

Université de Neuchâtel

Faculté des Sciences

**Isolement et identification de métabolites secondaires de
deux souches du champignon *Stagonospora* sp., agent
pathogène du liseron des haies (*Calystegia sepium*) et du
liseron des champs (*Convolvulus arvensis*)**

Travail de thèse présenté à la Faculté des Sciences par

Blaise Nicolet-Dit-Félix

Chimiste diplômé de l'Université de Neuchâtel
Pour l'obtention du titre de
Docteur ès Sciences

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Isolement et identification de métabolites secondaires de deux souches du champignon *Stagonospora* sp., agent pathogène du liseron des haies (*Calystegia sepium*) et du liseron des champs (*convolvulus arvensis*)

de M. Blaise Nicolet-dit-Félix

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

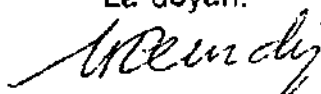
La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

Mme G. Defago (ETH-Zürich),
MM. R. Tabacchi (directeur de thèse), et R. Neier

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 20 octobre 1999

Le doyen:



J.-P. Derendinger

**Il n'est pas nécessaire d'espérer pour entreprendre,
ni de réussir pour persévérer.**

Guillaume d'Orange (1533-1584)

Le présent travail a été réalisé à l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel durant la période d'avril 1995 à juin 1999, au sein du département de Chimie Organique Analytique dirigé par le Professeur Raffaele Tabacchi*.

Je tiens à vivement le remercier pour m'avoir accueilli au sein de son groupe, pour la très grande confiance qu'il m'a témoignée et pour les grandes libertés qu'il m'a laissées dans la conduite de ce projet.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse, à savoir Madame le Professeur Geneviève Défago* de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Zürich et Monsieur le Professeur Reinhard Neier* de l'Université de Neuchâtel.

Cette thèse n'aurait pas abouti sans l'aide précieuse de nombreuses personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer tout au long de ces quatre ans. Je tiens donc vivement à remercier :

Chronologiquement, je commence par deux collègues qui ont su m'initier à l'analyse des substances naturelles ainsi qu'aux pratiques de ce laboratoire. Je veux parler de Nicolas Burki* et Michel Monziane*.

Un appui précieux et indispensable a été fourni par Abdellatif Fkyerat*, le « Monsieur Synthèse » du groupe qui était toujours disponible pour répondre à mes questions et me guider dans la bonne direction.

Je poursuis avec Mafalda Rama*, Guy-Marie Dubin*, Christine Poliard et Armelle Michel qui se sont succédés à la réalisation des spectres de masse. Pour la RMN, mes remerciements s'adressent à Saturnin Claude* qui a toujours su ce qu'il faisait et Heinz Bursian qui n'a toujours fait ce qu'il savait.

J'exprime également ma profonde gratitude à Camille Perret, qui a eu la patience et le courage de m'initier à la technique de la LC/MS, en dépit des problèmes techniques rencontrés.

Je me dois aussi de citer une seconde fois le nom de Saturnin Claude* pour les longues heures passées à la correction du présent manuscrit, pour les longues et passionnantes discussions ainsi que les précieux conseils diffusés tout au long de ce travail.

Une thèse en chimie des substances naturelles ne s'entend pas sans une collaboration active avec des scientifiques d'autres domaines et tout particulièrement des biologistes, j'exprime donc également toute ma reconnaissance aux personnes suivantes :

Toute l'équipe du Professeur Geneviève Défago* à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Zürich et tout particulièrement Hanspeter Pfirter*, Florence Marquis et Daniel Guntli*.

Le Professeur Aragno* et ses collaborateurs à l'Université de Neuchâtel qui ont mis à disposition le matériel et les appareils nécessaires aux cultures fongiques.

Le jardin Botanique de l'Université de Neuchâtel où j'ai pu cultiver mes plants de liserons et de tomates.

Je tiens aussi à citer les autres membres du groupe avec lesquels j'ai passé de très bons moments tout au long de ces quatre dernières années (par ordre alphabétique) : Cyril Barzaghi, Stefan Bieri, Cécile Bolle, Emmanuel Couché, Nicolas Droux, Gilles Goetz*, Gilles Grossmann, Ibrahim Lagbdaa, Christèle Leymarie, Vincent Linder, Stéphane Masi, Christelle Maspoli, David Masselot, Juan-Luis Naveira, Christian Ragot, Hoda Sherif, Manuel Tharin, Jean-Marc Vaucher, Paola Vivone, Lucien Vuilleumier, Sandra Wermeille et Claire-Lise Zbinden.

Au risque d'oublier quelqu'un, je ne peux malheureusement pas citer les noms de toutes les autres personnes côtoyées pendant les neuf dernières années passées à l'Institut. Je leur témoigne simplement toute mon affection et je les remercie pour tout le bonheur qu'elles m'ont apporté.

Je formule finalement l'espoir que le temps et la séparation n'aient jamais raison des liens étroits d'amitié scellés avec bon nombre de mes collègues.

* = Dr.

Résumé

Le liseron est considéré comme une mauvaise herbe à problème dans de nombreuses cultures du monde entier. Ses facultés de régénération ainsi que sa résistance à de nombreux herbicides rendent peu efficaces tous traitements chimiques ou mécaniques.

Le développement de la lutte biologique contre les mauvaises herbes par l'utilisation d'antagonistes naturels et, dans le cas présent, de mycoherbicides ouvre de nouvelles voies en direction du contrôle de cette plante.

Plusieurs projets, coordonnés par un programme européen COST, sont en cours sur le plan biologique. L'objet du présent travail s'inscrit dans une approche chimique, par l'étude de métabolites produits par un pathogène, en l'occurrence deux souches du champignon *Stagonospora* sp.

La culture du champignon en milieu artificiel est suivie de l'extraction des phases aqueuses et du mycélium. Les extraits obtenus sont ensuite purifiés par diverses techniques chromatographiques. L'analyse des composés isolés au moyen de techniques analytiques (RMN, MS, LC-MS, MS-MS), a conduit à l'identification de 17 composés, parmi lesquels quatre nouvelles molécules.

La réactivité envers les solvants de certains produits isolés génère des artefacts aux cours des procédures d'extraction et de purification. La synthèse de ces dérivés a été reproduite à partir de métabolites purifiés, de manière à confirmer les réactions intervenues. Cette étude permet également de postuler l'existence d'un composé naturel non-isolé, le leptosphaerodione lactol (20) à travers les dérivés synthétiques, 1-méthoxyleptosphaerodione (3) et 1-éthoxy-leptosphaerodione (4).

La comparaison de plusieurs milieux de culture a révélé le rôle essentiel joué par ces derniers sur le métabolisme du champignon et la biosynthèse de métabolites secondaires. La localisation prouvée, ou fort probable, des principaux composés isolés dans les spores du champignon laisse penser à un rôle de « première ligne » occupé par ces molécules. Cette action facilite l'implantation de pathogène dans les tissus de la plante.

La réalisation de tests sur des feuilles, pousses et plants de liseron et/ou de plantules de tomates a permis d'établir ou de confirmer l'activité biologique des trois principaux métabolites isolés : la leptosphaerodione (1), l'elsinochrome A (6) et la cercosporine (7). Une action synergique de la leptosphaerodione (1), en combinaison avec les spores du champignon, a également été établie.

L'étude du matériel végétal malade par l'utilisation de la LC-MS munie d'une source de type electrospray (ESI) a révélé la présence de leptosphaerodione (1), sous forme de trace, dans l'une des fractions étudiées. La présence d'elsinochrome A (6) est fortement soupçonnée dans une autre fraction.

Summary

Bindweeds are considered as weeds in many agricultural areas of the world. Their control with mechanical or chemical methods is difficult because of their vigorous regeneration capacity. Some control but not eradication is obtained with chemical herbicides.

The poor effectiveness of herbicides have stimulated studies on biological control of bindweeds using natural antagonists. The use of fungal pathogens, named mycoherbicides, open a new way for the control of these weeds.

Some research groups, coordinated by an european COST program, work on the biological aspects of selected fungal pathogens from the genus *Stagonospora* sp. This present research, concerns the chemical approach by the study of metabolites product by two strains of the fungus.

The pathogen is cultivated on an artificial medium, an extraction is afterwards performed on the aqueous phases and the mycelium. The crude extracts are then purified using various chromatographic techniques. The analysis of isolated compounds requires analytical methods (NMR, MS, MS-MS, LC-MS). This study led to the identification of 17 molecules, among them 4 new natural metabolites.

Some compounds react with solvents giving artefacts, generated during the extraction and purification procedures. The synthesis of these derivatives, starting from purified metabolites, allowed to confirm such reactions. This study permitted especially to assume the presence of a not-isolated natural compound, the leptosphaerodione lactol (20), by the identification of two synthetic products, 1-methoxyleptosphaerodione (3) and 1-ethoxyleptosphaerodione (4).

The comparison of two culture media showed the fundamental role played by them on fungal metabolism. The proved or very probable location of the main isolated metabolites in the fungal spores permits to assume a « front line » role played by these molecules. This action promote the establishment of the pathogen in plant tissues.

Tests performed on bindweeds and/or tomatoes leaves, sheets and seedlings establish or confirm the biological activity of the main isolated metabolites : leptosphaerodione (1), elsinochrom A (6) and cercosporin (7). A synergy is observed between leptosphaerodione (1) and the fungal spores.

The sick plant material was studied using a LC-MS system with an electrospray (ESI) source. Leptosphaerodione (1) has been detected, as traces, in one fraction. Elsinochrom A (6) is probably present in an other one.

Table des matières

CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.1 Les liserons	1
1.1.1 Généralités	1
1.1.2 Liseron des champs (<i>Convolvulus arvensis</i>)	4
1.1.3 Liseron des haies (<i>Calystegia sepium</i>)	5
1.1.4 Nuisances dues aux liserons	6
1.1.4 Moyens de lutte	8
1.2 Lutte biologique contre les mauvaises herbes	10
1.2.1 Mauvaises herbes	10
1.2.2 Lutte biologique	13
1.2.3 Lutte biologique contre les liserons	16
1.2.3.1 Mycoherbicides	18
1.2.4 Projet européen COST 816, groupe CONCAL	19
1.2.5 Recherches entreprises à Zürich	21
1.3 Genre <i>Stagonospora</i> spp.	21
1.3.1 Métabolites isolés de champignons du genre <i>Stagonospora</i>	23
1.3.2 Images au microscope	25
1.4 But du travail	27

CHAPITRE II : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE METABOLITES 29

2.1 Matériel de départ	29
2.2 Culture du champignon	29
2.3 Procédure d'extraction (milieu PDB)	31
2.4 Tests biologiques préliminaires	32
2.5 Procédure de purification de l'extrait brut des phases aqueuses	33
2.6 Métabolites isolés	36
2.6.1 Métabolites isolés de la souche LA39	38
2.6.1.1 <i>Leptosphaerodione (1)</i>	38
2.6.1.2 <i>o-Dihydroquinone (2)</i>	44
2.6.1.3 <i>1-Methoxyleptosphaerodione (3)</i>	51
2.6.1.4 <i>1-Ethoxyleptosphaerodione (4)</i>	56
2.6.1.5 <i>Vermélonge (5)</i>	60
2.6.1.6 <i>Elsinochrome A (6)</i>	63
2.6.2 Métabolites isolés de la souche 214 Ca	69
2.6.2.1 <i>Cercosporine (7)</i>	69
2.6.2.2 <i>Isocercosporine (8)</i>	76
2.6.2.3 <i>Acide coriolique (9)</i>	79
2.6.2.4 <i>3,4-Dihydro,-3,4,8-trihydroxy-1(2H) naphthalénone (10)</i>	85
2.6.2.5 <i>Scytalone (11)</i>	90
2.6.2.6 <i>3-Méthylscytalone (12)</i>	93
2.6.2.7 <i>6,8-Dihydroxy-3-hydroxyméthylisocoumarine (13)</i>	99
2.6.2.8 <i>o-Méthylidiaporthine (14)</i>	103
2.6.2.9 <i>6,8-Dihydroxy-3-(2'-oxopropyl)isocoumarine (15)</i>	107
2.6.2.10 <i>6,8-Dihydroxy-3-méthylisocoumarine (16)</i>	110
2.6.2.11 <i>Citreoisocoumarine (17)</i>	113

CHAPITRE III : SYNTHESSES	117
3.1 Introduction	117
3.2 Schémas réactionnels	118
3.2.1 <i>Synthèse du dérivé quinoxaline (18) de la leptosphaerodione (1)</i>	118
3.2.2 <i>Synthèse de l'ortho-dihydroquinone (2)</i>	121
3.2.3 <i>Synthèse de l'ortho-dihydroquinone deutérée (19)</i>	122
3.2.4 <i>Synthèse de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3)</i>	124
 CHAPITRE IV : MILIEUX DE CULTURE	 129
4.1 Types de milieux	129
4.2 Culture en milieu V8	131
4.3 Etude de la composition chimique de cultures en boîtes de pétri en milieu V8 sur agar	134
4.4 Localisation de la leptosphaerodione (1) dans les spores	135
 CHAPITRE V : TESTS BIOLOGIQUES	 139
5.1 Introduction	139
5.2 Activité biologique connue des métabolites isolés	140
5.2.1 <i>Composés dérivés du perylène (6, 7, 8)</i>	140
5.2.2 <i>Leptosphaerodione (1) et ses dérivés (2, 3, 4, 20)</i>	141
5.2.3 <i>Naphtalénones (5, 10, 11, 12)</i>	142
5.2.4 <i>Isocoumarines (13, 14, 15, 16, 17)</i>	143
5.3 Tests biologiques sur feuilles et pousses de liseron	145
5.4 Tests biologiques sur des plants de liseron	150

CHAPITRE VI : MATERIEL VEGETAL 153

6.1 But de l'analyse	153
6.2 Procédure expérimentale	154
6.3 HPLC	154
6.4 LC/MS	157
6.4.1 <i>Introduction</i>	157
6.4.2 <i>Analyse du matériel végétal</i>	161
6.4.2.1 <i>Analyse de la fraction LM5-3</i>	164
6.4.2.2 <i>Analyse de la fraction LM5-4</i>	165
6.4.2.3 <i>Analyse de la fraction LM5-5</i>	167
6.4.2.4 <i>Analyse de la fraction LM5-6</i>	169
6.4.2.5 <i>Analyse de la fraction LM5-7</i>	171

CHAPITRE VII : DISCUSSION 173

7.1 Composés isolés	173
7.1.1 <i>Composés quinoïques dérivés du perylène</i>	173
7.1.1.1 <i>Stéréochimie</i>	175
7.1.1.2 <i>Tautomérie</i>	177
7.1.1.3 <i>Biosynthèse</i>	178
7.1.2 <i>Leptosphaerodione et ses dérivés</i>	180
7.1.2.1 <i>Réactivité</i>	180
7.1.2.2 <i>Biosynthèse</i>	185
7.1.3 <i>Naphtalénones</i>	187
7.1.4 <i>Isocoumarines</i>	189
7.1.4.1 <i>Biosynthèse</i>	190
7.1.5 <i>Acide coriolique</i>	191

7.2	Activité biologique	192
7.3	Milieux de culture	193
7.4	Matériel végétal	194
CHAPITRE VIII : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		197
CHAPITRE IX : PARTIE EXPERIMENTALE		203
9.1	Techniques expérimentales	203
9.1.1	Généralités	203
9.1.2	Chromatographie sur colonne	204
9.1.3	HPLC	204
9.1.4	Résonance magnétique nucléaire (RMN)	205
9.1.5	Spectrométrie de masse	206
9.1.5.1	Modes EI et DCI	206
9.1.5.2	Haute résolution	206
9.1.5.3	LC/MS	206
9.1.6	Spectroscopie infrarouge	206
9.2	Cultures fongiques	207
9.2.1	Milieux de culture	207
9.2.2	Inoculation	207
9.2.3	Extraction	207
9.3	Tests biologiques	208
9.3.1	Matériel végétal	208
9.3.2	Procédure	209
9.3.2.1	Tests sur feuilles, pousses et plantules	209
9.4	Etude du matériel végétal	209
CHAPITRE X : BIBLIOGRAPHIE		211

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Les liserons

1.1.1 Généralités

Le mot « liseron » tire ses racines étymologiques du grec, il constitue un diminutif du mot lis et signifie petit-lis. Le mot lis dérive du mot grec « *leios* » ou « *lios* » qui signifie lisse, poli, brillant et par extension beau, agréable, charmant. Ainsi le mot lis signifie littéralement fleur brillante ou magnifique. Dans le patois du midi de la France, le mot *courréjado* ou littéralement longue courroie est utilisé, d'où littéralement la plante qui lie, qui attache [1].

Les liserons sont des dicotylédones appartenant à l'ordre des *Tubiflorae* et à la famille des convolvulacées (du latin *volvo*, je roule ; *cum*, avec : plante qui s'enroule), ils sont originaires d'Eurasie. On en recense environ 1800 espèces réparties dans près de 50 genres. Les convolvulacées forment une famille de plantes herbacées et ligneuses, souvent grimpantes, présentes dans toutes les régions tropicales et tempérées, dans des milieux très divers. Cette famille comporte de nombreuses plantes ornementales ou cultivées. Plusieurs centaines

de variétés de patates douces (*Ipomea batatas*), dont certaines, nommées à tort ignames, sont cultivées en régions tropicales et jouent un grand rôle dans l'approvisionnement en amidon des pays de ces régions. De nombreuses espèces des genres *Ipomea* et *Convolvulus* sont cultivées comme plantes ornementales et notamment le volubilis (*Ipomea purpurea*) [2, 3]. Le genre *Convolvulus* regroupe toutes les espèces de liserons, on en recense plus de 170 actuellement. Liseron se dit « *Winde* » en allemand, « *bindweed* » en anglais et « *vilucchio* » en italien.



Figure 1.1 : liserons s'enroulant autour d'un treillis de fer.

Les deux variétés de liserons impliquées dans ce travail, le liseron des haies ou grand liseron (*Calystegia sepium*, anciennement *Convolvulus sepium* L.) et celui des champs ou petit liseron (*Convolvulus arvensis* L.) sont classées parmi les « mauvaises herbes ». Ils causent de réels problèmes dans bon nombre de cultures européennes et mondiales [4]. Les liserons n'ont toutefois pas que mauvaise réputation et font partie intégrante de la flore de nos régions. A ce propos, *Henry Correvon* [5] en parlait en des termes plutôt élogieux en 1922 : « Le petit liseron rose tapisse de ses touffes étalées, recouvertes de délicieuses fleurs roses et blanches, le sol des champs bien éclairés ; sa tige volubile grimpe

aux chaumes et aux branches qu'elle enroule en spirale et qu'elle orne artistiquement. Son frère, le grand liseron blanc, court aux haies et grimpe aux arbustes ou aux chaumes des graminées, qu'il réjouit de ses grandes coupes blanc de lait » [5]. Le liseron a également inspiré les poètes. *Chateaubriand* [6] écrivait, en parlant des charmes de l'étude de la botanique : « A l'aspect attendrissant du *Convolvulus* qui entoure de ses fleurs pâles quelque aune décrépît, on croit voir une jeune fille presser de ses bras d'albâtre son vieux père mourant » [6].



Figure 1.2 : liserons envahissant un taillis de joncs.

Les liserons sont encore parfois employés en médecine naturelle à cause du suc laiteux, purgatif, abondant dans toutes les parties de la plante [7, 8]. A l'état sauvage, les chèvres, les moutons, les chevaux, ... s'en nourrissent volontiers. Les porcs consomment surtout les parties souterraines. Une récente étude sur les causes de maladies intestinales développées par des chevaux du Colorado montre que ces derniers ont comme point commun la consommation de liserons des champs. L'analyse des parties aériennes de la plante révèle la présence d'alcaloïdes dérivés du tropane ; la tropine, la pseudotropine et la tropinone ainsi que des alcaloïdes dérivés de la pyrrolidine ; la meso-cuscohygrine et l'hygrine [9]. Des alcaloïdes similaires ont également été isolés chez d'autres espèces du genre *Convolvulus*. On peut citer notamment la cuscohygrine [10] et certaines calystegines (dérivés polyhydroxylés du tropane), isolés de racines de *C. arvensis* et *C. sepium* [11-14] (figure 1.3). Des tests en laboratoire sur des souris ayant mangé des liserons montrent plusieurs signaux cliniques anormaux dépendant de la quantité consommée [9].

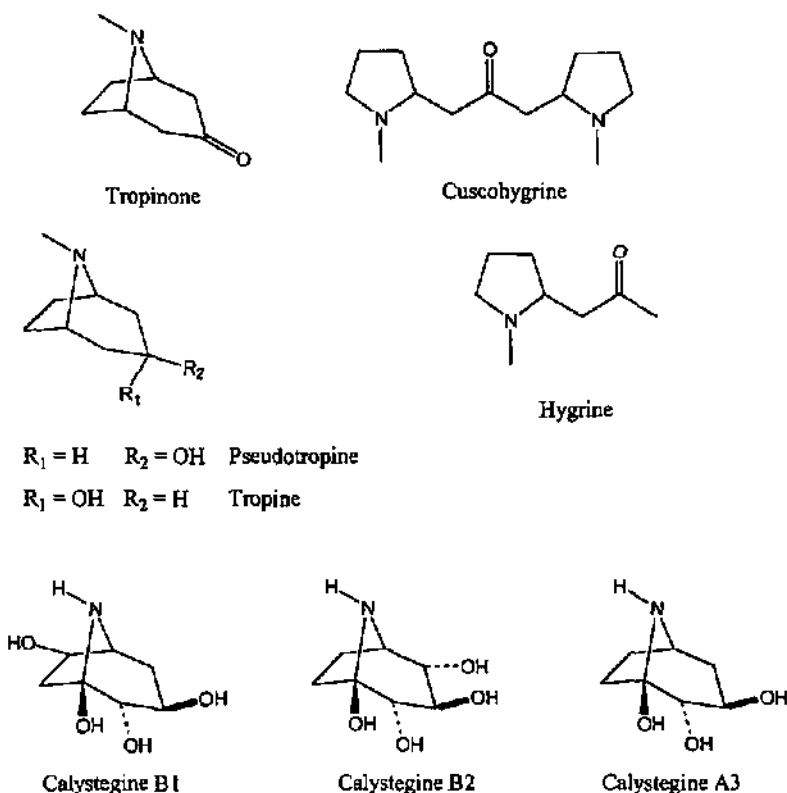


Figure 1.3 : exemples de métabolites isolés des liserons.

1.1.2 Liseron des champs (*Convolvulus arvensis*)

Le nom *arvensis* vient du mot latin *arvenere* qui signifie cultiver, labourer. Cette espèce est donc très commune dans les champs, les jardins, les talus et les bords des chemins. Elle est présente en altitude jusqu'à près de 3000 mètres, de même qu'au niveau de la mer. On la trouve presque partout dans le monde, grosso modo entre 60° de latitude nord et de 45° de latitude sud [15].

Il s'agit d'une plante pérenne variant de 30 centimètres à près de 2 mètres de long, rampante ou volubile. Ses fleurs roses, blanches ou mêlées de rose et de blanc apparaissent de mai à octobre, elles s'épanouissent pendant le jour et se referment le soir ou par temps humide. Les feuilles ont un pétiole et leurs limbes sont ovales ou allongés, en forme de fer de hallebarde ou de fer de flèche, ayant

à la base deux lobes aigus (figure 1.4). La plante se perpétue et se multiplie abondamment soit par des bourgeons nés sur les tiges souterraines, soit par des bourgeons adventifs nés sur les racines [8]. Son système racinaire adventif peut pénétrer jusqu'à des profondeurs de 9 mètres et sur un diamètre de 6 mètres [15]. Les graines permettent à la plante de coloniser de nouvelles régions, elles restent viables dans l'estomac des oiseaux pendant plusieurs jours et plus de 20 ans dans le sol [16].

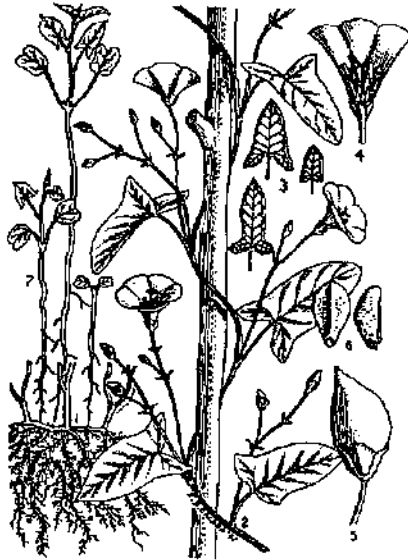


Figure 1.4 : liseron des champs [15].

1.1.3 Liseron des haies (*Calystegia sepium*)

Le nom *Calystegia* est composé des mots grecs *kalyx* : calice et *stega* : entourer ou inclure, indiquant que le calice est entouré de deux bractées en forme de feuilles (figure 1.5 (a)). Le liseron des haies est une plante grimpant dans les buissons, les haies, dans les endroits frais, dont les tiges peuvent atteindre jusqu'à 5 mètres de longueur et ses grandes et belles fleurs blanches apparaissent de juin à septembre. Il est très commun en Europe ainsi qu'en Asie, Amérique et Australie. Il supporte un peu moins l'altitude que son cousin le liseron des champs. Les feuilles, plus grandes que chez *C. arvensis*, ont un long pétiole et un limbe très développé en forme de fer de flèche ou de fer de hallebarde aigu au sommet, mais présentant à la base deux larges oreillettes obtuses (figure 1.5). Il s'agit d'une plante vivace à tiges souterraines très

allongées pouvant s'étendre sur 4 mètres de diamètre. On reconnaît chez cette plante deux sortes de tiges aériennes différentes, les unes florifères et les autres pas, ne s'enroulant pas et étalées au sol. Ces dernières, après avoir acquis une certaine longueur, se recourbent à leur extrémité et s'enfoncent dans la terre en donnant naissance à des racines adventives ; en outre les rameaux de la moitié inférieure des tiges grimpantes florifères se replient et arrivent jusqu'au sol, y rampent, puis se comportent comme les tiges rampantes. Toutes les parties de tiges souterraines sont susceptibles de donner naissance à de nouvelles plantes [8].



Figure 1.5 : liseron des haies (*Calystegia sepium*).

1.1.4 Nuisances dues aux liserons

La difficulté du contrôle des liserons réside dans ses grandes capacités de régénération et notamment par la multiplication végétative. Une racine de 1 à 2 noeuds suffit pour redonner une plante et ceci jusqu'à 32 centimètres de profondeur [17]. Le développement annuel d'un plant est considérable, la longueur des stolons peut atteindre jusqu'à 6 mètres.

La multiplication générative, mal connue, semble être moins importante sous nos latitudes. Toutefois il ne faut pas sous-estimer ce mode de reproduction qui permet l'introduction de liserons dans de nouvelles régions. La grande durée de vie des graines, leur abondante production (10⁷/ha) ainsi que leur dissémination facile via les oiseaux, les engins mécaniques, l'eau ou encore les récoltes elles-mêmes favorisent ce mode de reproduction.

Les épidémies naturelles dues à des agents pathogènes fongiques détruisent souvent les feuilles des liserons. Toutefois, ces épidémies se produisent trop tard dans la saison pour réduire l'impact négatif des liserons sur les cultures [18].

Comme nous le disions plus haut, les liserons constituent un sérieux problème pour bon nombre de cultures européennes et mondiales : maïs, blé, haricot, coton, betterave sucrière, vigne se trouvent concernés, sans oublier les plates-bandes de tout jardinier en herbe. Aux Etats-Unis, on a pu observer, dans certains cas, des baisses de production de l'ordre de 30 % pour l'orge, de 40 % sur le blé et de 70 % sur le maïs [4]. Dans le vignoble suisse, le liseron est également considéré comme une mauvaise herbe à problèmes. En Europe, le liseron des champs est classé en septième position sur vingt espèces de mauvaises herbes, tous types de cultures confondus. On le retrouve même en première position sur quinze variétés de mauvaises herbes dans la vigne et dans les vergers. Sur dix types de cultures majeures recensées, il apparaît sept fois parmi les quinze premières mauvaises herbes sévissant dans ces cultures [19].



Figure 1.6 : liserons envahissant un champ de maïs.

Les liserons réduisent la productivité en entrant en compétition avec les cultures, notamment au niveau de l'apport en eau et en sels minéraux. Les tiges enserrent également les plantes cultivées en provoquant le phénomène de verse, diminuent l'accès de ces dernières à la lumière et gênent au niveau de la récolte [20]. De plus les liserons représentent un site de reproduction pour certains insectes, qui ensuite s'attaquent aux cultures voisines [21]. Ces insectes peuvent aussi servir d'hôtes pour certains virus agissant sur les cultures, un exemple est l'agent de la mosaïque de la luzerne [22]. Ainsi, grâce à ses redoutables facultés d'extension, le liseron des champs se trouve à la douzième place des principales adventices mondiales [15].



Figure 1.7 : liserons recouvrant un talus.

1.1.5 Moyens de lutte

Traditionnellement il existe deux moyens pour lutter contre les liserons, la lutte mécanique et la lutte chimique. Ce n'est que depuis le début des années 1970 que l'on voit se développer de nouvelles stratégies de lutte biologique. On observe aussi la combinaison de plusieurs moyens afin de gagner en efficacité.

Le procédé mécanique consiste à labourer fréquemment la terre afin d'étouffer les racines des mauvaises herbes. Malheureusement cette technique n'est guère appropriée pour les liserons étant donné leur grand pouvoir de régénération. On assiste ainsi à une dispersion de la plante plutôt qu'à une réelle régulation. Le sarclage régulier des cultures une fois les liserons apparus donne certains résultats mais reste relativement compliqué et conduit à des blessures sur les plantes cultivées. Des essais menés sur plusieurs années dans le cadre de rotations des cultures et de l'utilisation du sarclage ont montré toutefois que, d'une façon générale, les associations de mauvaises herbes demeurent [23].

La lutte chimique

Dès 1915, on relate l'utilisation de chlorure de sodium le long des routes américaines. Dans les années 1920, c'est l'arsénite de sodium ou le disulfure de carbone qui furent employés [16, 24]. L'avènement de nouveaux herbicides tels que 2,4-D, glyphosate, dicamba, picloram [25], imazapyr [26], ou atrazine [23] offrent un certain contrôle mais pas une éradication de la mauvaise herbe [25, 27-29] (figure 1.8).

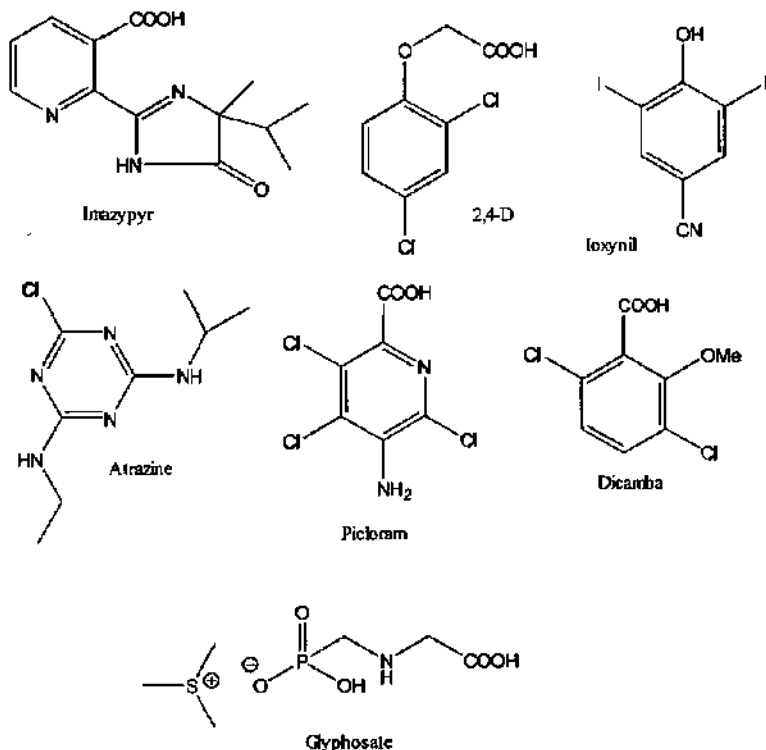


Figure 1.8 : exemples d'herbicides utilisés contre les liserons.

