)	1993	FD 93-4	FD 93-2
HA42	Australie	Hawthordene	1984	HA 42-5	HA 42-22
NE85	France	Neuillac (51)	1993	NE 85-8	NE 85-11
TH118	France	Theize (69)	1993	TH 118-4	TH 118-12
VL11	France	Villeneuve-les-Mag. (34)	1990		VL 11-5

Tableau VI.1 : Caractéristiques des différentes souches d'*Eutypa lata*

Nous avons reçu de l'INRA de Montpellier des lyophilisats de milieux de culture de chacune des souches d'*Eutypa lata*.

Chaque souche a été cultivée dans 40 ml de milieu D7 (dérivé du milieu de Murashige et Skoog). Après trois semaines d'incubation, le mycélium est éliminé par filtration et le filtrat lyophilisé.

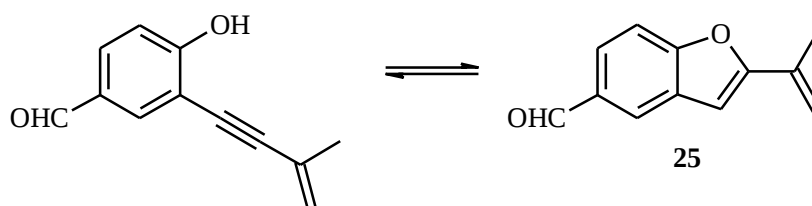
Chaque lyophilisat est alors dissout dans 100 ml d'eau distillée et extrait par deux portions de 50 ml d'acétate d'éthyle. Le solvant est ensuite éliminé.

VI.3- Recherche d'eutypine par LC-ESI-MS²

VI.3.1- Choix de la méthode

Pour cette étude nous avons choisi d'utiliser un spectromètre de masse (Finigan LCQ) comme détecteur. Ce détecteur présente deux avantages : il possède une très grande sensibilité et fournit des informations structurales sur le composé détecté.

D'autre part, il a été observé que l'eutypine se cyclisait aisément pour donner le composé 25.



Nous avons donc choisi d'utiliser une source électrospray qui permet d'une part, une ionisation très douce du composé à pression atmosphérique sans chauffage, et d'autre part, le couplage d'une HPLC (HP 1100) à un spectromètre de masse.

VI.3.2- Mise au point de la méthode

Nous avons commencé par régler les différents paramètres de la source électrospray afin d'optimiser l'ionisation de l'eutypine. Pour ce faire, nous avons injecté directement en continu une solution diluée de la toxine.

En MS simple, nous obtenons le pic moléculaire moins une unité de masse, soit 185 uma (figure VI.1).

Z:\cd\eutypine pure\eutypine 0,1 mg.ml-1

02/02/98 02:47:53 PM

S#: 861 RT: 28.47 AV: 1 NL: 4.25E5

F: - p Full ms [50.00 - 300.00]

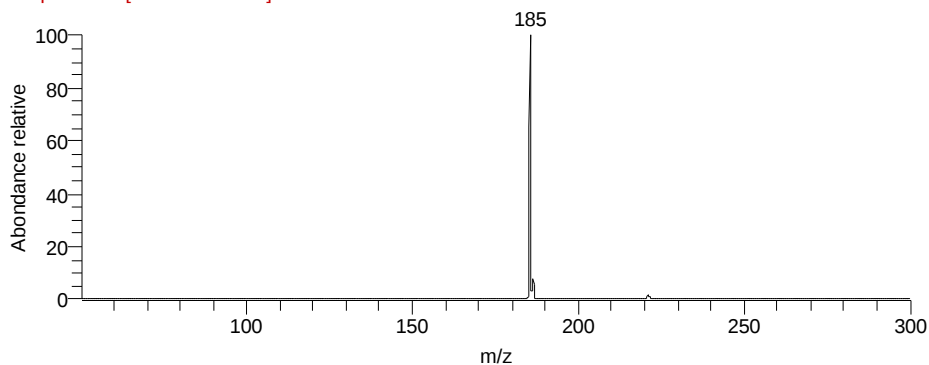


Figure VI.1 : Spectre ESI-MS de l'eutypine pure

Pour obtenir davantage d'informations structurales sur l'eutypine, l'ion 185 est sélectionné dans la trappe et fragmenté. Nous obtenons ainsi le spectre MS² de l'ion 185, caractérisé par deux ions fils principaux : l'ion 157 uma et l'ion 145 uma (figure VI.2).

Z:\cd\eutypine pure\eutypine 0,1 mg.ml-1

02/02/98 02:47:53 PM

S#: 866 RT: 28.63 AV: 1 NL: 1.38E3

F: - p d Full ms2 185.85

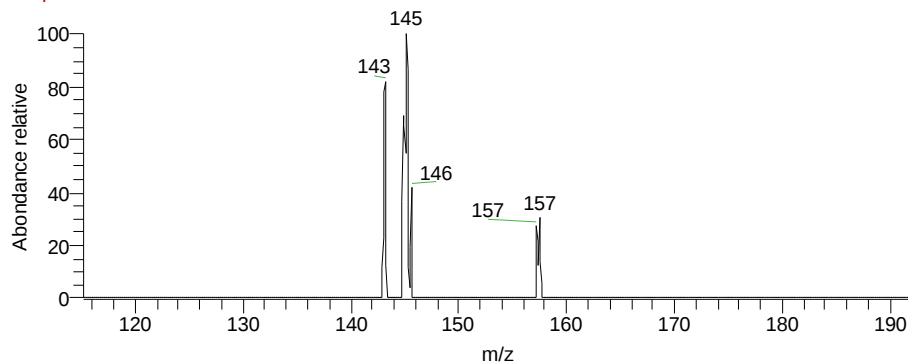
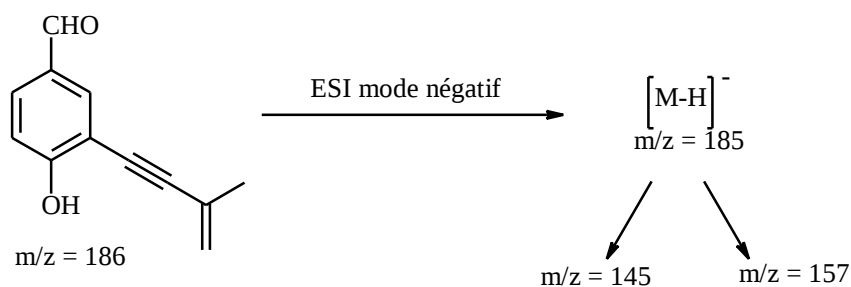


Figure VI.2 : Spectre ESI-MS² de l'ion 185 uma



20 μl d'une solution d'eutypine à 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ sont ensuite injectés en HPLC sur une colonne dotée d'une phase inverse RP-C₁₈ dont les caractéristiques sont les suivantes :

- diamètre des particules : 7 μm
- longueur de la colonne : 25 cm
- diamètre de la colonne : 4 mm

L'éluant est constitué du gradient croissant de méthanol (solvant A) dans l'eau (solvant B) suivant : 40% A (5'), de 40 % A à 100% A (60'). Le flux employé est de 1 ml/min.

L'HPLC est couplée au spectromètre de masse réglé avec les mêmes paramètres que précédemment. Deux expériences sont réalisées simultanément, avec un scan sur deux consacré à chacune d'entre elles. La première expérience consiste à enregistrer le courant ionique total de la MS simple entre 50 uma et 300 uma. La deuxième est l'enregistrement entre 50 uma et 200 uma du résultat de la MS/MS réalisée sur l'ion 185 uma (figure VI.3).

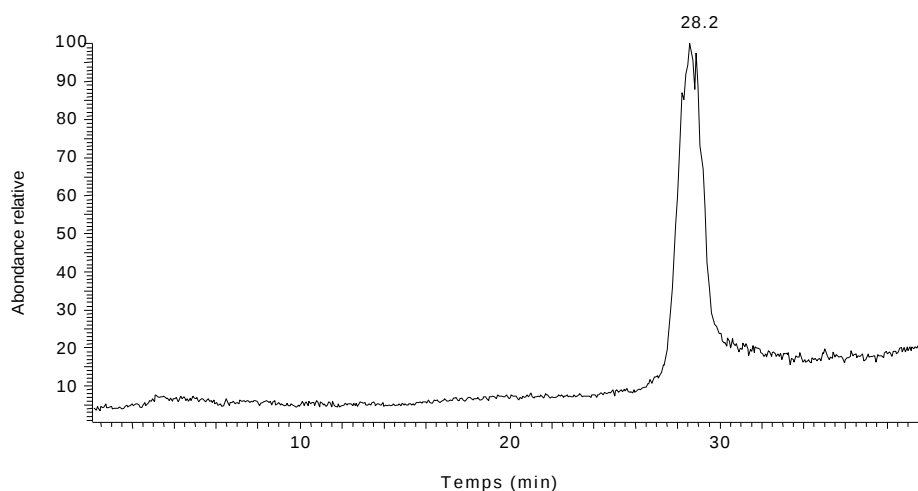


Figure VI.3 : Courant ionique total (ESI-MS en mode négatif) enregistré entre 50 et 300 uma

Les spectres correspondant aux pics à environ 28 minutes apparaissent sur les figures VI.4.

Z:\cd\eutypine pure\eutypine 0,1 mg.ml-1

02/02/98 02:47:53 PM

S#: 861 RT: 28.47 AV: 1 NL: 4.25E5

F: - p Full ms [50.00 - 300.00]

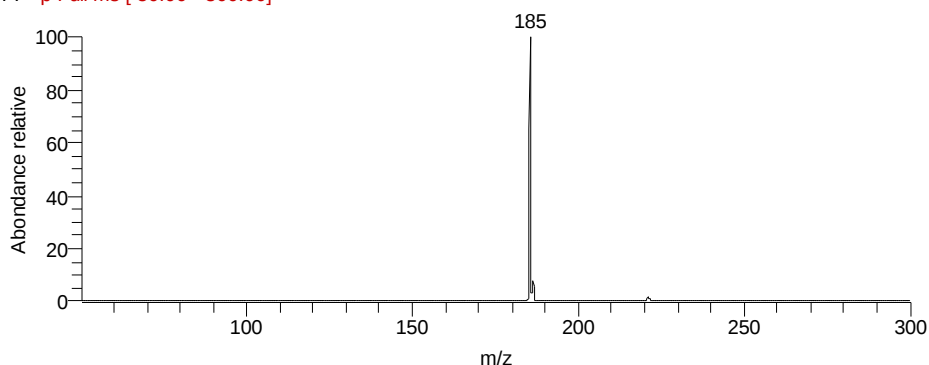


Figure VI.4a : Spectre ESI-MS mode négatif correspondant au pic à 28,47 min

Z:\cd\eutypine pure\eutypine 0,1 mg.ml-1

02/02/98 02:47:53 PM

S#: 866 RT: 28.63 AV: 1 NL: 1.38E3

F: - p d Full ms2 185.85

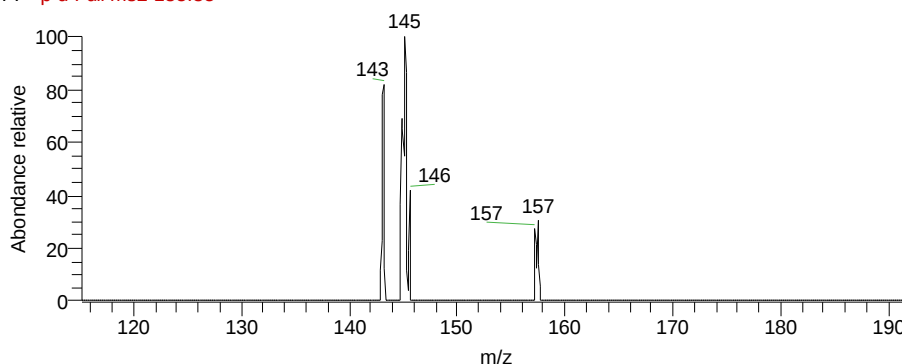


Figure VI.4b : Spectre ESI-MS² de l'ion 185 en mode négatif à 28.63 min

Le pic correspondant à l'eutypine (185 uma) apparaît à un temps de rétention d'environ 28 minutes dans les conditions utilisées. En MS², il est possible d'observer les deux ions fils principaux (157 et 145 uma) résultant de sa fragmentation.

VI.3.3- Recherche de l'eutypine dans les extraits de culture

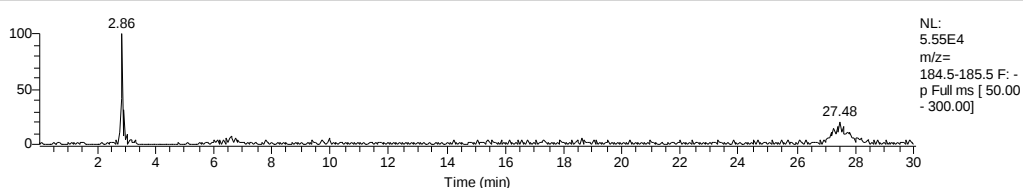
Connaissant le temps de rétention de l'eutypine dans les conditions utilisées et son comportement en électrospray, nous avons recherché cette toxine de la même manière dans les extraits des cultures des diverses souches d'*Eutypa lata*.

Les figures VI.5 présentent la recherche de l'ion 185 dans les courants ioniques totaux précédents de chacun des extraits de culture.

Souche agressive AM 78-1 :

D:\montpellier2\Am 78-1

02/13/98 06:04:22 PM

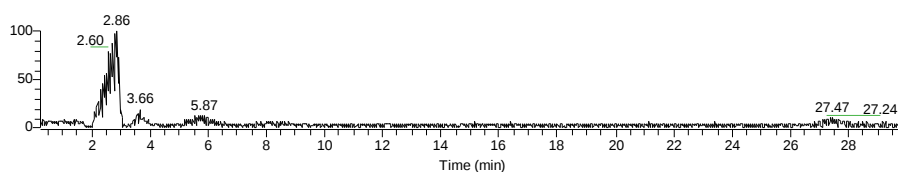


NL: 5.55E4
m/z= 184.5-185.5 F: -
p Full ms [50.00 - 300.00]

Souche non agressive AM 78-4 :

2eme injection de AM 78-4

02/18/98 04:49:49 PM

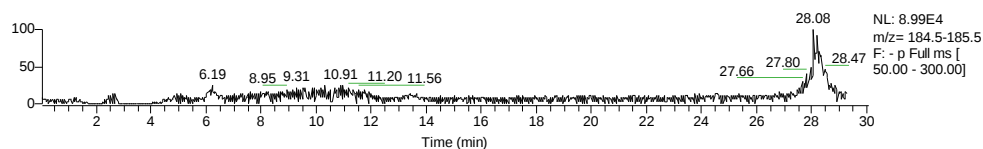


NL: 3.95E5
m/z= 184.5-185.5 F: -
p Full ms [50.00 - 300.00]

Souche agressive CM 96-7 :

D:\montpellier2\Cm 96-7

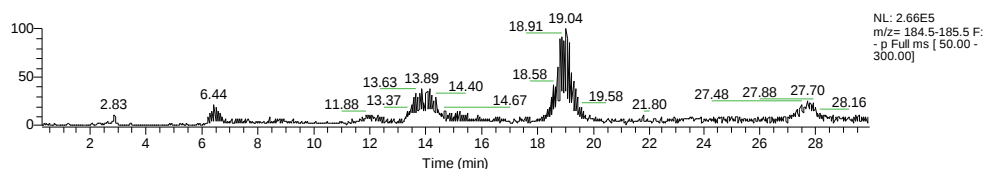
02/22/98 06:40:15 PM



Souche non agressive CM 96-3 :

D:\montpellier2\Cm 96-3

02/21/98 02:54:36 PM

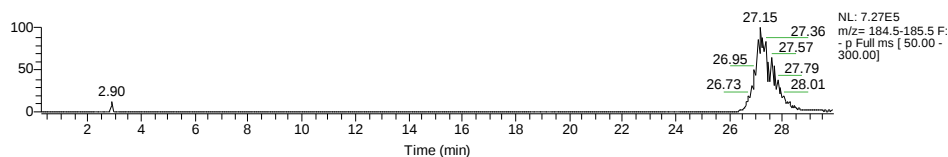


Souche non agressive FD 93-2 :

2EME INJECTION DE FD 93-2

02/09/98 06:59:28 PM

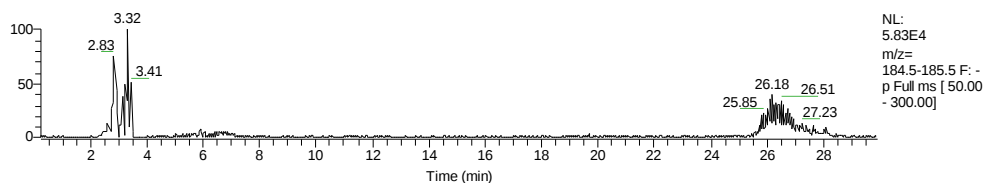
2EME INJECTION DE FD 93-2



Souche agressive FD 93-4:

D:\montpellier2\FD 93-4 2EME INJECTION

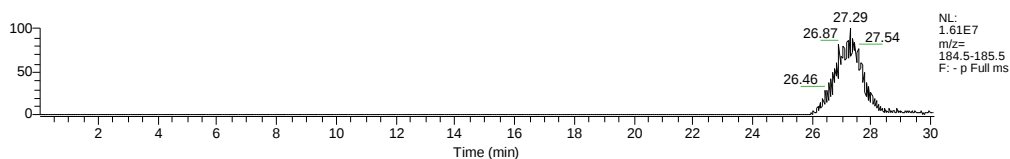
02/10/98 02:21:05 PM



Souche non agressive VL 11-5 :

D:\montpellier2\VI 11-5

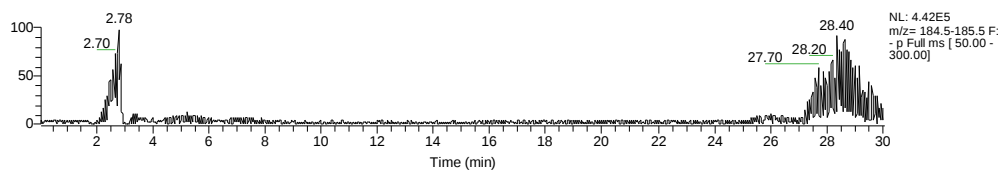
02/21/98 05:42:23 PM



Souche agressive TH 118-4 :

2eme injection de TH 118-4

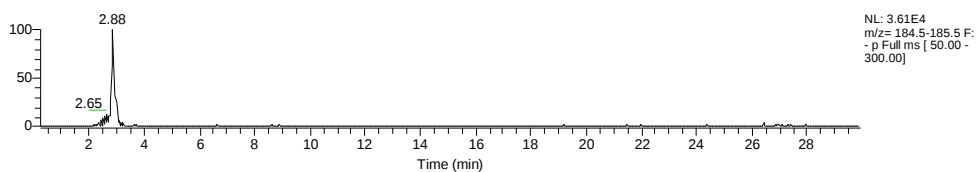
02/19/98 01:38:12 PM



Souche non agressive TH 118-12 :

D:\montpellier2\Th 118-12

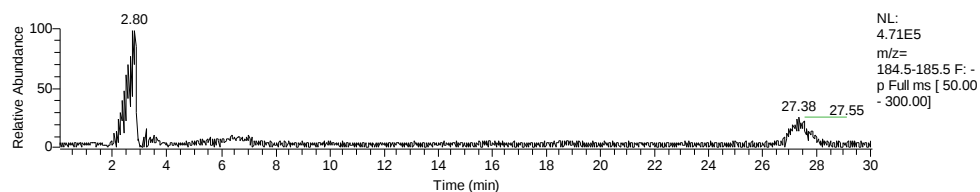
02/11/98 05:21:16 PM



Souche agressive NE 85-8 :

2eme injection de NE 85-8

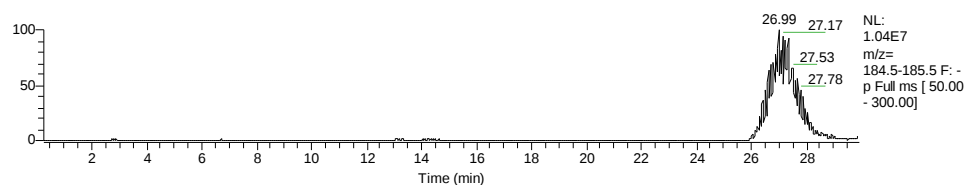
02/20/98 03:12:55 PM



Souche non agressive NE 85-11 :

D:\montpellier2\Ne 85-11

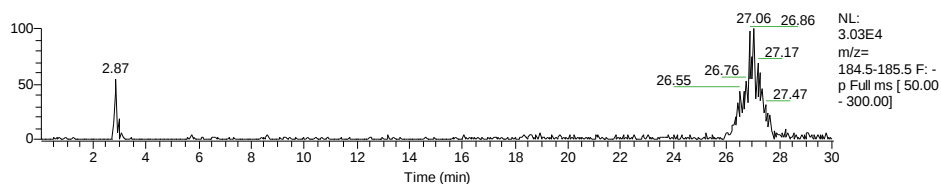
02/22/98 02:09:06 PM



Souche non agressive HA 42-22 :

3eme injection de HA 42-22

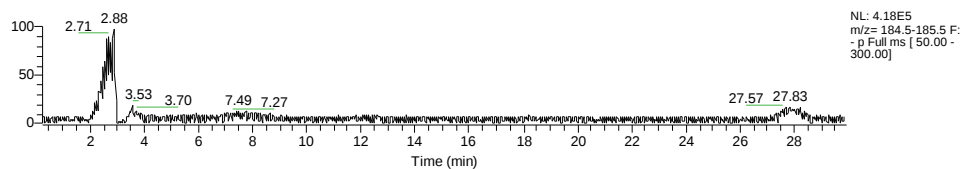
02/13/98 10:15:46 AM



Souche agressive HA 42-5 :

D:\montpellier2\Ha 42-5

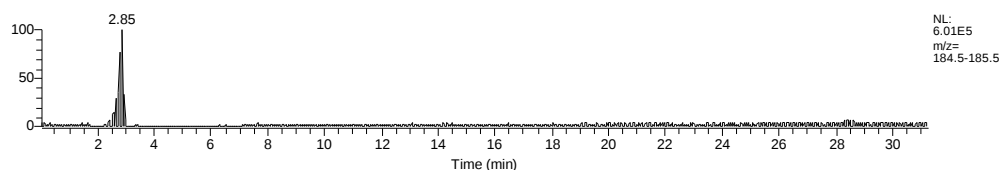
02/17/98 03:54:43 PM



Témoin T :

D:\montpellier2\2eme injection de T

02/20/98 07:30:14 PM



Figures VI.5 : Présence de l'ion 185 dans le courant ionique total de chacune des extraits de culture

Les figures VI.6 correspondent aux spectres ESI-MS² sur l'ion 185 obtenus au temps de rétention d'environ 28 minutes.

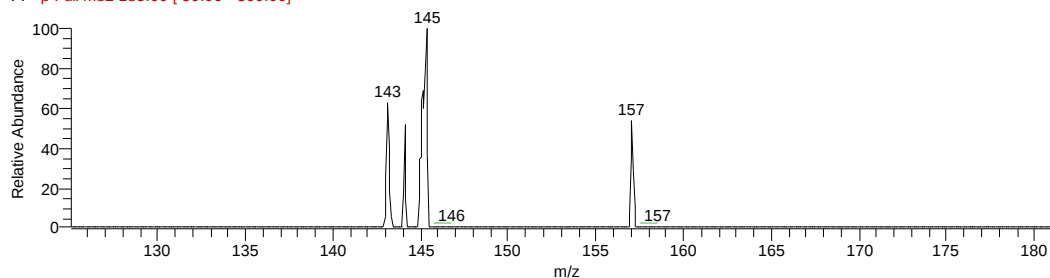
Souche non agressive VL 11-5 :

D:\montpellier2\VI 11-5

02/21/98 05:42:23 PM

S#: 1766 RT: 27.22 AV: 1 NL: 3.52E4

F: - p Full ms2 185.00 [50.00 - 300.00]



Souche non agressive FD 93-2 :

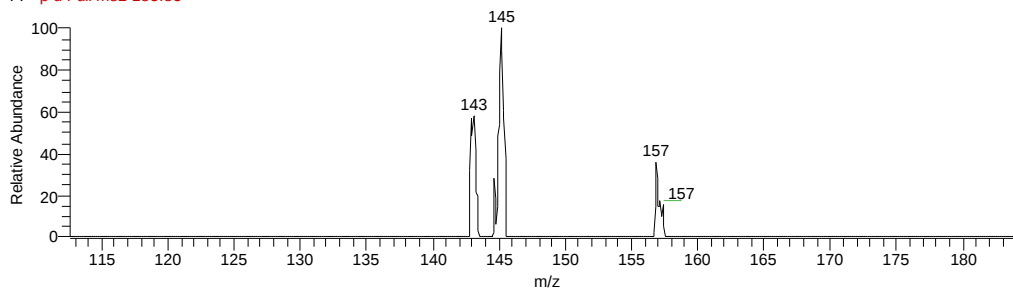
2EME INJECTION DE FD 93-2

02/09/98 06:59:28 PM

2EME INJECTION DE FD 93-2

S#: 819 RT: 27.19 AV: 1 NL: 1.31E3

F: - p d Full ms2 185.85



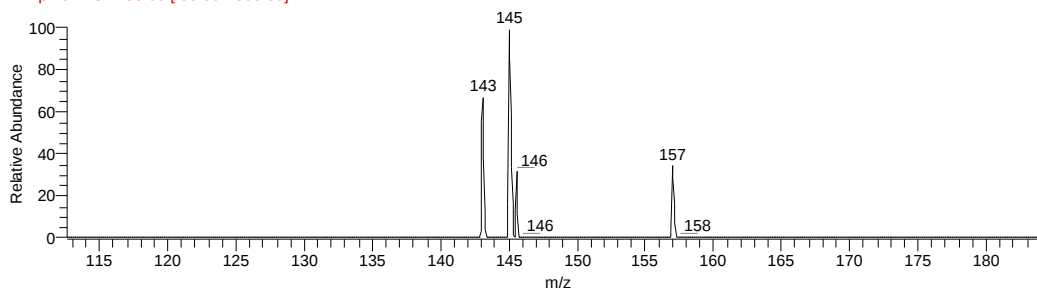
Souche non agressive NE 85-11 :

D:\montpellier2\Ne 85-11

02/22/98 02:09:06 PM

S#: 1673 RT: 26.94 AV: 1 NL: 3.03E4

F: - p Full ms2 185.00 [50.00 - 300.00]



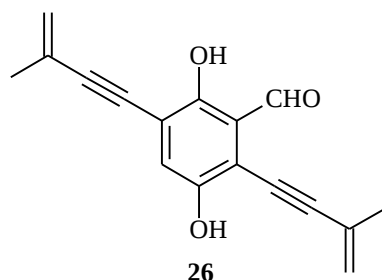
Figures VI.6 : spectres ESI-MS² sur l'ion 185 uma (RT= 28 minutes)

VI.4- Dosage de l'eutypine par LC-ESI-MS

VI.4.1- Méthode

Pour cette expérience, nous n'avons pas modifié les paramètres de la source électrospray. Par contre, le gradient croissant de méthanol (solvant A) dans l'eau (solvant B) a été changé afin de réduire le temps de rétention de l'eutypine. Les nouvelles conditions chromatographiques sont : 50% A (5'), de 50% A à 100% A (30'), toujours avec un flux de 1 ml.min⁻¹.

Le dosage de l'eutypine a été réalisé par la méthode du standard interne. La molécule étalon choisie est le stéréhirsutinal **26**, toxine isolée de *Stereum hirsutum* [35]



L'utilisation de cette molécule présente plusieurs avantages :

- ➔ Sa structure est proche de celle de l'eutypine, ce qui permet d'obtenir une bonne ionisation en électrospray dans les conditions optimisées pour la toxine d'*Eutypa lata*.
- ➔ Elle est moins polaire que l'eutypine de part la présence d'une deuxième chaîne acétylénique. Son temps de rétention ne coïncide donc pas avec celui de l'eutypine, dans les conditions utilisées.
- ➔ Elle n'est pas présente dans les extraits de milieux de culture d'*Eutypa lata*

L'injection d'une solution contenant les deux toxines montre que dans les conditions employées, l'eutypine et le stéréhirsutinal ont des temps de rétention respectifs de 16 et 28,5 minutes (figure VI.7)

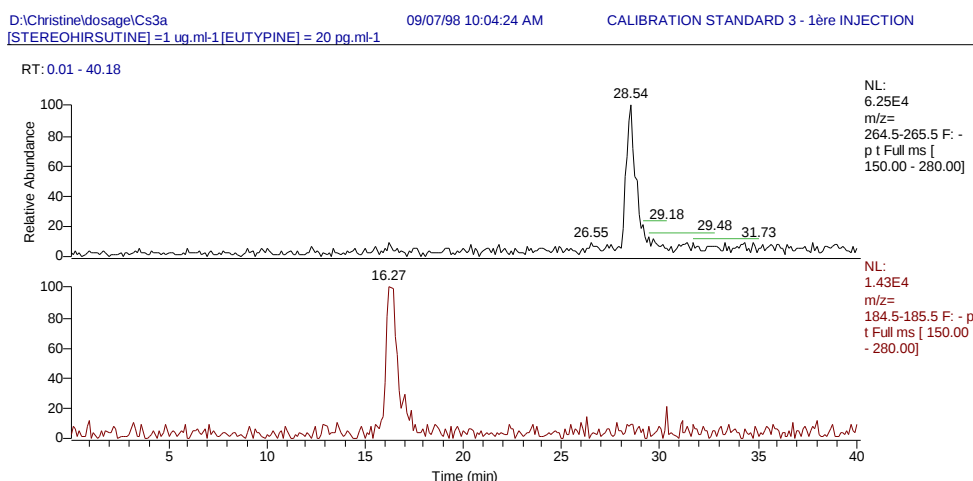


Figure VI.7 : De haut en bas : Présence de l'ion 265 dans le courant ionique total ; présence de l'ion 185 dans le courant ionique total.

VI.4.2- Courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage a été réalisée à partir de douze solutions de calibration contenant 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (soit 1 ppm) de stéréohirsutinal et les concentrations suivantes d'eutypine : 1, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 ng.ml^{-1} . Chaque solution standard est injectée trois fois.

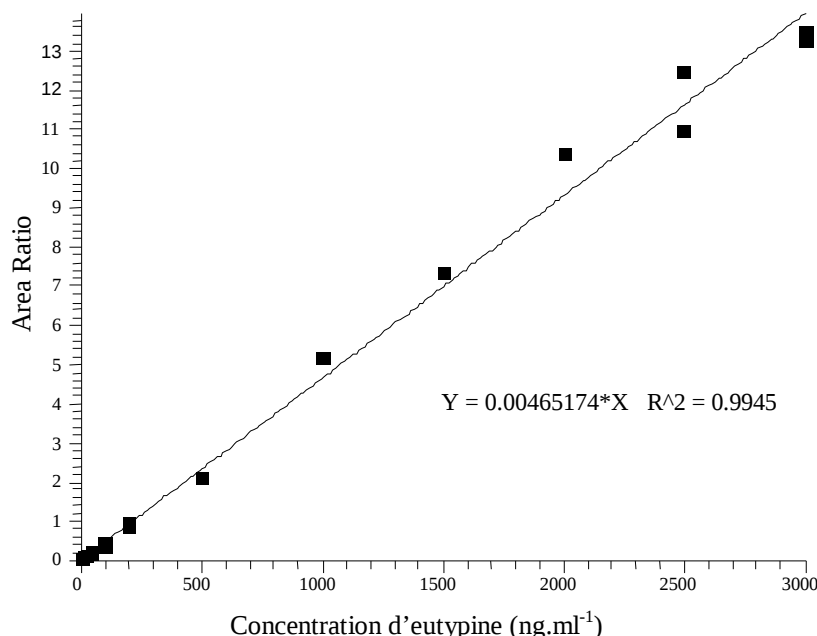
Afin d'améliorer la sensibilité de détection, l'eutypine et le stéréohirsutinal furent recherchés par SIM (single ion monitoring) en ESI mode négatif. En mode SIM, les ions formés sont stockés dans l'analyseur de masse, ici la trappe ionique du LCQ. On sélectionne ensuite une masse donnée, par exemple 185 uma. Seuls les ions de m/z sélectionné sont expulsés de la trappe et détectés. Ce mode présente deux avantages:

- ➔ Le balayage ne se fait que sur un intervalle de masse réduit, permettant d'obtenir plus de scans dans un même laps de temps
- ➔ La sensibilité est accrue car seuls les ions sélectionnés sont détectés

Les aires des pics obtenus sur les chromatogrammes en mode SIM de l'eutypine et de la stéréohirsutine sont intégrées. La courbe d'étalonnage est obtenue en représentant la fonction suivante:

$$f ([\text{Eutypine}]) = \frac{\text{Aire du pic de l'eutypine}}{\text{Aire du pic du stéréohirsutinal}}$$

Ce qui nous donne la courbe suivante:



La fiabilité de cette courbe a été vérifiée par l'injection de solutions de contrôle qui renferment 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de stéréohirsutinal et les concentrations suivantes d'eutypine : 50, 150, 800, 2500, 3000 ng.ml^{-1} . Les résultats sont présentés dans le tableau VI.2.

Solution	Conc. Attendue	Conc. Calculée	% de différence
QC 1	3000 ng.ml ⁻¹	2927 ng.ml ⁻¹	-2 %
QC 2	2500 ng.ml ⁻¹	2540 ng.ml ⁻¹	2 %
QC 3	800 ng.ml ⁻¹	791 ng.ml ⁻¹	-1 %
QC 4	150 ng.ml ⁻¹	154 ng.ml ⁻¹	3 %
QC 5	50 ng.ml ⁻¹	56 ng.ml ⁻¹	12 %

Tableau VI.2 : Détermination de la concentration en eutypine contenue dans des échantillons de contrôle à l'aide de la courbe d'étalonnage

VI.4.3- Dosage de l'eutypine dans les extraits de culture

Après l'extraction à l'acétate d'éthyle des milieux de culture, le solvant est évaporé. Nous rajoutons alors 100 µl d'une solution de stéréihirsutinal à 10 mg.ml⁻¹ et 900 µl de méthanol bidistillé pour arriver à un volume total de 1 ml. 20 µl des solutions ainsi obtenues sont injectées.

Après intégration de l'aire des pics, la concentration d'eutypine contenue dans chaque extrait est déterminée et reportée dans le tableau VI.3.

Souche	Concentration d'eutypine (en ng.ml ⁻¹)
AM 78-1	47
AM 78-4	20
CM 96-7	Non détectée
CM 96-3	3
FD 93-4	2987
FD 93-2	457
HA 42-22	730
HA 42-5	23
NE 85.8	946.5
NE 85-11	202.5
TH 118-12	140
TH 118-4	148
VL 11-5	2197
Témoin négatif	/

Tableau VI.3 : Concentration d'eutypine contenue dans les différents extraits de culture

La concentration d'eutypine dans les 40 ml de milieu d'origine est reportée dans le tableau VI.4.

Souche	Concentration d'eutypine (en ng.ml^{-1})
AM 78-1	1.175
AM 78-4	0.5
CM 96-7	/
CM 96-3	0.075
FD 93-4	74.675
FD 93-2	11.425
HA 42-22	18.25
HA 42-5	0.575
NE 85.8	23.66
NE 85-11	5.06
TH 118-12	3.5
TH 118-4	3.7
VL 11-5	54.925
Témoin négatif	/

Tableau VI.4 : Concentration d'eutypine dans les 40 ml de milieu de culture d'*Eutypa lata*

VI.4.4- Conclusion

Pour les couples de souches d'origine française, nous pouvons remarquer que, dans la majorité des cas, les souches agressives renferment plus d'eutypine que les souches non agressives correspondantes.

Deux exceptions sont à noter :

- ➔ le couple CM 96-7/CM96-3 : l'eutypine n'a pu être détectée dans la souche aggressive CM 96-7. Cependant, elle est présente en quantité voisine de la limite de détection dans l'extrait du milieu de culture de CM 96-3.
- ➔ Le couple TH 118-4/TH 118-12 : l'eutypine est présente en quantité similaire.

Par contre, pour le couple de souches d'origine australiennes, on remarque que la souche non aggressive HA 42-22 renferme beaucoup plus d'eutypine que la souche non aggressive HA 42-5.

Cependant, si l'on compare les couples de souches entre eux, on remarque que certaines souches non agressives comme VL 11-5 produisent beaucoup plus d'eutypine que des souches agressives comme AM 78-1. Il n'y a donc pas de corrélation directe entre la quantité d'eutypine produite et l'agressivité des souches.

Chapitre VII

Discussion

VII.1- Milieux de culture

VII.1.1- *Phaeoacremonium aleophilum*

Au cours de ce travail, nous avons rencontré beaucoup de problèmes pour cultiver en milieu liquide *Phaeoacremonium aleophilum*. Le milieu d'Eriksson et Petersson, satisfaisant pour la culture de *Phaeoacremonium chlamydosporum*, n'est pas adéquat pour *Phaeoacremonium aleophilum*. La substitution du glucose par le saccharose permet de pratiquement doubler la biomasse. Mais même en présence de ce sucre, la croissance du mycélium reste insuffisante. L'évolution du pH des milieux de culture testés en fonction du temps témoigne d'une importante production de composés acides par le champignon. Nous pouvons donc supposer qu'un tel milieu acide (pH ~ 3.5) inhibe le développement du mycélium.