Plusieurs essais ont été réalisés à l'aide de combinaisons d'herbicides appliquées à différentes périodes de l'année mais sans résultats spectaculaires. Il faut compter entre 3 et 5 ans pour réduire significativement les infestations du liseron des champs à l'aide de combinaisons de travaux du sol, de cultures compétitives (blé d'hiver) et d'herbicides [29]. Malgré le développement de nouvelles stratégies, des problèmes demeurent en raison des caractéristiques du

liseron et notamment, en plus de ses énormes capacités de régénération, son apparition tardive dans les cultures céréalières empêchant partiellement la lutte chimique par crainte de nuire aux cultures [30].

Dans le cas du maïs, il a été démontré que l'atrazine, principal herbicide utilisé dans ce type de culture, n'agit pas de façon satisfaisante contre les liserons, l'herbicide n'arrivant pas à atteindre les racines profondes. Les herbicides de contact utilisés dans les premiers stades de développement du maïs sont inopérants sur le liseron vu son apparition tardive. Il est donc nécessaire d'utiliser d'autres types d'herbicides que l'atrazine seule en recourant à des associations comme avec le dicamba [23].

Le dicamba possède les mêmes caractéristiques qu'un herbicide de type « hormonal » avec, en plus, un effet comme herbicide de pénétration par les organes souterrains.

Le 2,4-D possède une action hormonale sur la plante. Il permet une lutte efficace contre les liserons lorsqu'il est appliqué sur des plantes bien développées. L'utilisation de 2,4-D dans les cultures de maïs est également intéressante. Dans ce cas le traitement s'applique plante par plante. Malheureusement, l'application doit se faire lorsque le maïs mesure 15 cm et à ce stade le liseron est trop petit pour être totalement détruit [2].

Le stade de développement du liseron lors de l'application de l'herbicide est très important. Il a été remarqué qu'une application lors de l'apparition des premières fleurs permet d'obtenir de bons résultats.

1.2 Lutte biologique contre les mauvaises herbes

1.2.1 Mauvaises herbes [31]

Les mauvaises herbes sont parties intégrantes des agro-écosystèmes. La plupart d'entre elles ont évoluées parallèlement avec les plantes cultivées et dépendent ainsi de la manière dont les cultures sont réalisées. Par définition, elles sont considérées comme des plantes poussant à des endroits indésirables. Elles entrent en compétition avec les cultures pour l'eau, les nutriments, la lumière et de ce fait affectent les rendements des cultures. Elles compliquent les travaux agricoles et constituent des vecteurs de maladies, d'où le besoin de les contrôler.

Récemment, il a été considéré que les mauvaises herbes n'étaient pas seulement des plantes indésirables et qu'il était peut-être utile de s'intéresser à un éventuel rôle bénéfique. Les mauvaises herbes contribuent tout d'abord directement à la biodiversité; en Europe centrale, environ 300 espèces de plantes sauvages sont considérées comme mauvaises herbes. Elles sont également des hôtes indirects de nombreux autres organismes qui en sont dépendants, y compris les prédateurs. Les mauvaises herbes entrent également en compétition dans les premiers stades de développement des cultures en créant une compétition qui peut promouvoir la croissance des jeunes plants. Il s'en suit qu'un équilibre est à trouver entre les aspects bénéfiques et les nuisances.

Sur un plan conceptuel, on peut se poser la question de savoir si le contrôle des mauvaises herbes doit adhérer à certains principes ou simplement viser à leur élimination. Compte tenu de la longue histoire de l'agriculture, on ne peut relever que deux attitudes principales pouvant s'appliquer aux mauvaises herbes : le contrôle à n'importe quel prix ainsi que l'utilisation des limitations économiques.

Le concept du contrôle à tout prix vise à maintenir des niveaux d'infestation aussi bas que possible, afin d'éviter des baisses de rendements et d'empêcher une future augmentation de ces niveaux. Il s'agit du plus ancien des comportements. Il a été probablement appliqué depuis les premiers temps de l'agriculture quand aucune méthode valable n'était disponible et qu'une large partie du travail agricole consistait à mener la lutte. Malgré l'efficacité partielle de ces méthodes, le concept était rationnel et des règles simples basées sur la dynamique des populations des mauvaises herbes étaient déjà prises en compte. Il a été remarqué qu'il suffisait de laisser pousser les mauvaises herbes et se répandre leurs graines pendant juste une saison pour observer une augmentation significative des infestations les années suivantes. En son temps, il était tout à fait rationnel de faire un maximum d'efforts pour avoir des champs sains. Le concept n'était pas restreint à des mesures de contrôle direct, mais incluait aussi la rotation des cultures comme mesure de limitation des infestations.

Parmi les différents types de contraintes, le concept dit des limitations économiques est le plus directement applicable. Il est basé sur la densité en mauvaises herbes pour laquelle le coût du contrôle équivaut au montant des pertes dans les cultures. Cette approche a été introduite au moment où, l'on pouvait gérer efficacement les mauvaises herbes, par l'utilisation d'herbicides, tout en restant dans des coûts raisonnables. Au contraire du concept de contrôle à n'importe quel prix, cette approche tolère une certaine extension et le cultivateur n'a pas à s'effrayer d'être incapable de gérer une augmentation de

l'infestation dans l'année en cours pour n'avoir pas procédé à un traitement adéquat la saison passée. L'introduction de limitations économiques fut ainsi une étape importante allant dans le sens d'une gestion rationnelle des mauvaises herbes. Il est maintenant possible d'approfondir cette façon de procéder en y incorporant des aspects écologiques.

Le concept des limitations écologiques, bien plus compliqué, dépasse l'aspect purement économique : combien de mauvaises herbes sont utiles ? Cette question serait probablement assez déconcertante pour un cultivateur. Pour établir une telle approche, il est tout d'abord nécessaire de connaître non seulement les aspects négatifs mais également les effets positifs des diverses espèces d'herbes réputées mauvaises sur les cultures et les agro-écosystèmes en général. Dans un second temps, il faut avoir une idée du seuil de rentabilité. Pour le moment, trop de facteurs inconnus existent et de plus, il n'est pas encore possible de procéder à un contrôle sélectif des espèces les plus nuisibles en laissant les autres survivre dans des proportions où elles sont plus bénéfiques que nuisibles. Toutefois il est essentiel, pour les scientifiques de travailler dans cette voie afin de déboucher sur la quantification des effets bénéfiques des espèces de mauvaises herbes pour éventuellement les intégrer dans des modèles de limitations.

A l'heure actuelle, on ne remarque pas un grand besoin d'une telle approche, étant donné qu'avec le concept des limitations économiques il reste toujours des mauvaises herbes dans les champs et que ces dernières contribuent à une approche écologique. Il faut cependant admettre que seule une minorité de cultivateurs suivent ce schéma et que dans de nombreux cas ils possèdent des champs largement dépourvus de mauvaises herbes. Le concept des limitations écologiques pourrait devenir d'une grande importance avec le développement de nouvelles techniques plus efficaces, comme l'utilisation d'herbicides non-sélectifs dans des cultures leur résistant.

Si l'on accepte, pour le présent tout au moins, que les limitations économiques représentent un concept rationnel pour la gestion des mauvaises herbes dans les cultures, il est important de s'interroger sur les critères que doit suivre une telle méthode afin d'adhérer au concept. Le tableau 1.1 présente les conditions de base auxquelles la technique devrait adhérer.

Tableau 1.1 : critères de base que devrait remplir une méthode de contrôle des mauvaises herbes.

-
- contrôler un large spectre d'espèces de mauvaises herbes
 - avoir un coût lié à l'efficacité
 - agir efficacement dans des conditions environnementales changeantes
 - présenter une sélectivité liée au type de culture
 - permettre un traitement sur de grandes surfaces dans un temps relativement court
 - causer un minimum d'effets secondaires en protégeant l'environnement
 - ne pas engendrer de problème de résistance
-

Parmi les méthodes disponibles actuellement, le contrôle chimique satisfait le mieux les critères ci-dessus. Le premier d'entre eux, qui est le plus important pour le cultivateur, est habituellement suivi avec satisfaction. Il s'agit de l'unique raison favorisant la large utilisation d'herbicides chimiques comme méthode de contrôle, dans l'agriculture intensive actuelle. Toutefois, cette façon de procéder a ses faiblesses, notamment en ce qui concerne les deux derniers critères.

Le procédé mécanique, méthode la plus utilisée après la lutte chimique, n'engendre pas ces problèmes mais est moins satisfaisant, spécialement au niveau de la rentabilité, de la sélectivité, et des superficies traitées. Actuellement, il n'existe pas de véritables alternatives aux contrôles chimique et mécanique.

1.2.2 Lutte biologique

Le contrôle biologique représente une alternative possible. Il consiste en l'utilisation délibérée d'ennemis naturels pour supprimer la croissance ou réduire la population d'espèces de mauvaises herbes [32]. Ce type de lutte se fonde sur le fait que les antagonistes naturels peuvent jouer un rôle important dans l'extension et la densité des mauvaises herbes.

Les premiers exemples de lutte biologique remontent à 1902, à Hawaii. Il s'agissait d'insectes permettant de lutter contre une plante importée d'Amérique Tropicale, la *Lantana* (*Lantana camara*). Le même insecte fut aussi employé en 1914 en Australie.

Il existe plusieurs stratégies de lutte liées à l'utilisation d'agents pathogènes, parmi lesquelles trois couvrent une large majorité des exemples connus [33, 34] :

1) La première, la stratégie inoculative, introductive ou méthode classique, consiste à lutter contre des plantes introduites dans de nouvelles régions et qui s'y développent massivement par l'absence d'ennemis naturels. Dans ce cas, on cherche à introduire un organisme capable d'établir un équilibre dans la population de la plante et de permettre sa régulation, sans pour autant chercher à l'éradiquer.

Cette stratégie ne concerne qu'une faible part des infestations dues à des mauvaises herbes, le contrôle induit par celle-ci se fait graduellement. Le succès du procédé dépend des conditions de développement telles que :

- le développement et la reproduction de l'agent de contrôle
- la diminution de la population de l'herbe cible.

Dans cette situation, ce ne sont bien souvent que quelques plants de l'espèce qui ont été introduits, ce qui conduit à la présence d'un matériel génétique homogène. Il faut ainsi trouver un pathogène spécifique dans le pays d'origine de la mauvaise herbe et pour cela, on utilise préférentiellement des insectes.

Un exemple est l'introduction de la rouille *Puccinia chondillina* pour contrer *Chondrilla juncea*. Cette composée originaire des régions méditerranéenne, où elle est parfaitement inoffensive de part la présence d'ennemis naturels, a envahi le sud-est australien avec un remarquable succès. Dans certains cas sa densité pouvait atteindre plusieurs centaines d'individus au mètre carré. Des études dans le sud de la France ont montré que la rouille *Puccinia chondillina* avait un effet dépressif très marqué sur la population de la plante. L'introduction du champignon en un seul endroit a permis en moins d'un an d'en réduire drastiquement la population [35, 36].

2) La deuxième approche est la stratégie inondative ou méthode bioherbicide. On cherche ici à introduire massivement et sur un domaine spécifique un pathogène, dans le but d'infecter et de tuer la totalité de la population de l'herbe indésirable présente. Les plantes indigènes sont génétiquement hétérogènes, ce qui impose que les pathogènes utilisés soient endémiques et aient pu se développer parallèlement à la plante. Ils sont, par

conséquent, isolés à partir de mauvaises herbes et ensuite appliqués en grandes quantités et en plusieurs fois. Avec cette méthode de lutte, l'utilisation de champignons pathogènes ou mycoherbicides représente la voie la plus étudiée.

Les agents biologiques utilisés sont généralement, produits, formulés, emballés de manière standard, puis enregistrés comme des herbicides chimiques. Comparé à d'autres stratégies de lutte, cette approche est caractérisée par des coûts d'application souvent élevés et le besoin d'une période humide avant l'obtention de résultats sur les plantes cibles. Une formulation appropriée du champignon permettant de réduire, ou d'éliminer les besoins en humidité, augmente de manière significative l'efficacité du pathogène en tant que mycoherbicide [37].

Les premières tentatives dans ce domaine ont été menées par des forestiers américains du Minnesota. Ces derniers ont inoculé un parasite indigène, *Ceratocystis fagacearum* afin d'éliminer des chênes de faible intérêt forestier, au profit de plantes plus intéressantes. Cet agent biologique de débroussaillage s'est révélé d'une efficacité supérieure aux agents chimiques avec un coût d'application moindre [38].

Un exemple de succès commercial de la méthode bioherbicide est le Collego® [39, 40]. Il s'agit d'une suspension de spores du champignon *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene*, utilisée contre la légumineuse *Aeschynomene virginica* envahissant les champs de riz et de pois. Le Collego® est enregistré aux Etats-Unis depuis 1982. Il se présente sous la forme d'une poudre sèche contenant 15 % de spores et 85 % d'ingrédients inertes. Avant son utilisation, il est réhydraté, mis en suspension dans une solution sucrée puis additionné d'eau et enfin appliqué dans les champs dans des proportions d'environ 94 litres par hectare (2×10^6 spores viables/millilitre). L'épandage se fait par voie aérienne ou au moyen d'un tracteur. L'application a généralement lieu en une seule fois par saison, durant les mois de juillet et d'août, lorsque la mauvaise herbe vient à dépasser la hauteur des plants de riz. Le champignon infecte les folioles, les pétioles et les tiges de la plante, de même que les cosses et les graines. Après inoculation les spores du champignon germent et pénètrent dans l'épiderme de la plante en moins de 24 heures. Le mycélium se ramifie rapidement dans les tissus et des lésions sont visibles déjà après 3 jours en serre et après 7-10 jours dans les champs. Des observations menées après des épandages aériens du champignon montrent que des plants de 30-40 cm sont détruits en 4-6 semaines [40]. Entre 1974 et 1981, 16 champs de riz, couvrant 184 hectares ont ainsi été. En moyenne 92 % des mauvaises herbes ont péri, tuées par le champignon. Les plantes restantes (8 %), largement

infectées, ont peu produit de graines. Dans le cas des pois, le champignon est encore plus efficace avec un taux de contrôle moyen, sur la période de 1976 à 1981, de 94 %. Ces résultats montrent que le champignon *C. gloeosporioides* est un mycoherbicide très efficace conduisant à des résultats comparables, voir meilleurs que des herbicides chimiques [40].

3) La troisième stratégie de lutte est plus récente, sa traduction de l'anglais pourrait être « l'approche de la gestion d'un système » (« *system management approach* »), par un contrôle biologique des mauvaises herbes. Cette approche n'a toutefois été appliquée, à ce jour, que dans quelques rares cas. Il s'agit d'une stratégie intermédiaire entre les méthodes inoculative et inondative. Le terme « d'approche de la gestion d'un système » a été proposé par rapport aux aspects qualitatifs de la manipulation scrupuleuse des systèmes pathogène-mauvaise herbe ou insecte-mauvaise herbe. Son but est de développer la compétition mauvaise herbe-culture en faveur de cette dernière par stimulation du développement d'une maladie épidémique ou de l'action d'insectes sur la population de l'herbe cible [41]. Cette technique exclut des événements perturbateurs tels que : introduction d'organismes de contrôle exotiques (méthode classique) ou application en masse d'un inoculum (stratégie inondative). Il s'agit pour l'heure d'un modèle de recherche pour le contrôle de *Senecio vulgaris* en utilisant un champignon, largement répandu, *Puccinia lagenophorae* ainsi qu'une mite *Tyria jacobaeae* ayant des effets additifs sur le contrôle de la mauvaise herbe cible [42].

1.2.3 Lutte biologique contre les liserons

Depuis le début des années 1970, de nombreuses études sur le contrôle biologique des liserons ont été menées à l'aide de divers pathogènes. Pour ce qui est des animaux, on a recensé 140 espèces d'insectes et trois espèces d'acariens qui s'attaquent à *Convolvulus arvensis* et aux autres convolvulacées proches. Un des principaux problèmes est la nécessité de protéger les espèces utiles et notamment la patate douce (*Ipomea batatas*) qui, comme nous le disions plus haut, occupe une place prépondérante dans l'alimentation de nombreux pays tropicaux. Le manque de spécificité ainsi que les difficultés liées à leur application, rendent difficile l'utilisation de tels agents dans la lutte contre les liserons [43].

Un coléoptère *Megacerus discoidus* a été testé sur le liseron de haies (*Calystegia sepium*). Cet insecte, natif de l'Amérique du Nord s'attaque aux graines de nombreuses espèces de la famille des convolvulacées. Son taux d'efficacité approche les 70 %. Son action porte sur une partie des graines et pas du tout sur les autres plantes existantes. Dans le cadre d'une stratégie inondative il ne conduit qu'à une régulation du nombre de plants issus de la germination de graines. En conséquence, une utilisation, en combinaison avec d'autres facteurs de stress, pourrait être envisagée pour lutter contre les liserons [44].

D'autres travaux se sont portés sur d'autres espèces d'insectes tel que le coléoptère *Galeruca rufa* qui provoque une défoliation importante et réduit la production de fleurs chez *Convolvulus arvensis* [45]. On peut également citer un insecte granivore de la famille des *Bruchidae*, *Spermophagus sericeus* [4] ou une mite *Tyta luctuosa* [46]. Toutefois, ces insectes ne conduisent pas à des résultats probants. La plupart d'entre eux ne sont pas monophages et encore moins spécifiques aux variétés de liserons nuisibles. De plus, leur action sur les liserons n'est en général pas suffisante pour conduire à un véritable contrôle de la plante. Leur utilisation en combinaison avec un autre pathogène, comme un champignon, par exemple, semble constituer une voie intéressante à étudier. L'intégration de l'équipe du Prof. *Campobasso*, qui travaille sur la mite *Tyta luctuosa*, dans le programme européen sur la lutte contre les liserons constitue un premier pas en direction d'une stratégie mixte insectes-champignon pathogène (paragraphe 1.2.4).

Il existe également des travaux menés avec des acariens. On peut citer notamment le cas d'*Aceria malherbae* Nuzzaci, originaire de Grèce et introduit au Texas en tant qu'agent régulateur du liseron des champs (*C. arvensis*). Il s'agit de la première introduction positive d'un arthropode en tant qu'agent de contrôle biologique contre les mauvaises herbes aux Etats-Unis. Ce dernier est aussi capable de survivre en hibernant sur les rhizomes des plantes hôtes. Ses effets restent toutefois difficile à estimer. Des recherches sont également menées dans d'autres Etats et notamment dans le Dakota du Sud, dans le New Jersey et dans l'Oklahoma [47]. Une récente étude réalisée en Afrique du Sud sur le même acarien a montré que son action concernait uniquement des plantes des genres *Convolvulus* et *Calystegia*. Il serait ainsi inactif sur des espèces du genre *Ipomea* [48].

1.2.3.1 Mycoherbicides

Les premiers travaux mentionnant l'utilisation de champignons pathogènes dans la lutte biologique contre les liserons remontent à 1939. Ils concernaient un champignon du genre *Rhizoglyphus* ayant une activité contre *Convolvulus avense*. Les résultats de tests en champs ne furent toutefois pas extrêmement convaincants. Plus récemment, deux champignons pathogènes ont fait l'objet d'études menant à des résultats plus intéressants. Il s'agit de *Phoma proboscis* et *Phomopsis convolvulus*.

L'action de *Phoma proboscis* Heiny sur le liseron de champs (*C. arvensis*) conduit au flétrissement des pousses et des jeunes pétioles ainsi qu'au développement de petites lésions sur les feuilles [49]. Sous certaines conditions, il peut conduire à la mort de jeunes plants. Son utilisation comme mycoherbicide en début de saison de manière à affaiblir et à diminuer le nombre de plants se révèle intéressante. Ses capacités à contrôler des plants de liserons plus âgés n'ont pas encore fait l'objet d'investigations. Son intérêt en tant que mycoherbicide potentiel est appuyé par sa culture facile en milieu artificiel avec production d'un inoculum abondant et durable. Il reste toutefois d'autres critères à prendre en compte avant d'envisager son utilisation en tant que mycoherbicide, il s'agit notamment de tester sa spécificité et de déterminer ses performances en milieu naturel [50]. De nombreuses espèces de *Phoma*, agissant sur les genres *Convolvulus* et *Calystegia* ont été décrites précédemment mais sans étude concernant leur pathogénicité.

L'autre champignon, *Phomopsis convolvulus* Ormeno, cause des lésions brunes-claires, de tailles variables, sur les feuilles du liseron des champs (*C. arvensis*), une auréole jaune-verte entoure ces lésions [51, 52]. Les symptômes s'observent essentiellement sur les feuilles de plantes ombragées et exposées à l'humidité. L'utilisation du champignon sur de jeunes plants conduit à de bons résultats. L'application d'un inoculum contenant 10^9 spores/m² de *P. convolvulus* sur des plants de liserons au stade de 3-5 feuilles a permis d'observer un taux de mortalité de l'ordre de 70 % [53] ou même 87 % [54]. Des tests en champs, sur des graines prégermées de *C. arvensis* conduisent à de hauts niveaux de contrôle des liserons avec des réductions de la biomasse de l'ordre de 75 à 83 %. Une telle efficacité tant en champ qu'en milieu contrôlé est plutôt rare dans la recherche sur les bioherbicides [54].

Une étude portant sur les métabolites produits par *P. convolvulus* a permis d'isoler l'ergosterol, le peroxide d'ergostérol ainsi que 4 nouvelles phytotoxines : les phtalides A et B de l'acide convolvulannique, le convolvulol et

l' α -pyrone ou convolvulopyrone (figure 1.9). Les phthalides A et B de l'acide convolvulannique présentent une forte activité toxique ($3-5 \times 10^{-4}$ M), en 4 heures pour B et 12 heures pour A, envers des feuilles de liserons de champs. Des effets toxiques mineurs sont observés pour le convolvulol et la convolvulopyrone [55].

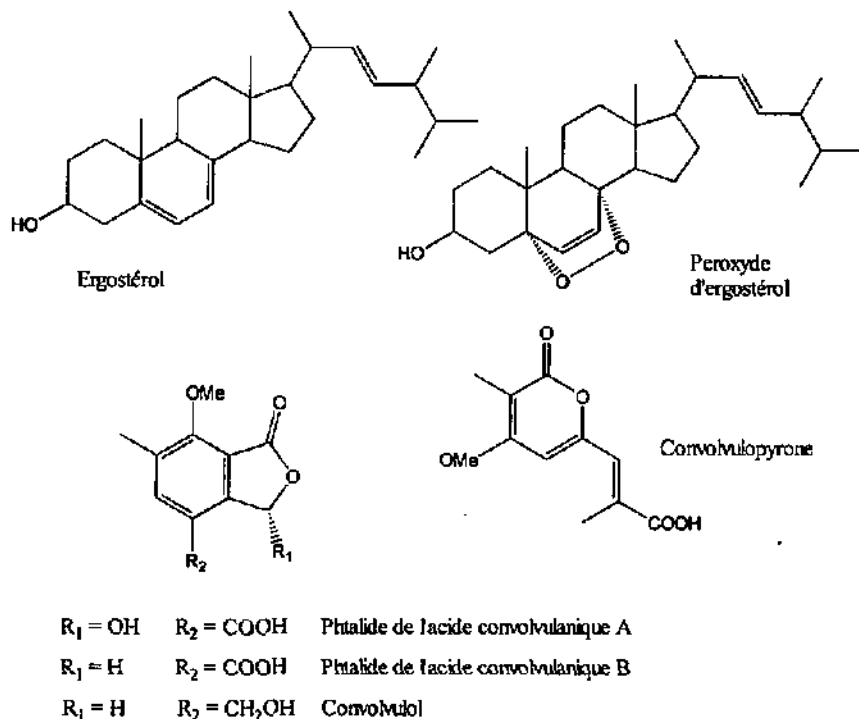


Figure 1.9 : métabolites isolés de *Phomopsis convolvulus* [55].

1.2.4 Projet européen COST 816, groupe CONCAL [33]

La lutte biologique contre les mauvaises herbes fait actuellement l'objet d'un programme européen de recherche sous l'intitulé de COST 816 (COopération européenne dans le domaine de la recherche Scientifique et Technique). Les principaux objectifs de ce programme sont présentés au tableau 1.2.

Tableau 1.2 : principaux objectifs du programme COST 816 :

- Regrouper les institutions européennes désirant coopérer dans la recherche sur les possibilités de contrôle biologique des mauvaises herbes dans les cultures.
 - Promouvoir un programme pour la recherche scientifique et l'échange.
 - Rédiger un protocole général sur le contrôle biologique des mauvaises herbes en Europe.
 - Intégrer le contrôle biologique dans les stratégies générales de contrôle des mauvaises herbes.
 - Etablir un protocole pour résoudre de possibles conflits d'intérêts.
 - Etablir une liste de nouvelles mauvaises herbes européennes pressenties pour un contrôle biologique.
-

Ce programme couvre cinq domaines, constituant cinq groupes de travail. Les mauvaises herbes étudiées sont *Amaranthus* spp., *Chenopodium album*, *Senecio vulgaris*, *Convolvulus arvensis/Calystegia sepium* et *Orobanche* spp. (dés 1997). Depuis son lancement en février 1994, le programme COST 816 a obtenu un large succès auprès de nombreux groupes de recherche européens cherchant à coopérer dans la mise au point de stratégies de lutte biologique contre les mauvaises herbes dans les cultures. Le projet a attiré des chercheurs provenant d'universités, d'institutions gouvernementales et d'industries privées couvrant un large spectre de disciplines.

La coopération développée au sein des divers groupes de travail a favorisé l'établissement de procédures de recherche coordonnées et d'un projet de gestion efficace. La focalisation des activités sur quatre puis cinq mauvaises herbes cibles a grandement stimulé la coopération et facilité le transfert de technologies entre les différents groupes de recherche.

Jusqu'à présent, les travaux se sont concentrés sur la recherche de base sur l'étude des interactions entre les mauvaises herbes cibles et leurs antagonistes naturels. L'objectif est de cerner les problèmes spécifiques à la mauvaise herbe et aux agents de contrôle potentiels. Il s'agit aussi d'élaborer une approche adéquate du contrôle biologique de la plante. Le prochain pas sera d'appliquer ces découvertes au développement de solutions pratiques.

Le groupe CONCAL (CONvolvulus/CALystegia), s'occupe de l'étude des deux variétés de liserons *Convolvulus arvensis* et *Calystegia sepium*. Il est dirigé par le Professeur G. Défago de Zürich [56] et regroupe plusieurs groupes de recherche européens dans des domaines divers.

1.2.5 Recherches entreprises à Zürich [57]

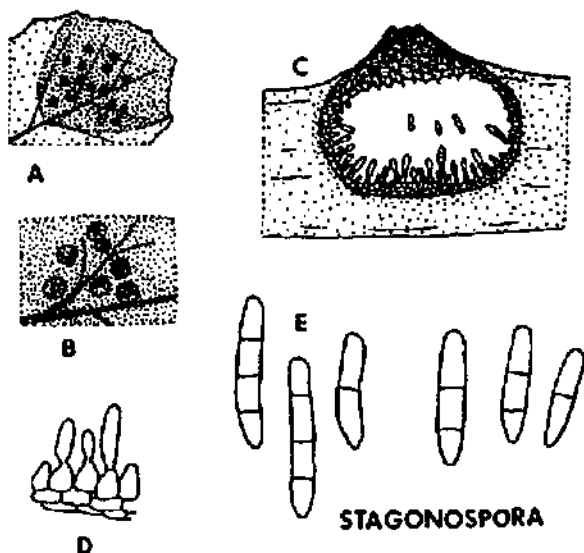
Les recherches ont commencé, en 1982, par la collecte de plants malades des deux variétés de liserons *C. arvensis* et *C. sepium* dans divers pays européens et notamment en Slovaquie, Suisse, France, Royaume-Uni, Allemagne, Italie ou Yougoslavie. Un total de 271 champignons représentant 44 espèces et 30 genres ont été isolés. La spécificité et la pathogénicité des meilleurs candidats, tous appartenant au genre *Stagonospora* sp., furent ensuite testées. Des tests en champs menés sur des plants âgés de 2 à 4 mois ont permis de sélectionner 5 champignons actifs envers *C. sepium* et 2 actifs envers *C. arvensis*. Par exemple, l'application de la souche 214 Ca contre *C. sepium*, dans le maïs (Eschikon, Suisse) a conduit à une diminution de la couverture du sol par la mauvaise herbe de 82 % en 1990 et de 63 % en 1991. Lors de ces tests, il a été remarqué que le champignon se dissémine naturellement depuis l'aire d'inoculation vers des sites voisins. L'intérêt se porta rapidement sur deux souches du genre *Stagonospora*, tout d'abord la souche 214 Ca, provenant de Brno en Slovaquie puis la souche 3.9, renommée plus tard LA39, provenant de Long Ashton (près de Bristol) en Angleterre. L'isolat 214 Ca n'est actif que contre *C. sepium* alors que l'isolat LA39 est actif contre les deux variétés de liserons mais avec un effet plus prononcé sur *C. arvensis*. Le champignon appliqué en émulsion avec de l'huile conduit à une efficacité supérieure envers les liserons. L'émulsion d'huile maintient l'agressivité du pathogène pendant les périodes sèches et constitue un micro-environnement favorable au cours du processus d'infection. Le liseron des champs est sensible à la souche LA39 à tous les stades de sa croissance, mais les vieilles plantes sont tout de même plus sensibles que les jeunes. On peut donc conclure que l'isolat LA39 constitue un agent potentiel de lutte biologique contre le liseron des champs, spécialement lorsqu'il est appliqué sous la forme d'une émulsion [37, 57, 58].

1.3 Genre *Stagonospora* sp.

Embranchement	<i>Deuteromycota</i>
Classe	<i>Coelomycetes</i>
Ordre	<i>Sphaeropsidales</i>
Genre	<i>Stagonospora</i>

Le genre *Stagonospora* appartient à l'embranchement des *Deuteromycota* ou deutéromycètes. Il s'agit de champignons imparfaits ne présentant pas de phase de reproduction sexuée ou non encore observée. Il fait partie de la classe des *Coelomycetes* et de l'ordre des *Sphaerosidales*, ces derniers regroupent près de 300 genres représentant 3000 espèces. L'ordre des *Sphaeropsidales* regroupe des champignons pycnidiaux, c'est-à-dire que les conidies sont produites dans des pycnidies, sortes de petits sacs asexués bien définis. Le genre *Stagonospora* compte près de 350 espèces.

Les espèces du genre *Stagonospora* vivent en saprophytes ou en parasites sur les feuilles et les tiges de différentes plantes (figure 1.10). Ces champignons possèdent un mycélium segmenté, ramifié et de couleur brunâtre. A l'intérieur des pycnidies noires se développent des conidies segmentées. Il est fréquent d'observer au microscope des spores de petite taille visiblement non septées. *Cunneil* [59] les considère comme des spores immatures détachées des pycnidies prématurément ; on parle de microconidies [60].



A, B : aspect de pycnidies sur une feuille ; C : coupe d'un pycnidie
D : conidiophores ; E : conidies segmentées

Figure 1.10 : le genre *Stagonospora* (*S. carpathica*) [61].

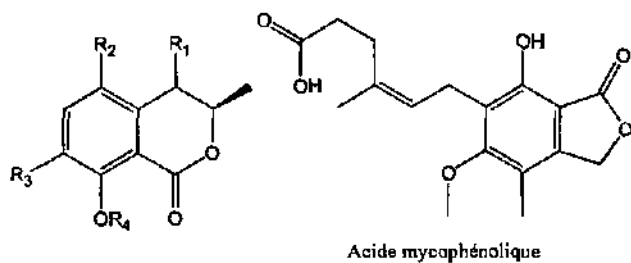
Les pycnidies noires s'observent facilement sur les parties nécrosées des feuilles de liseron infectées (figure 1.11).



Figure 1.11 : nécrose du champignon *Stagonospora convolvuli* (LA39) sur une feuille de liseron de champs (points noirs = pycnidies).

1.3.1 Métabolites isolés de champignons du genre *Stagonospora*

L'espèce la mieux connue et la plus étudiée est *Stagonospora nodorum* souvent nommée *Septoria nodorum* Berk. (téléomorphe : *Leptosphaeria nodorum* Müller). Cette dernière a fait l'objet de nombreuses études relatives à sa biologie et à sa chimie. L'intérêt porté à ce champignon provient du fait qu'il est l'agent pathogène responsable de la septoriose du blé, une importante maladie affectant cette céréale. Il cause des retards de germination et de croissance des graines et des jeunes plants. Il conduit également au blocage de l'assimilation du dioxyde de carbone par la plante [63]. L'étude des métabolites produits par ce champignon a permis d'isoler de nombreuses phytotoxines spécifiques. Il a, par exemple, été montré que la septorine cause l'inhibition des oxydations phosphorylantes [64]. Le milieu de culture du champignon renferme également des molécules voisines de la septorine, tels que la N-méthoxyseptorine (le composé ayant l'activité biologique la plus forte) et le N-méthoxyseptorinol [65]. D'autres phytotoxines appartenant à la famille de la melleine, un puissant inhibiteur de la germination et de la croissance, ont également été isolées : Il s'agit des substances suivantes : (-)-(3R)-melleine (ochracine), (3R)-O-méthylmelleine, (-)-(3R, 4R)- et (-)-(3R, 4S)-4-hydroxy melleine, (-)-(3R)-7-hydroxymelleine, acide mycophénolique ou (-)-(3R)-5-hydroxymelleine [63, 66, 67] (figure 1.12).



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
H	H	H	H	ochracine, (-)-(3R)-melleine
OH	H	H	H	(+)-(3R, 4R) et (-)-(3R, 4S)-4-hydroxymellein
H	H	OH	H	(-)-(3R)-7-hydroxymelleine
H	OH	H	H	(-)-(3R)-5-hydroxymelleine
Me	H	H	H	(3R)-O-methylmelleine

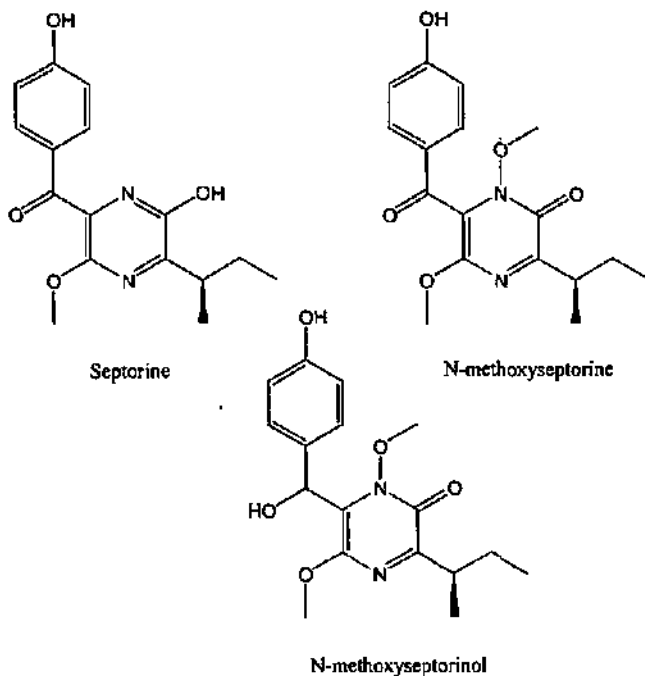


Figure 1.12 : métabolites isolés de *Septoria nodorum*.

L'analyse d'une souche stérile du genre *Stagonospora* (ATCC 74235), dans le but de trouver des métabolites antifongiques a débouché sur l'isolement de la pramanicine (figure 1.13). Ce composé présente des propriétés antifongiques en inhibant notamment les champignons *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* [68, 69].

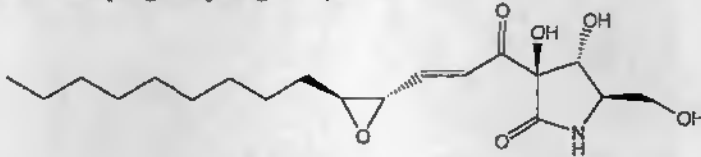


Figure 1.13 : pramanicine isolée d'une souche stérile du genre *Stagonospora*.

1.3.2 Images au microscope [62]

Des photographies au microscope électronique de spores de la souche LA39 ont été réalisées sur des feuilles de liserons des champs (*Convolvulus arvensis*) [62]. La figure 1.14 montre clairement que la pénétration du champignon s'effectue par les stomates de la feuille (A). Il est aussi possible que l'espace intercellulaire serve également d'entrée (B). La figure 1.15 montre, quant à elle, une spore germant à la surface d'une feuille (C).

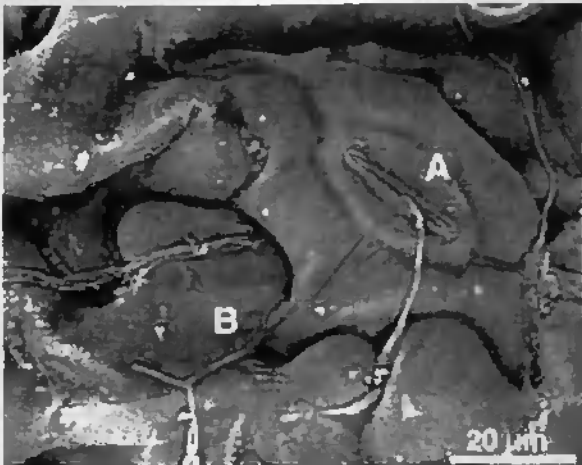


Figure 1.14 : pénétration de *Stagonospora convolvuli*, souche LA39 dans une feuille de liseron des champs (*Convolvulus arvensis*) [62].

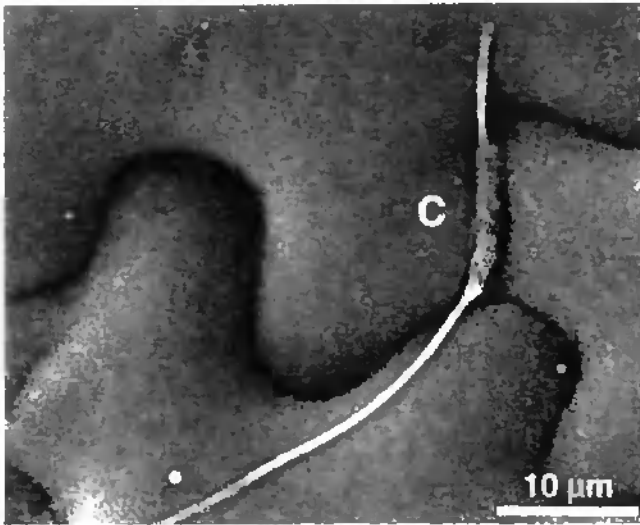


Figure 1.15 : spore de *Stagonospora convolvuli*, souche LA39 germant sur une feuille de liseron des champs (*Convolvulus arvensis*) [62].

1.4 But du travail

L'utilisation de mycoherbicides constitue un moyen potentiel de lutte biologique contre les liserons et en particulier ceux des champs (*Convolvulus arvensis*) et des haies (*Calystegia sepium*). Dans le cadre du développement de tels mycoherbicides, la sélection de souches actives puis leur étude sur le plan biologique a fait l'objet de plusieurs travaux de recherches depuis le début des années 1980 (*Phoma proboscis* [49, 50], *Phomopsis convolvulus* [51-54], *Stagonospora*, sp. [37, 56-58]). Il faut noter toutefois, que très peu de recherches ont concerné la composition chimique des souches sélectionnées (*P. convolvulus* [55]). Ceci justifie que l'on entreprenne l'étude de deux d'entre elles du genre *Stagonospora*. Il s'agit des souches LA39 et 214 Ca, des champignons *Stagonospora convolvuli*, et *Stagonospora* sp., respectivement. Ces dernières ont été sélectionnées et étudiées par le groupe du Prof. Défago [37, 56-58].

Dans ce travail, il est projeté, en premier lieu, d'isoler et d'identifier des métabolites secondaires produits par ces deux souches en milieu liquide artificiel. Dans une deuxième phase, il s'agira de réaliser des tests sur le matériel végétal, afin d'apprécier l'activité biologique des principaux métabolites et de la relier aux symptômes développés par la maladie. En dernier lieu, il sera nécessaire de confirmer la présence de ces même métabolites dans le matériel végétal infesté.

CHAPITRE II

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE METABOLITES

2.1 Matériel de départ

Les deux souches étudiées dans le présent travail appartiennent au genre *Stagonospora*. La souche LA39 a été isolée, en 1994, de feuilles et de tiges de plants de liseron des champs (*Convolvulus arvensis*) récoltés à Long Ashton près de Bristol, en Angleterre (*Défago*). L'identification de cette souche a permis de déterminer son espèce. Il s'agit de *Stagonospora convolvuli* (*Dearness & House*). La seconde souche, 214 Ca a été isolée, en 1988, de plants de liseron des haies (*Calystegia sepium*) récoltés à Brno en Slovaquie actuelle (*Unar*). L'espèce du champignon n'a pas été déterminée.

2.2 Culture du champignon

Les deux souches sont cultivées en milieu liquide. La majorité des cultures se font dans un milieu nutritif à base de PDB (Potato Dextrose Broth,

Difco, USA). Des essais ont également été menés dans deux autres milieux, dont un à base de jus de légumes concentré de marque V8 (Campbell Grocery Products Ltd., UK), selon la méthode décrite au chapitre 4.1.

Le milieu de culture est autoclavé dans des erlenmeyers de 500 ml contenant environ 300 ml de solution. Celui à base de PDB, une fois autoclavé, est limpide et de couleur jaune alors que le V8 est orange, opaque et comporte des dépôts solides.

L'inoculum est cultivé sur milieu nutritif de PDA (Potato Dextrose Agar) dans des boîtes de pétri fraîchement inoculées (maximum trois semaines). Le repiquage fréquent de nouvelles boîtes à partir de souches mères est important afin d'éviter d'éventuelles mutations génétiques du champignon. Ceci assure la reproductibilité du contenu de l'extrait brut. Le repiquage des boîtes de pétri a été régulièrement réalisé à Zürich [57].



Figure 2.1 : culture de la souche LA39 en agitation.

Le champignon est inoculé sous atmosphère stérile, les erlenmeyers sont agités pendant trois semaines, à la lumière du jour et à température ambiante.

L'aspect du mycélium varie d'une souche à l'autre mais aussi d'un milieu de culture à l'autre. En milieu PDB, le mycélium de la souche LA39 se présente

sous la forme de boulettes brunes-rouges de diamètres variables (de quelques millimètres à près d'un centimètre). Ces dernières sont couvertes de petites pointes; à l'image du bogue d'une châtaigne. Ces boulettes de mycélium apparaissent très tôt dans la culture, après trois jours déjà. La quantité de celles-ci change d'un flacon à l'autre et leur taille varie en raison inverse de leur nombre. La phase liquide est généralement de couleur brun-rouge. Il arrive parfois qu'elle soit incolore.

Pour la souche 214 Ca, toujours en milieu PDB, on remarque également la formation de boulettes mais ces dernières sont plutôt brunes-vertes. Elles présentent le même aspect que pour la souche LA39 mais sont plus petites et ne dépassent guère 2-3 mm de diamètre. La phase aqueuse est généralement brune-verte.

2.3 Procédure d'extraction (milieu PDB)

Les procédures d'extraction et de purification des souches LA39 et 214 Ca sont très proches. Pour éviter toute répétition, seul l'exemple de la souche LA39 est décrit (voir aussi paragraphe 9.2.3).

Après trois semaines le milieu liquide est séparé du mycélium par filtration. Les phases aqueuses sont ensuite extraites à l'acétate d'éthyle (AcOEt). Les phases organiques sont de couleur orange pour la souche LA39 et rouge intense pour la souche 214 Ca. Cette extraction permet d'obtenir entre 150 et 450 mg d'extrait brut pour 10 litres de milieu de culture. Le pH correspond à celui du milieu naturel, soit environ 5. Les quantités obtenues varient en fonction de la souche. Il n'a pas été remarqué de différences significatives en fonction de la température et du temps d'éclairage.

Le mycélium est extrait par agitation mécanique à l'aide d'acétate d'éthyle. On obtient environ un gramme d'extrait brut du mycélium pour 10 litres de milieu de culture. La coloration est semblable aux extraits bruts des phases aqueuses. Le contenu de l'extrait brut du mycélium n'a pas été étudié dans ce travail.

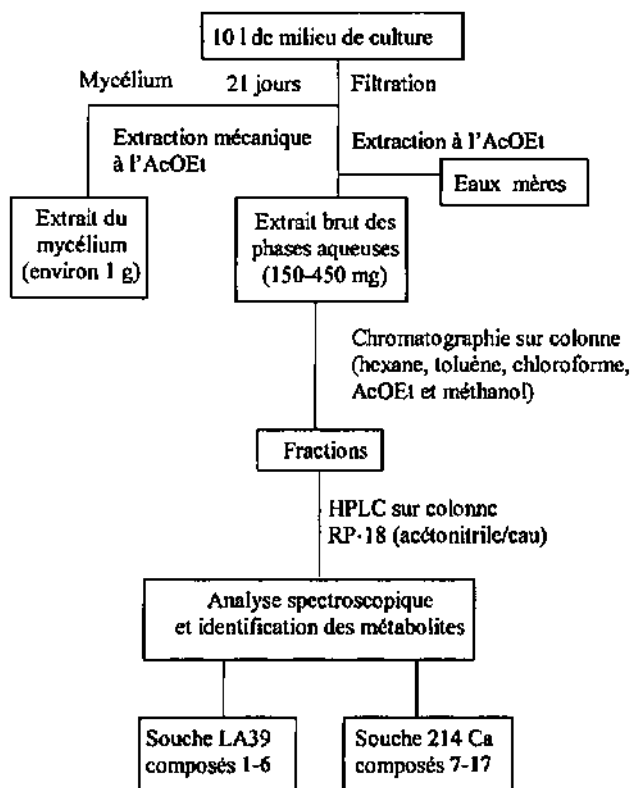


Schéma 2.1 : procédure générale d'extraction et de purification.

2.4 Tests biologiques préliminaires

Des tests biologiques préliminaires sont menés sur les extraits bruts des phases aqueuses et du mycélium ainsi que sur les eaux mères de la souche LA39 dépourvues de NaCl. Des feuilles des deux variétés de liserons sont plongées dans des piluliers contenant des solutions de concentration 2 mg/ml des divers extraits. L'ajout de 3 % d'éthanol facilite la solubilisation. Des observations visuelles quotidiennes sont réalisées sur cinq jours.

Tableau 2.1 : tests préliminaires sur les extraits bruts et les eaux mères de la souche LA39 (après 5 jours).

	Eaux mères	Extrait phases aqueuses	Extrait mycélium	Contrôle
<i>C. sepium</i>	+ -	++	++	+ -
<i>C. arvensis</i>	+ -	+	+ -	+ -

- pas d'activité (aucun symptôme visible)
- + - faible activité (peu de symptômes, faible jaunissement)
- + activité moyenne (symptômes bien visibles, brunissement partiel)
- ++ activité importante (symptômes importants, brunissement intégral)

On remarque une activité plus marquée de la souche LA39 envers le liseron de haies (*C. sepium*). Les extraits bruts des phases aqueuses et du mycélium sont actifs alors que les eaux mères ne sont guère toxiques. Ce test démontre l'efficacité de l'extraction et permet d'éliminer les eaux mères.

Un autre test a été réalisé à Zürich [62] sur de jeunes plants de liseron des champs. Il s'agit du sprayage de solutions contenant respectivement 9 mg (A) et 90 mg (B) d'extrait brut de la souche LA39 pour 10 ml de solution. Une solution de spores (5×10^6 spores/ml) sert de référence. La solubilisation de l'extrait fongique est rendue possible par l'ajout de 10 % d'éthanol. Après deux semaines. Un taux de surface nécrosée de 23 % pour A et de 28 % pour B est observé sur les feuilles. La référence conduit à un taux de surface nécrosée de 68 %. Ces résultats confirment la toxicité de l'extrait brut de la souche LA39 envers le liseron de champs mais montre que l'activité de l'organisme vivant est tout de même supérieure à celle de l'extrait brut.

2.5 Procédure de purification de l'extrait brut des phases aqueuses

Une première séparation est réalisée par chromatographie sur une colonne ouverte de gel de silice. Des solvants de polarité croissante en commençant par de l'hexane puis progressivement du toluène, du chloroforme et de l'acétate d'éthyle sont utilisés. Les résidus les plus polaires sont finalement élués avec du méthanol.

Dans le cas de la souche LA39, un test de toxicité préliminaire est également réalisé sur les fractions issues de la colonne chromatographique afin d'en sélectionner les plus actives. Le tableau 2.2 présente l'exemple d'un extrait séparé en sept fractions. La fraction B n'a pas été testée.

Tableau 2.2 : tests de toxicité préliminaires sur les fractions issues de la chromatographie sur colonne d'un extrait brut de la souche LA39 (après 5 jours).

fractions	A	C	D	E	F	G	Contrôle
<i>C. sepium</i>	-	++	+-	+	+	++	+-
<i>C. arvensis</i>	-	+	++	+	+-	+	+-

- pas d'activité (aucun symptôme visible)
- +- faible activité (peu de symptômes, début de jaunissement)
- + activité moyenne (symptômes bien visibles, brunissement partiel)
- ++ activité importante (symptômes importants, brunissement intégral, tâches noires)

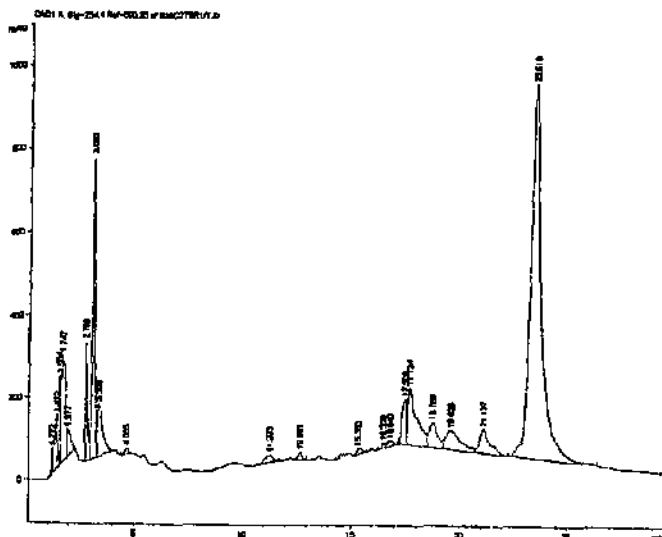
On remarque l'inactivité de la fraction A, la moins polaire. Les fractions C et D, contenant majoritairement des produits rouges, présentent une activité importante envers les deux variétés de liserons. Les fractions E et F sont moins actives mais possèdent tout de même une certaine activité. La fraction G, contenant les produits les plus polaires, présente, elle aussi, une activité importante. Après 5 jours, un jaunissement de certains blancs est remarqué, ce qui conduit à l'interruption du test. Ce test permet d'orienter nos recherches sur les fractions les plus actives en laissant provisoirement de côté les autres.

L'étape suivante consiste à purifier ces fractions dans le but d'obtenir des substances pures, la méthode de choix est l'HPLC. Divers essais ont été conduits en chromatographie sur couche épaisse ainsi qu'en chromatographie sur colonne, mais sans résultat concluant.

Une colonne analytique en phase inverse (RP-C18) est utilisée pour les séparations en HPLC. La phase mobile initiale consiste en un mélange eau/acétonitrile 70/30 (v/v). Les conditions du programme standard utilisé sont décrites au chapitre 9.1.3. Ce programme est utilisé pour réaliser l'analyse des extraits bruts de chaque culture et permet de déterminer les temps de rétention des composés isolés. Les fractions récoltées sont ensuite soumises à une analyse plus fine par ajustement du gradient d'élution.

L'utilisation initiale de méthanol n'a pas permis d'obtenir de résultats exploitables, d'où le recourt à l'acétonitrile. Ce solvant, moins acide et induisant des interactions dipolaires plus prononcées que le méthanol, se trouve être plus favorable à l'analyse de nos extraits.

L'examen de la souche LA39 cultivée en milieu PDB (figure 2.2), montre la présence d'un produit largement majoritaire ayant un temps de rétention de 23.5 minutes. S'agissant de la souche 214 Ca, toujours en milieu PDB, un produit majoritaire est également remarqué. Ce dernier possède un temps de rétention de 15.5 minutes dans les conditions du programme de la figure 2.3.



2.6 Métabolites isolés

Six composés ont été isolés de la souche LA39 du champignon *Stagonospora convolvuli* (figure 2.4). L'analyse de la souche 214 Ca du champignon *Stagonospora* sp. a permis d'isoler onze métabolites, parmi lesquels deux sont de nouveaux produits naturels (**12** et **15**) (figure 2.5).

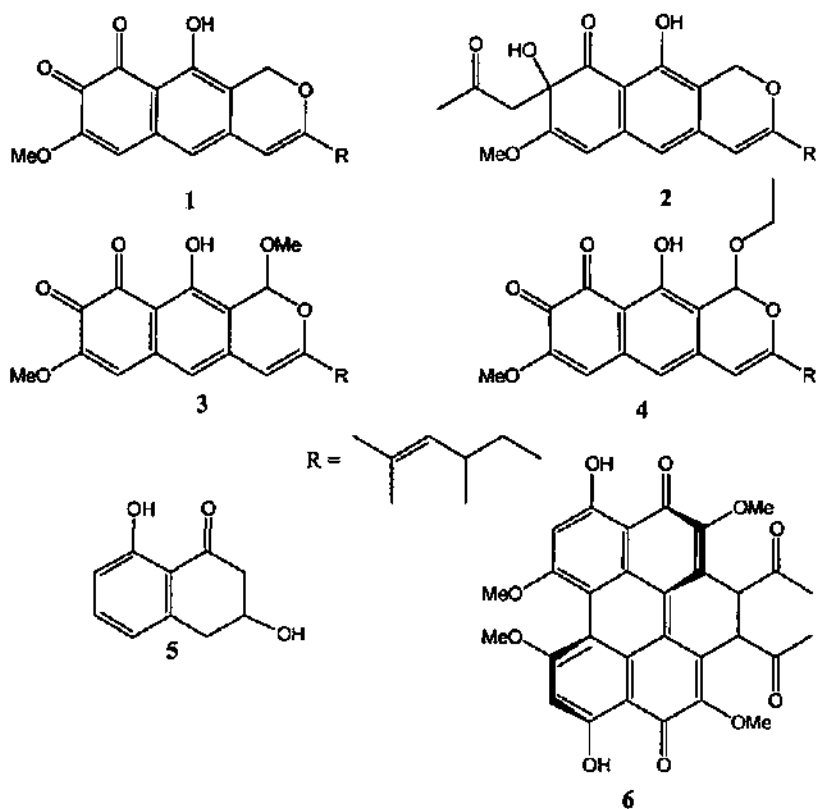


Figure 2.4 : métabolites isolés du champignon *Stagonospora convolvuli*, souche LA39.

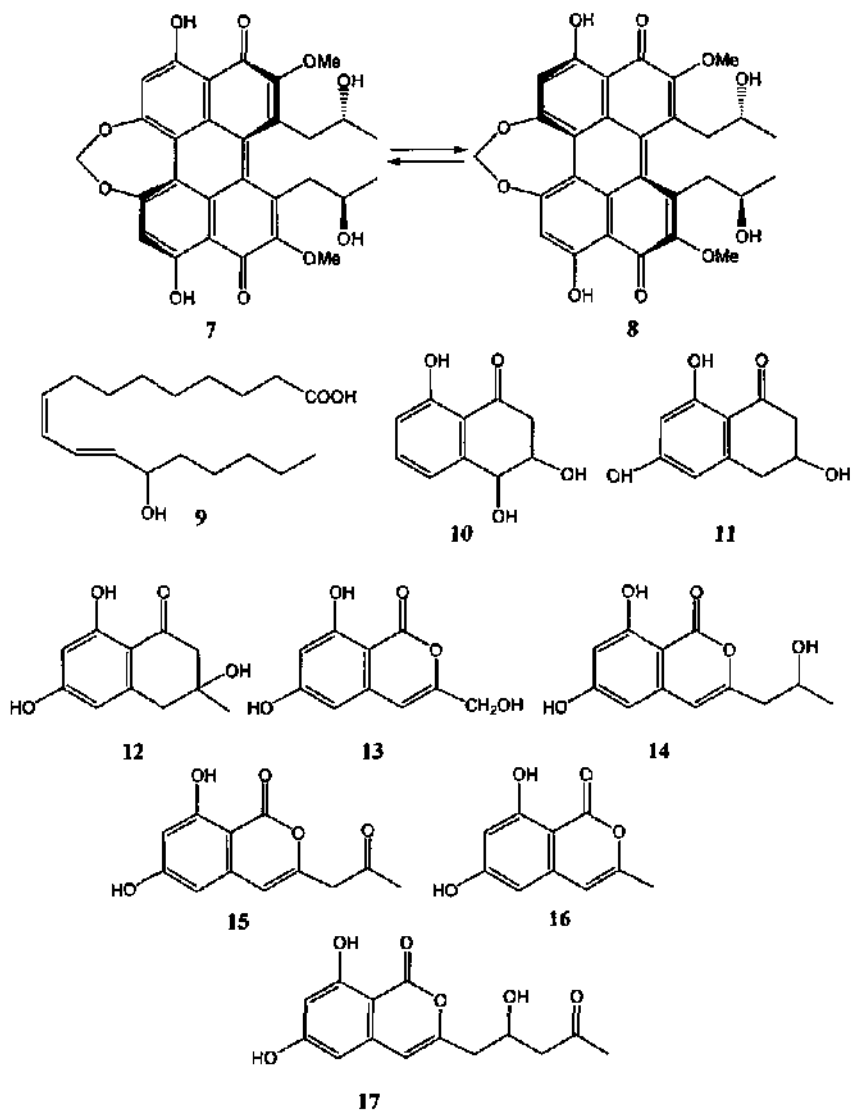


Figure 2.5 : métabolites isolés du champignon *Stagonospora*, souche 214 Ca.

2.6.1 Métabolites isolés de la souche LA39

2.6.1.1 Leptosphaerodione (1) (3-[(1E)-1,3-diméthylpent-1-enyl]-10-hydroxy-7-méthoxy-1H-naphto[2,3-c]pyran-8,9(8H)-dione)

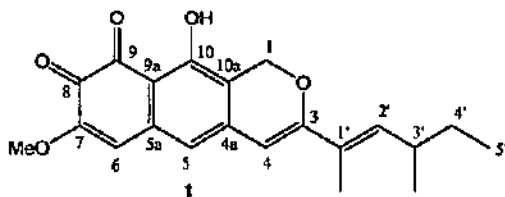


Figure 2.6 : structure de la leptosphaerodione (1).

Ce composé a été isolé par *Guerriero et al.* [70], du champignon marin *Leptosphaeria oreamaris*. Il s'agit du produit majoritaire contenu dans l'extrait brut (PDB) de la souche LA39. Il est de couleur rouge.

Analyse :

Formule brute : $C_{21}H_{22}O_5$

Poids moléculaire : 354

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 23.5 minutes

Quantité isolée : 10 mg pour 10 litres de milieu de culture

1H -RMN : voir tableau 2.3

^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ_H [ppm] : 179.57 (1C, s, C=O(9)); 177.82 (1C, s, C=O(8)); 162.84 (1C, s(10)); 162.56 (1C, s(3)); 152.37 (1C, s(7)); 145.15 (1C, s); 141.89 (1C, d, =CH(2')); 135.48 (1C, s); 127.20 (1C, s(1')); 118.77 (1C, d, Ar(5)); 114.68 (1C, d, =CH(6)); 113.32 (1C, s); 111.80 (1C, s); 101.17 (1C, d, Ar(4)); 63.42 (1C, t(1)); 56.49 (1C, q, $CH_3O-C(7)$); 35.57 (1C, d(3')); 30.78 (1C, t(4')); 20.91 (1C, q, Me-C(3')); 13.58 (1C, q, Me-C(1')); 12.71 (1C, q, Me(5')).

SM (EI, 70 eV) m/z : 354 (M^+ , 100 %); 336 (M^+-H_2O , 9 %); 325 ($M^+-C_2H_5$, 13 %); 307 ($M^+-C_2H_5-H_2O$, 17 %); 285 ($M^+-C_3H_9$, 11 %); 255 (10 %).

IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3432; 2960; 2924; 2853; 1683; 1625; 1604; 1551; 1342; 1109.

UV λ/nm : 242 (max); 273 (min); 310; 482.

L'identification de la leptosphaerodione (**1**) a été facilitée par comparaison de nos résultats avec les données spectroscopiques publiées par *Guerriero et al.* [70], ainsi que par l'étude de composés voisins décrits dans la littérature [71-73].

Tableau 2.3 : comparaison des données spectroscopiques de **1** avec nos résultats.

	¹ H-RMN (300 MHz, CDCl ₃ , [ppm]) [70]	¹ H-RMN (400.134 MHz, CDCl ₃ , [ppm])
	12.38 (s, OH)	12.37 (s, OH)
5	6.43 (s)	6.42 (s)
6	6.30 (s)	6.29 (s)
2'	6.23 (dq, J = 9.9 Hz et 1.2 Hz)	6.22 (large dd, J = 9.9 Hz et 0.9 Hz)
4	5.87 (s)	5.86 (s)
1	5.20, 5.17 (AB, J _{AB} = 13.5 Hz)	5.19, 5.16 (AB, J _{AB} = 13.4 Hz)
	3.83 (s, OMe)	3.83 (s, OMe)
3'	2.45 (m)	2.45 (m)
<u>Me-C(1')</u>	1.88 (d, J = 1.2 Hz)	1.87 (d, J = 1.1 Hz)
4'	1.41 (m)	1.27-1.45 (m)
<u>Me-C(3')</u>	1.02 (d, J = 6.8 Hz)	1.01 (d, J = 6.6 Hz)
5'	0.87 (t, J = 7.0 Hz)	0.87 (t, J = 7.4 Hz)

La structure de la chaîne alkyle fixée en C(3) a été établie grâce au spectre COSY 45, à des découplages sélectifs et à l'étude des couplages allyliques. Deux références de la littérature [71, 72], décrivant des composés possédant une chaîne alkyle analogue, ont permis de confirmer cette interprétation.