Au laboratoire de microbiologie de l'université de Neuchâtel, le Dr. Oberson a amélioré la culture en milieu liquide de *Phaeoacremonium aleophilum*. La croissance de ce champignon est améliorée lorsque l'on incube les divers milieux à l'aide des spores provenant d'un milieu de culture de quelques jours. D'autre part, la biomasse obtenue est importante lorsque ce champignon est cultivé sur un milieu à base d'extrait de malt, à l'obscurité et en absence d'agitation. Après 13 jours d'incubation, le milieu de culture à base d'extrait de malt a été filtré et extrait à l'AcOEt. Nous avons alors évalué sa composition par HPLC, en utilisant le programme de référence (figure VII.1). Sa toxicité a été révélée par le test réalisé sur carrés de feuilles de vigne.

Le chromatogramme obtenu montre que le champignon semble produire des métabolites un peu moins polaires sur ce milieu à base d'extrait de malt. Le pH de ce milieu avant l'extraction est de 4,5. La quantité d'extrait brut acquise (110 mg pour 7 litres de milieu de culture) est plus importante que lors des cultures sur milieu dérivé d'Eriksson et Petersson. D'autre part, l'extrait brut testé sur carrés de feuilles de vigne est capable d'induire des nécroses. Il serait maintenant intéressant d'étudier l'influence du temps de culture sur la production des métabolites secondaires.

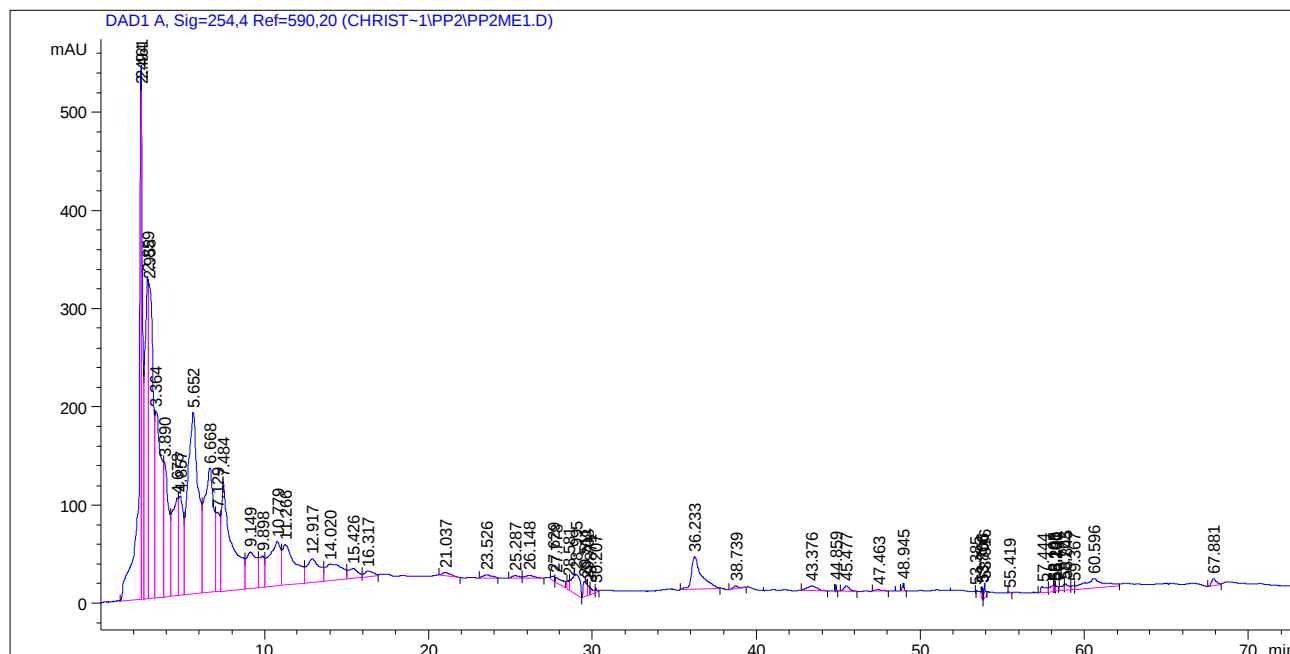


Figure VII.1 : Chromatogramme HPLC d'un extrait brut de *Phaeoacremonium aleophilum* cultivé sur un milieu à base d'extrait de malt

VII.1.2- *Fomitiporia punctata*

Ce champignon a été cultivé sur un milieu à base de carottes. Bien que ce milieu favorise la croissance du champignon, il n'est pas idéal dans le cadre de notre étude. L'origine de certains métabolites dans le milieu, comme la 6-méthoxy-melléine, est ambiguë. En effet, bien que ce métabolite ait été isolé de nombreux champignons [60, 93, 94, 95, 96], c'est également une phytoalexine connue produite par les racines des carottes [87, 88, 89, 90, 91, 92].

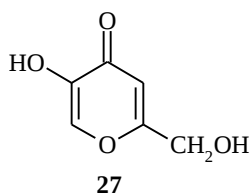
VII.2- Origine biosynthétique des métabolites [104, 116]

Le métabolisme primaire d'un organisme est constitué d'un ensemble de réactions chimiques catalysées par des enzymes. Il a pour but de fournir à l'organisme l'énergie dont il a besoin, ainsi que des intermédiaires synthétiques et les macromolécules essentielles comme l'ADN et les protéines. Ce métabolisme est pratiquement le même pour tous les systèmes vivants.

Le métabolisme secondaire, quant à lui, implique des processus synthétiques dont les produits finaux ne semblent pas contribuer au fonctionnement fondamental de l'organisme. Il est souvent espèce, voir même souche, spécifique.

Les métabolites secondaires dérivent d'intermédiaires biosynthétiques du métabolisme primaire. Une des hypothèses émises pour expliquer leur production est qu'ils constituent une voie d'élimination d'intermédiaires du métabolisme primaire qui autrement s'accumuleraient dans l'organisme. Ces métabolites secondaires permettraient ainsi de maintenir opérationnelles les réactions primaires en présence, par exemple, d'un excès d'hydrate de carbone.

La plupart des organismes hétérotrophes utilisent le glucose comme source de carbone et d'énergie. Quelques métabolites secondaires, comme l'acide kojique **27**, dérivent directement du glucose [105,106].



Mais la majorité est issue des intermédiaires des différentes voies de dégradation du glucose. Chez les champignons, il en existe trois :

- ☞ deux voies principales : la voie d'Embden-Meyerhof et le cycle des pentoses.
- ☞ une voie minoritaire : la voie d'Entner-Doudoroff.

Trois processus biochimiques sont alors utilisés pour modifier les produits du métabolisme primaire :

- ☞ Oxydation et réduction : réactions catalysées par deux types d'enzymes :
 - Les deshydrogénases : l'hydrogène est transféré à l'oxygène moléculaire par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire.
 - Les oxydases : enzymes catalysant l'introduction d'un atome d'oxygène dans les terpénoides et les stéroïdes, et dans les composés dérivés des polycétides.
- ☞ Méthylation : Transfert du groupe méthyle d'une méthionine via l'acide tétrahydrofolique.
- ☞ Halogénéation : par l'intermédiaire de chloroperoxydase par exemple [107,108].

VII.2.1- Acide *p*-hydroxy-benzoïque (1)

L'acide *p*-hydroxy-benzoïque est un intermédiaire clef dans la biosynthèse de plusieurs métabolites secondaires, comme par exemple chez les plantes, l'ubiquinone [109] et la shikonine [110]. Il a été démontré que l'acide 4-hydroxy-benzoïque avait pour origine biosynthétique l'acide shikimique, *via* la voie du préphénate-cinnamate, par dégradation de la chaîne latérale de l'acide cinnamique (figure VII.2) [111].

Deux mécanismes de rupture de la chaîne latérale de l'acide coumarique ont été proposés. Le premier, décrit par Zenk, correspond à une réaction dont le mécanisme est analogue à celui de la β -oxydation des acides gras [112]. Il fait ainsi intervenir plusieurs cofacteurs comme l'ATP et le coenzyme A (CoA) (figure VII.3). Par contre, chez le basidiomycète *Polyporus hispidus*, la conversion enzymatique de l'acide *p*-coumarique en acide *p*-hydroxy-benzoïque ne dépend pas de la présence de ces deux cofacteurs [113]. Ce champignon semble donc utiliser une autre voie décrite par Gross [111]. Elle implique une dégradation non-oxydative de la chaîne latérale de l'acide *p*-coumarique, suivie d'une oxydation du dérivé benzaldéhydique résultant (figure VII.4).

Cependant, *Polyporus tumulus* Cooke est capable de synthétiser ce métabolite par la voie de l'acide shikimique, *via* la tyrosine et non la phénylalanine [114] (figure VII.5). Chez les bactéries, par contre, ce métabolite est directement formé à partir de l'acide chlorismique [115].

La présence du *p*-hydroxy-benzaldéhyde dans les milieux de culture de *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* et *Fomitiporia punctata* indique que ces champignons utilisent un mécanisme de dégradation non-oxydatif pour biosynthétiser l'acide *p*-hydroxy-benzoïque à partir de l'acide *p*-coumarique.

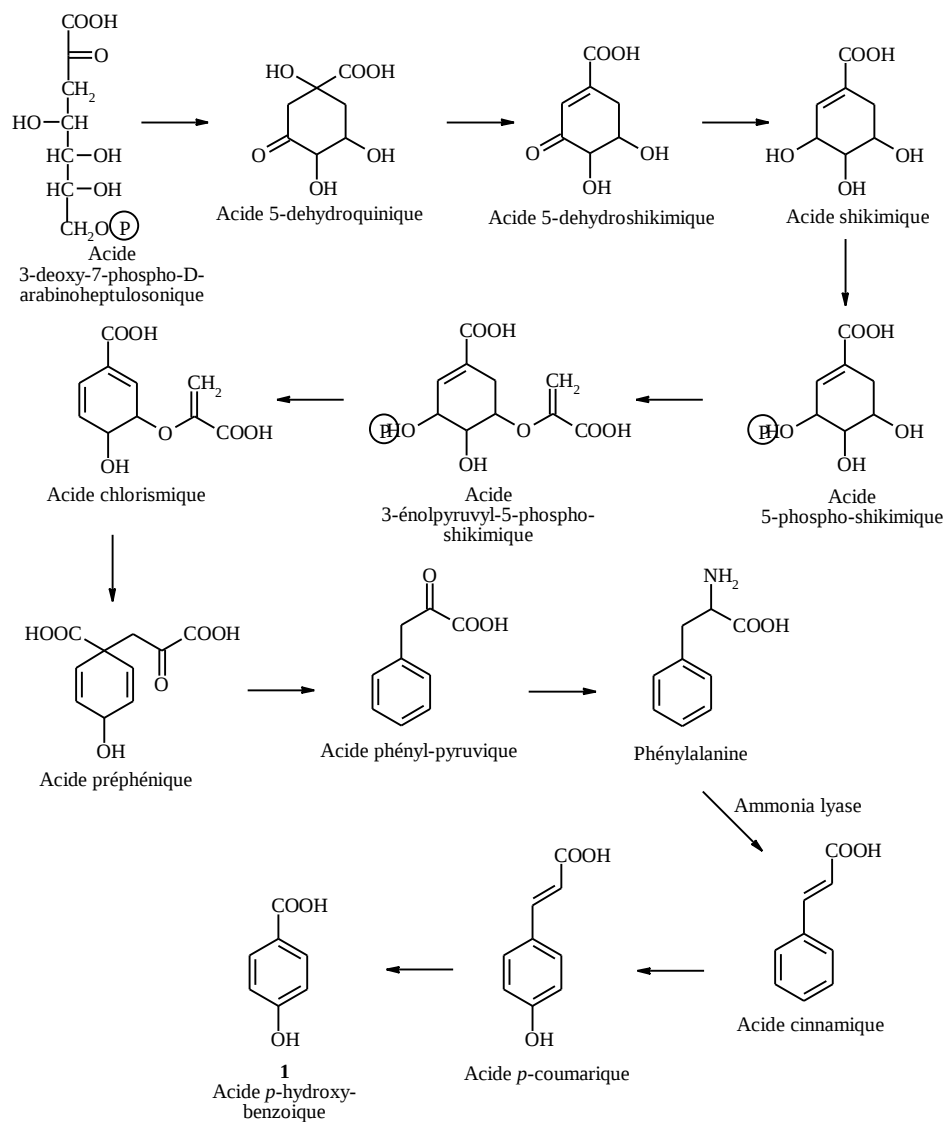


Figure VII.2 : Voie de biosynthèse de l'acide *p*-hydroxy-benzoïque (1) via la voie du préphénate-cinnamate

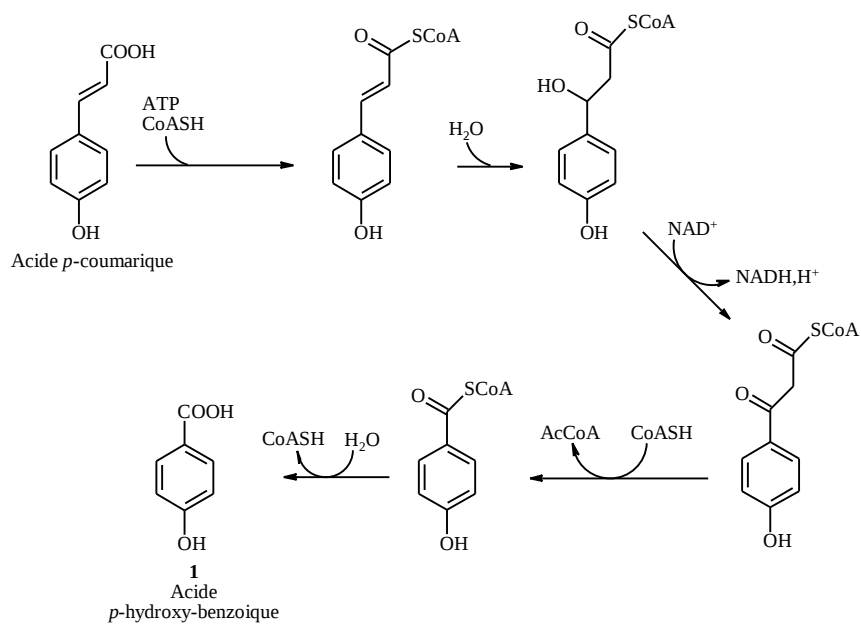


Figure VII.3 : Mécanisme de rupture de la chaîne latérale de l'acide *p*-coumarique similaire à la β -oxydation des acides gras

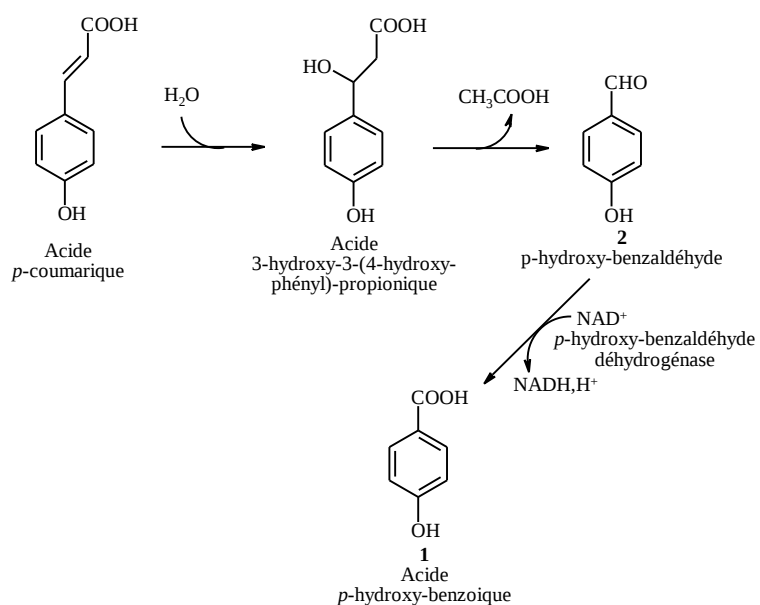


Figure VII.4 : Mécanisme non-oxydatif de dégradation de la chaîne latérale de l'acide *p*-coumarique

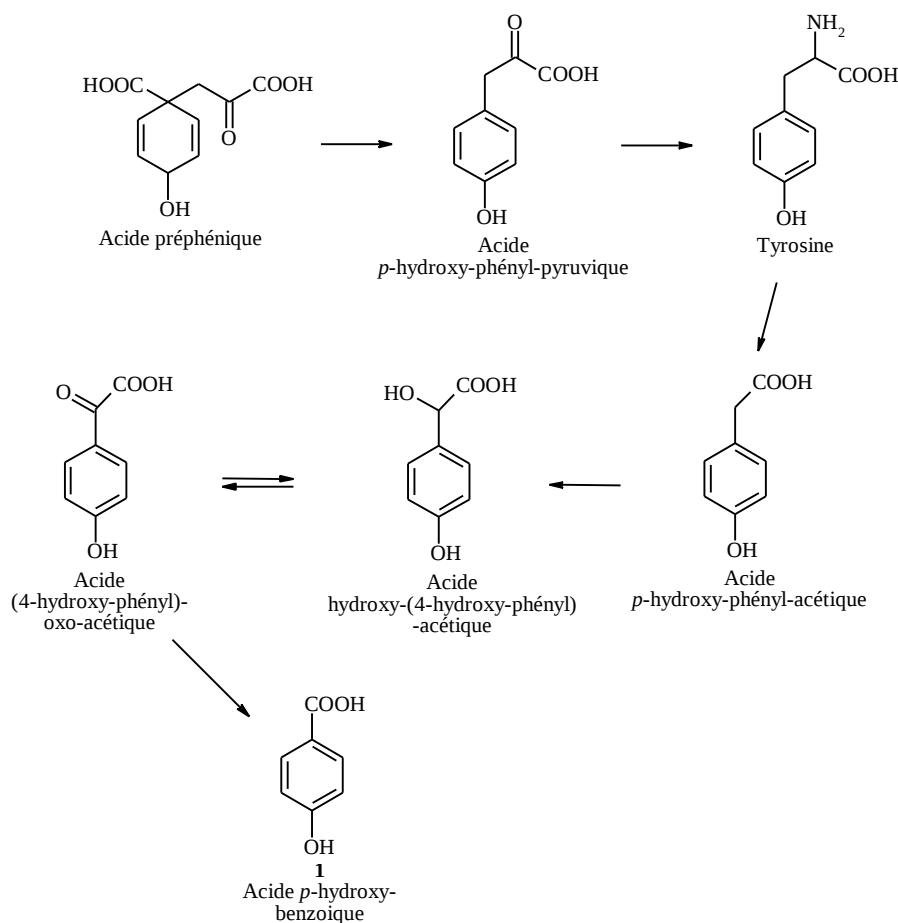


Figure VII.5 : Biosynthèse de l'acide *p*-hydroxy-benzoïque (1) chez *Polyporus tumulus* Cooke

VII.2.2- *p*-Hydroxy-benzaldéhyde (2)

Comme nous avons pu le voir précédemment, le *p*-hydroxy-benzaldéhyde est un métabolite issu de la voie biosynthétique de l'acide shikimique. Il résulte d'une dégradation, par un mécanisme non-oxydatif, de la chaîne latérale de l'acide *p*-coumarique (figure VII.4).