Les méthyles en C(5') et C(3') se présentent sous forme d'un triplet et d'un doublet à 0.87 et 1.01 ppm respectivement. Le méthyle en C(1') apparaît sous la forme d'un doublet à 1.87 ppm, résultat d'un couplage allylique ⁴J de ~ 1 Hz avec le proton situé en C(2'). Le méthylène en C(4') correspond au multiplet entre 1.27 et 1.45 ppm. Le proton situé sur le carbone asymétrique C(3') engendre un multiplet à 2.45 ppm. Il est couplé avec les protons des carbones C(2') et C(4') et ceux du méthyle en C(3'). Le proton oléfinique en C(2') génère un doublet de doublet élargi situé à 6.22 ppm. Il s'agit en fait d'un doublet de

quadruplet mal résolu. Un couplage de 9.9 Hz est observé avec le proton en C(3') ainsi qu'un couplage allylique longue distance 4J de ~ 1 Hz avec le méthyle en C(1').

Le groupe méthoxy fixé en C(7) se situe à 3.83 ppm. Il lui correspond un signal à 56.49 ppm dans le spectre ^{13}C -RMN. Le spectre COLOC permet d'établir que le méthoxy se trouve sur le carbone quaternaire C(7) observé à 152.37 ppm. Les protons oléfiniques des carbones C(6), C(5) et C(4) apparaissent sous la forme de singulets à 6.29, 6.42 et 5.86 ppm respectivement. Ils ont été attribués grâce aux couplages ^1H - ^{13}C longue distance obtenus via le spectre COLOC. Le méthylène en C(1) se présente sous la forme d'un système AB situé à 5.16 et 5.19 ppm. La constante de couplage J_{AB} est de 13.4 Hz.

L'hydrogène de l'hydroxyle en C(10), apparaît à 12.37 ppm. Ce fort déblindage est dû à l'effet chélatant avec le groupe carbonyle en C(9). Son attribution au carbone C(10) situé à 162.84 ppm a été possible grâce au spectre COLOC. Les groupes carbonyles en C(8) et C(9) apparaissent sur le spectre ^{13}C -RMN à respectivement 177.82 et 179.57 ppm. L'attribution des positions de ces deux groupes a été possible par analogie avec les données spectrales de l'obionine A décrite par Poch et Gloer [73].

Spectrométrie de masse

Le pic de base du spectre de masse en impact électronique (EI) correspond au pic moléculaire à $m/z = 354$

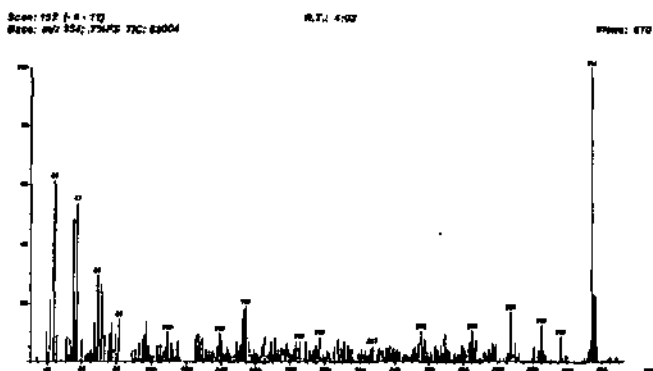


Figure 2.6.1 : spectre de masse EI de la leptosphaerodione (1).

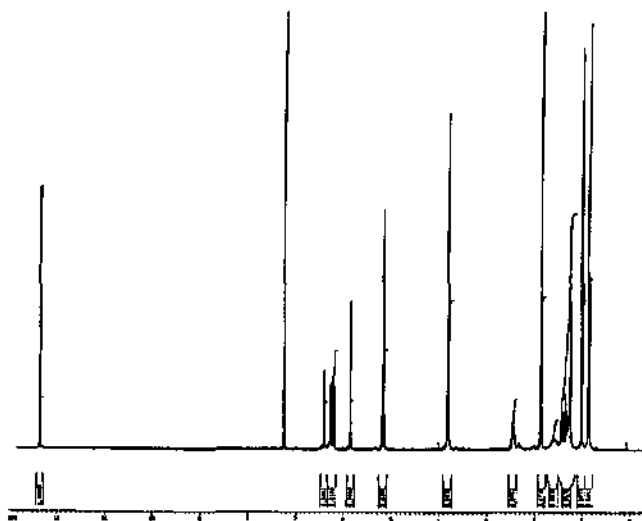


Figure 2.6.2 : spectre ^1H -RMN de la leptosphaerodione (1).

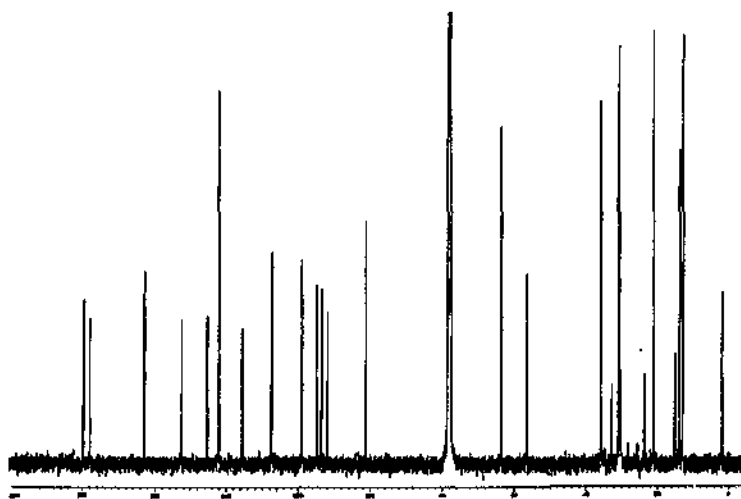


Figure 2.6.3 : spectre ^{13}C -RMN de la leptosphaerodione (1).

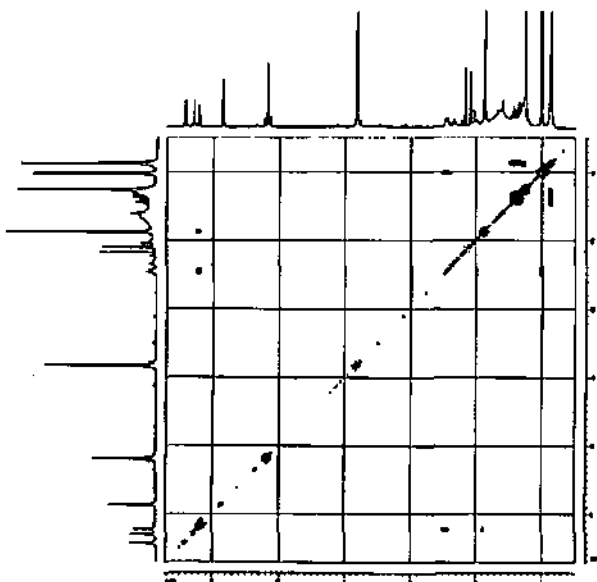


Figure 2.6.4 : spectre COSY 45 de la leptosphaerodione (1).

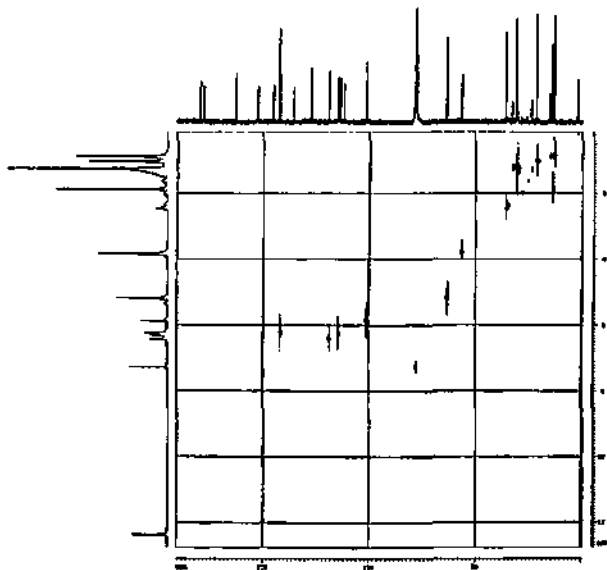


Figure 2.6.5 : spectre HETCOR SR de la leptosphaerodione (1).

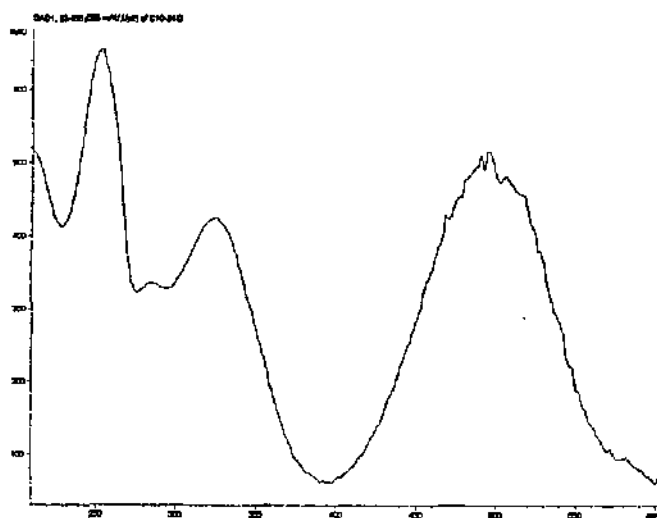


Figure 2.6.6 : spectre UV/VIS de la leptosphaerodione (1).

2.6.1.2 *o*-Dihydroquinone (2) (3-[(1*E*)-1,3-diméthylpent-1-enyl]-8,10-dihydroxy-7-méthoxy-8-(2''-oxopropyl)-1*H*-naphto[2,3-*c*]pyran-9(8*H*)-one)

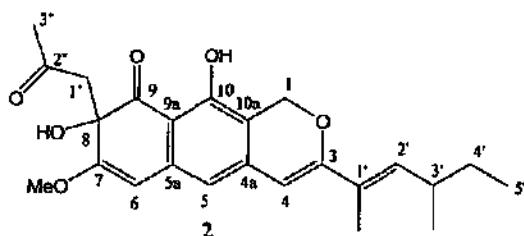


Figure 2.7 : structure de l'*o*-dihydroquinone (2).

Ce composé, également identifié par *Guerrero et al.* [70], se trouve être un dérivé de la leptosphaerodione (1) formé par addition d'acétone au groupe carbonyle en position C(8). Il ne s'agit donc pas d'un produit naturel mais d'un artefact résultant de l'utilisation d'acétone lors de la purification de 1 (solubilisation des extraits). Cette réaction est commentée aux paragraphes 3.2.2 et 3.2.3. Il est de couleur jaune.

Analyse :

Formule brute : $C_{24}H_{28}O_6$

Poids moléculaire : 412

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 18.8 minutes

1H -RMN : voir tableau 2.4

^{13}C -RMN : voir tableau 2.5

SM (EI, 70 eV) m/z : 412 (M^+ , 100 %); 380 ($M^+ - CH_3OH$, 20 %); 355 ($M^+ - 57$, $COCH_2CH_3$, 42 %); 327 (39 %); 285 (40 %); 269 (55 %); 253 (39 %).

IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3431; 2960; 2853; 1716; 1660; 1618; 1545.

UV λ/nm : 264 (min); 295 (épaulement); 391 (max).

L'identification de 2 s'est également faite par comparaison de nos résultats spectroscopiques avec ceux obtenus par *Guerrero et al.* [70].

Tableau 2.4 : comparaison des données spectroscopiques (¹H-RMN) de 2 avec nos résultats.

	¹ H-RMN (300 MHz, CDCl ₃ , [ppm]) [70]	¹ H-RMN (400.134 MHz, CDCl ₃ , [ppm])
10	12.00 (s, OH)	11.99 (s, OH)
5	6.30 (s)	6.31 (s)
2'	6.14 (large d, J = 9.9 et 1.2 Hz)	6.15 (large dd, J = 9.9 et 1.1 Hz)
4	5.83 (s)	5.84 (s)
6	5.60 (s)	5.62 (s)
1	5.19, 5.12 (AB, J _{AB} = 13.2 Hz)	5.21, 5.13 (AB, J _{AB} = 13.2 Hz) <i>5.18, 5.16 (AB, J_{AB} = 13.2 Hz)^a</i>
	3.76 (s, OMe)	3.77 (s, OMe)
1"	3.11 (s)	3.105 (s) <i>3.101 (s)</i>
3'	2.43 (m)	2.42 (m)
3"	2.16 (s)	2.18 (s)
<u>Me</u> -C(1')	1.85 (d, J = 1.2 Hz)	1.86 (d, J = 1.1 Hz)
4'	1.40 (m)	1.28-1.48 (m)
<u>Me</u> -C(3')	1.00 (d, J = 6.9 Hz)	1.010 (d, J = 6.6 Hz) <i>1.006 (d, J = 6.6 Hz)</i>
5'	0.86 (t, J = 7.0 Hz)	0.866 (t, J = 7.4 Hz) <i>0.863 (t, J = 7.3 Hz)</i>

a) En italique, valeurs des déplacements chimiques pour le second diastéréoisomère.

Les signaux de la chaîne alkyle en C(3) ne diffèrent que très peu de ceux observés pour la leptosphaerodione (1). Il en va de même pour le groupe méthoxy en C(7) à 3.77 ppm, ainsi que pour les protons oléfiniques en C(5) et C(4) situés à 6.31 et 5.84 ppm. La présence de deux diastéréoisomères conduit au dédoublement des signaux du système AB en C(1) et des groupes méthyles en C(5') et fixé en C(3'). *Guerriero et al.* [70] émettent aussi l'hypothèse que ce dédoublement serait dû à de lents mouvements conformationnels. L'hydroxyle en C(10) est un peu moins déblindé que celui du composé 1, il apparaît à 11.99 ppm.

La différence de déplacement chimique la plus marquée est observée pour le proton oléfinique en C(6) qui apparaît à 5.62 ppm, contre 6.29 ppm pour le produit 1. Ceci résulte de la modification structurelle générée.

Les nouveaux signaux apparus correspondent aux groupes méthylène C(1'') et méthyle C(3'') de l'acétone fixée en C(8). Le méthylène apparaît sous la forme d'un singulet dédoublé à 3.101 et 3.105 ppm, conséquence de la présence de deux diastéréoisomères tandis que le signal du méthyle est un singulet situé à 2.18 ppm. A noter que l'on n'observe pas de dédoublement des signaux sur le spectre ^{13}C -RMN.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse en impact électronique (EI) présente un pic moléculaire important à $m/z = 412$. Le fragment à $m/z = 355$ ($M - 57$) correspond à la perte du groupement oxopropyle en C(8).

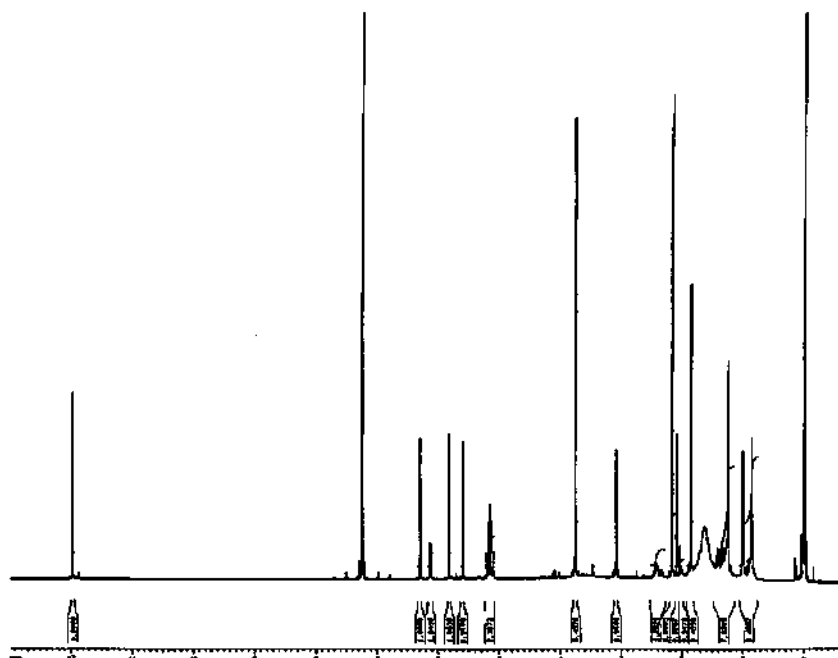


Figure 2.7.1 : spectre ^1H -RMN de l'*o*-dihydroquinone (2).

Tableau 2.5 : comparaison des données spectroscopiques (^{13}C -RMN) de 2 avec nos résultats.

	^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , [ppm]) [70]	^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3 , [ppm])
2''	206.37 (s)	207.46 (s)
9	199.86 (s)	200.52 (s)
3	160.11 (s)	160.84 (s)
7	158.66 (s)	159.30 (s)
10	158.14 (s)	158.86 (s)
4a	142.85 (s)	143.60 (s)
5a	139.64 (s)	140.12 (s)
2'	138.39 (d)	139.31 (d)
1'	126.69 (s)	127.38 (s)
5	113.63 (d)	114.32 (d)
10a	111.09 (s)	111.82 (s)
9a	108.14 (s)	108.79 (s)
4	100.43 (d)	101.12 (d)
6	97.62 (d)	98.32 (d)
8	73.54 (s)	74.33 (s)
1	62.95 (t)	63.64 (t)
MeO	55.69 (q)	56.40 (q)
1''	50.72 (t)	51.41 (t)
3'	34.74 (d)	35.44 (d)
3''	31.15 (q)	31.93 (q)
4'	30.16 (t)	30.85 (t)
Me-C(3')	20.31 (q)	21.01 (q)
Me-C(1')	12.90 (q)	13.59 (q)
C(5')	12.03 (q)	12.73 (q)

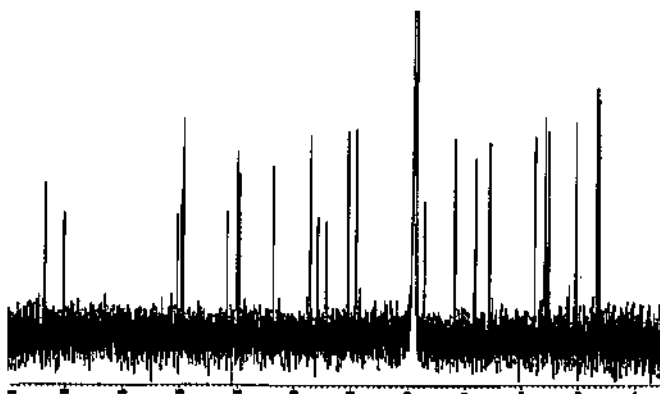


Figure 2.7.2 : spectre ^{13}C -RMN de l'*o*-dihydroquinone (2).

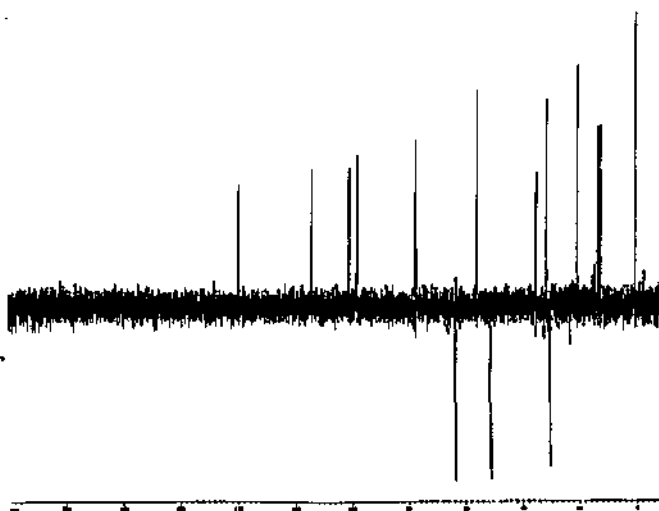


Figure 2.7.3 : spectre DEPT 135 de l'*o*-dihydroquinone (2).

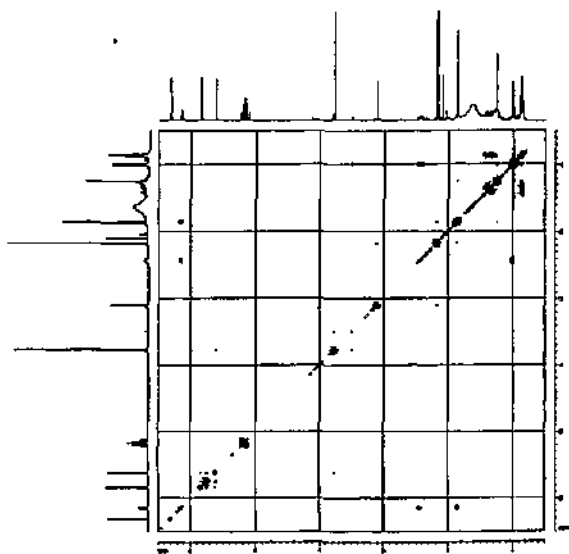


Figure 2.7.4 : spectre COSY 45 de l'*o*-dihydroquinone (2).

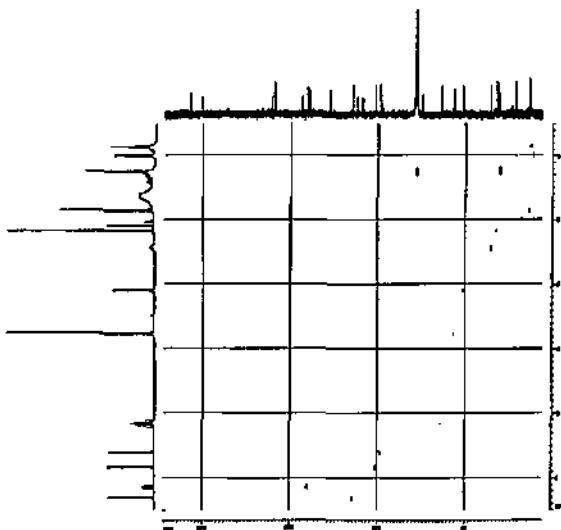


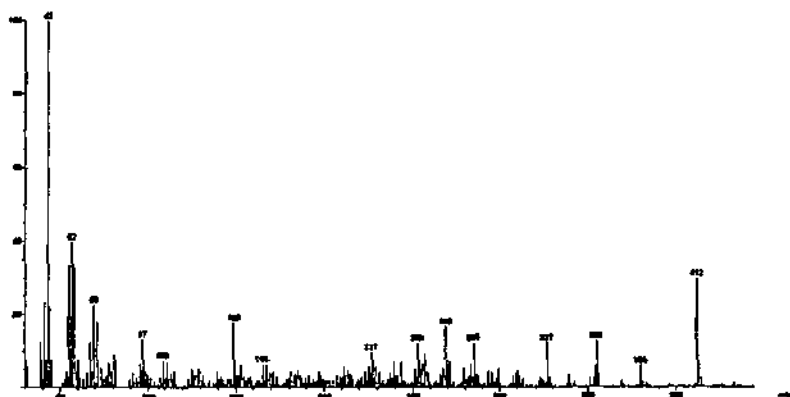
Figure 2.7.5 : spectre HETCOR SR de l'*o*-dihydroquinone (2).

Scan: 428 (4.4 - 13)

Base: ref: 42; 1.0VPS TIC: 85464

R.T.: 3.77

Mass: 670



2.6.1.3 1-Méthoxyleptosphaerodione (3) (3-[(1*E*)-1,3-diméthylpent-1-enyl]-10-hydroxy-1,7-diméthoxy-naphto[2,3-*c*]pyran-8,9(8*H*)-dione)

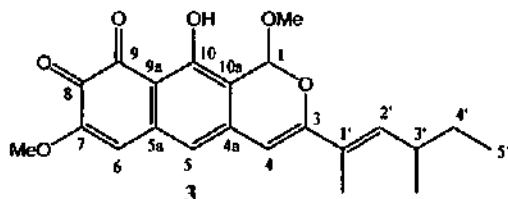


Figure 2.8 : structure de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3).

A notre connaissance, il s'agit d'une nouvelle substance. Cependant, elle pourrait être un artefact, dérivé de l'hémiacétal leptosphaerodione lactol (20) hydroxylé en position 1, par réaction avec du méthanol. Ce dernier est utilisé comme solvant de solubilisation lors de la purification des extraits. Cette réaction est commentée en détail au chapitre 3.2.3.

Analyse :

Formule brute : $C_{22}H_{24}O_6$

Poids moléculaire : 384

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 21.4 minutes

Quantité isolée : environ 2.5 mg pour 10 litres de milieu de culture

¹H-RMN : (400.138 MHz, $CDCl_3$) δ_H [ppm] : 12.59 (s, OH, (10)); 6.53 (s, 1H, (5)); 6.34 (m, 1H, (2')); 6.33 (s, 1H, (6)); 6.33 (s, 1H, (1)); 6.031 (s, 1H, (4)); 6.028 (s, 1H, (4))^a; 3.84 (s, 3H, MeO-C(7)); 3.602 (s, 3H, MeO-C(1)); 3.596 (s, 3H, MeO-C(1)); 2.49 (m, 1H, (3')); 1.914 (d, 3H, $J = 1.0$ Hz, Me-C(1')); 1.912 (d, 3H, $J = 0.9$ Hz, Me-C(1')); 1.52-1.30 (m, 2H, (4')); 1.040 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, Me-C(3')); 1.033 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, Me-C(3')); 0.881 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, (5')); 0.877 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, (5')).

a) En italique, valeurs des déplacements chimiques pour le second diastéréoisomère.

^{13}C -RMN (100.625 MHz, CDCl_3) δ_{C} [ppm] : 178.85 (1C, s, C=O (9)); 176.4 (1C, s, C=O (8)); 163.97 (1C, s, (10)); 157.63 (1C, s, (3)); 151.98 (1C, s, (7)); 142.45 (1C, s); 140.80 (1C, d, =CH(2')); 135.49 (1C, s); 127.02 (1C, s, (1')); 118.64 (1C, d, Ar(5)); 113.69 (1C, d, =CH(6)); 112.6 (1C, s) ; 110.8 (1C, s); 99.98 (1C, d, =CH(4)); 99.92 (1C, d, =CH(4)'); 94.58 (1C, d, (1)); 94.52 (1C, d, (1)); 55.71 (1C, q, MeO-C(7)); 55.43 (1C, q, MeO-C(1)); 55.34 (1C, q, MeO-C(1)); 34.82 (1C, d, (3')); 34.77 (1C, d, (3')); 30.11 (1C, t, (4)); 20.23 (1C, q, Me-C(3')); 20.18 (1C, q, Me-C(3')); 12.83 (1C, q, Me-C(1')); 12.78 (1C, q, Me-C(1')); 12.00 (1C, q, (5')); 11.94 (1C, q, (5')).

a) *En italique, valeurs des déplacements chimiques pour le second diastéréoisomère.*

UV λ/nm : 244 (max); 305; 482.

Les signaux en ^1H -RMN de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3) ne diffèrent que très peu de ceux observés pour la leptosphaerodione (1). On observe un déblindage allant jusqu'à 0.2 ppm. Les plus grandes différences de déplacement chimique sont observées pour les protons situés à proximité de la position 1. Par exemple, le proton de l'hydroxyle en C(10) apparaît à 12.59 ppm contre 12.37 ppm pour la leptosphaerodione (1). Le méthylène en C(1) a disparu. Il est remplacé par le signal du méthoxy à 3.60 ppm et par celui du proton en C(1) à 6.33 ppm. La non-stéréosélectivité de la réaction de condensation du méthanol conduit, comme pour la réaction de la leptosphaerodione avec l'acétone, à la formation de deux diastéréoisomères. La présence de ceux-ci a pour conséquence le dédoublement des signaux des groupements méthyles en C(1'), C(3') et C(5') ainsi que du méthoxy fixé en C(1). S'agissant du spectre ^{13}C -RMN, de faibles différences de déplacements chimiques sont également observées. On note aussi le dédoublement de certains signaux en raison de la présence de deux diastéréoisomères.

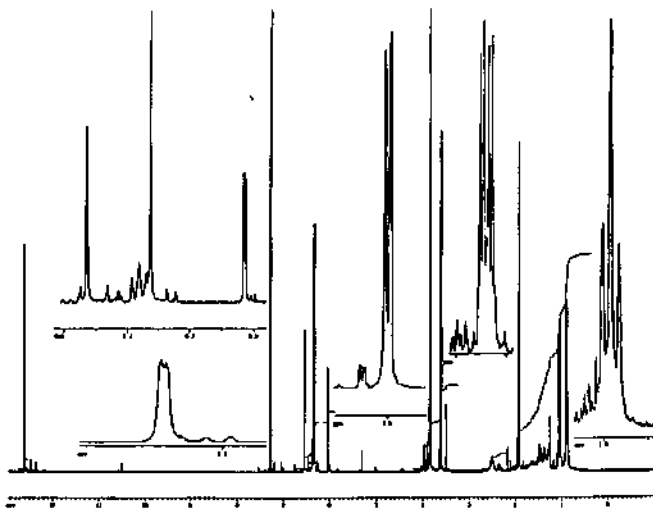


Figure 2.8.1 : spectre ^1H -RMN de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3).

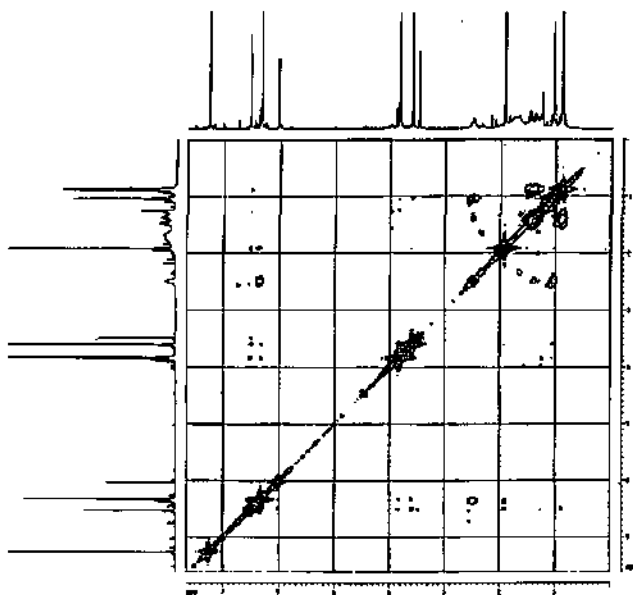


Figure 2.8.2 : spectre COSY 45 de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3).

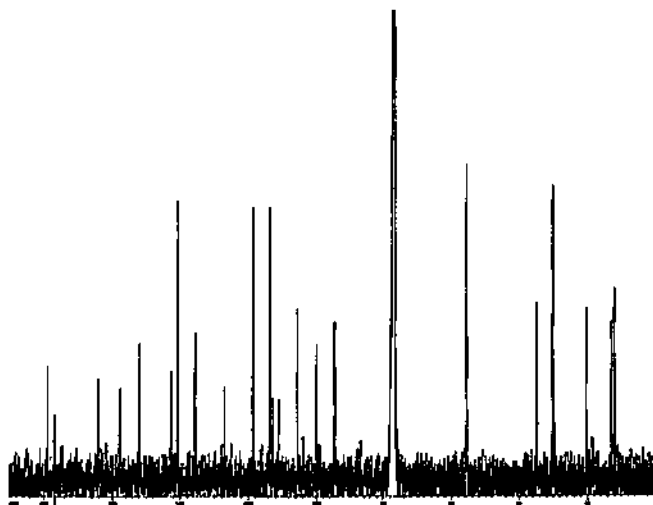


Figure 2.8.3 : spectre ^{13}C -RMN de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3).

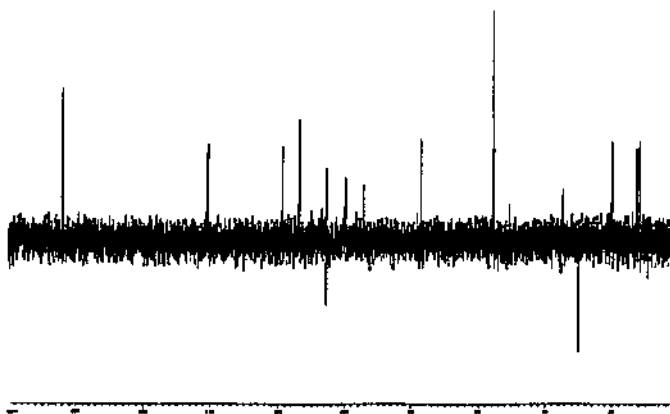


Figure 2.8.4 : spectre DEPT 135 de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3).

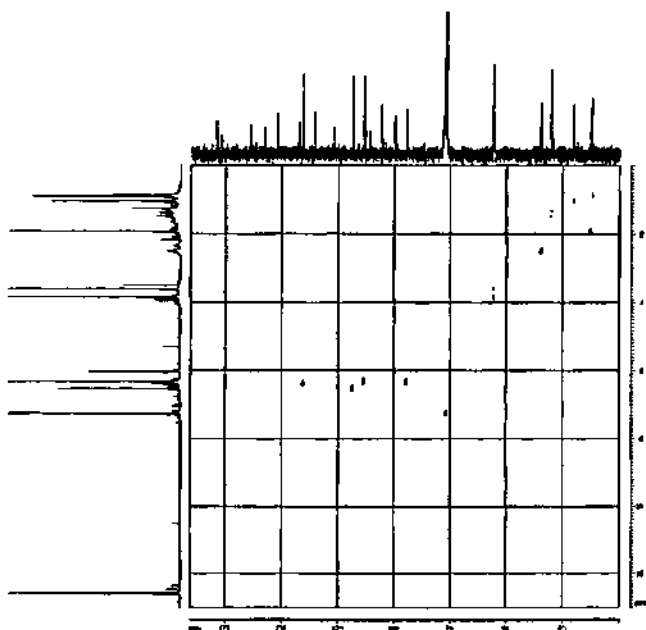


Figure 2.8.5 : spectre HETCOR SR de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3).

2.6.1.4 1-Éthoxyleptosphaerodione (4) (3-[(1E)-1,3-diméthylpent-1-enyl]-1-éthoxy-10-hydroxy-7-méthoxy-naphto[2,3-c]pyran-8,9(8H)-dione)

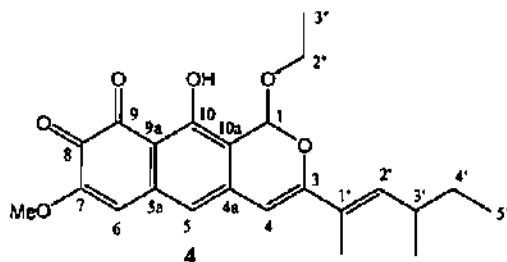


Figure 2.9 : structure de la 1-éthoxyleptosphaerodione (4).

Comme la 1-méthoxyleptosphaerodione (3), la 1-éthoxyleptosphaerodione (4) n'est pas mentionnée dans la littérature. Il s'agit aussi probablement d'un produit résultant de la condensation du leptosphaerodione lactol (20) avec de l'éthanol pendant la procédure de purification (voir chapitre 3.2.3). L'éthanol incriminé est certainement présent minoritairement dans l'un ou l'autre des solvants utilisés.

Analyse :

Formule brute : $C_{23}H_{26}O_6$

Poids moléculaire : 398

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 23.2 minutes

Quantité isolée : environ 3.5 mg pour 10 litres de milieu de culture

1H -RMN : (400.138 MHz, $CDCl_3$) δ_H [ppm] : 12.575 (s, OH, (10)); 12.574 (s, OH, (10))^a; 6.51 (s, 1H, (5)); 6.418 (s, 1H, (1)); 6.414 (s, 1H, (1)); 6.32 (m, 1H, (2'')); 6.32 (s, 1H, (6)); 6.021 (s, 1H, (4)); 6.017 (s, 1H, (4)); 3.83 (m, 2H, (2'')); 3.83 (s, 3H, MeO-C(7)); 2.49 (m, 1H, (3'')); 1.91 (d, 3H, J = 1.0 Hz, Me-C(1')); 1.50-1.30 (m, 2H, (4'')); 1.254 (t, 3H, J = 7.1 Hz, (3'')); 1.250 (t, 3H, J = 7.1 Hz, (3'')); 1.033 (d, 3H, J = 6.7 Hz, Me-C(3'')); 1.028 (d, 3H, J = 6.6 Hz, Me-C(3'')); 0.87 (t, 3H, J = 7.4 Hz, (5')).

a) En italique, valeurs des déplacements chimiques pour le second diastéréoisomère.

UV λ_{nm} : 245 (max); 306; 483.

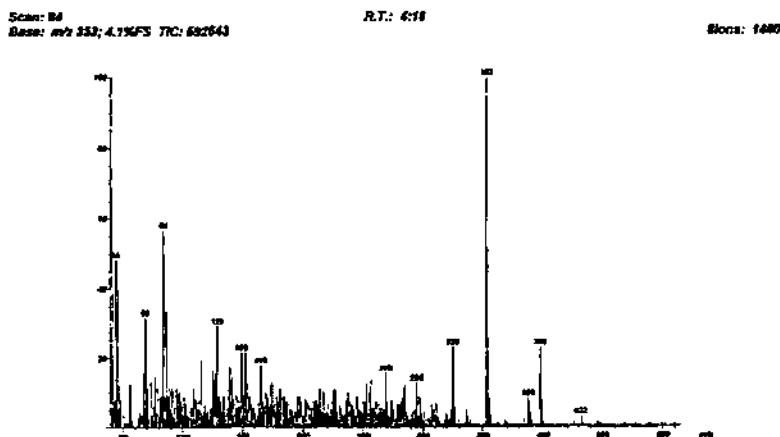
SM (EI, 70 eV) m/z : 398 (M^+ , 23 %); 353 ($M^+ - OCH_2CH_3$, 100 %); 325 (23 %); 295 (13 %); 269 (16 %).

^{13}C -RMN (100.614 MHz, $CDCl_3$) δ_C [ppm] : 178.82 (1C, s, C=O (9)); 176.99 (1C, s, C=O (8)); 164.00 (1C, s, (10)); 157.76 (1C, s, (3)); 151.93 (1C, s, (7)); 142.48 (1C, s); 140.76 (1C, d, =CH(2)); 135.32 (1C, s); 127.18 (1C, s, (1')); 127.13 (1C, s, (1''))^a; 118.73 (1C, d, Ar(5)); 113.75 (1C, d, =CH(6)); 113.2 (1C, s); 111.0 (1C, s); 99.95 (1C, d, =CH(4)); 99.88 (1C, d, =CH(4)); 93.36 (1C, d, (1)); 93.31 (1C, d, (1)); 64.11 (1C, t, (2'')); 64.02 (1C, t, (2'')); 55.70 (1C, q, MeO-C(7)); 34.81 (1C, d, (3')); 34.76 (1C, d, (3')); 30.10 (1C, t, (4')); 20.24 (1C, q, Me-C(3'')); 15.20 (1C, q, (3'')); 12.84 (1C, q, Me-C(1'')); 12.79 (1C, q, Me-C(1'')); 11.99 (1C, q, (5'')); 11.89 (1C, q, (5'')).

a) En italique, valeurs des déplacements chimiques pour le second diastéréoisomère.

Les remarques valables pour la 1-méthoxyeptosphaerodione (3) le sont aussi pour 4, tant pour les signaux 1H -RMN que ^{13}C -RMN. On observe également le dédoublement de certains signaux en raison de la présence de deux diastéréoisomères. En 1H -RMN, les groupements méthylène et méthyle du groupement éthyloxy fixé en C(1) apparaissent à respectivement 3.83 et 1.25 ppm.

Le spectre de masse (EI) donne le pic moléculaire à $m/z = 398$. Le pic de base correspond au fragment à $m/z = 353$, ce dernier résulte de la perte de la chaîne éthyloxy.



Figures 2.9.1 : spectre de masse (EI) de la 1-éthoxyeptosphaerodione (4).

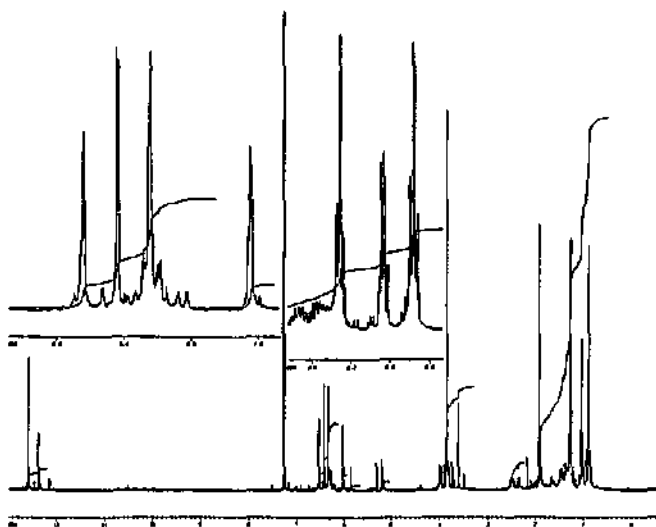


Figure 2.9.2 : spectre ^1H -RMN de la 1-éthoxyleptosphaerodione (4).

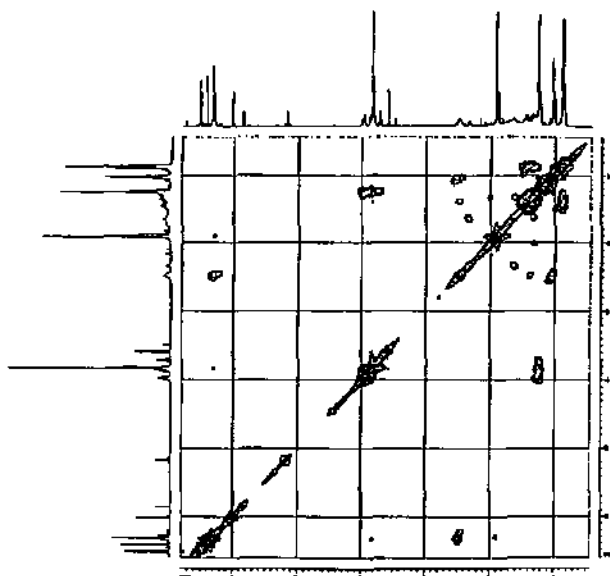


Figure 2.9.3 : spectre COSY 45 de la 1-éthoxyleptosphaerodione (4).

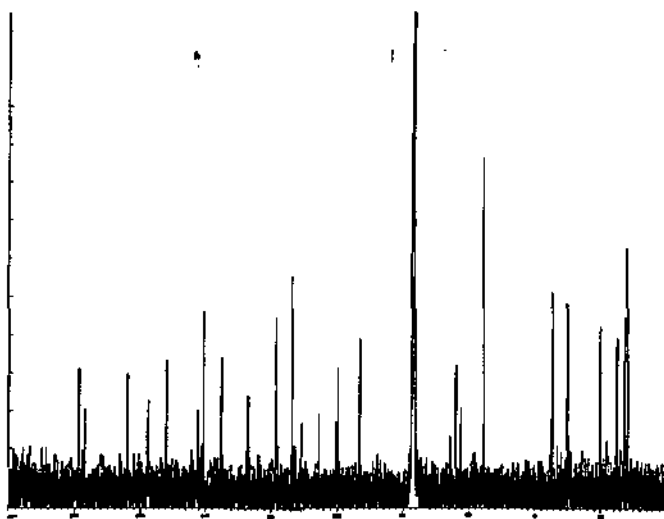


Figure 2.9.4 : spectre ¹³C-RMN de la 1-éthoxyleptosphaerodione (4).

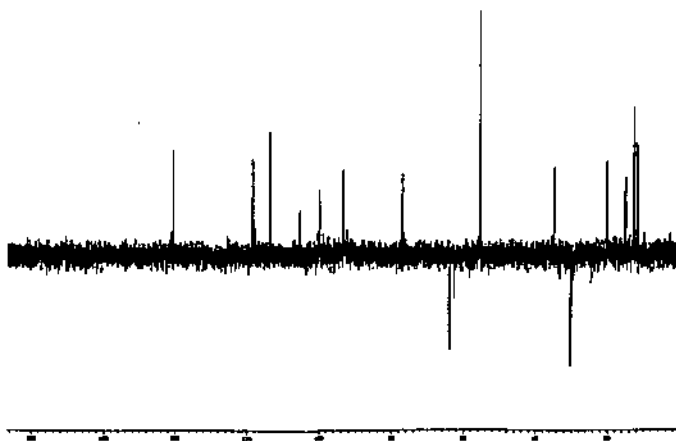


Figure 2.9.5 : spectre DEPT 135 de la 1-éthoxyleptosphaerodione (4).

2.6.1.5 Verménone (5) (3,4-dihydro-3,8-dihydroxynaphtalèn-1(2H)-one)

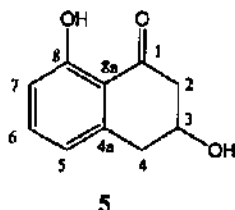


Figure 2.10 : structure de la verménone (5).

L'analyse de fractions moins polaires et surtout incolores issues de la souche LA39 a permis l'isolement et l'identification de la verménone.

Cette naphthalénone a été isolée pour la première fois d'une culture d'un mutant mélano-déficitaire de *Verticillium dahliae* [74]. Elle a également été isolée de *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea*, un champignon pathogène du café étudié dans nos laboratoires [75-77].

Analyse :

Formule brute : $C_{19}H_{10}O_3$

Poids moléculaire : 178

Quantité isolée : < 1 mg pour 40 litres de milieu de culture

1H -RMN : voir tableau 2.6

SM (DCI, NH_3 , +) m/z : 179 ($M^+ + 1$, 100 %).

UV λ/nm : 214 (max); 261; 333.

Tableau 2.6 : comparaison des données spectroscopiques ($^1\text{H-RMN}$) de 5 avec nos résultats.

	$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3 [ppm]) [76]	$^1\text{H-RMN}$ (400.137 MHz, CDCl_3 , [ppm])
8	12.27 (s, OH)	12.27 (s, OH)
6	7.41 (t, $J = 7\text{-}8$ Hz)	7.42 (dd, $J = 7.6$ et 8.3 Hz)
5	6.84 (d, $J = 8.3$ Hz)	6.84 (dd, $J = 8.5$ et ~ 1 Hz)
7	6.75 (d, $J = 7.1$ Hz)	6.76 (dd, $J = 7.4$ et 1.0 Hz)
3	4.44 (m)	4.46 (m, ABXCD)
4	3.23 (dd, $J = 17\text{-}18$ et 4.0 Hz)	3.24 (ABX, $J_{AB} = 16.2$ Hz, $J_{AX} = 3.7$ Hz)
4	2.95-3.05 (m)	3.02 (ABX, $J_{AB} = 16.2$ Hz, $J_{BX} = 7.5$ Hz)
2	2.95-3.05 (m)	2.98 (CDX, $J_{CD} = 17.1$ Hz, $J_{CX} = 3.9$ Hz)
2	2.78 (dd, $J = 16\text{-}17$ et 7.5 Hz)	2.79 (CDX, $J_{CD} = 17.1$ Hz, $J_{DX} = 8.1$ Hz)

Le spectre $^1\text{H-RMN}$ de la vermélone (5) concorde avec celui établi par *Gremaud* [76]. Les trois protons aromatiques en C(5), C(6) et C(7) se présentent sous la forme de trois doublets de doublets à 6.84, 7.42 et 6.76 ppm respectivement. Le couplage 3J , en *ortho* entre les protons en C(6) et C(5) est de 8.4 Hz. Le même couplage entre C(6) et C(7) est, quant à lui de 7.5 Hz. Le couplage 4J en *méta* entre C(5) et C(7) vaut environ 1 Hz.

Les protons des carbones C(2), C(3) et C(4) donnent lieu à un spectre de type ABXCD (C(4)/C(3)/C(2)). Les couplages géminaux J_{AB} et J_{CD} valent respectivement 16.2 et 17.1 Hz. Les couplages vicinaux dépendent, selon la courbe de *Karplus*, de l'angle diédrique entre les protons en C(3) et les protons en C(2), respectivement C(4). Les couplages J_{AX} et J_{CX} valent, 3.7 et 3.9 Hz alors que les couplages J_{BX} et J_{DX} sont de 7.5 et 8.1 Hz.

La partie ABX donne des déplacements chimiques de 3.24 et 3.02 ppm pour les protons A et B en C(4). Le même calcul effectué sur le système XCD donne, quant à lui, les valeurs de 2.98 et 2.79 ppm pour les deux protons C et D en C(2). Le proton X en C(3) se présente sous la forme d'un multiplet à 4.46 ppm. Le proton du groupe hydroxyle en C(8) est fortement déblindé par

chélation avec le groupe carbonyle en C(1), il possède un déplacement chimique de 12.27 ppm.

Spectrométrie de masse

En spectrométrie de masse, la réalisation du spectre en mode DCI (NH_3 , +) permet d'observer le pic $M+1$ à $m/z = 179$.

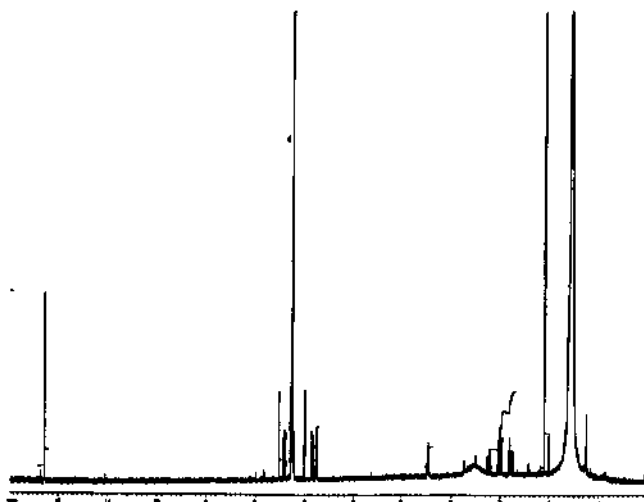


Figure 2.10.1 : spectre ^1H -RMN de la vermeline (5).

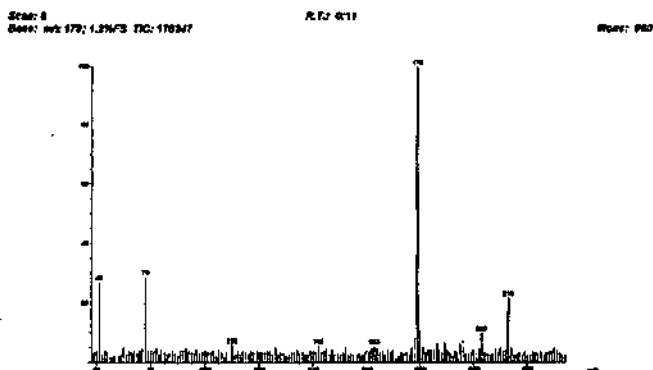


Figure 2.10.2 : spectre de masse DCI (NH_3 , +) de la vermeline (5).

2.6.1.6 **Elsinochrome A (6) (13,16-diacetyl-4,9-dihydroxy-2,6,7,11-tetra méthoxy-13,16-dihydro-benzo<ghi>perylene-3,10-dione)**

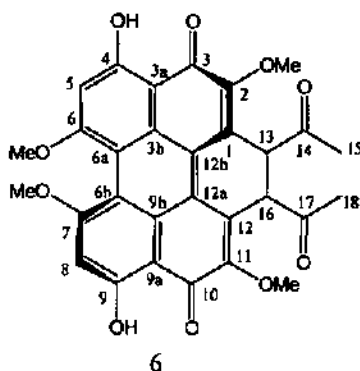


Figure 2.11 : structure de l'elsinochrome A (6).

L'elsinochrome A a été isolé pour la première fois en 1957 dans plusieurs espèces de champignons pathogènes du genre *Elsinoë* (ascomycètes) et de sa forme asexué *Sphaceloma* [78]. Sa structure a été décrite par *Lousberg et al.* en 1969 [79].

L'elsinochrome A est le composé majoritaire de la culture de la souche LA39 en milieu V8 (voir chapitre 4.2). Il est de couleur rouge intense.

Analyse :

Formule brute : $C_{30}H_{24}O_{10}$

Poids moléculaire : 544

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 19.5 minutes

Quantité isolée : environ 1 mg pour 10 litres de milieu de culture (produit isolé du mycélium, voir paragraphe 4.2).

1H -RMN : voir tableau 2.7

^{13}C -RMN : voir tableau 2.8

SM (ESI, +, HCOOH 10 %, 5 μ l/min) m/z : 544.8 ($M^+ + 1$).

UV λ /nm : 217 (max); 268; 338 (min); 459; 528, 568.

Tableau 2.7 : comparaison des données spectroscopiques (^1H -RMN) de 6 avec nos résultats.

	^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3 [ppm]) [80]	^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 [ppm])
4, 9	16.14 (2x1H, s, OH)	16.13 (2x1H, s, OH)
5, 8	6.61 (2x1H, s)	6.61 (2x1H, s)
13, 16	5.20 (2x1H, s)	5.18 (2x1H, s)
2, 11	4.36 (2x3H, s, OMe)	4.35 (2x3H, s, OMe)
6, 7	4.06 (2x3H, s, OMe)	4.06 (2x3H, s, OMe)
15, 18	2.04 (2x3H, s, Me)	2.03 (2x3H, s, Me)

L'elsinochrome A possède une symétrie C_2 , ce qui a pour conséquence l'équivalence chimique des protons et des carbones de chacune des deux moitiés de la molécule. Cette symétrie, additionnée à l'absence de couplage entre les protons conduit à un spectre ^1H -RMN largement simplifié puisqu'il se présente sous la forme de six singulets entre 16.13 et 2.03 ppm.

Il faut relever toutefois, que les deux protons en C(13) et C(16), sont magnétiquement non-équivalents, ce qui a permis à *Arnove et al.* [81] de déterminer leur constante de couplage par l'analyse des pics satellites ^{13}C du spectre ^1H -RMN (voir chapitre 7.1.1).

On peut noter le très fort déblindage des signaux des groupements hydroxyyles en C(4, 9) qui apparaissent à 16.14 ppm.

Tableau 2.8 : comparaison des données spectroscopiques (^{13}C -RMN) de 6 avec nos résultats.

	^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3 [ppm]) [81]	^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3 , [ppm])
14, 17	204.61 (2x1C, s)	204.82 (2x1C, s)
4, 9	179.39 (2x1C, s)	179.76 (2x1C, s)
3, 10	172.06 (2x1C, s)	171.97 (2x1C, s)
6, 7	167.34 (2x1C, s)	167.44 (2x1C, s)
2, 11	150.02 (2x1C, s)	150.07 (2x1C, s)
1, 12	130.11 (2x1C, s)	130.21 (2x1C, s)
3b, 9b	122.62 (2x1C, s)	122.70 (2x1C, s)
12a, 12b	121.65 (2x1C, s)	121.59 (2x1C, s)
6a, 6b	118.40 (2x1C, s)	118.58 (2x1C, s)
3a, 9a	107.62 (2x1C, s)	107.74 (2x1C, s)
5, 8	102.25 (2x1C, d)	102.40 (2x1C, d)
2, 11-OMe	61.05 (2x1C, q)	61.11 (2x1C, q)
6, 7-OMe	56.44 (2x1C, q)	56.47 (2x1C, q)
13, 16	48.65 (2x1C, d)	48.62 (2x1C, d)
15, 18	27.95 (2x1C, q)	27.98 (2x1C, q)

Le spectre ^{13}C -RMN présente 15 signaux correspondant tous à des couples de carbones chimiquement équivalents. Les groupes carbonyles C(3, 10) apparaissent à 204.82 ppm.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse réalisé en électrospray (ESI, +) permet d'identifier le pic moléculaire à $m/z = 544.8$ (M+1).

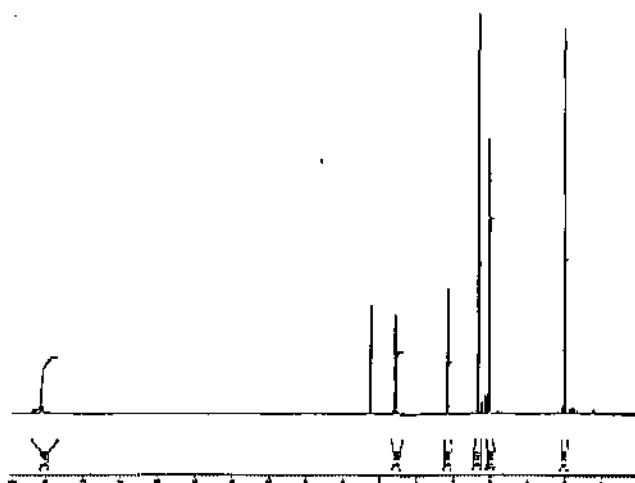


Figure 2.11.1 : spectre ^1H -RMN de l'elsinochrome A (6).

S#: 12 RT: 0.16 AV: 1 NL: 5.44E6
F: + c Full ms [150.00 - 800.00]

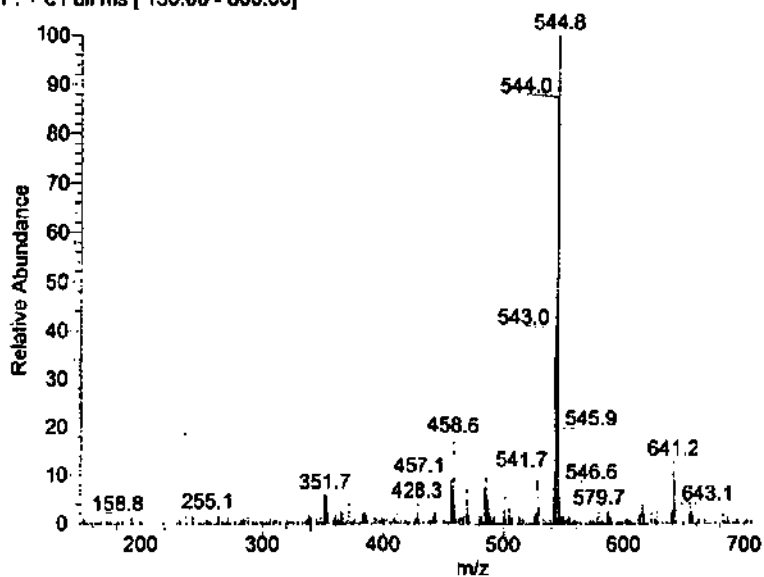


Figure 2.11.2 : spectre de masse (ESI) de l'elsinochrome A (6).

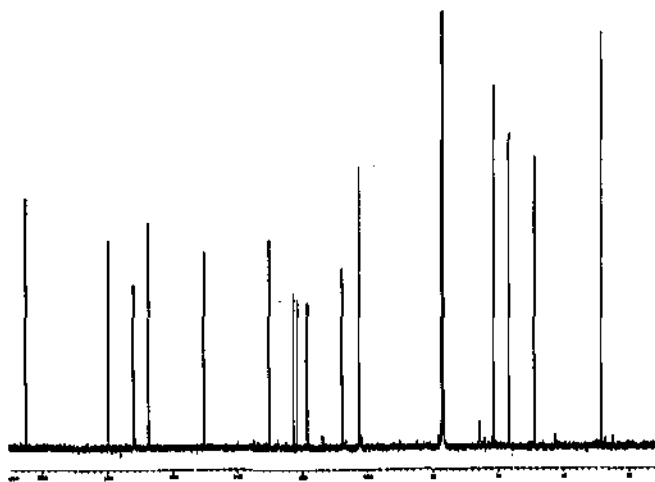


Figure 2.11.3 : spectre ^{13}C -RMN de l'elsinochrome A (6).

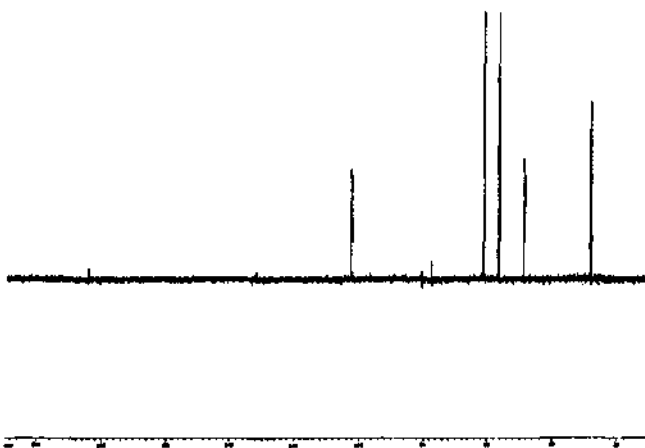


Figure 2.11.4 : spectre DEPT 135 de l'elsinochrome A (6).

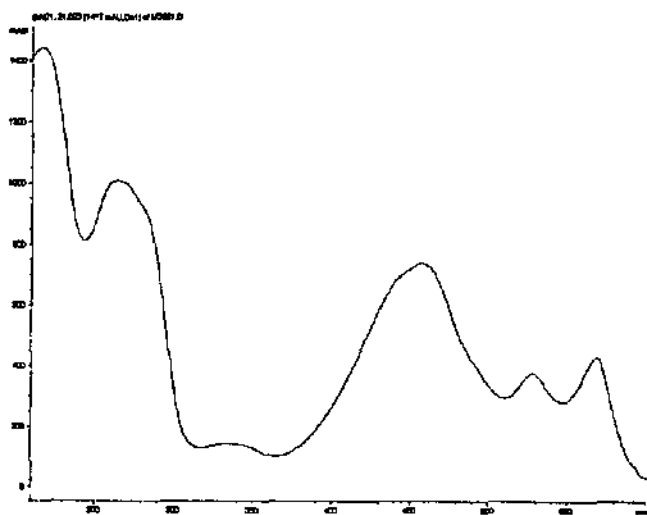


Figure 2.11.5 : spectre UV/VIS de l'elsinochrome A (6).

2.6.2 Métabolites isolés de la souche 214 Ca

2.6.2.1 Cercosporine (7) (5,12-dihydroxy-8,9-bis-(2-hydroxy-propyl)-7,10-diméthoxy-perylo<1,12-def><1,3>dioxepine-6,11-dione)

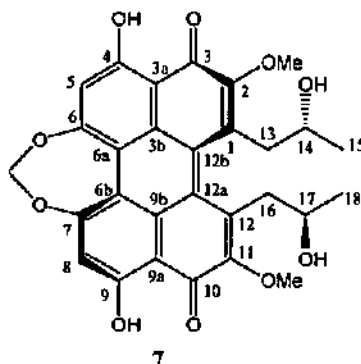


Figure 2.12 : structure de la cercosporine (7).

La cercosporine a été isolée pour la première fois en 1957 du champignon *Cercospora kikuchii*, un pathogène du soja [82, 83]. Sa structure a été décrite à peu d'intervalle par *Lousberg et al.* [84] et par *Yamazaki et Ogawa* [85]. Il s'agit du composé majoritaire contenu dans l'extrait brut (PDB) de la souche 214 Ca. Il est de couleur rouge intense.

Analyse :

Formule brute : $C_{29}H_{26}O_{10}$

Poids moléculaire : 534

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 15.8 minutes

Quantité isolée : environ 25 mg pour 25 litres de milieu de culture

1H -RMN : voir tableau 2.9

^{13}C -RMN : voir tableau 2.10

HR-SM (ESI, +) m/z : 535.160 ($M^+ + 1$, 100 %) (calc. 535.213, $C_{29}H_{27}O_{10}$).

IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1} : 3431; 2927; 2854; 1619; 1266; 1163; 1014.

UV λ/nm : 235 (max); 268; 323 (min); 460; 562 (épaulement).

Tableau 2.9 : comparaison des données spectroscopiques (^1H -RMN) de 7 avec nos résultats.

	^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3 [ppm]) [80]	^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , [ppm])
4, 9	14.82 (2x1H, s, OH)	14.82 (2x1H, s, OH)
5, 8	7.03 (2x1H, s)	7.07 (2x1H, s)
6-OCH ₂ O	5.75 (2H, s)	5.74 (2H, s)
2, 11	4.18 (2x3H, s, OMe)	4.21 (2x3H, s, OMe)
13, 16	3.58 (2x1H, m, 2x $\underline{\text{ABX}}$)	3.59 (2x1H, m, 2x $\underline{\text{ABX}}$, $J_{\text{AB}} = 12.9 \text{ Hz}$, $J_{\text{AX}} = 6.9 \text{ Hz}$)
14, 17	3.38 (2x1H, q, 2x $\underline{\text{ABX}}$)	3.39 (2x1H, m, 2x $\underline{\text{ABX}}$)
13, 16	2.88 (2x1H, m, 2x $\underline{\text{ABX}}$)	2.91 (2x1H, m, 2x $\underline{\text{ABX}}$, $J_{\text{AB}} = 12.9 \text{ Hz}$, $J_{\text{BX}} = 5.9 \text{ Hz}$)
15, 18	0.60 (2x3H, d)	0.65 (2x3H, d, $J = 6.1 \text{ Hz}$)

La symétrie C_2 de la cercosporine (7) conduit, comme pour l'elsinochrome A (6), à l'équivalence chimique des signaux des protons de chacune des moitiés de la molécule. Les carbones C(6) et C(7) sont reliés par un groupe O-CH₂-O. Ces protons méthyléniques résonnent à 5.74 ppm.

Les seuls couplages observés concernent les chaînes fixées en C(1) et en C(12). Un système ABX est engendré par les méthylènes C(13, 16) et les protons fixés en C(14, 17). Les constantes de couplages sont les suivantes : $J_{\text{AB}} = 12.9 \text{ Hz}$, $J_{\text{AX}} = 5.9 \text{ Hz}$ et $J_{\text{BX}} = 6.9 \text{ Hz}$.

Du couplage entre les méthyles en C(15, 18) et les protons en C(14, 17) résulte un doublet centré à 0.65 ppm ($^3J = 6.1 \text{ Hz}$). Les méthoxy apparaissent à 4.21 ppm et les protons aromatiques C(5, 8) à 7.07 ppm. Les groupes hydroxyles fixés en C(4, 9) sont fortement déblindés et apparaissent à 14.82 ppm, soit 1.3 ppm de moins que les signaux analogues de l'elsinochrome A (6).

Tableau 2.10 : comparaison des données spectroscopiques (^{13}C -RMN) de 7 avec nos résultats.

	^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3 [ppm]) [80]	^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3 , [ppm])
3, 10	181.82 (2x1C, s)	182.50 (2x1C, s)
4, 9	167.49 (2x1C, s)	168.18 (2x1C, s)
6, 7	163.41 (2x1C, s)	164.08 (2x1C, s)
2, 11	152.86 (2x1C, s)	153.51 (2x1C, s)
1, 12	135.35 (2x1C, s)	135.91 (2x1C, s)
12a, 12b	130.65 (2x1C, s)	131.24 (2x1C, s)
9b, 3b	127.96 (2x1C, s)	128.62 (2x1C, s)
6a, 6b	112.93 (2x1C, s)	113.60 (2x1C, s)
5, 8	109.30 (2x1C, d)	110.03 (2x1C, d)
3a, 9a	108.28 (2x1C, s)	108.94 (2x1C, s)
6-OCH ₂ O	92.65 (1C, t)	93.32 (1C, t)
14, 17	68.09 (2x1C, d)	68.77 (2x1C, d)
22-, 11-OMe	61.20 (2x1C, q)	61.88 (2x1C, q)
13, 16	42.21 (2x1C, t)	42.85 (2x1C, t)
15, 18	23.31 (2x1C, q)	24.09 (2x1C, q)

Le spectre ^{13}C -RMN présente 15 signaux dont 14 correspondent à des couples de carbones chimiquement équivalents. Les groupes carbonyles C(3, 10) sortent à 182.50 ppm.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse haute résolution, réalisé à l'aide d'une source électrospray (ESI), donne le pic moléculaire à $m/z = 535.160$ (M+1), ce qui correspond à la valeur théorique pour la formule brute $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{O}_{10}$ (535.213).

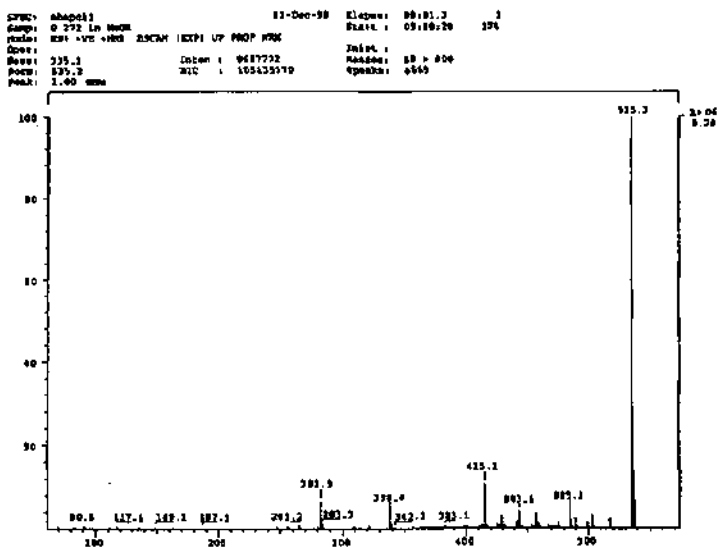


Figure 2.12.1 : spectre de masse haute résolution (ESI) de la cercosporine (7).

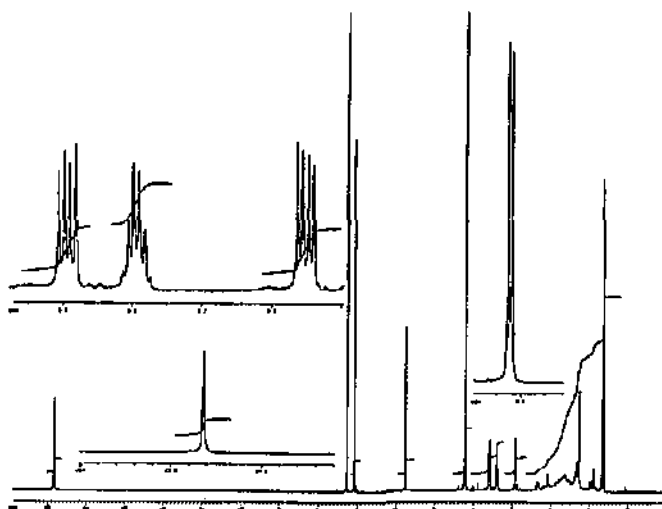


Figure 2.12.2 : spectre ^1H -RMN de la cercosporine (7).

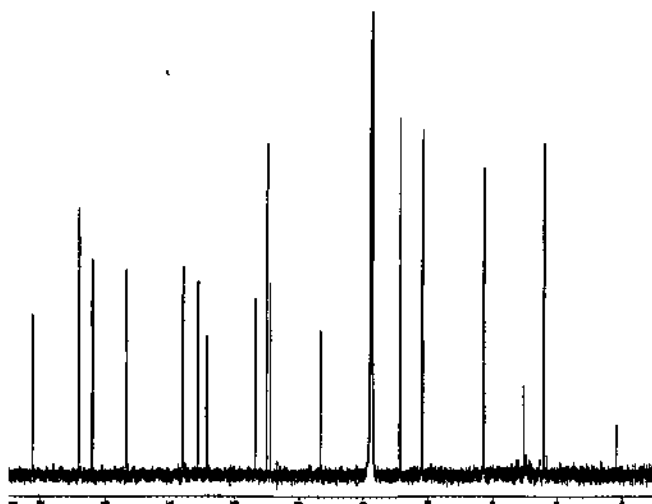


Figure 2.12.3 : spectre ^{13}C -RMN de la cercosporine (7).

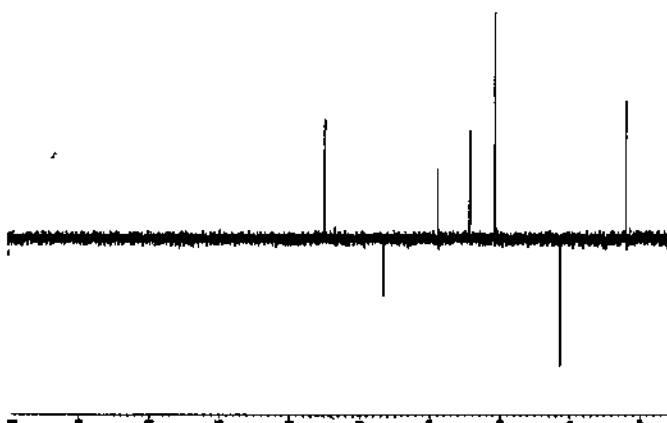


Figure 2.12.4 : spectre DEPT 135 de la cercosporine (7).

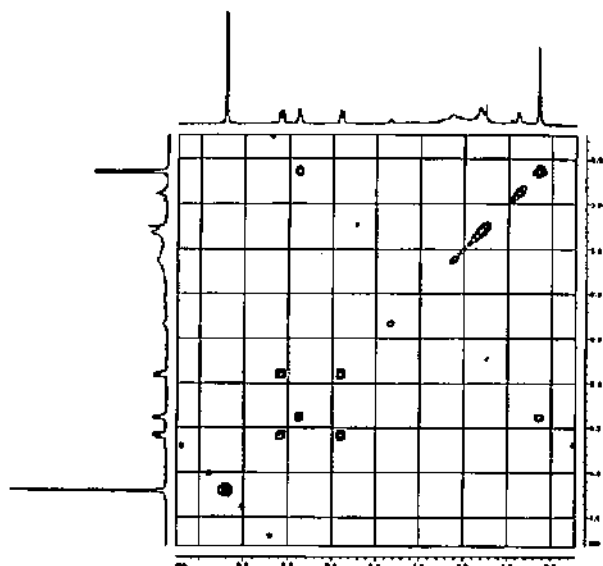


Figure 2.12.5 : spectre COSY 45 de la cercosporine (7).

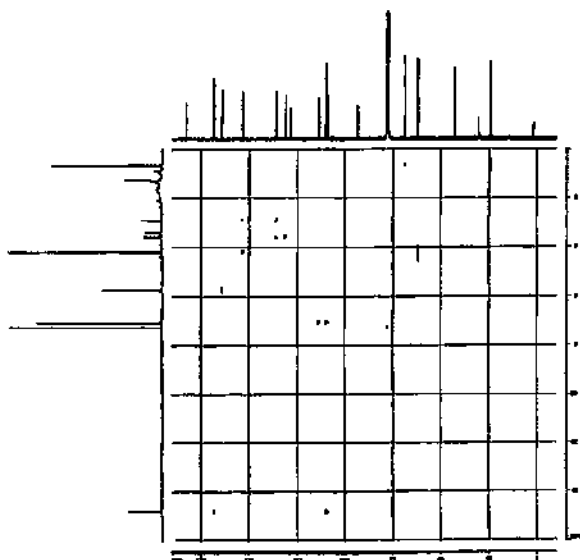


Figure 2.12.6 : spectre HETCOR SR de la cercosporine (7).

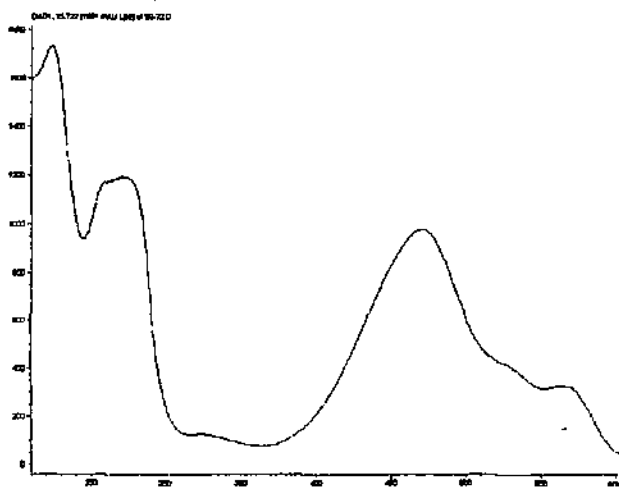


Figure 2.12.7 : spectre UV/VIS de la cercosporine (7).

2.6.2.2 Isocercosporine (8) (5,12-dihydroxy-8,9-bis-(2-hydroxy-propyl)-7,10-diméthoxy-pérylo<1,12-def><1,3>dioxepine-6,11-dione)

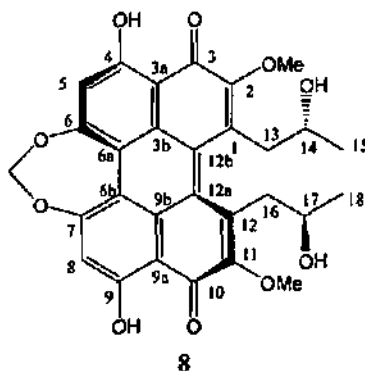


Figure 2.13 : structure de l'isocercosporine (8).

L'isocercosporine (8) a été isolée d'une fraction moins polaire que celle contenant majoritairement la cercosporine (7). On y trouve également les composés 10, 13 et 14 décrits aux paragraphes 2.6.2.4, 2.6.2.7 et 2.6.2.8.

La première mention de 8 revient également à *Kuyama* [82, 83] dans son article de 1957. La description structurale a été publiée en 1973 par *Mumma et al.* [86].

Analyse :

Formule brute : $C_{29}H_{26}O_{10}$

Poids moléculaire : 534

1H -RMN : voir tableau 2.11.

Tableau 2.11 : comparaison des données spectroscopiques (¹H-RMN) de **8** avec nos résultats.

	¹ H-RMN (600 MHz, CDCl ₃ [ppm]) [80]	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃ , [ppm])
14, 17	14.90 (1x1H, s, OH)	14.90 (2x1H, s, OH)
5, 8	6.67 (2x1H, s)	7.06 (2x1H, s)
6-OCH ₂ O	5.62 (2H, s)	5.74 (2H, s)
2, 11	4.20 (2x3H, s, OMe)	4.23 (2x3H, s, OMe)
14, 17	3.69 (2x1H, m, 2xABX)	3.71 (2x1H, m, 2xABX, J _{AX} = 3.5 Hz)
13, 16	3.49 (2x1H, m, 2xABX)	3.51 (2x1H, m, 2xABX, J _{AB} = 13.3 Hz)
13, 16	2.86 (2x1H, m, 2xABX)	2.87 (2x1H, m, 2xABX, J _{BX} = 8.1 Hz)
15, 18	0.96 (2x3H, d)	0.96 (2x3H, d, J = 6.2 Hz)

Le spectre ¹H-RMN de l'isocercosporine (**8**) est assez proche de celui de la cercosporine (**7**). On y retrouve les mêmes signaux mais avec quelques différences de déplacement chimique : les chaînes 2-hydroxypropyles fixées en C(1, 11) et notamment les groupements méthyle en C(15, 18) subissent un déblindage de plus de 0.3 ppm. Cette différence suggère que les méthyles de la cercosporine (**7**) et de l'isocercosporine (**8**) n'aient pas la même position spatiale, relativement au plan des cycles aromatiques [86].

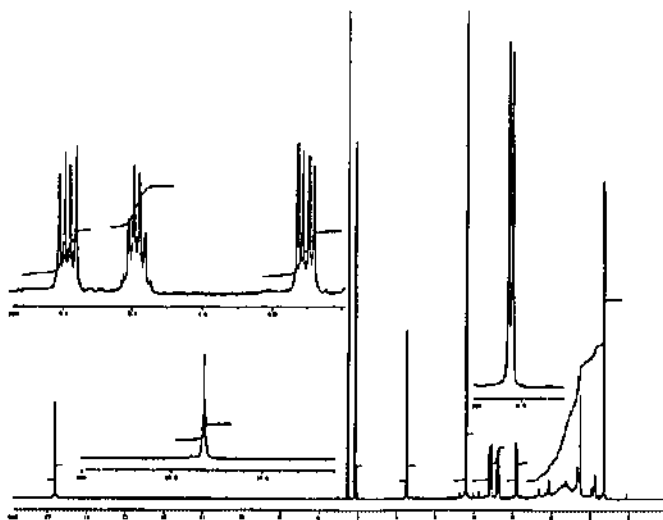


Figure 2.13.1 : spectre ¹H-RMN de l'isocercosporine (8).

2.6.2.3 Acide coriolique (9) (acide 13-hydroxy-9(Z), 11(E)-octadécénoïque)

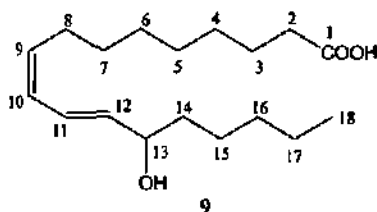


Figure 2.14 : structure de l'acide coriolique (9).

Le composé 9, est connu dans la littérature sous le nom d'acide coriolique (isomère 13R). Ce dernier a été isolé à partir de graines de *Coriaria Nepalensis* Wall. par Tallent et al. [87].

Dans notre cas, l'acide coriolique a été obtenu dans la même fraction que la cercosporine (7).

Analyse :

Formule brute : $C_{18}H_{32}O_3$

Poids moléculaire : 296

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 17.9 minutes

Quantité isolée : environ 7 mg pour 15 litres de milieu de culture

1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) : voir tableau 2.12.

^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C [ppm] : 179.22 (s, (1)); 135.64 (d, (12)); 133.11 (d, (9)); 127.64 (d, (10)); 125.92 (d, (11)); 72.93 (d, (13)); 37.24 (t, (14)); 33.89 (t, (2)); 31.45 (t); 29.29 (t, 2C); 29.12 (t); 28.95 (t); 27.73 (t, (8)); 25.32 (t); 24.62 (t, (3)); 22.53 (t); 14.04 (q, (18)).

SM (EI, 70 eV) m/z : 296 (M^+ , 1 %), 278 (M^+ - H_2O 5 %); 207 (M^+ - C_5H_{11} , 3 %); 179 (M^+ - C_5H_{11} - $C=O$, 9 %), 171 (32 %), 55 (100 %).

UV λ_{nm} : 241 (max).

Tableau 2.12 : comparaison des données spectroscopiques (¹H-RMN) de 9 avec nos résultats.

	¹ H-RMN (300 MHz, CDCl ₃ , [ppm]) [88]	¹ H-RMN (400 MHz, CDCl ₃ , [ppm])
11	6.47 (dd, J ₁₁₋₁₀ = 11 Hz, J ₁₁₋₁₂ = 14 Hz)	6.48 (dd, 1H, J ₁₁₋₁₀ = 11.0 Hz, J ₁₁₋₁₂ = 15.1 Hz)
10	5.95 (t, (t, 1H, J ₁₀₋₉ ≅ J ₁₀₋₁₁ = 11 Hz)	5.97 (t, 1H, J ₁₀₋₉ ≅ J ₁₀₋₁₁ = 10.9 Hz)
12	5.65 (dd, 1H, J ₁₂₋₁₁ = 15 Hz, J ₁₂₋₁₃ = 7 Hz)	5.65 (dd, 1H, J ₁₂₋₁₁ = 15.1 Hz, J ₁₂₋₁₃ = 6.9 Hz)
9	5.42 (dt, 1H, J ₉₋₈ = 7 Hz, J ₉₋₁₀ = 11 Hz)	5.45 (dt, 1H, J ₉₋₈ = 7.6 Hz, J ₉₋₁₀ = 10.8 Hz)
13	4.20 (m)	4.16 (dt, 1H, J ₁₃₋₁₂ ≅ J ₁₃₋₁₄ = 6.8 Hz)
2	2.35 (t, J ₂₋₃ = 9 Hz)	2.34 (J ₂₋₃ = 7.5 Hz)
8	2.15 (m)	2.15 (dq, 2H, J ₈₋₉ = 7.5 Hz, J ₈₋₁₀ = 1.2 Hz)
3	1.65-1.50 (m)	1.63 (m, 2H)
14	1.65-1.50 (m)	1.53 (m, 2H)
4-7, 15-17	1.35-1.20 (m)	1.35-1.25 (m, 7x2H)
18	0.85 (t, J = 8 Hz)	0.89 (t, 3H, J = 6.9 Hz)

On remarque la bonne correspondance des déplacements chimiques des protons oléfiniques avec les données de la récente publication (1997) de *Gragouri et Legoy* [88]. Ceci confirme la configuration *cis* et *trans* des deux doubles liaisons. Pour la double liaison C(9)=C(10), un couplage *cis* J₉₋₁₀ de 10.8 Hz est observé alors que le couplage *trans* J₁₁₋₁₂ de la double liaison C(11)=C(12) est de 15.1 Hz. L'interaction entre les protons en C(10) et C(11) conduit à J₁₀₋₁₁ = 11.0 Hz. J₉₋₁₀ et J₁₀₋₁₁ étant très proches, le signal du proton en C(10) apparaît sous la forme d'un triplet au lieu d'un doublet de doublet.

Les signaux des groupes méthylènes en C(2), C(3), C(8) et C(14) ont été attribués grâce au spectre de COSY 45. Les sept autres méthylènes C(4-7) et C(15-17) n'ont pas pu être assignés.

A l'image du proton en C(10), celui en C(13) à 4.16 ppm se présente sous la forme d'un quadruplet et non d'un doublet de triplet, en raison de la proximité des constantes de couplage J_{13-12} et J_{13-14} ppm ($J_{12-13} \cong J_{13-14} = 6.8$ Hz).

Le spectre de masse (EI) présente un faible pic moléculaire à $m/z = 296$ ainsi qu'un fragment à $m/z = 278$ correspondant à une perte d'eau ($M - 18$). Le pic à $m/z = 207$ ($M - 18 - 71$, C_5H_{11}) correspondant à la perte du bout de chaîne alkylée en β de la double liaison C(11)=C(12). Une perte de C=O supplémentaire conduit au fragment $m/z = 179$ ($M - 71 - 28$). Les fragments principaux sont en accord avec les résultats publiés en 1997 Gargouri et Legoy [88].

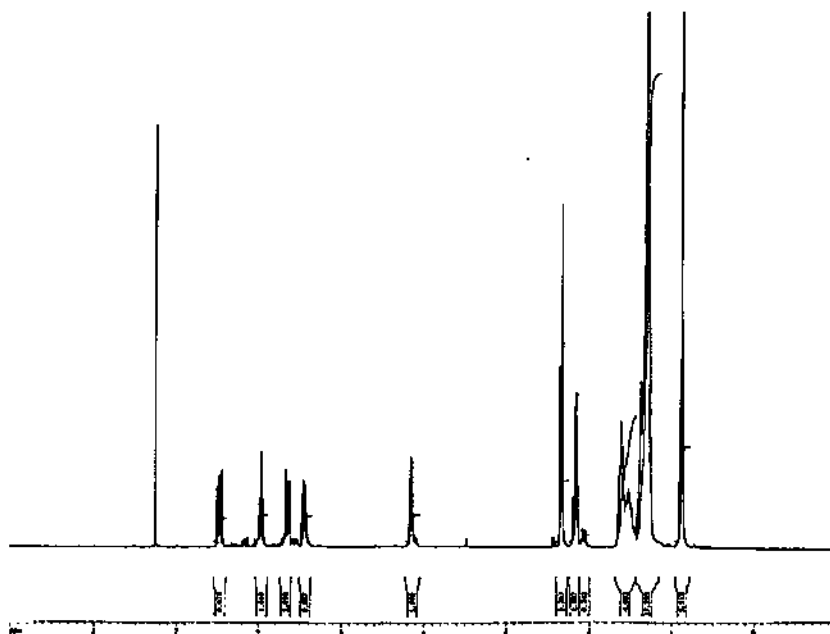


Figure 2.14.1 : spectre ^1H -RMN de l'acide coriolique (9).

Scan: 42
Base: m/z 66; 31.65%FS TIC: 2045140

R.T.: 1.20

Words: 070

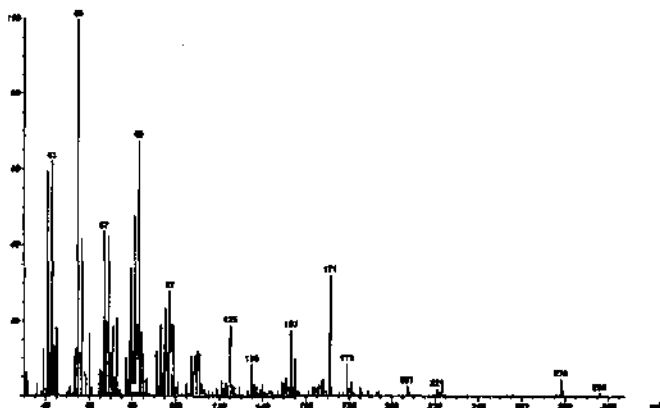


Figure 2.14.2 : spectre de masse EI de l'acide coriolique (9).

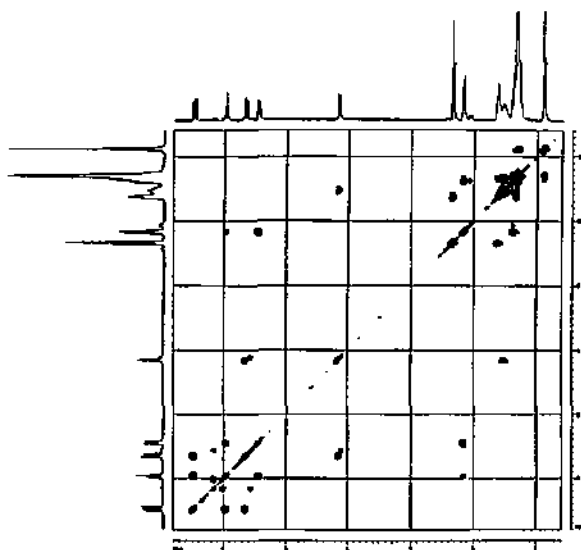


Figure 2.14.3 : spectre COSY 45 de l'acide coriolique (9).

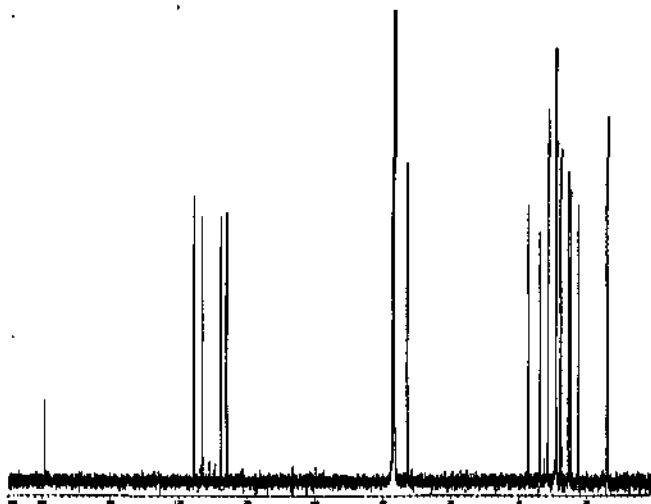


Figure 2.14.4 : spectre ^{13}C -RMN de l'acide coriolique (9).

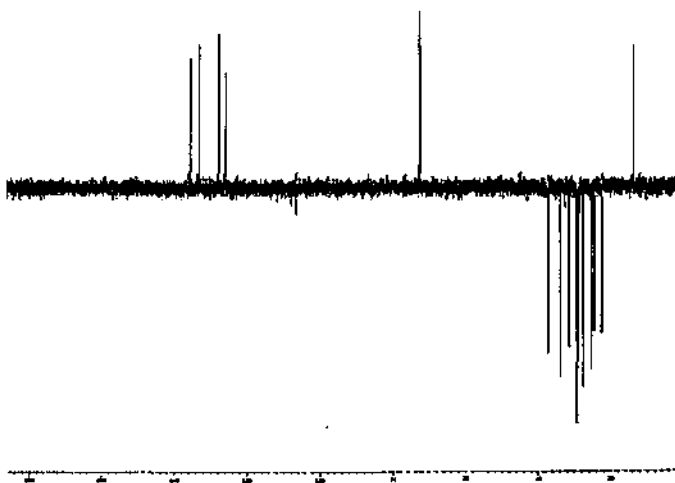


Figure 2.14.5 : spectre DEPT 135 de l'acide coriolique (9).

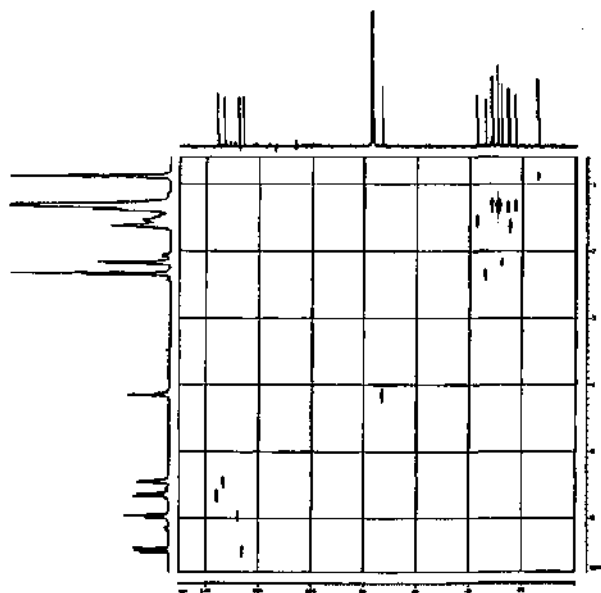


Figure 2.14.6 : spectre HETCOR SR de l'acide coriolique (9).

2.6.2.4 3,4-Dihydro,-3,4,8-trihydroxy-1(2H)naphthalénone (10)

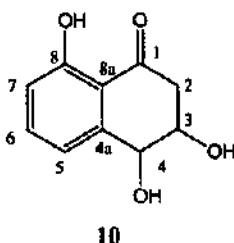


Figure 2.15 : structure de la naphthalénone (10).

Cette naphthalénone a été isolée pour la première fois de *Pyricularia oryzae* Cavara, un champignon pathogène du riz [89]. On la trouve également chez *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea*, un champignon pathogène du café étudié dans nos laboratoires [76, 77].

Analyse :

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

Poids moléculaire : 194

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 3.6 minutes

Quantité isolée : < 1 mg pour 40 litres de milieu de culture

1H -RMN : voir tableau 2.13

^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ_c [ppm] : 201.79 (s, (1)); 162.42 (s, (8)); 142.22 (s, (8a)); 137.20 (d, (6)); 119.00 (d, (5)); 118.15 (d, (7)); 115.29 (s, (4a)); 70.09 (d, (3)); 69.11 (d, (4)); 42.59 (t, (2)).

SM (EI, 70 eV) m/z : 194 (M^+ , 35 %); 176 ($M^+ - H_2O$, 34 %); 150 ($M^+ - CH_2CHOH$, 37 %); 121 ($M^+ - CH_2CHOH - CHO$, 100 %); 92 (28 %); 65 (53 %).