VII.2.3- Tyrosol (4)

Le tyrosol est également un métabolite issu de la voie de l'acide shikimique. Il a comme précurseur la tyrosine. Cet acide aminé peut être déaminé, décarboxylé ou hydroxylé suivant la voie métabolique utilisée par le champignon [116].

Le tyrosol peut être synthétisé par décarboxylation de la tyrosine en tyramine, suivie d'une déamination et d'une hydroxylation de cet intermédiaire (figure VII.6).

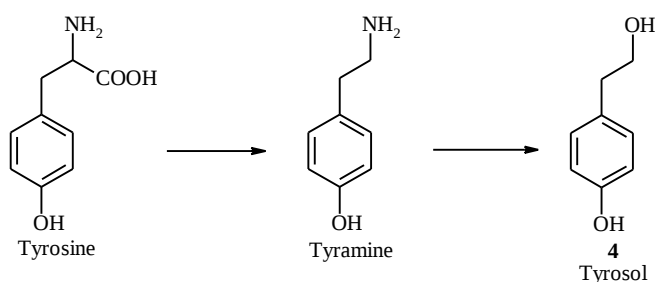


Figure VII.6 : Biosynthèse du tyrosol (4) par décarboxylation de la tyrosine

Cependant une deuxième voie de biosynthèse du tyrosol a été mise en évidence chez différentes espèces pathogènes et non-pathogènes de *Candida* sp. [117]. Elle commence par la déamination oxydative de la tyrosine en acide 4-hydroxyphénylpyruvique. Ce dernier subit alors une décarboxylation non oxydative en 4-hydroxy-phényl-acétaldéhyde (figure VII.7).

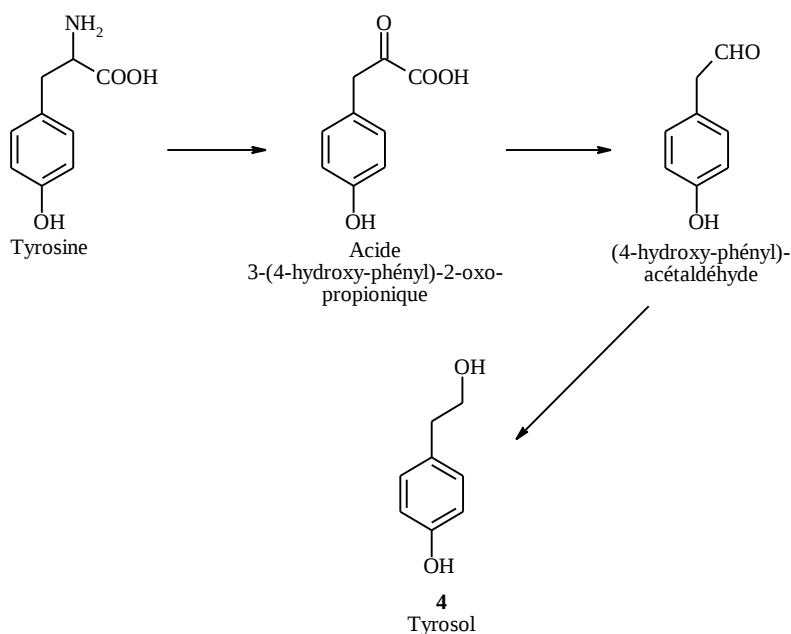


Figure VII.7 : Voie de biosynthèse du tyrosol (4) par déamination oxydative de la tyrosine

VII.2.4- Acide 3-phényl-lactique (5)

L'acide 3-phényl-lactique provient de la voie de l'acide shikimique, et plus particulièrement du métabolisme de la phénylalanine. Cet acide aminé subit tout d'abord une déamination oxydative. L'acide phényl-pyruvique est ensuite réduit en acide 3-phényl-lactique (figure VII.8).

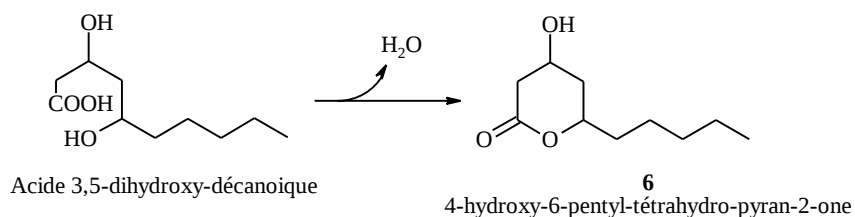


Figure VII.10 : Formation de la 4-hydroxy-6-pentyl-tétrahydro-pyran-2-one (6) par la voie des acides gras

La formation de la 4-hydroxy-6-pentyl-tétrahydro-pyran-2-one par la voie des polycétides, commence par la condensation successive de 4 malonyl CoA avec l'acétyl CoA. Le composé obtenu se cyclise, et subit alors une série d'hydrogénations, de déshydratations et de réductions (figure VII.11).

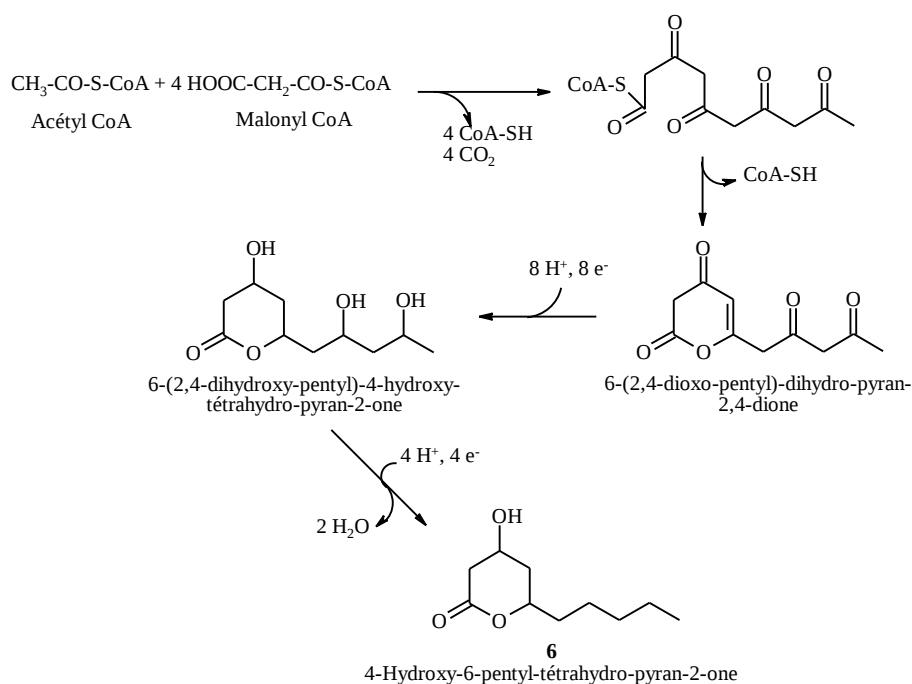


Figure VII.11 : Formation de la 4-hydroxy-6-pentyl-tétrahydro-pyran-2-one (6) par la voie des polycétides

Dans le cadre de notre étude, nous n'avons isolé ni l'acide 3,5-dihydroxy-décanoïque, ni les 6-(2,4-dioxo-pentyl)-dihydro-pyran-2,4-dione et 6-(2,4-dihydroxy-pentyl)-4-hydroxy-tétrahydro-pyran-2-one. Il nous est donc impossible de déterminer qu'elle est la voie utilisée par *Phaeoacremonium chlamydosporum*.

VII.2.6- Scytalone (7)

La scytalone est un intermédiaire dans la biosynthèse de la mélanine [72] pigment noir synthétisé par les champignons pathogènes [76]. Elle est issue de la voie des polycétides [119]. Selon les études de Wheeler, la biosynthèse de la mélanine de nombreux ascomycètes et de champignons imparfaits est réalisée à partir du 1,8-dihydroxy-naphtalène. Les basidiomycètes et quelques champignons imparfaits semblent quant à eux utilisés des voies alternatives [118].

La condensation de quatre malonyls CoA avec un acétyl CoA fournit un intermédiaire polycétonique en C₁₀. La cyclisation de cet intermédiaire aboutit à la synthèse de 1,3,6,8-tétrahydroxy-naphtalène. L'étude, chez *Phialophora labergii*, de l'incorporation de l'acétate marqué au carbone 13, a montré que la scytalone est formée par réduction du 1,3,6,8-tétrahydroxy-naphtalène [119, 120]. La réduction enzymatique du 1,3,6,8-tétrahydroxy-naphtalène en scytalone, par l'hydroxy-naphtalène réductase, a également été mise en évidence à partir d'un homogénat de cellules de *Verticillium dahliae* [121, 122].

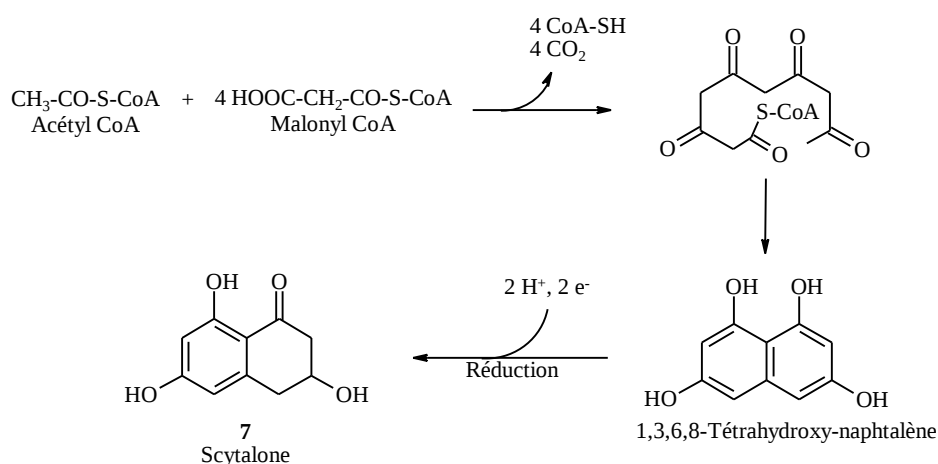


Figure VII.12 : Biosynthèse de la scytalone (7)

VII.2.7- Isosclérone (8)

Cette tétralone est également issue de la voie des polycétides [116]. Plusieurs auteurs ont rendu compte des liens qui unissent ce métabolite à la biosynthèse de la mélanine [75, 123, 124]. L'étude de la biosynthèse de la mélanine chez *Wangiella dermatidis* [75] a mis en évidence deux voies métaboliques conduisant à la production d'isosclérone (figure VII.13).

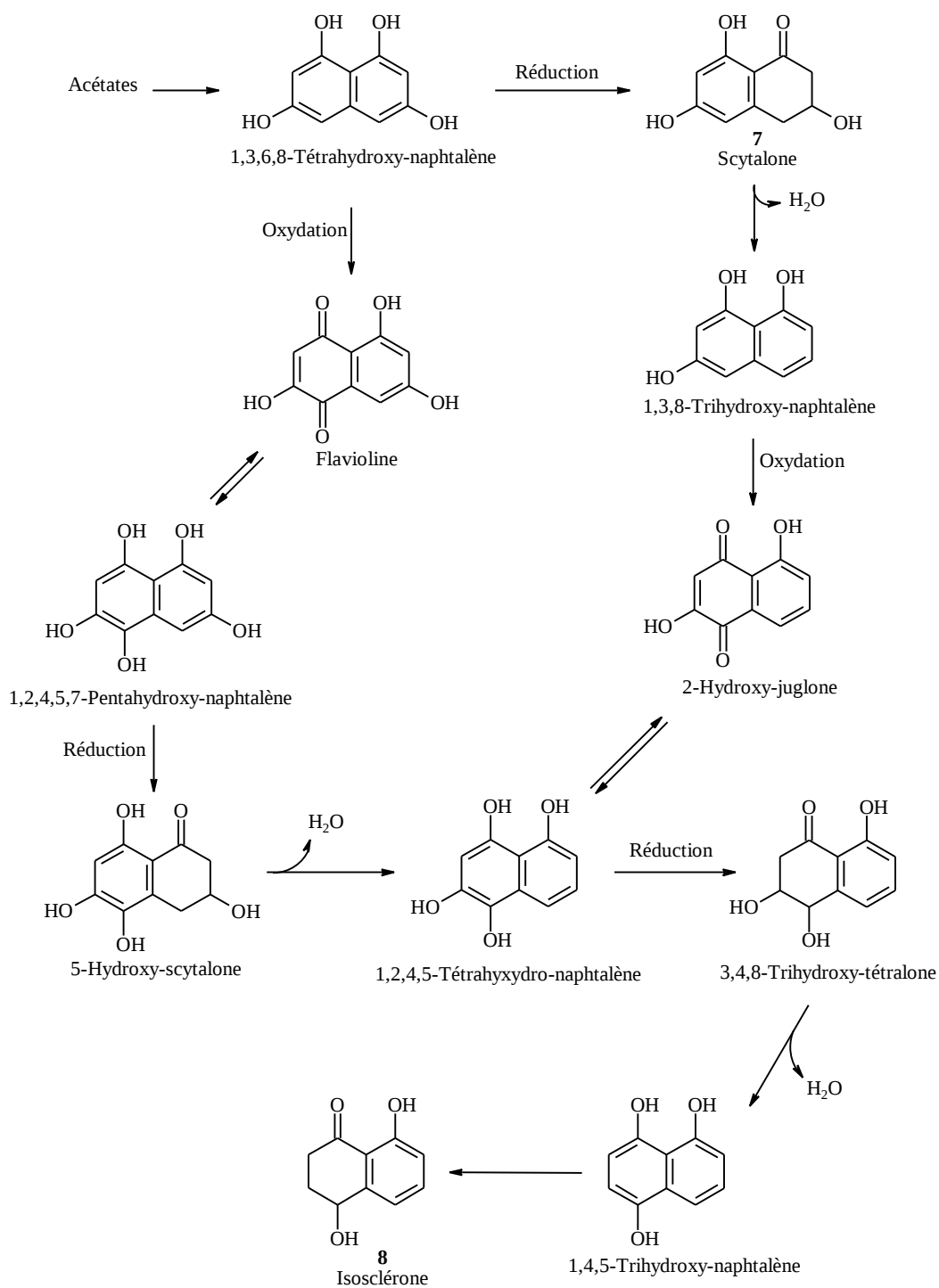
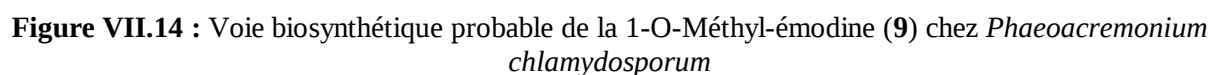


Figure VII.13 : Voie biogénétique de l'isoclérone (8) chez *Wangiella dermatidis*

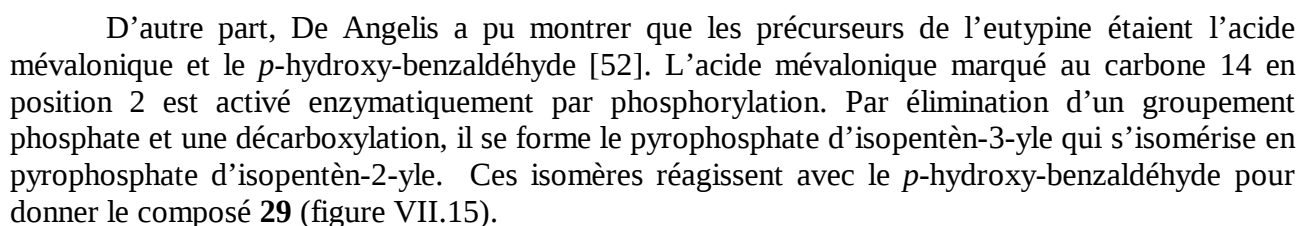
Etant donné que la scytalone est également présente dans le milieu de culture de *Phaeoacremonium chlamydosporum*, nous pouvons penser que ce champignon utilise ce métabolite pour synthétiser l'isoclérone.

La biosynthèse des anthraquinones fongiques *via* la voie des polycétides a été établie par des expériences utilisant de l'acétate et du malonate marqués au carbone 14 et/ou à l'oxygène 18 [125, 127, 128, 129].



Ce composé est un nouveau produit naturel. Son métabolisme n'a pas été étudié jusqu'à présent. Par similitude avec la biosynthèse connue de certains analogues, nous allons tenter d'expliquer sa formation par *Phaeoacremonium chlamydosporum*.

D'après les études réalisées par marquage de l'acétate au carbone 13, les chaînes O-prényl et C-prényl de la tajixanthone **28** proviennent du mévalonate [130].



Ces deux résultats nous suggèrent que l'acide 4-hydroxy-3-(3-méthyl-but-2-ényloxy)-benzoïque résulte de la condensation de l'acide 3,4-dihydroxy-benzoïque avec les isomères pyrophosphate-isopentényles issus de l'acide mévalonique. L'acide 3,4-dihydroxy-benzoïque provient de la voie de l'acide shikimique, soit par déshydratation de l'acide déhydroshikimique [131], soit par oxydation de l'acide *p*-hydroxy-benzoïque [132] (figure VII.16).