SM (DCI) m/z : 212 ($M^+ + NH_4$, 7.5 %); 195 ($M^+ + 1$, 100 %).

UV λ/nm : 258 (max), 332.

Tableau 2.13 : comparaison des données spectroscopiques ($^1\text{H-RMN}$) de **10** avec nos résultats.

	$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, acétone- d_6 [ppm]) [76]	$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3 , [ppm])
8	12.46 (s, OH)	12.26 (s, OH)
6	7.67 (dd, $J = 8.3$ et 7.6 Hz)	7.53 (dd, $J = 7.5$ et 8.4 Hz)
5	7.29 (dd, $J = 6.5$ et 0.9 Hz)	7.09 (dt, $J = 7.5$ et 1.0 Hz)
7	6.96 (dd, $J = 8.3$ et 0.9 Hz)	6.96 (dd, $J = 8.5$ et 0.7 Hz)
4	4.79 (d, $J = 7.3$ Hz)	4.91 (s, large)
3	4.23 (ABX, m)	4.40 (ABX, m)
2	3.18 (ABX, $J_{AB} = 17.2$ Hz et $J_{AX} = 4.1$ Hz)	3.08 (ABX, $J_{AB} = 17.4$ Hz, $J_{AX} = 3.8$ Hz)
2	2.85 (ABX, $J_{AB} = 17.2$ Hz et $J_{BX} = 8.8$ Hz)	2.88 (ABX, $J_{AB} = 17.4$ Hz, $J_{BX} = 7.5$ Hz)
(4)		2.54 (s, OH)
(3)		2.33 (s, OH)

La comparaison des spectres $^1\text{H-RMN}$ de **10** dans CDCl_3 et dans l'acétone- d_6 conduit à de légères différences de déplacements chimiques n'excédant toutefois pas 0.2 ppm. Les constantes de couplage sont, elles aussi, concordantes.

On constate la présence d'un système ABX entre les protons du groupement méthylène en C(2) et le proton situé en C(3). Les protons en C(6), C(5) et C(7), apparaissant respectivement à 7.53, 7.09 et 6.96 ppm. Ils présentent des multiplicités (couplages *ortho* et *méa*) typiques de trois protons contigus sur un cycle aromatique à six carbones.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse (EI) conduit à une fragmentation en accord avec les résultats de *Gremaud* [76]. On obtient le pic moléculaire à $m/z = 194$ ainsi que des fragments importants à 176 ($M - 18$, perte d'eau), 150 ($M - 44$, CH_2CHOH , Rétro Diels-Alder) et 121 ($150 - \text{CHO}$), ce dernier constituant le pic de base. Le spectre de masse en mode DCI (NH_3 , +) fournit une confirmation avec un pic de base à $m/z = 195$ ($M + 1$).

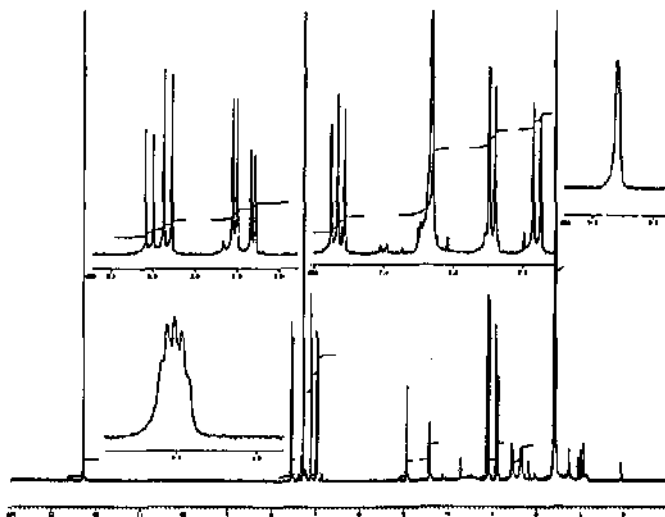


Figure 2.15.1 : spectre $^1\text{H-RMN}$ de la naphthalénone (10).

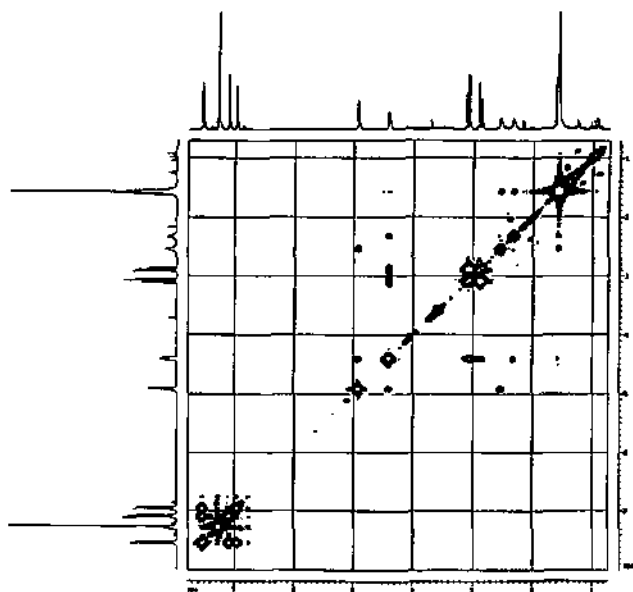


Figure 2.15.2 : spectre COSY 45 de la naphthalénone (10).

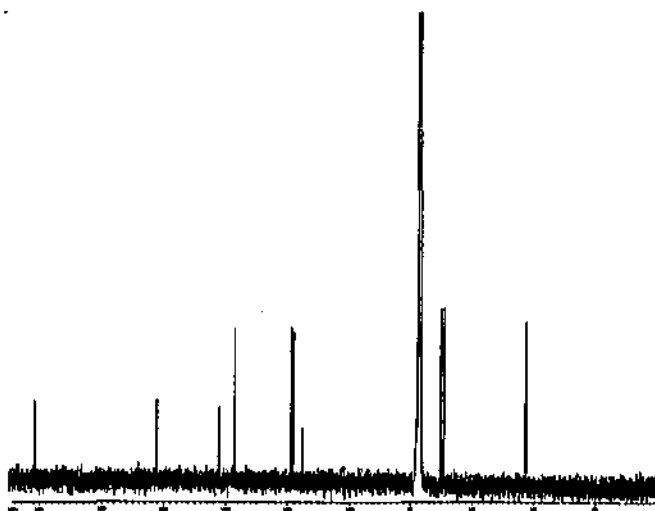


Figure 2.15.3 : spectre ^{13}C -RMN de la naphthalénone (10).

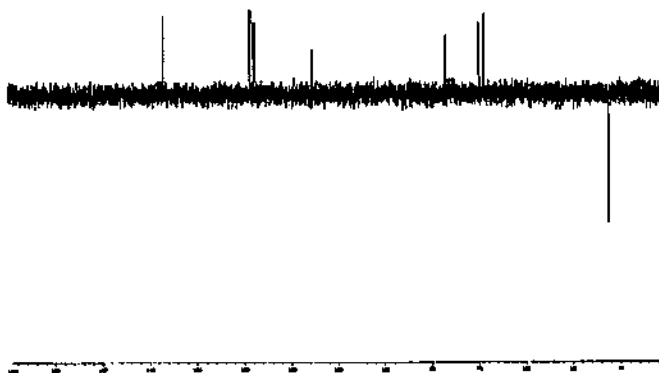


Figure 2.15.4 : spectre DEPT 135 de la naphthalénone (10).

Scan: 49
Base: m/z 32; 6.4%FS TIC: 416302

R.T.: 2.31

Mass: 1470

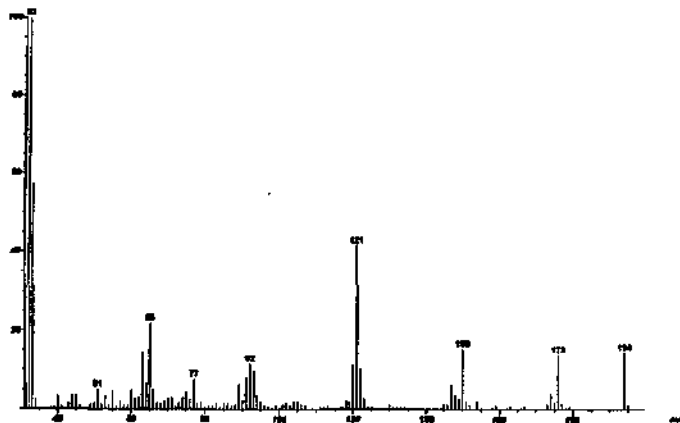


Figure 2.15.5 : spectre de masse EI de la naphthalénone (10).

Scan: 9
Base: m/z 30; 4.3%FS TIC: 273411

R.T.: 0.20

Mass: 1470

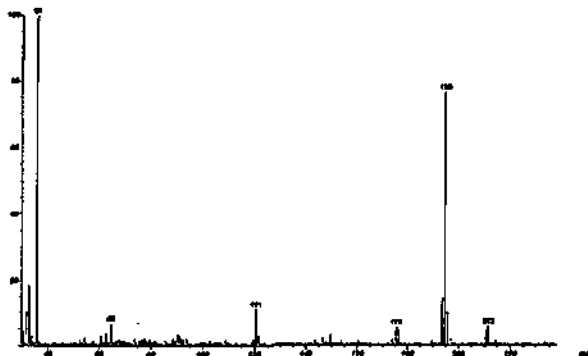
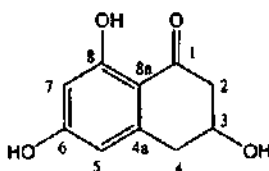


Figure 2.15.6 : spectre de masse DCI (NH₃, +) de la naphthalénone (10).

2.6.2.5 Scytalone (11) (3,2-dihydro-3,6,8-trihydroxynaphtalèn-1(2H)-one)



11

Figure 2.16 : structure de la scytalone (11).

Cette naphthalénone a été isolée pour la première fois d'une culture de *Scytalidium* FY [90]. Elle a également été obtenue à partir de *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea* et var. *platani*, deux champignons pathogènes du café, et du platane respectivement, étudiés dans nos laboratoires [76, 77, 91].

Analyse :

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

Poids moléculaire : 194

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 3.8 minutes

Quantité isolée : < 1 mg pour 40 litres de milieu de culture

1H -RMN : voir tableau 2.14.

SM (EI, 70 eV) m/z : 194 (M^+ , 7.5 %); 176 ($M - H_2O$, 6.6 %), 150 ($M - CH_2CHOH$, 8.1 %), 44 (CH_2CHOH^+ , 100 %).

UV λ/nm : 283 (max); 322.

Tableau 2.14 : comparaison des données spectroscopiques (¹H-RMN) de 11 avec nos résultats.

	¹ H-RMN (200 MHz, méthanol-d ₄ , [ppm]) [91]	¹ H-RMN (400.136 MHz, méthanol-d ₄ , [ppm])
5	6.30 (dt, J = 2.3 et 1.2 Hz)	6.27 (s, large)
7	6.18 (d, J = 2.3 Hz)	6.14 (s, large)
3	4.32 (m, J = 4 Hz)	4.33 (m, ABXCD)
4	3.2 (ddd, J = 16.6, 4.0 et 1.2 Hz)	3.15 (ABX, J _{AB} = 16.0 Hz, J _{AX} = 3.6 Hz)
4	2.96 (m)	2.92 (ABX, J _{AB} = 16.0 Hz, J _{BX} = 8.8 Hz)
2	2.96 (m)	2.92 (CDX, J _{CD} = 17.0 Hz, J _{CX} = 3.6 Hz)
2	2.70 (ddd, J = 16.6, 8.0 et 0.7 Hz)	2.69 (CDX, J _{CD} = 17.0 Hz, J _{DX} = 8.0 Hz)

Le spectre ¹H-RMN de la scytalone est proche de celui de la vermélone (5), pour ce qui est de la partie non aromatique. On observe à nouveau un système de type ABXCD. Les déplacements chimiques ainsi que les constantes de couplages des deux molécules sont proches, indépendamment des solvants utilisés : CDCl₃ pour la vermélone et MeOD pour la scytalone.

Pour la partie aromatique, il y a seulement deux signaux élargis correspondant aux deux protons en C(5) et C(7). La présence d'un groupement hydroxyle en C(6) conduit à un blindage. Les déplacements chimiques de ces derniers sont ainsi de 6.27 et 6.14 ppm respectivement, comparé à 6.84 et 6.76 ppm pour la vermélone (5) (dans CDCl₃). Le spectre ¹H-RMN de la scytalone, réalisé dans le méthanol, ne permet pas d'observer le signal du proton du groupe hydroxyle en C(8).

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse (EI) conduit à une fragmentation correspondant aux résultats présentés par *Gremaud* [76]. On obtient le pic moléculaire à m/z = 194 ainsi que des fragments importants à 176 (M - 18, perte d'eau) et 150 (M - 44, CH₂CHOH, Rétro Diels-Alder).

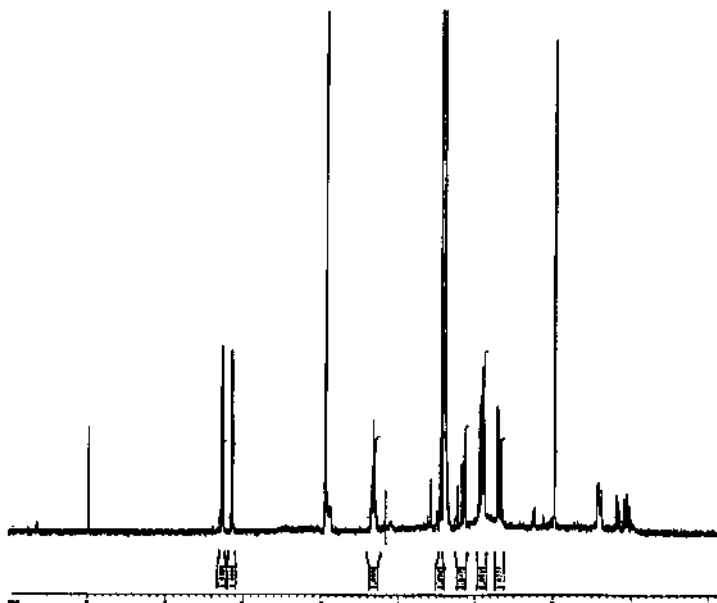


Figure 2.16.1 : spectre ¹H-RMN de la scytalone (11).

Scan: 80
Base: inv 44; 13.8%FS TIC: 385416

R.T.: 3.06

Mass: 1470

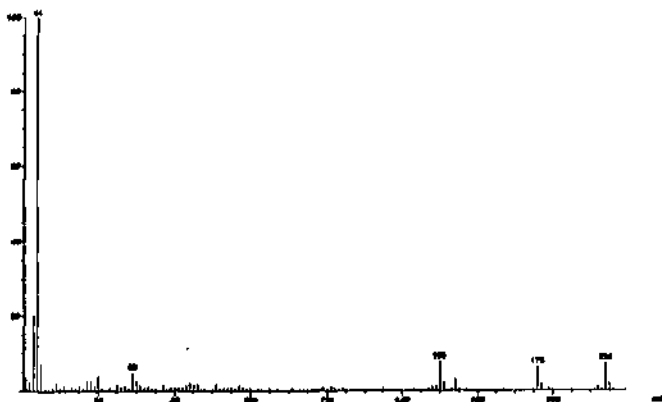


Figure 2.16.2 : spectre de masse EI de la scytalone (11).

2.6.2.6 3-Méthylscytalone (12) (3,4-dihydro-3,6,8-trihydroxy-3-méthyl-naphthalèn-1(2H)-one)

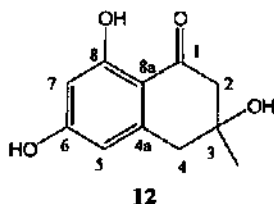


Figure 2.17 : structure de la 3-méthylscytalone (12).

A notre connaissance, ce composé n'est à ce jour pas encore décrit dans la littérature. La quantité isolée (< 0.5 mg) n'a permis de réaliser que le spectre ¹H-RMN, le COSY 45, la masse (EI) ainsi que l'UV. Ce dernier est pratiquement identique à celui de la scytalone (11).

Analyse :

Formule brute : C₁₁H₁₂O₄

Poids moléculaire : 208

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 4.4 minutes

Quantité isolée : << 1 mg pour 40 litres de milieu de culture

¹H-RMN (400 MHz, méthanol-d₄) : δ_H [ppm] : 6.27 (m, 1H, J = 2.2 Hz, 5); 6.16 (d, 1H, J = 2.2 Hz, 7); 3.05 (AB, 1H, J_{AB} = 16.2 Hz, 4A); 2.99 (AB, 1H, J_{AB} = 16.2 Hz, 4B); 2.81 (AB, 1H, J_{AB} = 17.0 Hz, 2A); 2.74 (AB, 1H, J_{AB} = 17.0 Hz, 2B); 1.42 (s, 3H, Me-3).

SM (EI, 70 eV) m/z : 208 (M⁺, 50 %); 193 (M - CH₃, 25 %), 190 (M - H₂O, 21 %); 179 (32 %); 151 (28 %); 150 (M - CH₂CCH₃OH, 88 %); « 120 » (100 %); 107 (25 %); 91 (30 %); 77 (26 %).

UV λ/nm : 283 (max); 325.

Le spectre $^1\text{H-RMN}$ de la 3-méthylscytalone (12) n'est pas totalement pur, il contient une impureté minoritaire. Les signaux correspondant à 12 sont voisins de ceux de la scytalone (11), notamment en ce qui concerne la partie aromatique où les différences de déplacements chimiques ne dépassent pas 0.02 ppm. Le proton en C(7) se présente sous la forme d'un doublet à 6.16 ppm ($J = 2.2$ Hz). Le couplage *métra* de 2.2 Hz est aussi mesurable sur le signal du proton en C(5). Ce dernier est toutefois plus complexe en raison de couplages longue distance avec le système AB en C(4). Les interactions entre les protons en C(7)-C(5) et C(5)-C(4) sont observables sur le spectre COSY 45.

La partie non aromatique est plus simple. Au lieu d'un système ABXCD, on observe deux systèmes AB distincts par l'absence de proton en C(3), remplacé par un méthyle. Les constantes de couplage J_{AB} sont de 16.2 et 17.0 Hz pour les protons en C(4) et C(2) respectivement. Les déplacements chimiques des protons en C(4) sont 3.05 et 2.99 ppm. Pour C(2), ils sont de 2.81 et 2.74 ppm. Le méthyle se présente sous la forme d'un singulet à 1.42 ppm.

Des exemples de la littérature concernant des molécules présentant des structures voisines de 12, confirment notre proposition [92, 93]. La comparaison des signaux en $^1\text{H-RMN}$ de la 3-méthylscytalone avec ceux correspondants de l'atrichrysonne (figure 2.18) [92, 93] permet d'observer une très bonne concordance.

Tableau 2.15 : comparaison des données spectroscopiques ($^1\text{H-RMN}$) de certains signaux de 12 avec l'atrichrysonne [93].

	atrichrysonne	3-méthylscytalone (12)
	$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, acétone- d_6 , [ppm]) [93]	$^1\text{H-RMN}$ (400.136 MHz, méthanol- d_4 , [ppm])
4	3.08 ($J = 15.9$ Hz)	3.05 (AB, $J_{AB} = 16.2$ Hz)
4	2.99 ($J = 15.9$ Hz)	2.99 (AB, $J_{AB} = 16.2$ Hz)
2	2.90 ($J = 17.4$ Hz)	2.81 (AB, $J_{AB} = 17.0$ Hz)
2	2.77 ($J = 17.4$ Hz)	2.74 (AB, $J_{AB} = 17.0$ Hz)
Me(3)	1.40 (s)	1.42 (s, Me)

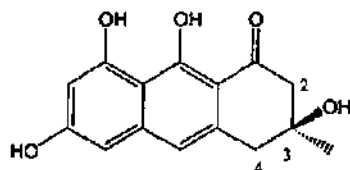


Figure 2.18 : structure de l'atrochryson [92].

La comparaison des signaux des protons des carbones C(2), C(3) et C(4) de l'atrochryson [92] confirme également notre hypothèse.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse en impact électronique (EI) de la 3-méthylscytalone (12) présente un pic moléculaire important à $m/z = 208$ (50 %). La fragmentation de la molécule ressemble à celle de la scytalone avec des pics à 193 (M - 15, perte d'un méthyle), 190 (M - 18, perte d'eau), 179 (M - 29, CHO) ou 150 (M - 58, $\text{CH}_2\text{CCH}_2\text{OH}$, Rétro Diels-Alder) (schémas 2.2 et 2.3). Le pic de base se situe quant à lui à $m/z = 120$. Ce fragment ne provient pas de 12 mais correspond vraisemblablement à l'impureté présente dans la fraction étudiée.

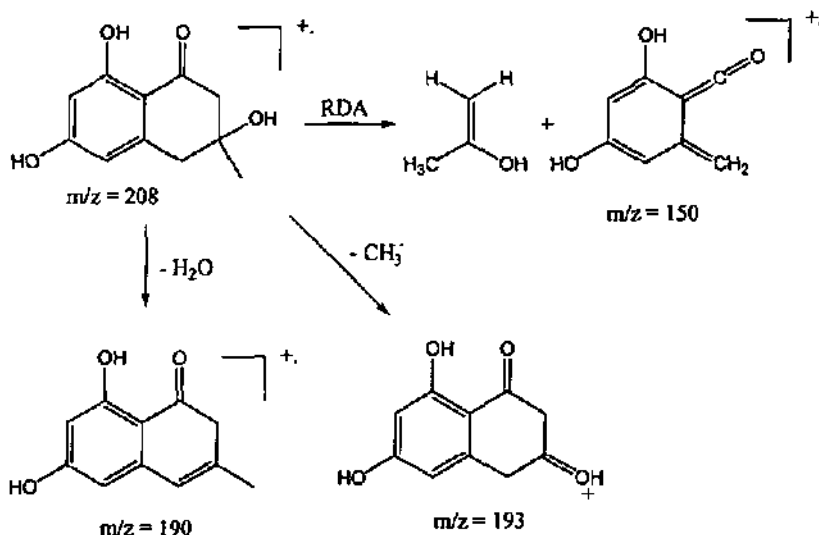


Schéma 2.2 : fragmentation de la 3-méthylscytalone (12), fragments $m/z = 190$, 193 et 150.

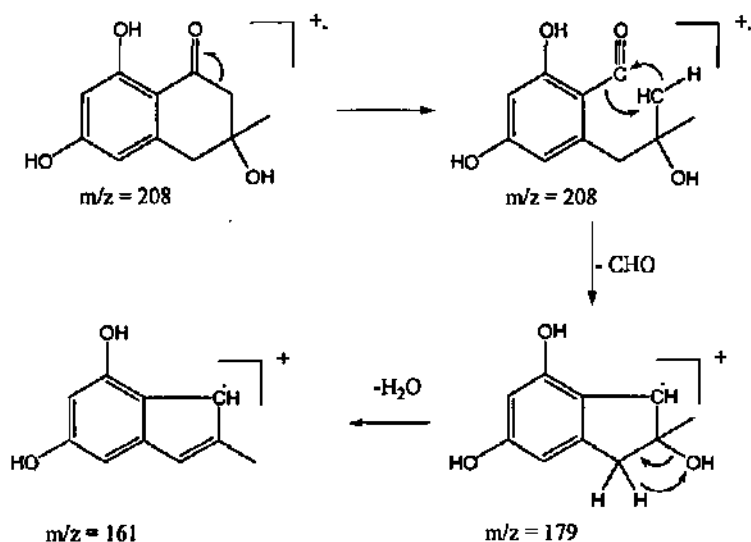


Schéma 2.3 : fragmentation de la 3-méthylscytalone (12), fragments $m/z = 179$ et 161.

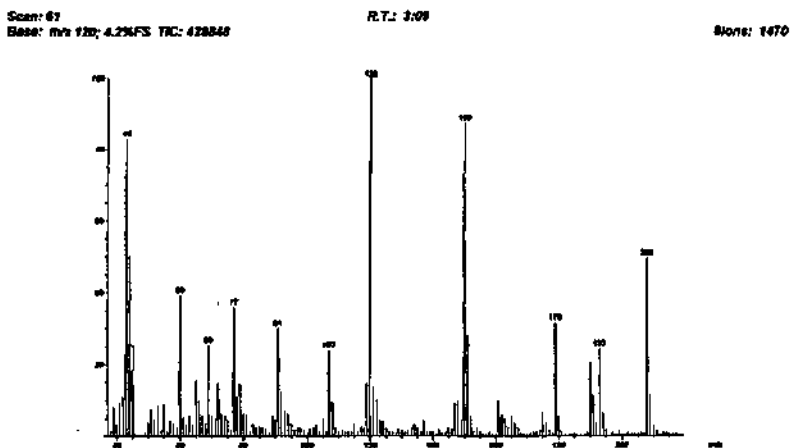


Figure 2.17.1 : spectre de masse EI de la 3-méthylscytalone (12).

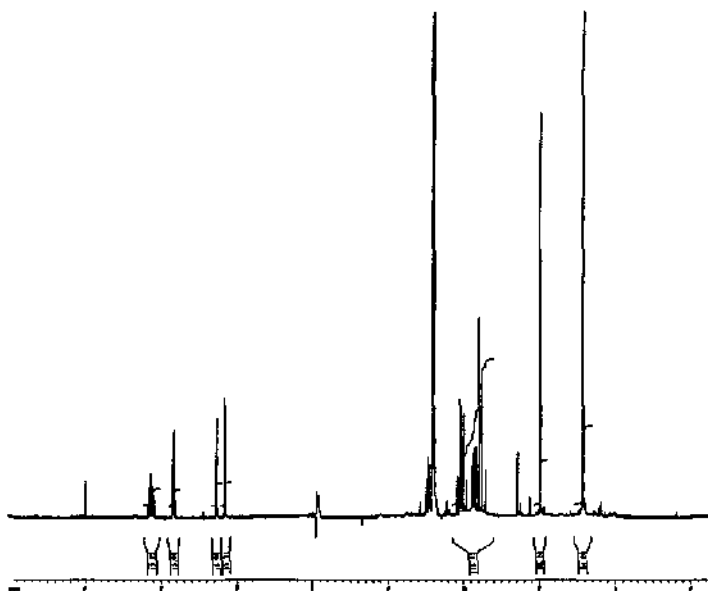


Figure 2.17.2 : spectre ^1H -RMN de la 3-méthylscytalone (12).

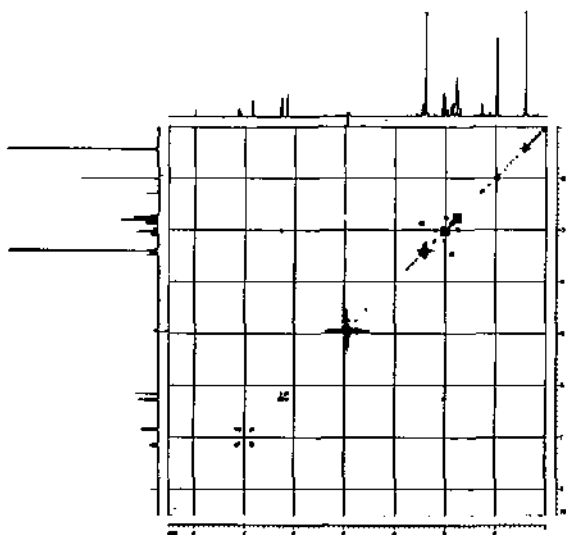


Figure 2.17.3 : spectre COSY 45 de la 3-méthylscytalone (12).

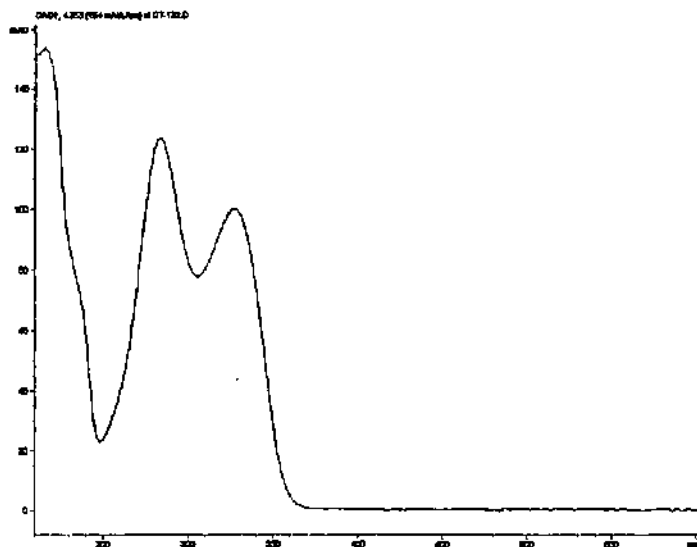


Figure 2.17.4 : spectre UV/VIS de la 3-méthylscytalone (12).

2.6.2.7 6,8-Dihydroxy-3-hydroxyméthylisocoumarine (13)

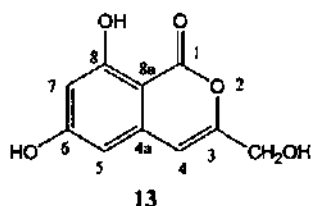


Figure 2.19 : structure de l'isocoumarine (13).

Cette isocoumarine a été isolée pour la première fois d'une culture de *Ceratocystis minor*, un champignon pathogène du pin [94]. Elle a également été obtenue à partir de *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea* et var. *platani*, deux champignons pathogènes du café et du platane respectivement, étudiés dans nos laboratoires [75-77, 91].

Analyse :

Formule brute : $C_{10}H_8O_5$

Poids moléculaire : 208

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 5.0 minutes

Quantité isolée : < 1 mg pour 40 litres de milieu de culture

1H -RMN : (400 MHz, méthanol- d_4) : voir tableau 2.16. (400 MHz, $CDCl_3$)
 δ_H [ppm] : 11.03 (s, OH, (8)); 6.45 (s, (4)); 6.43 (d, $J = 2.4$ Hz, (5) ou (7)); 6.34 (d, $J = 2.2$ Hz, (5) ou (7)); 4.47 (d, $J = 5.8$ Hz, $\underline{CH_2OH}$).

SM (EI, 70 eV) m/z : 208 (M^+ , 81 %); 179 (41 %); 177 ($M - CH_2OH$, 17 %); 149 ($M - CH_2OH - CO$, 15 %); 121($M - CH_2OH - 2xCO$, 72 %), 44 (100 %).

SM (DCI, NH_3 , +) m/z : 209 ($M^+ + 1$, 25 %), 208 (M^+ , 36 %); 177 (19 %); 121(19 %), 61 (100 %).

UV λ/nm : 238 (max); 276 (épaulement); 288 (épaulement); 327.

Tableau 2.15 : comparaison des données spectroscopiques (¹H-RMN) de **13** avec nos résultats.

	¹ H-RMN (200 MHz, acétone-d ₆ , [ppm]) [91]	¹ H-RMN (400 MHz, méthanol-d ₄ , [ppm])
4	6.59 (t, J = 1.0 Hz)	6.60 (s(large))
5	6.48 (d, J = 2.2 Hz)	6.42 (d, J = 2.2 Hz)
7	6.40 (d, J = 2.2 Hz)	6.40 (d, J = 2.2 Hz)
CH ₂ OH	4.40 (d, J = 1.0 Hz)	4.42 (d, J = 0.9 Hz)
(6)	3.84 (s, OH)	4.66 (s, OH)

Les spectres ¹H-RMN enregistrés dans l'acétone-d₆ [91], le méthanol-d₄ ou le CDCl₃ sont légèrement différents. Il est tout de même possible de les comparer, à l'exception du déplacement du groupe hydroxyle en C(6) où la différence est de plus de 0.8 ppm.