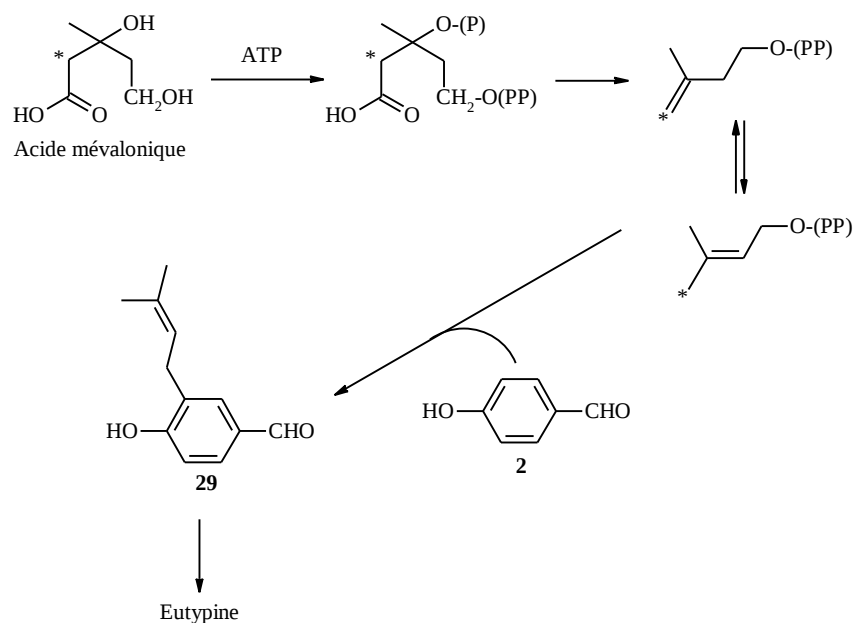


Figure VII.15 : Biosynthèse de l'eutypine

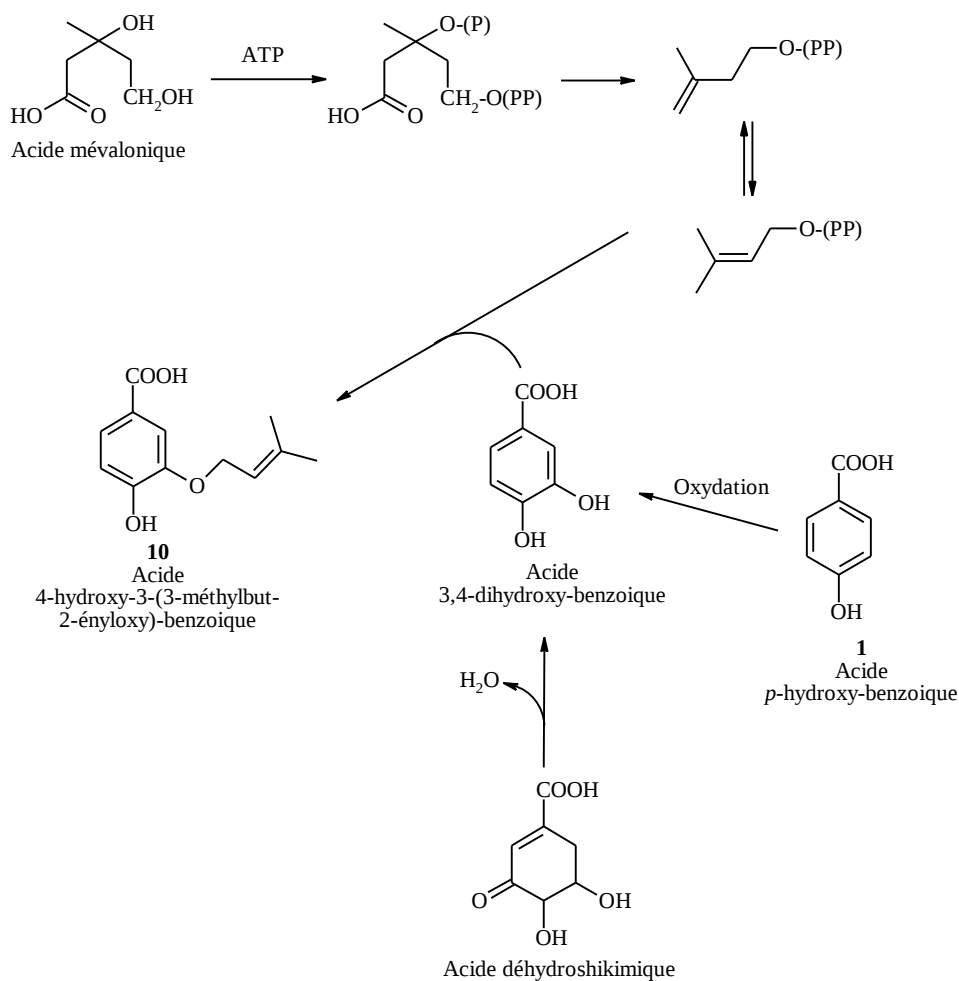


Figure VII.16 : voie de biosynthèse proposée pour l'acide 4-hydroxy-3-(3-méthylbut-2-ényloxy)-benzoïque (10)

VII.2.10- Phényl-méthanol

Ce composé dérive du glucose *via* la voie de l'acide shikimique [133].

VII.2.11- Phényl-acétate de méthyle (19)

Ce métabolite est issu de la voie de l'acide shikimique [116]. Il provient de la dégradation de la phénylalanine suivant le processus décrit dans la figure VII.17.

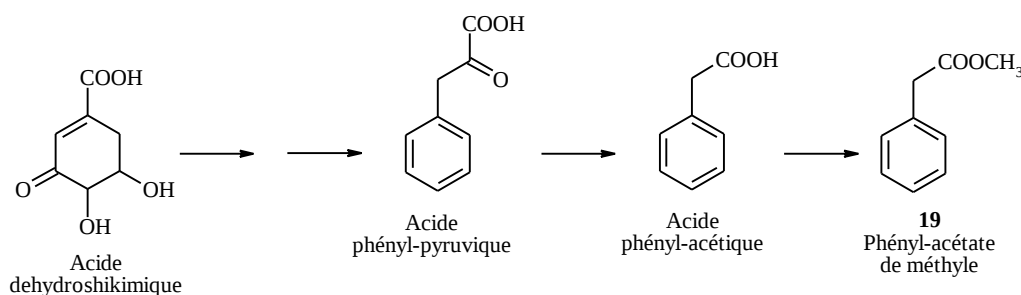


Figure VII.17 : Biosynthèse du phényl-acétate de méthyle (19)

VII.2.12- 2,2-diméthyl-6-Formyl-4-chromanone (22)

Les chromanones sont des métabolites provenant de la voie des pentacétides [104, 116].

VII.2.13- 3-Oxo- α -ionone (21)

Chez les plantes, les dérivés de la ionone sont générés enzymatiquement par la coupure oxydative de la chaîne polyène des cyclo-caroténoïdes [134]. Chez les tomates, Stevens a montré que les caroténoïdes étaient rapidement dégradés après l'altération des tissus de la plante [135].

La 3-oxo- α -ionone a été isolée du milieu de culture, à base de carottes, de *Fomitiporia punctata*. En se basant sur les résultats obtenus par Stevens, il paraît peu probable que ce composé soit issu du métabolisme de *Fomitiporia punctata*.

VII.2.14- Dihydroactinidiolide (20)

Ce composé est issu de la dégradation oxydative des caroténoïdes. Dans les tissus de plantes non impliqués dans la photosynthèse, le dihydroactinidiolide est obtenu par photo-oxydation du β -carotène [136]. Il semble que dans les feuilles de tabac, le dihydroactinidiolide provienne de l'oxydation d'un précurseur en C₁₃ tel que la β -ionone [137, 138].

Tout comme la 3-oxo- α -ionone, le dihydroactinidiolide a été isolé d'un milieu de culture à base de carottes. Considérant les résultats décrits précédemment, il semble peu probable que ce produit résulte du métabolisme de *Fomitiporia punctata*.

VII.2.15- 6-Méthoxy-melléine (23)

De nombreuses études métaboliques, réalisées à l'aide d'acétate marqué au carbone 13 ou 14, ont permis de montrer que les isocoumarines de ce type étaient issues de la voie des polycétides [104, 116, 139, 140, 141, 142, 143] (figure VII.18).

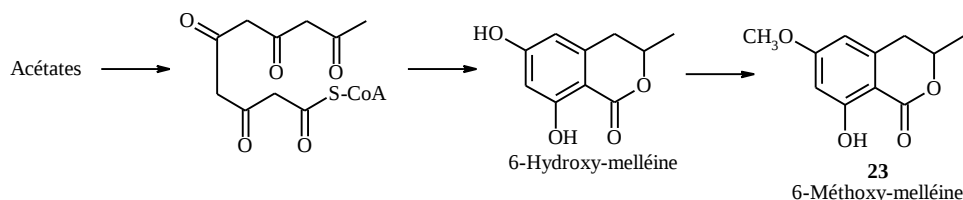


Figure VII.18 : Voie probable de biosynthèse de la 6-méthoxy-melléine (23)

Ce composé a été isolé du milieu de culture, à base de carottes, de *Fomitiporia punctata*. Or les tissus des racines de carotte sont capables d'excréter de la 6-méthoxy-melléine, en réponse à l'attaque d'un champignon pathogène [87, 88, 89, 90, 91, 92]. Bien qu'il ait été montré que de nombreux champignons synthétisent cette molécule [60, 93, 94, 95, 96], notre étude ne permet pas de dire si la présence de 6-méthoxy-melléine dans le milieu de culture de *Fomitiporia punctata* résulte du métabolisme des tissus des carottes ou du métabolisme propre du champignon.

VII.3- Activité biologique

VII.3.1- Toxicité des métabolites

Au cours de ce travail, dix-huit molécules ont été identifiées. Seuls les produits commerciaux (acide 3-phényl-lactique, tyrosol, acide 4-hydroxy-benzoïque, 4-hydroxy-benzaldéhyde) ont pu faire l'objet de l'ensemble des tests biologiques. Dans les meilleurs cas, les autres composés ont pu être soumis à l'un ou l'autre des trois tests.

La plupart des métabolites identifiés de *Stereum hirsutum* avaient été isolés en quantité trop faible pour être testés sur la vigne [37]. Le stéréhirsutinal, le stéréhirsutinol, le 5-méthoxy-frustulosinol et la 5-méthoxy-frustulosine ont depuis été synthétisés [36]. Ils ont donc pu être testés sur protoplastes de vigne.

Cinq métabolites présentent une toxicité vis à vis des plants de tomate : le 4-hydroxy-benzaldéhyde, l'acide 4-hydroxy-benzoïque, l'isosclérone, l'acide 3-phényl-lactique, et le N-butyl-benzène-sulfonamide. Cependant, ils semblent agir suivant deux modes d'action différents. Les uns provoquent un flétrissement marqué des feuilles et des cotylédons (4-hydroxy-benzaldéhyde, isosclérone), alors que les autres induisent une nécrose de la tige (acide 4-hydroxy-benzoïque, acide 3-phényl-lactique). Cette différence d'activité avait déjà été remarquée entre l'eutypine (responsable d'un flétrissement des feuilles) et le stéréhirsutinal (à l'origine d'une nécrose de la tige) [37]. Les composés présentant une activité similaire à celle de l'eutypine semblent donc transportés par la sève vers les feuilles et les cotylédons. Alors que les métabolites agissant comme le stéréhirsutinal semble pouvoir détruire les cellules de la tige et induisent sa nécrose.

Les tests sur plants de tomate donnent une bonne indication de l'activité biologique des métabolites isolés. Cependant, ils ne nous permettent pas de déterminer si ces produits agissent de la même façon sur des cellules de vigne. Dans un premier temps, nous avons donc entrepris un test

simple sur des carrés de feuilles de vigne. A une concentration de 1 mM, l'eutypine et l'acide 3-phényl-lactique sont les seuls métabolites testés à induire une légère nécrose des feuilles. En passant à une concentration de 10 mM, ces deux composés sont capables de provoquer une nécrose totale des feuilles après 48 h d'incubation. Cependant, l'eutypine agit plus rapidement que l'acide 3-phényl-lactique. En effet, après 24 h d'incubation, la surface nécrosée par l'eutypine est d'environ 90 %, alors que par l'acide 3-phényl-lactique, elle est d'environ 50 %. Les autres métabolites testés (acide 4-hydroxy-benzoïque, 4-hydroxy-benzaldéhyde, tyrosol) sont capables d'induire des nécroses, mais après 48 h d'incubation, la surface nécrosée n'excède pas 50 %. D'autre part, nous avons remarqué que les nécroses obtenues en présence de tyrosol étaient de couleur rouge, tout comme celles observées sur des feuilles de ceps atteints par l'esca.

Ce test a permis de confirmer la toxicité du 4-hydroxy-benzaldéhyde, de l'acide 4-hydroxy-benzoïque, et de l'acide 3-phényl-lactique vis à vis, cette fois, de cellules de vigne.

Le test réalisé sur protoplastes de vigne confirme l'activité de l'acide 4-hydroxy-benzoïque et de l'acide 3-phényl-lactique. Cependant, la toxicité de ces deux métabolites à 1 mM s'exprime après un 48 h d'incubation, alors que l'eutypine à la même concentration agit en 4 h. Suivant ce test, le tyrosol et le 4-hydroxy-benzaldéhyde ont une activité toxique faible.

Les protoplastes de vigne sont des cellules végétales dépourvues de leur paroi pectocellulosique. Ce test aurait dû être nettement plus sensible que celui sur carrés de feuilles. Or, s'il permet de tester les métabolites à des concentrations inférieures à 1 mM, les informations qu'il apporte sont moins nettes que celles obtenues par le test précédent. D'autre part, sa mise en place est plus longue.

Quatre composés de *Stereum hirsutum* ont également été testés sur protoplastes de vigne. Ces métabolites présentent une structure proche de celle de l'eutypine. Le stéréhirsutinal et la 5-méthoxy-frustulosine ont une toxicité comparable à celle de l'eutypine, également après seulement 4 h d'incubation. Par contre, si les alcools correspondant (stéréhirsutinol et 5-méthoxy-frustulosinol) sont toxiques, ils n'agissent qu'après 24 h d'incubation.

Ce test confirme donc la toxicité équivalente des deux toxines, eutypine et stéréhirsutinal. D'autre part, la 5-méthoxy-frustulosine semble proche de ces deux toxines non seulement en structure mais aussi en activité. Nous avons également pu confirmer que la présence du groupement aldéhyde, chez ces composés acétyléniques, accentue la toxicité de ces produits vis à vis de *Vitis vinifera*.

Un troisième test a été réalisé sur cals de vigne. Il met en évidence la toxicité de l'eutypine, l'acide 4-hydroxy-benzoïque, l'acide 3-phényl-lactique, du 4-hydroxy-benzaldéhyde et du tyrosol. Comme dans les tests précédents, l'acide 3-phényl-lactique inhibe totalement la croissance des cals à une concentration identique à celle de l'eutypine. Cependant, la croissance des tissus est estimée après 28 jours de culture. Ce test ne permet donc pas de savoir si l'acide 3-phényl-lactique agit aussi rapidement que l'eutypine, ou si comme dans les cas précédents, l'eutypine est plus foudroyante. Ce test est le plus sensible des trois réalisés sur du matériel végétal de vigne. En effet, l'effet de l'acide 4-hydroxy-benzoïque, par exemple, est détecté à une concentration de 0.1 mM.

VII.3.2- Activité biologique potentielle de certains métabolites

La dégradation de la lignine par les champignons de la pourriture blanche impliquent de nombreuses phénol oxydases (lignine-péroxydases, manganèse-péroxydases, laccases, peroxydase de raifort), et des dioxygénases [144]. Les lignine-péroxydases catalysent l'oxydation des structures phénoliques bloquées de la lignine. Au cours de cette réaction, il se forme un radical cation aromatique, entité responsable de la biodégradation de la lignine *in vivo*. Les manganèse-

peroxydases catalysent l'oxydation des structures présentant une fonction phénol libre *via* la formation d'un radical phénoxy [145].

Les composés phénoliques sont connus pour accélérer diverses réactions catalysées par des peroxydases [146, 147, 148, 149, 150, 151]. L'étude de la dynamique de la réaction d'oxydation du NADH par la peroxydase de raifort a permis de montrer que l'acide 4-hydroxy-benzoïque augmente la vitesse de réaction [152].

Les milieux de culture de *Stereum hirsutum* présentent une activité laccase [159]. Les milieux de culture de *Fomitiporia punctata*, autre champignon de la pourriture blanche, comportent une forte activité laccase et peroxydase [153, 159]. La présence *in vivo* de l'acide 4-hydroxy-benzoïque pourrait donc favoriser l'activité lignivore de ces deux champignons.

Les monophénols substitués en *para* sont connus pour activer la réaction d'oxydation de l'acide indole-acétique *in vitro* [154, 155, 156]. Cet acide est impliqué dans la régulation de la croissance des plantes. L'acide 4-hydroxy-benzoïque, en favorisant la dégradation de l'acide indole-acétique, pourrait inhiber la croissance des tissus d'une plante.

Les études réalisées par Ayer et *al* ont permis de montrer que l'acide 4-hydroxy-benzoïque, le 4-hydroxybenzaldéhyde, et le tyrosol étaient en partie responsables de la décoloration du bois de tremble, par complexation des ions Fe^{3+} [60]. La diffusion de ces molécules pourrait donc être à l'origine de la décoloration des zones infectées du bois de vigne.

Testé sur des tiges de boutures de pin, le 4-hydroxy-benzaldéhyde est capable d'inhiber faiblement la conductivité de l'eau [53]. Chez des plants de vigne, il a été montré qu'un stress hydraulique provoquait une réduction de croissance des jeunes pousses [157]. Le 4-hydroxy-benzaldéhyde pourrait contribuer à ce phénomène.

Les signaux extracellulaires sont transmis aux cellules par fixation d'une molécule informative hydrophile à un récepteur protéique présent à la surface des cellules. Ces récepteurs agissent comme des transducteurs de transmission, convertissant une information extracellulaire en des signaux intracellulaires qui modifient le comportement de la cellule cible [158].

Parmi ces récepteurs, certains sont couplés aux protéines G trimériques liant le GTP. L'activation de certaines protéines G déclenche une modification de la concentration en AMP cyclique. L'AMPc est un second messenger intracellulaire synthétisé à partir de l'ATP par l'adénylate cyclase. C'est une molécule médiatrice clef des cellules eucaryotes et procaryotes. Elle modifie le comportement de différentes protéines cellulaires, et ainsi agit sur l'expression des gènes. Or le 4-hydroxy-benzaldéhyde est capable d'inhiber l'AMP cyclique phosphodiesterase [56]. Cette enzyme est impliquée dans la dégradation de l'AMP cyclique. Il paraît donc probable que l'inhibition de ce catabolisme ait des conséquences non négligeables sur le métabolisme cellulaire.

D'autres récepteurs protéiques ont une activité tyrosine kinase. Leur activation provoque une phosphorylation des résidus tyrosine spécifiques d'un petit groupe de protéines de transmission intracellulaires qui relaient le signal jusqu'au noyau et agissent sur la prolifération ou la différenciation cellulaire. Il a été montré que la 1-O-méthyl-émordine était capable d'inhiber des protéines tyrosine kinases [83]. Ce métabolite pourrait donc influencer sur la prolifération et la différenciation cellulaires.

VII.4- Matériel végétal

L'étude par LC-MS du matériel végétal a permis de montrer la présence de 1-O-méthyl-émodyne dans le bois de cep infecté. Par contre, la présence de ce composé n'a pu être détectée ni dans les feuilles présentant des symptômes, ni dans la sève provenant de cep malade. Ce produit ne semble pas diffuser à l'intérieur de la plante par l'intermédiaire de la sève, ce qui explique qu'il ne soit pas retrouvé dans les feuilles. Ce métabolite n'a pu être testé que sur plantules de tomate, du fait des faibles quantités à disposition. A une concentration de $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$, il ne présente aucune activité toxique.

L'acide 3-phényl-lactique a été retrouvé dans les feuilles présentant des symptômes. Mais sa présence n'a pu être mise en évidence ni dans la sève, ni dans le bois de cep infecté. Ce composé n'a pas été retrouvé dans les feuilles ne présentant pas de symptôme. Il semble donc qu'il diffuse depuis la zone infestée du tronc vers les feuilles. Or la transmission ascendante de l'eau et des nutriments dans les plantes est assurée par les vaisseaux du xylème, transporteurs de la sève brute. Il est donc très probable que ce produit soit présent dans les extraits de sève en concentration trop faible pour permettre sa détection même en utilisant la spectrométrie de masse.

Le 4-hydroxy-benzaldéhyde et l'acide 4-hydroxy-benzoïque ont été retrouvés dans les feuilles et le bois malades et sains. A une concentration de 0.5 mM , on a pu montrer que ces composés étaient toxiques vis à vis des cals de vigne. Nous pouvons donc penser que cette activité pourrait se manifester *in vivo* par l'accumulation locale de ces métabolites.

Les autres produits recherchés n'ont pu être mis en évidence dans le matériel végétal. Cette absence de détection ne signifie pas forcément qu'ils ne sont pas présents. Nous pouvons simplement émettre trois hypothèses pour expliquer ce résultat :

- Les métabolites sont présents en quantité trop faible pour permettre leur détection par un spectromètre de masse.
- Les métabolites sont métabolisés par les cellules du cep infecté. Seul l'identification des produits de ce métabolisme pourrait permettre de les rechercher dans le matériel végétal.
- Les métabolites ne sont pas produits *in vivo* par le champignon.

VII.5- Dosage de l'eutypine

Ce dosage a été réalisé dans le but d'établir s'il existait une corrélation entre l'agressivité d'une souche d'*Eutypa lata* vis à vis de la vigne, et la quantité d'eutypine qu'elle produit.

Pour la majorité des couples de souches d'origine française, les souches agressives renferment plus d'eutypine que les souches non-agressives. Deux exceptions sont à relever :

- Le couple TH 118-4/TH 118-12, pour lequel l'eutypine est présente en quantité proche dans les souches agressives et non-agressives.
- Le couple CM 96-7/CM 96-3, dans lequel la concentration en eutypine est très faible, ce qui ne facilite pas sa détection.

Par contre, dans le cas du couple de souches d'origine australienne, la souche non agressive renferme beaucoup plus d'eutypine que la souche agressive.

Cependant, si l'on compare les couples de souches entre eux, on remarque que certaines souches non agressives comme VL 11-5 produisent beaucoup plus d'eutypine que des souches

agressives comme AM 78-1. Il n'y a donc pas de corrélation directe entre la quantité d'eutypine produite et l'agressivité des souches.

Pour la réalisation de ce dosage, un milieu de culture de 40 ml a été réalisé pour chaque souche et lyophilisé. Les conditions de culture (température, etc...) ont été les mêmes pour tous les échantillons. Cependant, afin de s'affranchir d'éventuels artéfacts, il serait intéressant de refaire ce dosage sur plusieurs lyophilisats d'une même souche, et ce pour l'ensemble des souches.

D'autre part, les souches d'*Eutypa lata* ont été cultivées *in vitro*. Le métabolisme de ce champignon peut être très différent au sein de la plante hôte. Un dosage d'eutypine dans des extraits de bois infectés par ces diverses souches serait donc une meilleure approche pour déterminer s'il existe une corrélation entre la quantité de toxine produite et l'agressivité d'une souche.

Chapitre VIII

Conclusions & Perspectives

L'analyse des milieux de culture de *Phaeoacremonium chlamydosporum* a permis d'isoler onze métabolites secondaires (1-11), dont un est un nouveau composé naturel (10). Le composé 11 n'a jamais, à ce jour, été isolé comme produit naturel. Sa présence dans les milieux de culture de *Phaeoacremonium chlamydosporum* n'est pas constante. Bien qu'il n'ait pas été détecté dans les éventuels sources de contamination analysées, on ne peut certifier son origine.

Les composés 1, 2, 7 et 11 ont également été identifiés dans les milieux de culture de *Phaeoacremonium aleophilum*, tout comme les métabolites 17, 18, et 19.

Quant aux produits 20, 21, 22 et 23, ils sont issus des milieux de culture de *Fomitiporia punctata*. Les métabolites 1 et 2 sont également synthétisés par ce champignon. Le composé (22) est une nouvelle chromanone, qui n'avait jamais été décrite dans la littérature.

Tous ces métabolites sont présentés dans la figure VIII.1.

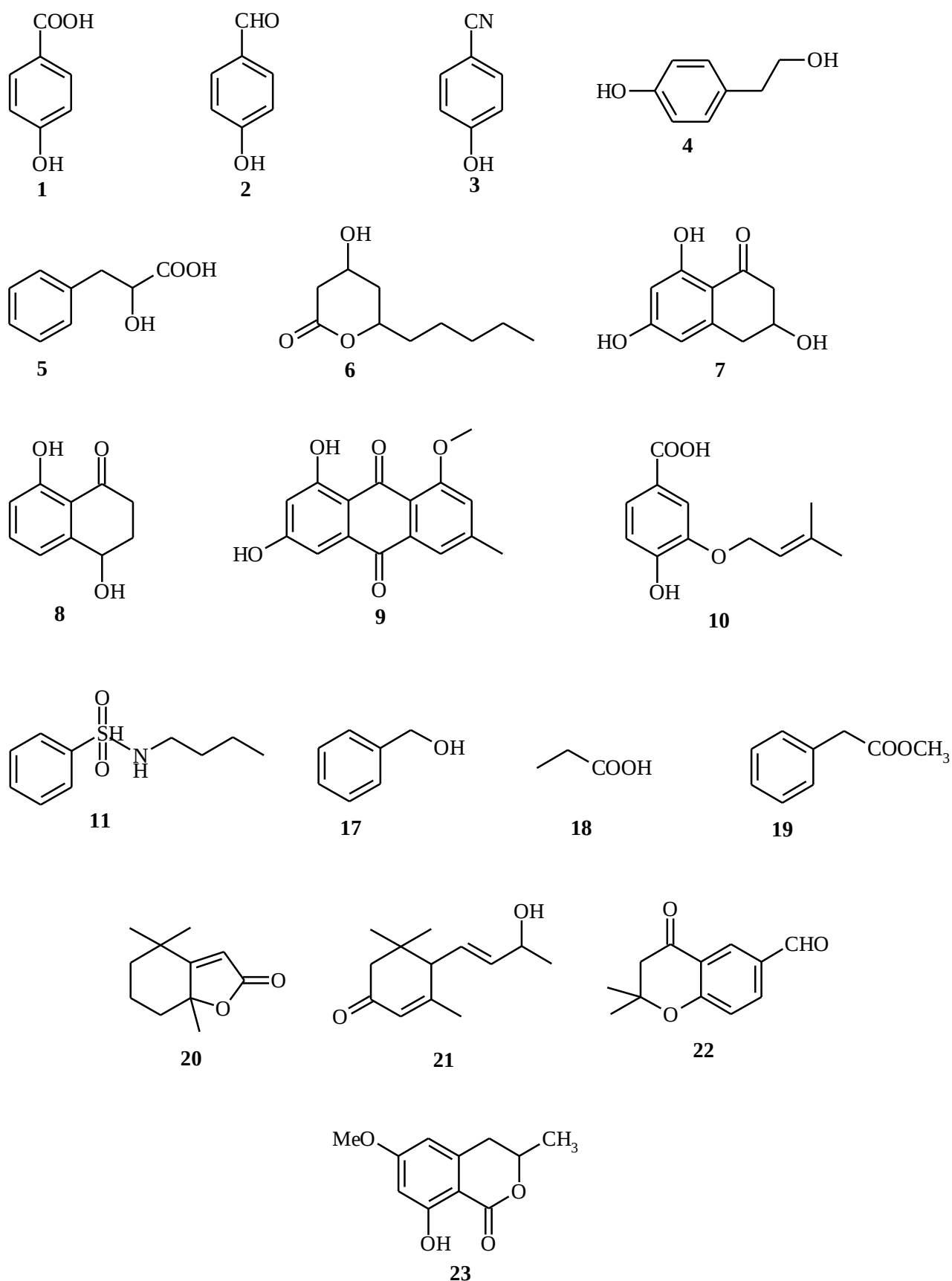


Figure VIII.1 : Composés identifiés dans les différents milieux de culture des champignons étudiés

Neuf de ces métabolites (**1**, **2**, **4**, **5**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**) ont été testés sur des plantules de tomate. Ce test a mis en évidence l'activité toxique des composés **1**, **2**, **5**, **8**, et **11**.

D'autres tests biologiques ont été réalisés afin d'évaluer la toxicité vis à vis de la vigne des composés synthétisés par les divers champignons. Les composés **1**, **2**, **4**, **5**, **20** et l'eutypine ont été soumis au test sur carrés de feuilles de vigne. Les composés **1**, **2**, **4**, **5**, **9**, **21** ainsi que l'eutypine, le stéréhirsutinal, le stéréhirsutinol, la 5-méthoxy-frustulosine et le 5-méthoxy-frustulosinol, ont fait l'objet de tests sur protoplastes de vigne. Et enfin, les composés **1**, **2**, **4**, **5**, l'eutypine et le stéréhirsutinal ont été testés sur cals de vigne.

De ces trois tests, nous pouvons conclure à la toxicité de l'acide 3-phényl-lactique, de l'acide 4-hydroxy-benzoïque, du 4-hydroxy-benzaldéhyde, du tyrosol, du 5-méthoxy-frustulosinol, de la 5-méthoxy-frustulosine et du stéréhirsutinol, vis à vis de *Vitis vinifera*. Nous avons pu confirmer que le stéréhirsutinal présente une toxicité équivalente à celle de l'eutypine. D'autre part, il s'est avéré que la présence d'un groupement aldéhyde sur les dérivés acétyléniques proches de l'eutypine (plutôt qu'un groupement alcool), accentue la toxicité de ces composés.

La recherche par LC-ESI-MS des différents métabolites produits par les champignons impliqués dans l'esca, a permis d'établir la présence dans le bois malade de l'acide 4-hydroxy benzoïque, du 4-hydroxy-benzaldéhyde et de la 1-O-méthyl-émodyne. Dans les feuilles présentant des symptômes d'esca, nous avons retrouvé l'acide 3-phényl-lactique, l'acide 4-hydroxy-benzoïque, et le 4-hydroxy-benzaldéhyde. Aucun métabolite n'a été détecté dans les échantillons de sève. L'acide 4-hydroxy-benzoïque et le 4-hydroxy-benzaldéhyde ont été retrouvés dans les extraits de bois sain et de feuilles ne présentant pas de symptôme.

La présence spécifique de l'acide 3-phényl-lactique dans les feuilles présentant des symptômes, ainsi que l'activité toxique de ce composé vis à vis des protoplastes et des cals de vigne, suggère que ce métabolite est impliqué dans la maladie.

Nous ne pouvons pas aboutir à cette conclusion pour le 4-hydroxy-benzaldéhyde et l'acide 4-hydroxy-benzoïque du fait de leur présence dans le matériel végétal sain et infecté.

La 1-O-méthyl-émodyne n'a pu être testée que sur plantules de tomate, du fait de la faible quantité disponible. Etant donné que ce composé a été retrouvé spécifiquement dans le matériel végétal infecté, il serait intéressant de réaliser sa synthèse afin de pouvoir la tester sur des feuilles, des protoplastes et/ou des cals de vigne. Cette molécule peut être préparée par la méthylation du 6-benzoate d'émodyne suivie d'une hydrolyse en milieu alcalin [82] suivant le schéma présenté dans la figure VIII.2.

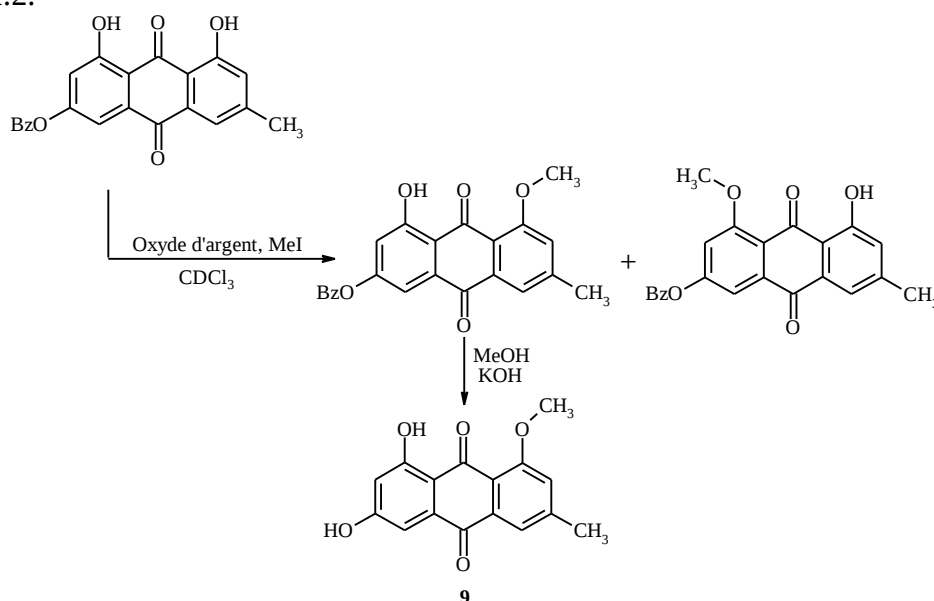


Figure VIII.2 : Schéma de synthèse de la 1-O-méthyl-émodyne (**9**) [82]

La synthèse du produit **10** a été effectuée par le Dr Fkyerat. Cependant, la déprotection du groupement éther en position 4 à l'aide de l'acide *p*-toluène-sulfonique provoque également le départ de la chaîne prénylique en position 3. Le rendement de cette réaction est très faible. Cette méthode de préparation ne permet pas d'obtenir de grandes quantités de produit. Il serait donc intéressant de rechercher une autre méthode de préparation afin d'obtenir suffisamment de produit pour réaliser l'ensemble des tests.

Le produit **22** est une nouvelle chromanone. Afin d'une part de confirmer la structure proposée, et d'autre part, d'obtenir une plus grande quantité de produit, il serait intéressant de synthétiser cette molécule.

Au cours de ce travail nous avons réalisé le dosage de l'eutypine en utilisant le stéréhirsutinal comme standard interne. Cette quantification par LC-MS est une méthode très sensible. Les résultats de cette expérience montrent qu'au sein d'un couple de souche, la souche agressive produit davantage d'eutypine que la souche non agressive. Par contre, certaines souches non agressives sécrètent plus d'eutypine que d'autres agressives. Il semble donc qu'il n'y ait pas de relation directe entre la quantité d'eutypine produite et la nocivité d'une souche d'*Eutypa lata*. Cependant, ces souches ont été cultivées *in vitro*. Dans la plante hôte, le métabolisme du champignon peut être très différent. Il serait plus judicieux de réaliser un dosage d'eutypine directement dans des extraits de bois infecté par ces différentes souches d'*Eutypa lata*.

Nous avons montré que l'acide 3-phényl-lactique semblait impliqué dans la maladie. Ce métabolite ainsi que l'acide 4-hydroxy-benzoïque, le 4-hydroxy-benzaldéhyde et la 1-O-méthyl-émidine, sont présents *in vivo*. Il serait donc intéressant d'étudier leur mode d'action chez les cellules de *Vitis vinifera*. L'injection de ces composés dans des ceps pourrait permettre d'évaluer les effets qu'ils produisent dans la plante hôte.

D'autre part, nous avons vu que l'acide 4-hydroxy-benzoïque était capable d'accélérer certaines réactions catalysées par la peroxydase de raifort [152]. Dès lors, l'aptitude de ce composé à activer l'activité lignivore de *Fomitiporia punctata* et *Stereum hirsutum* pourrait faire l'objet d'une étude.

Chapitre IX

Partie expérimentale

IX.1- Techniques chromatographiques

IX.1.1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de silicagel 60 F254 (E. Merck, Darmstadt) de 0.1 mm d'épaisseur, sur feuilles d'aluminium.

IX.1.2- Chromatographies liquides à basse pression (LPLC)

Les chromatographies liquides à basse pression ont été réalisées sur gel de silice (C-Gel, C-560, CU Chemie Uetikon AG, Uetikon, CH) de granulométrie 0.060-0.200 mm. Les séparations préliminaires des extraits bruts ont été effectuées à l'aide d'une colonne en verre de 20 x 300 mm munie d'un robinet en téflon. Pour les purifications subséquentes des fractions, nous avons utilisé une colonne en verre de 10 x 150-300 mm, et parfois un gel de silice de granulométrie ?. L'extrait à purifier est solubilisé dans un solvant, et un peu de silice est additionné à la solution. Le solvant est alors évaporé. L'extrait est ainsi déposé sous forme sèche en tête de colonne.

IX.1.3- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les extraits et les fractions analysés par HPLC ont été préalablement filtrés sur des précolonnes RP-C18 de type supelclean (LC-18, SPE, 3 ml, Supelco, Bellefonte, USA). L'éluant utilisé était du méthanol.

Les analyses HPLC ont été effectuées soit sur un appareil de type HP 1050 (Hewlett-Packard) couplé à un détecteur à barrettes de diodes (DAD de type HP 1040 A (Hewlett-Packard), soit sur un appareil de type HP 1100 (Hewlett-Packard) couplé à un détecteur ultra-violet de type HP 1100 (Hewlett-Packard). Nous avons employé une colonne analytique remplie de silice en phase inverse de type RP-C18 (Nucléosil 100-7-C18, 7 μ m, 250 x 4.6 mm, Bischoff, Leonberg, D), munie d'une précolonne (Nucléosil 100-7-C18, 7 μ m, 20 x 4 mm).

Tous les solvants utilisés ont préalablement été filtrés sur une membrane Millipore en nylon 66 (0.45 μm x 47 mm, Supelco, Bellefonte, USA). Lors de l'utilisation de l'appareil de type HP 1100, les solvants étaient dégazés en continu par un dégazeur à vide de type HP 1100 (Hewlett-Packard). Dans le cas de l'emploi de l'appareil de type HP 1050, le dégazage en continu était effectué par un flux d'hélium (Carbagaz, CH). Le méthanol utilisé était de qualité HPLC (Maechler AG, Reinach, CH). Nous avons également employé de l'eau bidistillée.

Le programme standard d'analyse que nous avons employé pour déterminer le temps de rétention des différents métabolites recherchés en LC-MS et évaluer la composition des extraits bruts (programme 1), correspond au gradient croissant de méthanol dans l'eau suivant :

Temps (Min)	H ₂ O (%)	MeOH (%)
0	60	40
10	60	40
60	10	90
65	0	100
70	0	100

Le débit de solvant utilisé était de 1 ml.min⁻¹.

IX.2- Méthodes spectroscopiques et spectrométriques

IX.2.1- Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été mesurés sur un appareil Bruker AMX-400. Comme solvants deutérés, nous avons utilisé du CDCl₃, du CD₃OD, de l'acétone-d₆ provenant de Cambridge Isotope Laboratories Inc. (CIL, Andover, USA). Le pic du solvant a servi de référence. Les valeurs des déplacements chimiques de chaque solvant étaient : 7.26 ppm pour le CDCl₃, 2.04 ppm pour l'acétone-d₆, et 3.4 ppm pour le méthanol-d₄.

Les échantillons solubilisés dans un minimum de solvant deutéré ont été filtrés sur de la ouate.

IX.2.2- Spectrométrie de masse

IX.2.2.1- Spectres EI ou DCI

Les spectres de masse, obtenus par impact électronique (EI) ou par ionisation chimique par désorption (DCI), sont mesurés sur un appareil Delsi-Nermag R30-10 à triple quadripôle. L'énergie cinétique des électrons est de 70 eV.

Dans le cas de l'ionisation chimique par désorption, l'échantillon est déposé sur un filament en tungstène chauffé à des températures supérieures à 600 °C en quelques secondes. Nous avons utilisé l'ammoniac comme gaz ionisant.

IX.2.2.2- GC-MS

Le spectromètre de masse est un appareil Delsi-Nermag R30-10, muni d'une source à impact électronique. Il est couplé à un chromatographe en phase gazeuse de type Dani 6500, équipé d'une colonne capillaire de type OV-1 de 25 m de long et 0.32 mm de diamètre. Le débit d'hélium est de 1 ml.min⁻¹.

IX.2.2.3- LC-MS

Le spectromètre de masse utilisé était un LCQ Finnigan, muni d'une source électrospray (ESI). Cet appareil était couplé à une HPLC soit de type Rhéos 4000, soit de type HP 1100 (Hewlett-Packard).

Le flux de solvant utilisé en HPLC était de 1 ml.min^{-1} . Le type de colonne utilisé était identique à celui décrit précédemment.

Afin d'obtenir un flux de $100 \text{ } \mu\text{l.min}^{-1}$ à l'entrée de la source électrospray, nous avons effectué un split post-colonne de 10 %. D'autre part, $5 \text{ } \mu\text{l.min}^{-1}$ d'une solution aqueuse à 5 % de NH_3 ont été injectés pour favoriser l'ionisation des composés, et ainsi augmenter la sensibilité.

Nous avons utilisé une source électrospray avec les paramètres suivants :

- Température du capillaire chauffant : 190°C
- Voltage de la source : 4 kV
- Flux d'azote : 900 ml.min^{-1}

IX.3- Cultures fongiques

Pour chaque culture, 10 litres de milieux sont préparés. Ils sont ensuite répartis dans des erlenmeyers de 500 ml possédant une chicane. La présence d'une chicane permet d'obtenir un milieu plus homogène lors de l'agitation, et contribue également à une meilleure oxygénation du milieu. Chaque erlenmeyer était alors fermé à l'aide d'un bouchon d'ouate surmonté d'une feuille d'aluminium. Ces flacons étaient ensuite autoclavés à 121°C pendant 15 minutes.

L'inoculation du champignon dans le milieu liquide est effectuée sous flux laminaire. Les cols des erlenmeyers ainsi que les ustensiles utilisés sont passés à la flamme afin d'être stérilisés. Un morceau de mycélium prélevé d'une culture sur milieu PDA, réalisée sur boîte de Pétri, est alors introduit.

Les erlenmeyers sont alors agités à 120 tours/min en salle climatisée, à l'obscurité.

IX.4- Procédures d'extraction

IX.4.1- Extraction des milieux de culture

A l'issue de la période d'incubation, le milieu de culture est filtré sur Büchner, à l'aide de célite et d'un papier filtre. Le mycélium est détruit par autoclavage. Le filtrat, possédant un pH acide ($\sim 4/5$), est ensuite extrait deux fois à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse récupérée est alors basifiée à l'aide d'une solution de NaOH jusqu'à $\text{pH} = 8$. Elle est ensuite extraite deux fois à l'acétate d'éthyle.

IX.4.2- Extraction du bois

Le bois est préalablement réduit en sciure. 40 grammes de bois sont alors introduits dans une cartouche et extrait à l'éther dans un soxhlet pendant 24 heures.

IX.4.3- Extraction de la sève

Les 400 ml de sève, dont le pH = 5, ont été extraits à l'éther. La phase aqueuse a ensuite été basifiée à l'aide d'une solution de NaOH jusqu'à pH = 8, et extraite à nouveau à l'éther. Ces extraits bruts ont alors été filtrés sur des précolonnes RP-C18 de type supelclean (LC-18, SPE, 3 ml, Supelco, Bellefonte, USA). L'éluant utilisé était du méthanol.

IX.4.4- Extraction des feuilles

Les feuilles sont plongées dans de l'azote liquide, puis pilées dans un mortier. 50 g de la fine poudre obtenue sont introduits dans un bécher. Après addition de 300 ml d'acétate d'éthyle, nous laissons sous agitation mécanique pendant 24 heures. L'extrait brut est alors filtré sur des précolonnes RP-C18 de type supelclean (LC-18, SPE, 3 ml, Supelco, Bellefonte, USA). L'éluant utilisé était du méthanol.

IX.5- Tests biologiques

IX.5.1- Test sur plantules de tomate

Les plantules de tomate utilisées étaient issues de graines de la variété Bonny.Best (Mausser, Winterthur, CH), cultivées au Jardin Botanique de l'Université de Neuchâtel.

Ces tests ont été réalisés sur des plantules de tomate de 6 à 8 cm possédant deux cotylédons et deux feuilles.

L'échantillon à tester a été déposé dans un pilulier de 2,5 ml, puis séché 24 heures sous vide. Ensuite, nous ajoutons 1 ml d'eau bidistillée additionnée de 1 à 2 % d'acétone ou de méthanol.

Les racines des plantules sont coupées sous l'eau. Chaque plantule est alors plongée dans une solution à tester.

Les piluliers témoins ne renferment que de l'eau bidistillée additionnée de 1 à 2 % d'acétone ou de méthanol.

IX.5.2- Tests sur carrés de feuilles

Dans des snap-caps de 5 ml, nous dissolvons une quantité connue de composé à tester à laquelle nous ajoutons 1 ml d'eau bidistillée contenant 2 % d'éthanol. Le récipient témoin ne contient que de l'eau bidistillée additionnée de 2 % d'éthanol.

Des fragments carrés de 1 cm² de feuilles de vigne sont découpés sous l'eau et ensuite plongés dans les solutions à tester.

Dans ces conditions, des bandes nécrosées apparaissent sur tout le pourtour du fragment, et convergent symétriquement vers son centre. Pour déterminer le pourcentage des surfaces nécrosées, nous mesurons la largeur de ces bandes en fonction du temps. Si x correspond à cette largeur, la surface S est donnée par [69] :

$$S = 4x - 4x^2 \text{ (cm}^2\text{)}$$

Le pourcentage P de surface nécrosée est alors déterminé par l'équation suivante :

$$P = (S / 1) * 100$$

Chapitre X**Bibliographie**

- [1] Agrios G.N. : Plant Pathology, **1997**, 4th edition, Academic Press, NY-London.
- [2] Muller E., Loeffler W. : Mycology, **1982**, 4th Ed, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [3] Dubos B.: Mise au point sur les maladies de dépérissement dans le vignoble français.
Prog. Agr. Vitic., **1987**, 104 (6), 135-140.
- [4] Arnaud G., Arnaud M. : Traité de pathologie végétale, Tome 1, **1931**, Le Chevalier Ed., Paris, 428-444.
- [5] Graniti A. : Il « mal dell'esca » della vite in Puglia.
Ital. Agric., **1960**, 97, 543-550.
- [6] Grasso S. : Il « mal dell'esca » della vite (*Phellinus igniarius* Patouillard) in Sicilia. *Tecnica Agric. (Catania)*, **1969**, 21, 204-212.
- [7] Chiarappa L. : Wood decay of the grapevine and its relationship with black measles disease.
Phytopathology, **1959**, 49, 510-519.
- [8] Mugnai L., Graniti A., Surico G.: Esca (black measles) and Brown-wood streaking : two old and elusive diseases of grapevines.
Plant Disease, **1999**, 83 (5), 404-418.
- [9] Vinet E. : L'apoplexie de la vigne en Anjou.
Revue vitic., **1909**, 32, 676-681.
- [10] Rives L. : Sur le parasitisme de *Stereum hirsutum* et son rôle dans l'apoplexie de la vigne.
Prog. Agr. Vitic., **1921**, Tome LXXIII, 600-601.

- [11] Gard M. : L'apoplexie de la vigne et les formes résupinées du *Fomes igniarius* (L.) Fries.
Bull. Soc. Path. Veg., **1922**, 22-28.
- [12] Bachala A. : Le folletage et l'apoplexie de la vigne.
Prog. Agr. Vitic., **1926**, Tome LXXXIII, 225-227.
- [13] Viala P. : Esca.
Revue vitic., **1928**, Tome LXVIII, 5-8 ; 53-57 ; 85-89.
- [14] Hawksworth D., Gibson I., Gams W. : *Phialophora parasitica* associated with disease conditions in various trees.
Trans. Br. Mycol. Soc., **1976**, 66 (3), 427-431.
- [15] Galet P. : Les maladies et les parasites de la vigne, Tome 1, **1977**, Imp. Paysan du Midi, Montpellier, 409-430.
- [16] Crous P., Gams W., Wingfield M., van Wyk P. : *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections.
Mycologia, **1996**, 88 (5), 786-796.
- [17] Larignon P., Dubos B. : Fungi associated with esca disease in grapevine.
Eur. J. Plant Pathol., **1997**, 103, 147-157.
- [18] Pavlou C.H. : *Prog. Agr. Vitic.*, **1906**, 690.
- [19] Ravaz L., Pavlou C.H. : *Prog. Agr. Vitic.*, **1921**.
- [20] Viala P. : *Ann. des Epiphyties*, XII, **1926**, 5-108.
- [21] Ferreira J., van Wyk P., Venter E. : Slow dieback of grapevine : association of *Phialophora parasitica* with slow dieback of grapevines.
S. Afr. J. Enol. Vitic., **1994**, 15 (1), 9-11.
- [22] Morton L. : Mystery diseases hit young vines.
Wines Vines, **1995**, 76 (11), 46-47.
- [23] Scheck H., Vasquez S., Gubler W. : First report of three *Phaeoacremonium* spp. causing young grapevine decline in California.
Plant Disease, **1998**, 82 (5), 590.
- [24] Scheck H., Vasquez S., Fogle D., Gubler W. : Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline.
California agriculture, **1998**, 52 (4), 19-23.
- [25] Bertelli E., Mugnai L., Surico G. : Presence of *Phaeoacremonium chlamydosporum* in apparently healthy rooted grapevine cuttings.
Phytopath. Mediterr., **1998**, 37, 79-82.
- [26] Dupont J., Laloui W., Roquebert M.F. : Partial ribosomal DNA sequences show an important divergence between *Phaeoacremonium* species isolated from *Vitis vinifera*.
Mycol. Res., **1998**, 102 (5), 631-637.

- [27] Mugnai L., Surico G., Sfalanga A. : Produzione di enzimi esocellulari da parte di funghi del legno di viti colpite dal « mal dell'esca ».
Mic. Ital., **1997**, 1, 11-22.
- [28] Renaud J.-M., Tsoupras G., Tabacchi R. : Biologically active natural acetylenic compounds from *Eutypa lata* (Pers : F.) TUL.
Helv. Chim. Acta, **1989**, 72, 929-932.
- [29] Renaud J.-M., Tsoupras G., Stoeckli-Evans H., Tabacchi R. : A novel allenic epoxycyclohexane and related compounds from *Eutypa lata* (Pers : F.) TUL.
Helv. Chim. Acta, **1989**, 72, 1262-1266.
- [30] Defrancq E., Zeziger T., Tabacchi R. : The synthesis of natural acetylenic compounds from *Eutypa lata* (Pers : F.) TUL.
Helv. Chim. Acta, **1993**, 76, 425-430.
- [31] Tey-Ruth P., Philippe I., Renaud J.-M., Tsoupras G., De Angelis P., Fallot J., Tabacchi R. : Eutypine, a phytotoxin produced by *Eutypa lata* the causal agent of dying-arm disease of grapevine.
Phytochemistry, **1991**, 30 (2), 471-473.
- [32] Deswarte C., Canut H., Kläbe A., Roustan J.-P., Fallot J. : Transport, cytoplasmic accumulation and mechanism of action of the toxin eutypine in *Vitis vinifera* cells.
J. Plant Physiol., **1996**, 149, 336-342.
- [33] Deswarte C., Eychenne J., Davy de Virville J., Roustan J.-P., Moreau F., Fallot J. : Protonophoric activity of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, in plant mitochondria.
Arch. Biochem. Biophys., **1996**, 334 (2), 200-205.
- [34] Colrat S., Deswarte C., Latché A., Kläbé A., Bouzayen M., Fallot J., Roustan J.-P. : Enzymatic detoxification of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, by *Vitis vinifera* cells : partial purification of an NADPH-dependent aldehyde reductase.
Planta, **1999**, 207, 544-550.
- [35] Dubin G.-M., Fkyerat A., Tabacchi R. : Acetylenic aromatic compounds from *Stereum hirsutum*.
Phytochemistry, **2000**, 53, 571-574.
- [36] Fkyerat A., Dubin G.-M., Tabacchi R. : The synthesis of natural acetylenic compounds from *Stereum hirsutum*.
Helv. Chim. Acta, **1999**, 82, 1418-1422.
- [37] Dubin G.-M. : Isolement et identification de métabolites secondaires phytotoxiques de *Stereum hirsutum*, un des champignons impliqués dans une maladie de la vigne, l'esca.
Thèse de Doctorat, Neuchâtel, **1998**.
- [38] Borrow A., Jefferys E., Kessell R., Lloyd E., Lloyd P., Nixon I. : The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture.
Can. J. Microbiol., **1961**, 7, 227-276.

- [39] Eriksson K., Petersson B. : Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose.
Eur. J. Biochem., **1975**, 51, 193-206.
- [40] Barrero A., Oltra J., Poyatos J. : Acidic metabolites from *Phycomyces blakesleeana*.
Phytochemistry, **1996**, 42 (5), 1427-1433.
- [41] Ayer W., Trifonov L. : Phenolic and polyketide metabolites of the aspen blue stain fungus *Ophiostoma crassivaginata*.
Phytochemistry, **1995**, 38 (2), 371-372.
- [42] Otomo N., Sato H., Sakamura S. : Novel phytotoxins produced by the causal fungus of the shoot blight of larches.
Agric. Biol. Chem., **1983**, 47 (5), 1115-1119.
- [43] Natsume H., Seto H., Otake N. : Studies on apple canker disease. The necrotic toxins produced by *Valsa ceratosperma*.
Agric. Biol. Chem., **1982**, 46 (8), 2101-2106.
- [44] Cho J.-Y., Moon J.-H., Seong K.-H., park K.-H. : Antimicrobial activity of 4-hydroxy benzoic acid and *trans*-4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull.
Biosci. Biotechnol. Biochem., **1998**, 62 (11), 2273-2276.
- [45] Koshino H., Terada S.-I., Yoshihara T., Sakamura S., Shimanuki T., Sato T., Tajimi A.: three phenolic acid derivatives from stomata of *Epichloe typhina* on *Phleum pratense*.
Phytochemistry, **1988**, 27 (5), 1333-1338.
- [46] Gunata Y., Sapis J.-C., Moutounet M. : Substrates and aromatic carboxylic inhibitors of grape phenol oxidases.
Phytochemistry, **1987**, 26 (6), 1573-1575.
- [47] Sato T., Kiushi F., Sankawa U. : Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds.
Phytochemistry, **1982**, 21 (4), 845-850.
- [48] Lee T., Staratt A., Jevnikar J. : Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols.
Phytochemistry, **1982**, 21 (3), 517-523.
- [49] Harborne J., Baxter H. : *Phytochemical Dictionnary*. **1993**, Taylor and Francis, London.
- [50] Goodwin T., Mercer E. : *Introduction to Plant Biochemistry*. **1972**, Pergamon Press, Oxford, New York.
- [51] Kummer U., Hauser M., Wegmann K., Olsen L., Baier G. : Oscillations and complex dynamics in the peroxidase-oxidase reaction induced by naturally occurring aromatic substrates.
J. Am. Chem. Soc., **1997**, 119, 2084-2087.
- [52] De Angelis P. : Isolement et caractérisation de l'eutypine et d'autres métabolites secondaires d'*Eutypa lata* (Pers. : Fr.) Tul., parasite de la vigne.
Thèse de Doctorat, Neuchâtel, **1990**.

- [53] Ayer W., Browne L., Feng M.-C., Orszanska H., Saeedi-Ghomi H. : The chemistry of the blue stain fungi. Part 1. Some metabolites of *Ceratocystis species* associated with mountain pine beetle infected lodgepole pine.
Can. J. Chem., **1986**, 64, 904-909.
- [54] Catlin E.R. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1968**, 156, 109
- [55] Kubo I., Kinst-Hori I. : Tyrosinase inhibitors from cumin.
J. Agric. Food Chem., **1998**, 46, 5338-5341.
- [56] Nikaido T., Sung Y., Ohmoto T., Sankawa U. : Inhibitors of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in *Phyllostachys nigra* MUNRO var. *henonis* STAPF. and *Phragmites communis* TRIN., and inhibition by related compounds.
Chem. Pharm. Bull., **1984**, 32 (2), 578-584.
- [57] Mantel P., Weedon C. : Biosynthesis and transformation of tremorgenic indole-diterpenoids by *Penicillium paxilli* and *Acremonium lolii*.
Phytochemistry, **1994**, 36 (5), 1209-1217.
- [58] Grémaud G., Tabacchi R. : Relationship between the fungus *Ceratocystis fimbriata* and the canker disease of the coffee tree.
Phytochemistry, **1996**, 42 (6), 1547-1549.
- [59] Capasso R., Cristinzio G., Evidente A., Scognamiglio F. : Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters.
Phytochemistry, **1992**, 31 (12), 4125-4128.
- [60] Ayer W. : The chemistry of the blue stain fungi. Part 3. Some metabolites of *Ceratocystis minor* (Hedgcock) Hunt.
Can. J. Chem., **1987**, 65, 765-769.
- [61] Stoessl A. : Toxins in Plant Disease. **1981**, Durbin R.B. ed., Academic Press, New York.
- [62] Bitan G., Gilon C. : Building units for N-backbone cyclic peptides. 2. Synthesis of protected N-(ω -thioalkylene) amino acids and their incorporation into dipeptide units.
Tetrahedron, **1995**, 51 (38), 10513-10522.
- [63] Bur D., Luyten M., Wynn H., Provencher L., Bryan Jones J., Gold M., Friesen J., Clarke A., Holbrook J. : An evaluation of the substrate specificity and asymmetric synthesis potential of the cloned L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*.
Can. J. Chem., **1989**, 67, 1065-1070.
- [64] Degerbeck F., Fransson B., grehn L., Ragnarsson U. : Synthesis of ^{15}N -labelled chiral boc-amino acids from triflates : enantiomers of leucine and phenylalanine.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, **1993**, 11-14.
- [65] Schlamowitz M., Shaw A., Jackson W. : The nature of the binding of inhibitors to pepsin and the kinetics of inhibited peptic hydrolysis of N-acetyl-L-phenylalanyl-L-tyrosine.
J. Biol. Chem., **1968**, 243, 2821-2828.
- [66] Vesonder R.F. : *Can. J. Chem.*, **1972**, 50, 563.

- [67] Kurosawa T., Sakai K., Nakahara T., Oshima Y., Tabuchi T. : Extracellular accumulation of the polyol lipids, 3,5-dihydroxydecanoyl esters of arabitol and mannitol by *Aureobasidium* sp.
Biosci. Biotechnol. Biochem., **1994**, 58 (11), 2057-2060.
- [68] Nicolet B. : Isolement et identification de métabolites secondaires de deux souches du champignon *Stagnospora* sp., agent pathogène du liseron des haies (*Calystegia sepium*) et du liseron des champs (*Convolvulus arvensis*)
Thèse de Doctorat, Neuchâtel, **1999**.
- [69] Burki N. : Isolement et identification de métabolites secondaires de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*, agent pathogène du platane.
Thèse de Doctorat, Neuchâtel, **1996**.
- [70] Grémaud G. : Isolement et identification de métabolites secondaires de *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea*, champignon parasite du caféier.
Thèse de Doctorat, Neuchâtel, **1994**.
- [71] Mc Graw G., Hemingway R. : 6,8-dihydroxy-3-hydroxymethyl-isocoumarin, and other phenolic metabolites of *Ceratocystis minor*.
Phytochemistry, **1977**, 16, 1315-1316.
- [72] Bell A., Stipanovic R., Puhalla J. : Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*.
Tetrahedron, **1976**, 32, 1353-1356.
- [73] Aldridge D.C. : Pentaketide metabolites of the fungus *Phialophora labergii*.
J. Chem. Soc. Perkin 1, **1974**, 1540-1541.
- [74] Kubo Y., Suzuki K., Furusawa I., Yamamoto M. : Scytalone as a natural intermediate of melanin biosynthesis in appressoria of *Colletotrichum lagenarium*.
Exp. Mycol., **1983**, 7, 208-215.
- [75] Wheeler M.H., Stipanovic R. : Melanin biosynthesis and the metabolism of flaviolin and 2-hydroxyjuglone in *Wangiella dermatidis*.
Arch. Microbiol., **1985**, 142, 234-241.
- [76] Bell A., Wheeler M. : Biosynthesis and functions of fungal melanins.
Ann. Rev. Phytopathol., **1986**, 24, 411-451.
- [77] Fujimoto Y., Yokoyama E., Takahashi T., Uzawa J., Morooka N., Tsunoda H., Tatsuno T. : Studies on the metabolites of *Penicillium diversum* var. *aureum*. I.
Chem. Pharm. Bull., **1986**, 34 (4), 1497-1500.
- [78] Talapatra S., Karmacharya B., De S., Talapatra B. : (-)-Regiolone, an α -tetralone from *Juglans regia* : structure, stereochemistry and conformation.
Phytochemistry, **1988**, 27 (12), 3929-3932.
- [79] Morita T., Aoki H. : Isosclerone, a new metabolite of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary.
Agr. Biol. Chem., **1974**, 38 (8), 1501-1505.

- [80] Fujimoto H., Nagano J., Yamaguchi K., Yamazaki M. : Immunosuppressive components from an ascomycete, *Diplogelanispora grovesii*.
Chem. Pharm. Bull., **1998**, 46 (3), 423-429.
- [81] Tabushi H., Tajimi A., Ichihara A. : Phytotoxic metabolites isolated from *Scloretichum graminis* Fuckel.
Biosci. Biotechnol. Biochem., **1994**, 54 (11), 1956-1959.
- [82] Cameron D., Crossley M. : Synthesis of emodin methyl ethers.
Aust. J. Chem., **1977**, 30, 1161-1165.
- [83] Fredenhagen A., Mett H., Meyer T., Buchdunger E., Regenass U., Roggo B., Petersen F. : Protein tyrosine kinase C inhibition by fungal anthraquinones related to emodin.
J. Antibiot., **1995**, 48 (11), 1355-1358.
- [84] Lombardino J. : Preparation of substituted 1,2-benzisothiazolin-3-one 1,1 dioxides (o-benzoic sulfimides).
J. Org. Chem., **1971**, 36 (13), 1843-1845.
- [85] Nobuhiko I., Takeaki E. : Reactions of endocyclic linearly conjugated dienolates with Michael acceptors leading to bicyclo [2.2.2] octane derivatives. Application to the synthesis of C₁₃ degradation products of carotenoids.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, **1996**, 2397-2405.
- [86] Vinot N., Maitte P. : Synthèse de diméthyl-2,2-chromannediones-3,4: condensation avec les *ortho*-diaminopyridines.
J. Heterocyclic Chem., **1989**, 26, 1013-1021.
- [87] Codon P., Kué J. : Isolation of a fungitoxic compound from carrot root tissue inoculated with *Ceratocystis fimbriata*.
Phytopathology, **1960**, 50, 267-270.
- [88] Codon P., Kué J. : Confirmation of the identity of a fungitoxic compound produced by carrot root tissue.
Phytopathology, **1962**, 52, 182-183.
- [89] Harding V. : *Physiological Plant Pathology*, **1980**, 17, 277-289.
- [90] Kurosaki F., Nishi A. : Isolation and antimicrobial activity of the phytoalexin 6-methoxymellein from the cultured carrot cells.
Phytochemistry, **1983**, 22 (3), 669-672.
- [91] Kurosaki F., Tsurusawa Y., Nishi A. : Phytoalexin production in cultured carrot cells treated with pectinolytic enzymes.
Phytochemistry, **1985**, 24 (7), 1479-1480.
- [92] Marinelli F., Ronchi V., Pini D., Salvadori P. : Induction of 6-methoxy-mellein and 6-hydroxy-mellein production in carrot cells.
Phytochemistry, **1990**, 29 (3), 849-851.
- [93] Aue R., Mauli R., Sigg H. : Production of 6-methoxy-mellein by *Sporormia bipartis* Cain.
Experientia, **1966**, 22, 575.

- [94] Eaton M., Hutchinson D.: Isocoumarins from *Streptomyces mobaraensis*.
Tetrahedron lett., **1971**, 1337-1340
- [95] Stadler M., Anke H., Sterner O. : Metabolites with nematocidal and antimicrobial activities from the ascomycete *Lachnum papyraceum* (Karst.) Karst. III. Production of novel isocoumarin derivatives, isolation, and biological activities.
J. Antibiot., **1995**, 48 (3), 261-266.
- [96] Krohn K., Bahramsari R., Flörke U., Ludewig K., Kliche-Spory C., Michel A., Aust H.-J., Draeger S., Shulz B., Antus S. : Dihydroisocoumarins from fungi. Isolation, structure elucidation, circular dichroism, and biological activity.
Phytochemistry, **1997**, 45 (2), 313-320.
- [97] Ho Park S., Stierle A., Strobel G. : Metabolism of maculosin, a host-specific phytotoxin produced by *Alternaria alternata* on spotted knapweed (*Centaurea maculosa*).
Phytochemistry, **1994**, 35 (1), 101-106.
- [98] Sugawara F., Strobel G., Fisher L., Vanduyne G., Clardy J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 8291-8294.
- [99] Fenn J.B., Mann M., Meng C., Wong S., Whitehouse C. : «Electrospray ionization – principles and practice».
Mass Spectrometry Reviews, **1990**, 9, 37-70.
- [100] De Hoffmann E., Charette J., Stroobant V. (1994) : Spectrométrie de masse, Masson, Paris.
- [101] Bruins A. : Mechanistic aspects of electrospray ionization.
J. Chromatogr. A, **1998**, 794, 345-357
- [102] Cole R.B. : Electrospray ionization mass spectrometry. **1997**, Wiley, New York.
- [103] P. Kebarle, L. Tang : From ions in solution to ions in the gas phase – the mechanism of electrospray mass spectrometry.
Anal. Chem., **1993**, 65, 972a.
- [104] Turner W.B. : Fungal metabolites, **1971**, Academic Press, London and New York.
- [105] Arnstein H., Bentley R. : The biosynthesis of kojic acid.
Biochem. J., **1953**, 54, 517-522.
- [106] Arnstein H., Bentley R. : *Biochem. J.*, **1956**, 62, 403.
- [107] Morris D., Hager L. : Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein.
J. Biol. Chem., **1966**, 241 (8), 1763
- [108] Hager L., Morris D., Brown F., Eberwein H. : Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions.
J. Biol. Chem., **1966**, 241 (8), 1769-1777.

- [109] Threlfall D., Whistance G. : Biosynthesis of ubiquinone – a search for polyprenyl phenol and quinone precursors.
Phytochemistry, **1970**, 9, 355-359.
- [110] Inouye H, Ueda S., Inoue K., Matsumura H. : Biosynthesis of shikonin in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*.
Phytochemistry, **1979**, 18, 1301-1308.
- [111] Gross G. : Biosynthesis and biodegradation of wood components, **1985**, (Higuchi T. ed), Academic Press, Florida, p 229.
- [112] Zenk M.H. : *Rec. Adv. Phytochem.*, **1979**, 12, 139
- [113] French C., Vance C., Towers G. : Conversion of *p*-coumaric acid to *p*-hydroxybenzoic acid by cell free extracts of potato tubers and *Polyporus hispidus*.
Phytochemistry, **1976**, 15, 564-566.
- [114] Crowden R. : biosynthesis of the phenolic acid metabolites of *Polyporus tumulosus* Cooke.
Can. J. microbiol., **1967**, 13, 181-197.
- [115] Laurence J., Cox G.B., Gibson F. : Biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli* K-12: biochemical and genetic characterization of a mutant unable to convert chlorismate into 4-hydroxybenzoate.
J. Bacteriol., **1974**, 118, 41-45
- [116] Turner W., Aldridge D. : Fungal metabolites II, **1983**, Academic Press, London.
- [117] Narayanan T., Ramanada Rao G. : Production of β -(4-hydroxyphenyl)ethanol and β -(4-hydroxyphenyl)lactic acid by *Candida* species.
Can. J. Microbiol., **1976**, 22, 384-389.
- [118] Wheeler M.: Comparisons of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi.
Trans. Br. Mycol. Soc., **1983**, 81 (1), 29-36.
- [119] Sankawa U., Shimada H., Sato T., Kinoshita T., Yamasyki K. : Biosynthesis of scytalone.
Chem. Pharm. Bull., **1981**, 29 (12), 3536-3542.
- [120] Sankawa U., Shimada H., Sato T., Kinoshita T., Yamasyki K. : Biosynthesis of scytalone.
Tetrahedron lett., **1977**, 483-486.
- [121] Wheeler M. : Melanin biosynthesis in *Verticillium dahliae*: dehydration and reduction reactions in cell-free homogenates.
Exp. Mycol., **1982**, 6, 171-179.
- [122] Viviani F., Gaudry M., Marquet A. : Melanin biosynthesis: a study of polyphenol deoxygenation.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, **1990**, 1255.
- [123] Wheeler M., Stipanovic : Melanin biosynthesis in *Thielaviopsis basicola*.
Exp. Mycol., **1979**, 3, 340-350.

- [124] Greenblatt, Wheeler M. : HPLC analysis of fungal melanin intermediates and related metabolites.
J. Liq. Chromatog., **1986**, 9 (5), 971-981.
- [125] Gatenbeck S. : Incorporation of labelled acetate in emodin in *Penicillium islandicum*.
Acta Chem. Scand., **1958**, 12, 1211-1214.
- [126] Gatenbeck S. : On the biosynthesis of the pigments of *Penicillium islandicum*. II.
Acta Chem. Scand., **1960**, 14, 296-302.
- [127] Cohen P. : Biosynthetic studies on chlorinated anthraquinones in the lichen *Nephroma laevigatum*.
Phytochemistry, **1996**, 42 (5), 1325-1329.
- [128] Gill M. : Pigments of Australasian *Dermocybe* toadstools.
Aust. J. Chem., **1995**, 48, 1-26.
- [129] Gill M. : Pigments of fungi (macromycetes)
Nat. Prod. Rep., **1994**, 67-90.
- [130] Holker J., Lapper R., Simpson T. : The biosynthesis of fungal metabolites. Part IV. Tajixanthone : ^{13}C nuclear magnetic resonance spectrum and feedings with [1- ^{13}C]- and [2- ^{13}C]-acetate.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, **1974**, 2135-2140.
- [131] Dewick P. : The biosynthesis of shikimate metabolites.
Nat. Prod. Rep., **1994**, 11, 173.
- [132] Sandmann G., Hildenberg W. : *Z. Pflanzenphysiol.*, **1982**, 105, 379.
- [133] Russell D, Henderson M., Farmer V. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1961**, 52, 565.
- [134] Wahlberg I., Karlsson K., Austin D., Junker N., Roeraade J., Enzell C., Johnson W. : Effects of flue-curing and ageing on the volatile, neutral and acidic constituents of virginia tobacco.
Phytochemistry, **1977**, 16, 1217-1231.
- [135] Stevens M. : Relationship between polyene-carotene content and volatile compound composition of tomatoes.
J. Am. Soc. Hort. Sci., **1970**, 95, 461.
- [136] Isoe S., Hyeon S., Katsumura S., Sakan T. : *Tetrahedron lett.*, **1970**, 2517.
- [137] Foote C., Brenner M. : Chemistry of singlet oxygen. VIII. An unusual allenic oxygenation product (1).
Tetrahedron lett., **1968**, 6041.
- [138] Mousseron-Canet M., Dalle J.-P., Mani J.-C. : Photooxydation sensibilisée de composés apparentés aux caroténoides. Analogie avec la structure des caroténoides oxygénés, alléniques et autres.
Tetrahedron lett., **1968**, 6037-6040.

- [139] Abell C., Sutkowski A., Staunton J. : Studies on the biosynthesis of hydroxymellein using ^{17}O NMR and ^2H NMR spectroscopy to determine the origine of the C-4 hydroxy group.
J. Chem. Soc., Chem. Commun., **1987**, 586-587.
- [140] Abell C., Garson M., Leeper F., Staunton J. : Biosynthesis of the fungal metabolites alternariol, mellein, rubrofusarin, and 6-methylsalicylic acid from $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{H}$.
J. Chem. Soc., Chem. Commun., **1982**, 1011-1013.
- [141] Abell C., Doddrell D., Garson M., Laue E., Staunton J. : Biosynthesis of the polyketide mellein from $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{H}$ and $^{13}\text{CD}_3\text{CO}_2\text{H}$ in *Aspergillus melleus*: detection of deuterium by ^2H NMR and edited ^{13}C NMR spectra.
J. Chem. Soc., Chem. Commun., **1983**, 694-696.
- [142] Holker J., Simpson T. : Studies on fungal metabolites. Part 2. Carbon-13 nuclear magnetic resonance biosynthetic studies on pentaketide metabolites of *Aspergillus melleus* : 3-(1,2-epoxypropyl)-5,6-dihydro-5-hydroxy-6-methyl-pyran-2-one and mellein.
J. Chem. Soc. Perkin Trans I, **1981**, 1397-1400.
- [143] Brereton R., Garson M., Staunton J. : Biosynthesis of fungal metabolites : asperlactone and its relationship to other metabolites of *Aspergillus melleus*.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, **1984**, 1027-1033.
- [144] Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtas-Wasilewska M., Cho N.-S., Hofrichter M. : Biodegradation of lignin by white rot fungi
Fungal Genetics and biology, **1999**, 27, 175-185.
- [145] Labat G., Meunier B. : Etudes de la dégradation enzymatique de la lignine : évolutions récentes.
Bull. Soc. Chim. Fr., **1990**, 127, 553-564.
- [146] Elstner E., Heupel A. : Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.).
Planta, **1976**, 130, 175-180.
- [147] Gross G., Janse C., Elstner E. : Involvement of malate, monophenols and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.).
Planta, **1977**, 136, 271-276.
- [148] Mäder M., Füssl R. : *Plant Physiol.*, **1982**, 70, 1132-1134.
- [149] Thorpe G., Kricka I., Moseley S., Whitehead T. : *Clin. Chem.*, **1985**, 31, 1335-1345.
- [150] Job D., Dunford H. : Substituent effect on the oxidation of phenols and aromatic amines by horseradish peroxidase compound I.
Eur. J. Biochem., **1976**, 66, 607-614.
- [151] Schejter A., Lanir A., Epstein N. : Binding of hydrogen donors to horseradish peroxidase : a spectroscopic study.
Arch. Biochem. Biophys., **1976**, 174, 36-44.

- [152] Kummer U., Hauser M., Wegmann K., Olsen L., Baier G. : Oscillations and complex dynamics in the peroxidase-oxidase reaction induced by naturally occurring aromatic substrates.
J. Am. Chem. Soc., **1997**, 119, 2084-2087.
- [153] Mugnai L., Surico G., Sfalanga A. : Produzione di enzimi esocellulari da parte di funghi del legno di viti colpite dal « mal dell'esca ».
Mic. Ital., **1997**, 1, 11-22.
- [154] Tomaszewski M., Thimann K. : Interactions of phenolic acids, metallic ions and chelating agents on auxin-induced growth.
Plant Physiol., **1966**, 41, 1443-1454.
- [155] Lee T, Skoog F. : Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., **1965**, 18, 386-402.
- [156] Lee T., Starratt A., Jevnikar J. : Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols : structure-activity relationships.
Phytochemistry, **1982**, 21 (3), 517-523.
- [157] Lovisolo C., Schubert A. : Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in *Vitis vinifera* L..
J. Exp. Bot., **1998**, 49 (321), 693-700.
- [158] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. (1994) : Biologie moléculaire de la cellule, troisième édition, Médecine-Sciences Flammarion, Paris.
- [159] Chiarappa L. : Extracellular oxidative enzymes of wood-inhabiting fungi associated with the heart rot of living grapevines.
Phytopathology, **1959**, 49, 578-583.
- [160] Bieri S. : Isolement et caractérisation de métabolites secondaires de *Phellinus punctatus*, un des champignons impliqués dans une des maladies de la vigne : l'esca.
Travail de Diplôme, Université de Neuchâtel, **1999**.
- [161] Offe H.A, Barkow W. : *Chem. Ber.*, **1947**, 80, 458-469.
- [162] Govindachari T., Patankar S., Viswanathan N. : Isolation and structure of two new dihydroisocoumarins from *Kigellia pinnata*.
Phytochemistry, **1971**, 10, 1603-1606.
- [163] Kupchan S., Maruyama M., Hemingway R., Hemingway J., Shibuya S., Fujita T. : Structural elucidation of novel tumor-inhibitory sesquiterpene lactones from *Eupatorium cuneifolium*.
J. Org. Chem., **1973**, 38, 2189-2196
- [164] Claydon N., Allan M., Hanson J.R., Avent A.G. : Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*.
Trans. Br. Mycol. Soc., **1987**, 88, 503-513.

- [165] Pezet R., Pont V., Tabacchi R. : Simple analysis of 6-pentyl- α -pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi.
Phytochem. Anal., **1999**, 10, 285-288.
- [166] Collins R.P., Halim A.F. : Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers.).
J. Agric. Food Chem., **1972**, 20, 437-438.
- [167] Evidente A., Sparapano L., Andolfi A., Bruno G. : Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca of grapevine.
Phytopathol. Mediterr., **2000**, 39, 162-168.
- [168] Minervini G., Bisiach M. : Il deperimento della vite.
Notiziario sulle malattie delle Piante, **1988**, 109, 19-27.