Spectrométrie de masse

La bonne correspondance de la fragmentation des spectres de masse (EI et DCI) et UV typique d'une isocoumarine permet tout de même de proposer la structure **13**. Le spectre de masse en mode d'ionisation électronique (EI) présente un ion moléculaire important à m/z = 208 (81 %). La fragmentation correspond bien avec les résultats de *Gremaud* [76] avec des fragments à 179 (M - 29, perte de CHO), 177 (M - 31, perte de CH₂OH), 149 (177 - 28, perte de CO) ou 121 (149 - 28, perte de CO). Le spectre en mode DCI confirme la valeur du pic moléculaire avec la présence de l'ion M + 1 à m/z = 209.

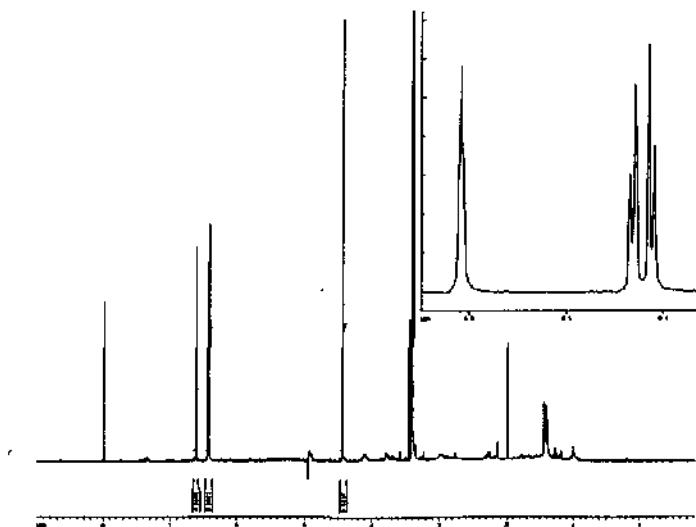


Figure 2.19.1 : spectre ^1H -RMN de l'isocoumarine (13).

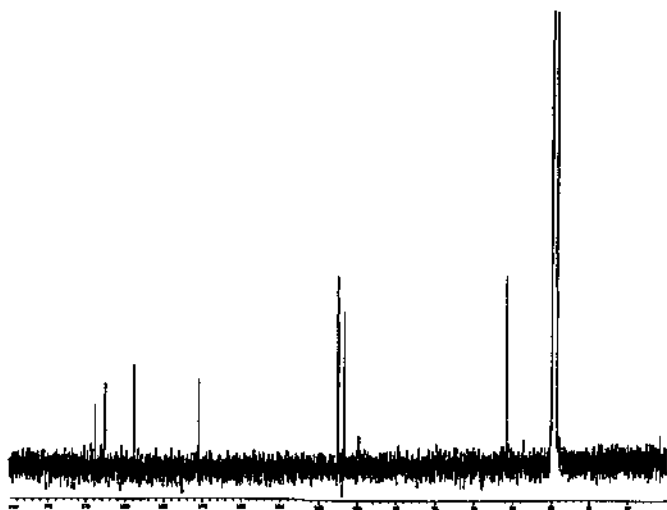
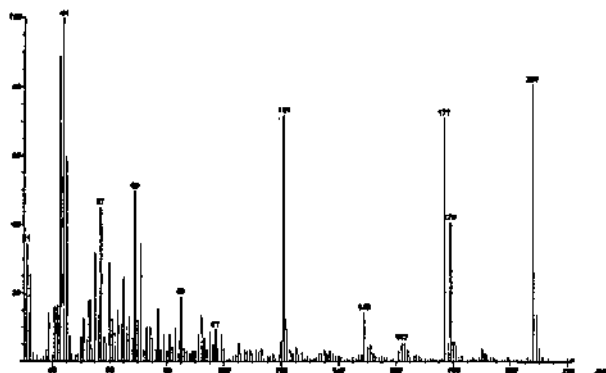


Figure 2.19.2 : spectre ^{13}C -RMN de l'isocoumarine (13).

Scan: 89 R.T.: 2.93
Base: ms 44; 6.91kPS TIC: 696289 Mon: 1470



2.6.2.8 *o*-Méthyladiaporthine ou orthosporine (14) (6,8-dihydroxy-3-(2'-hydroxypropyl)isocoumarine)

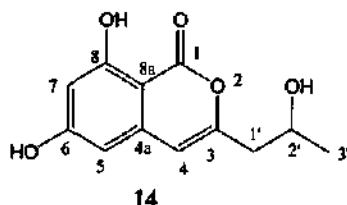


Figure 2.20 : structure de *o*-méthyladiaporthine ou orthosporine (14).

Cette isocoumarine a été isolée pour la première fois de *Drechlera siccas*, un champignon pathogène de l'avoine et du seigle, sous le nom de *o*-méthyladiaporthine [95]. Elle a également été trouvée dans le champignon pathogène *Rhynchosporium orthosporum* Caldwell, mais dénommée (+)-orthosporine [96] et dans les milieux de culture de *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea* et var. *platani* [75-77, 91].

Analyse :

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

Poids moléculaire : 236

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 7.5 minutes

Quantité isolée : < 1 mg pour 40 litres de milieu de culture

1H -RMN : (400.134 MHz, $CDCl_3$) : voir tableau 2.17. (400 MHz, méthanol- d_4) : voir tableau 2.18.

SM (EI, 70 eV) m/z : 236 (M^+ , 38 %); 192 ($M - CH_3CHO$, 100 %); 177 ($M - CH_3CHOHCH_2$, 6 %); 164 (15 %); 146 (18 %); 121 ($M - C_3H_5O_3$, 13 %).

UV λ /nm : 240 (max); 276 (épaulement); 288 (épaulement); 326.

Tableau 2.17 : comparaison des données spectroscopiques ($^1\text{H-RMN}$, CDCl_3) de 14 avec nos résultats.

	$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3 , [ppm]) [91]	$^1\text{H-RMN}$ (400.134 MHz, CDCl_3 , [ppm])
8	11.08 (s, OH) 8.03 (s, OH)	11.07 (s, OH)
5	6.40 (d, $J = 2.2$ Hz)	6.41 (d, $J = 2.3$ Hz)
7	6.28 (d, $J = 2.2$ Hz)	6.29 (d, $J = 2.2$ Hz)
4	6.26 (s)	6.26 (s)
2'	4.29 (m, ABX)	4.27 (m, ABX)
1'	2.64 (2H, ABX)	2.64 (ABX , $J_{\text{AB}} = 14.5$ Hz, $J_{\text{AX}} = 5.6$ Hz 2.59 (ABX , $J_{\text{AB}} = 14.5$ Hz, $J_{\text{BX}} = 8.2$ Hz)
	2.61 (s, OH)	
3'	1.31 (d, $J = 6.4$ Hz)	1.31 (d, $J = 6.2$ Hz)

Comme pour la naphthalénone (10), un système ABX entre le méthylène en C(1') et le proton situé en C(2') de la chaîne 2'-hydroxypropyle fixée en C(3) est observé. La comparaison des déplacements chimiques en $^1\text{H-RMN}$ ainsi que les fragmentations de masse concordent bien avec les résultats de *Gremaud* [76], *Burki* [91] et *Hallock et al.* [95].

Le tableau 2.18 présente les données spectroscopiques de 14 mesurées dans le méthanol- d_4 et comparées avec les résultats publiés par *Lai et al.* [97]. On y remarque des différences quant à l'attribution des signaux correspondant aux protons oléfinique en C(4) et aromatiques en C(5) et C(7). Dans notre cas, les deux protons aromatiques (doublets) apparaissent à 6.38 et 6.37 ppm alors que le singulet du proton oléfinique se situe à 6.44 ppm. *Lai et al.* [97] identifient les protons aromatiques à 6.37 et 6.30 ppm et le proton oléfinique à 6.33 ppm. On retrouve les mêmes divergences concernant la description de la citreoisocoumarine (17) dans la publication de *Lai et al.* [97] (paragraphe 2.6.2.11).

Tableau 2.18 : comparaison des données spectroscopiques (^1H -RMN, méthanol- d_4) de 14 avec nos résultats.

^1H -RMN 400 MHz, méthanol- d_4 , [ppm] [97]		^1H -RMN (400 MHz, méthanol- d_4 , [ppm])	
5	6.37 (d, $J = 2.2$ Hz)	4	6.44 (s)
4	6.33 (s)	5 ou 7	6.38 (d, $J = 2.2$ Hz)
7	6.30 (d, $J = 2.2$ Hz)	5 ou 7	6.37 (d, $J = 2.3$ Hz)
			4.66 (s, large, OH)
2'	4.15 (m)		4.23 (m, ABX)
1'	2.61 (dd, $J = 15.1$ et 5.9 Hz)		2.63-2.73 (m, ABX)
	2.56 (dd, $J = 15.1$ et 7.3 Hz)		
3'	1.24 (d, $J = 6.3$ Hz)		1.34 (d, $J = 6.3$ Hz)

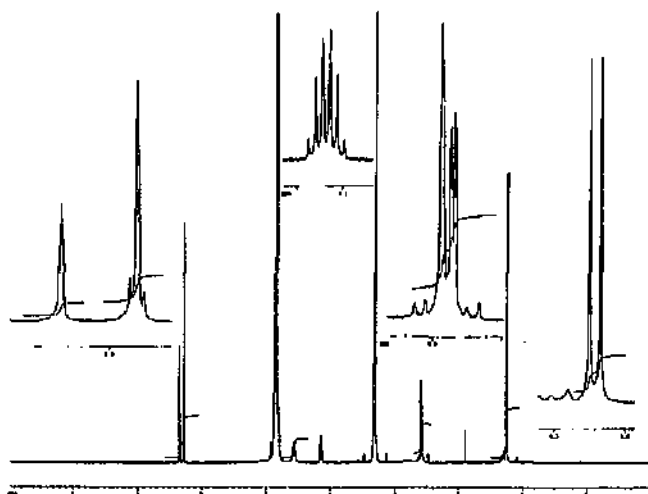


Figure 2.20.1 : spectre ^1H -RMN (méthanol- d_4) de l'orthosporine (14).

Scan: 60
Base: m/z 192; 26.2%FS TIC: 603418

R.T.: 2.34

Mass: 1470

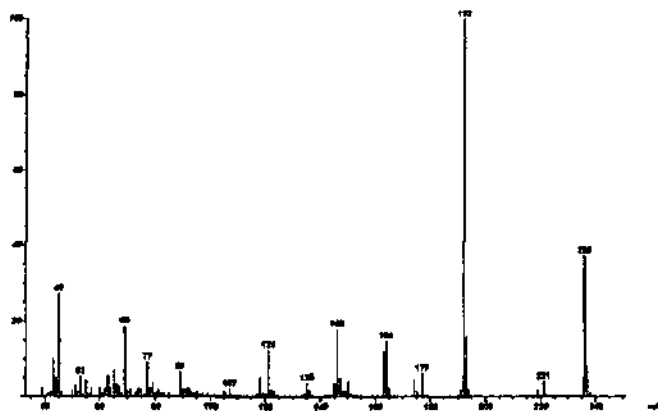


Figure 2.20.2 : spectre de masse EI de l'orthosporine (14).

2.6.2.9 6,8-Dihydroxy-3-(2'-oxopropyl)isocoumarine (15)

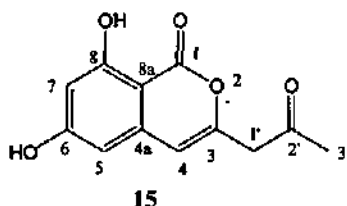


Figure 2.21 : structure de l'isocoumarine (15).

A notre connaissance, ce composé n'est à ce jour pas encore décrit dans la littérature. Sur la base des spectres ¹H-RMN, MS (EI) et UV, on peut proposer la structure ci-dessus.

Analyse :

Formule brute : C₁₂H₁₀O₅

Poids moléculaire : 234

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 9.8 minutes

Quantité isolée : < 1 mg pour 40 litres de milieu de culture

¹H-RMN : (400 MHz, CDCl₃) δ_H [ppm] : 11.02 (s, 1H, OH, (8)); 6.42 (d, 1H, J = 2.2 Hz, (5)); 6.30 (d, 1H, J = 2.2 Hz, (7)); 6.30 (s, 1H, (4)); 3.59 (s, 2H, (1')); 2.29 (s, 3H, (3')).

SM (EI, 70 eV) m/z : 234 (M⁺, 6 %); 192 (M - CH₂CO, 20 %); 164 (192 - CO, 5 %); 122 (10 %); 105 (13 %); 44 (100 %).

UV λ/nm : 243 (max); 277 (épaulement); 289 (épaulement); 326.

Les déplacements chimiques des protons aromatiques en C(7) et C(5) ainsi que le proton oléfinique en C(4) correspondent à ceux de l'analogue réduit (14). Le méthylène (1') donne lieu à un singulet à 3.59 ppm, tout comme le méthyle (3') à 2.29 ppm. Le déplacement chimique de ce dernier est comparable à la valeur obtenue pour le groupement méthyle C(5') de la citreoisocoumarine (17) mesuré à 2.27 ppm dans le méthanol-d₄ (paragraphe 2.6.2.11).

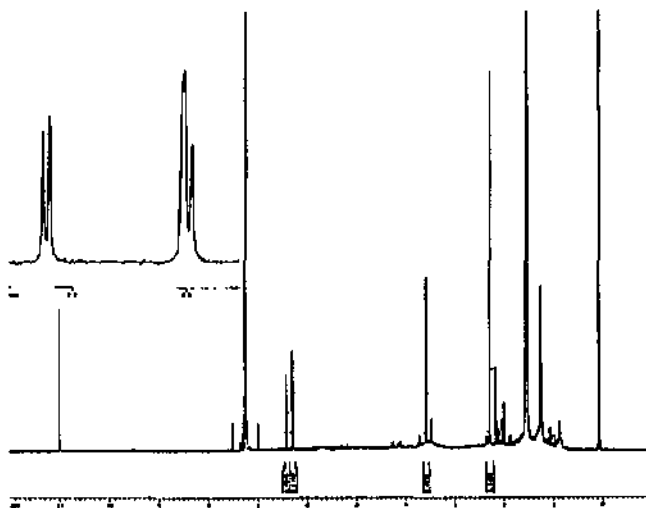


Figure 2.21.1 : spectre ^1H -RMN de l'isocoumarine (15).

Le spectre de masse en mode EI présente un ion moléculaire à $m/z = 234$. On observe un ion important (20 %) à $m/z = 192$ correspondant à la perte d'une molécule acétène ($M - 42, \text{CH}_2\text{CO}$). Une perte de CO sur l'ion $m/z = 192$ conduit au fragment $m/z = 164$ (schéma 2.3). D'une manière générale, la fragmentation de 15 est proche de celles d'autres isocoumarines, telles que l'orthosporine (14) ou la 3-méthylisocoumarine (16).

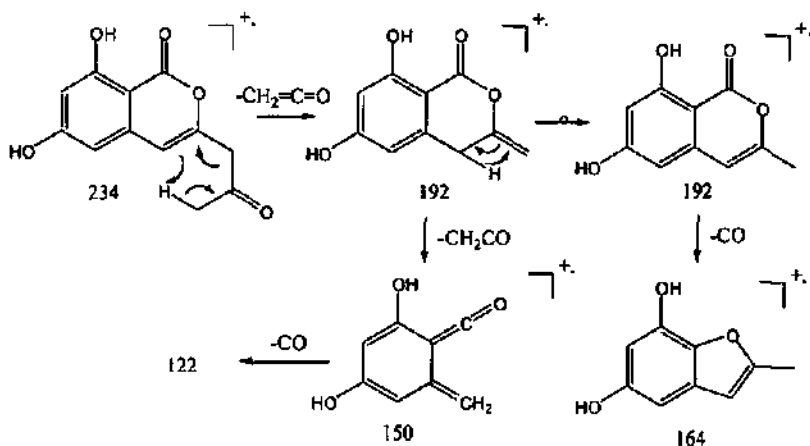


Schéma 2.3 : fragmentation de masse de l'isocoumarine 15 [95].

Scan: 65
Base: m/z 44; 12.9KFS TIC: 1174470

R.T.: 9.90

Area: 1470

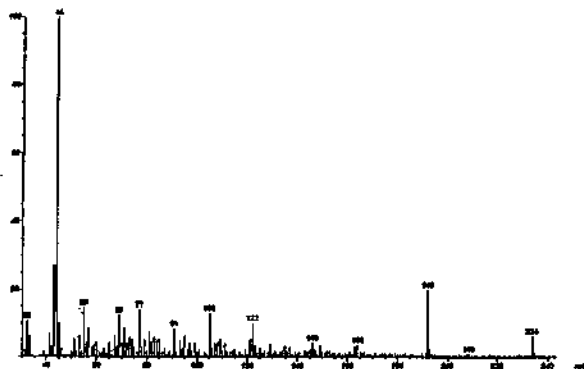


Figure 2.21.2 : spectre de masse EI de l'isocoumarine (15).

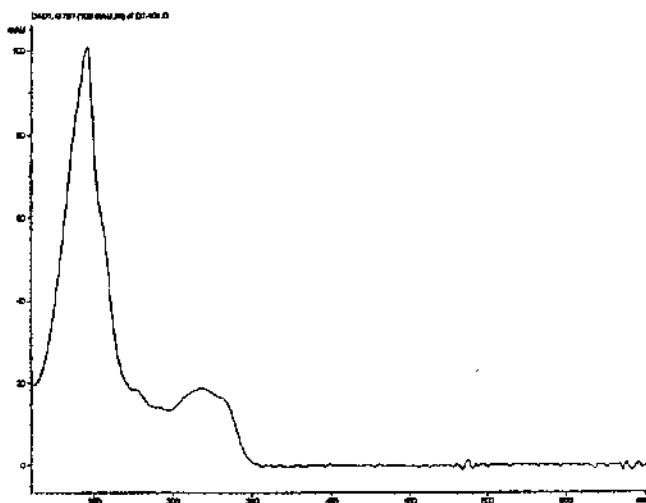


Figure 2.21.3 : spectre UV/VIS de l'isocoumarine (15).

2.6.2.10 6,8-Dihydroxy-3-méthylisocoumarine (16)

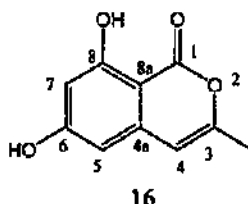


Figure 2.22 : structure de l'isocoumarine (16).

Cette isocoumarine a été isolée pour la première fois d'une culture de *Ceratocystis minor*, un champignon pathogène du pin [93]. Elle existe également dans *Ceratocystis ips* [98] et *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea* [75-77].

Analyse :

Formule brute : $C_{10}H_8O_4$

Poids moléculaire : 192

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 12.0 minutes

Quantité isolée : < 1 mg pour 40 litres de milieu de culture

1H -RMN : (400 MHz, $CDCl_3$) voir tableau 2.19. (400 MHz., acétone- d_6) : δ_H [ppm] : 6.34 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, (7) ou (5)); 6.34 (s, 1H, (4)); 6.33 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, (5) ou (7)); 2.21 (d, 3H, $J = 0.9$ Hz Me-C(3)).

SM (EI, 70 eV) m/z : 192 (M^+ , 26 %); 177 ($M - Me$, 13 %); 121 (8 %), 44 (12 %), 31 (100 %).

UV λ/nm : 242 (max); 276 (épaulement); 288 (épaulement); 326.

Tableau 2.19 : comparaison des données spectroscopiques (^1H -RMN) de 16 avec nos résultats.

	^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , [ppm]) [76]	^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , [ppm])
8	11.13 (s, OH)	11.12 (s, OH)
5	6.38 (d, $J = 2.1$ Hz)	6.38 (d, $J = 2.0$ Hz)
7	6.24 (d, $J = 2.2$ Hz)	6.24 (d, $J = 1.9$ Hz)
4	6.16 (s)	6.16 (s)
3-Me	2.25 (d, $J = 0.9$ Hz)	2.25 (s)

Le spectre ^1H -RMN dans CDCl_3 correspondent bien avec les références de la littérature [76], de même que la fragmentation de masse.

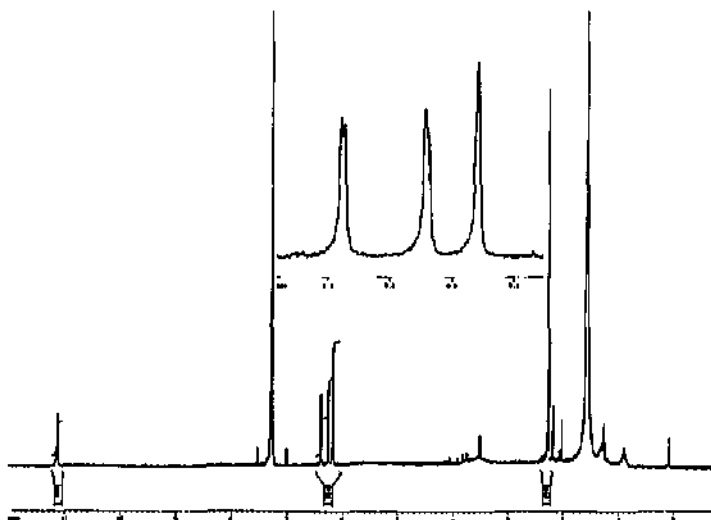


Figure 2.22.1 : spectre ^1H -RMN de l'isocoumarine (16).

Scan: 44
Base: 10/31; 20.7MPS TIC: 118386

R.T.: 2.11

Chan: 1470

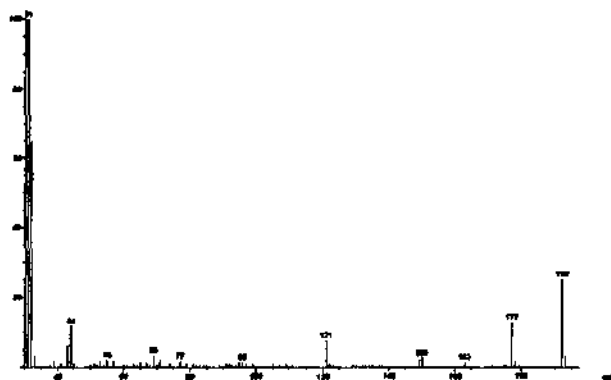


Figure 2.22.1 : spectre de masse EI de l'isocoumarine (16).

2.6.2.11 Citreoisocoumarine (17) (3-(2-hydroxy-4-oxopentyl)-6,8-dihydroxyisocoumarine)

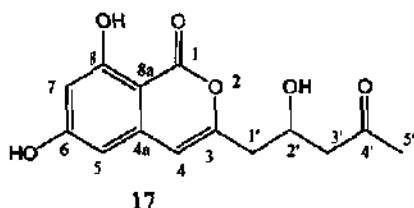


Figure 2.23 : structure de la citreoisocoumarine (17).

L'énantiomère de configuration S en position 2' de cette isocoumarine, a été isolé par *Lai et al.* [97] du mycélium du champignon *Penicillium citreoviride* B. (IFO 4692), par addition de bromure de sodium. L'énantiomère de configuration R en position 2', a quant à lui, été produit par un gène (*wA*) cloné de *Aspergillus nidulans* exprimé via le champignon *A. oryzae* [99]. Ce résultat confirme que le gène en question contient le code génétique d'un enzyme de type heptaketide synthase.

Analyse :

Formule brute : $C_{14}H_{14}O_5$

Poids moléculaire : 278

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 6.5 minutes

Quantité isolée : < 1 mg pour 40 litres de milieu de culture

¹H-RMN : voir tableau 2.20.

SM (EI, 70 eV) m/z : 260 ($M^+ - H_2O$, 8 %); 218 (21 %); 192 ($M - CH_3COCH_2CHO$, 35 %); 177 (15 %); 150 (11 %); 121 (12 %), 69 (22 %), 43 (100 %).

SM (DCI, NH_3 , +) m/z : 296 ($M^+ + NH_4^+$, 14 %); 279 ($M^+ + 1$, 30 %) 261 ($M^+ + 1 - H_2O$, 13 %); 219 (12 %); 193 (16 %); 108 (20 %), 78 (44 %), 61 (100 %).

UV λ/nm : 242 (max); 276 (épaulement); 288 (épaulement); 325.

Tableau 2.20 : comparaison des données spectroscopiques ($^1\text{H-RMN}$) de 17 avec nos résultats.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, méthanol- d_4 , [ppm]) [97]		$^1\text{H-RMN}$ (400.136 MHz, méthanol- d_4 , [ppm])	
7 ou 5	6.39 (d, $J = 2.2$ Hz)	4	6.45 (s)
4	6.33 (s)	7 ou 5	6.37 (d, $J = 2.1$ Hz)
5 ou 7	6.32 (d, $J = 2.2$ Hz)	5 ou 7	6.36 (d, $J = 2.2$ Hz)
2'	4.47 (m)		4.54 (m, ABX)
3'	2.71 (d, $J = 6.3$ Hz)		2.79 (d, $J = 6.3$ Hz)
1'	2.67 (d, $J = 6.3$ Hz)		2.76 (ABX, $J_{AB} = 14.5$ Hz, $J_{AX} = 6.2$ Hz)
			2.69 (ABX, $J_{AB} = 14.5$ Hz, $J_{BX} = 6.7$ Hz)
5'	2.23 (s)		2.27 (s)

Comme pour l'orthosporine (14), on observe un système ABX entre le méthylène en C(1') et le proton situé en C(2') de la chaîne 2'-hydroxypropyle fixée en C(3). A noter que le méthylène en C(3') se présente sous la forme d'un doublet à 2.79 ($J = 6.3$ Hz). La présence d'un système ABX peut s'expliquer par la faible mobilité du groupement méthylène en C(1') dû à la chélation de groupe hydroxyle en C(2') avec l'oxygène en position 2.

La multiplicité et les déplacements chimiques des protons aromatiques en C(5) et C(7) et du proton oléfinique en C(4) observés dans le spectre $^1\text{H-RMN}$ ne correspond pas à la description de *Lai et al.* [97]. Nos résultats indiquent que les protons aromatiques, présentant un couplage en méta de 2.2 Hz, apparaissent à 6.37 et 6.36 ppm avec un effet de toit très prononcé, tandis que le proton oléfinique en C(4), plus déblindé, se situe à 6.45 ppm. *Lai et al.* [97] identifient les protons aromatiques à 6.39 et 6.32 ppm et le proton oléfinique à 6.33 ppm.

Les données spectroscopiques, publiées pour le 2'(R)-citreoisocoumarine, par *Watanabe et al.* [99] vont dans le sens de nos résultats. Le singulet du proton oléfinique est identifié à 6.53 ppm et les deux doublets aromatiques à 6.49 et 6.45 ppm. Il est à noter que le solvant utilisé dans ce cas est l'acétone- d_6 et non le méthanol- d_4 . Le spectromètre utilisé a une fréquence de 500.00 MHz [99].

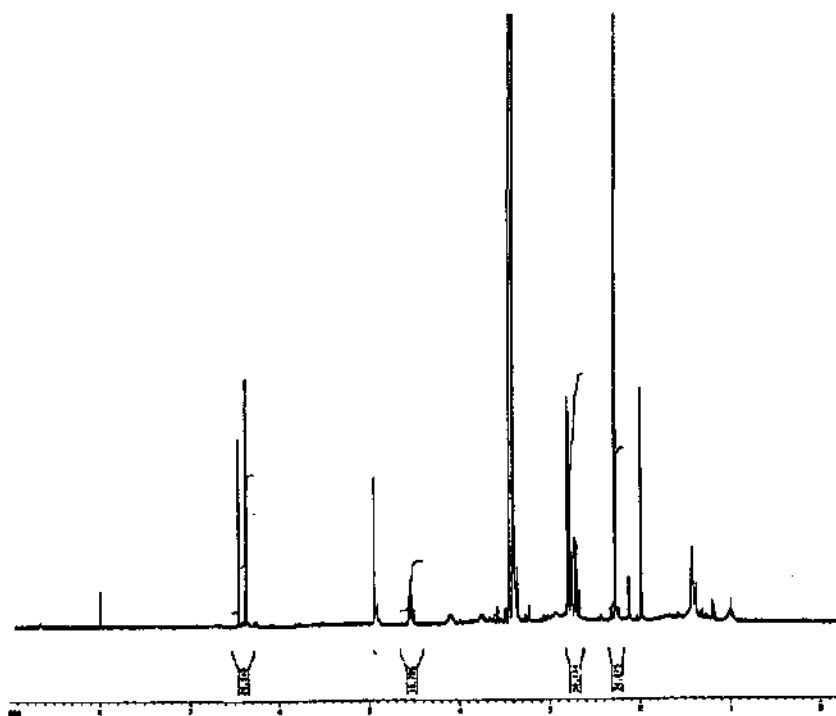


Figure 2.23.1 : spectre ^1H -RMN de la citreoisocouramine (17).

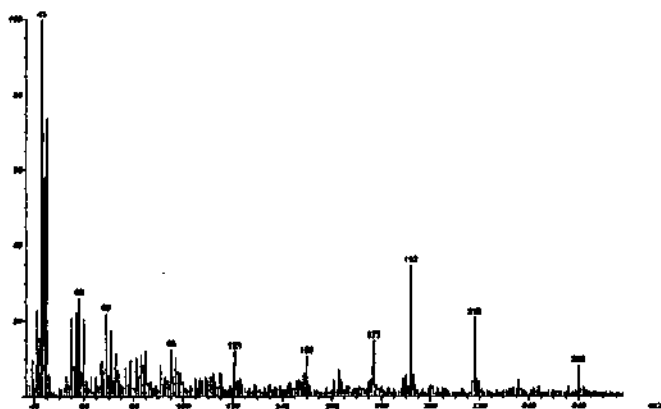
Spectrométrie de masse

Le spectre de masse en mode d'ionisation électronique (EI) ne présente pas le pic moléculaire. L'ion de m/z le plus élevé est à $m/z = 260$ et correspond à une perte d'eau. Un pic important se situe à $m/z = 192$ ($M - 86$), il correspond à la perte du fragment $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CHO}$. La confirmation du poids moléculaire est apportée par le spectre de masse en mode DCI ($\text{NH}_3, +$) avec un pic important à $m/z = 279$ ($M + 1$). Les fragments principaux du spectre EI présenté par *Lai et al.* [97] concordent bien avec nos résultats.

Scan: 66
Base: m/z 43; 39%FS TIC: 488637

R.T.: 2:53

Norm: 1470



CHAPITRE III

SYNTHESES

3.1 Introduction

Dans ce travail, il n'a pas été procédé à la synthèse des métabolites isolés dans les deux souches fongiques analysées. Par contre, les réactions parasites survenues lors des extractions et conduisant à des artefacts ont été examinées.

Ainsi, des dérivés de la leptosphaerodione (1), obtenus suite à l'utilisation d'acétone et d'acétone- d_6 , en vue de former le dérivé *ortho*-dihydroquinone (2) ont été réalisés. Par ce biais, la grande réactivité à l'endroit de l'acétone et la structure *ortho*-quinoïque ont pu être confirmés.

Par ailleurs, considérant que les dérivés 1-méthoxy- (3) et 1-éthoxy-leptosphaerodione (4) sont probablement des artefacts, il a été procédé à la synthèse de 3 par oxydation de la leptosphaerodione (1). Cette hypothèse permet de postuler l'existence, par analogie avec des exemples de la littérature [100-103], de la 1-hydroxyleptosphaerodione ou leptosphaerodione lactol (20) en milieu naturel.

Il est à relever que cinq composés isolés dans ce travail ont déjà fait l'objet de recherches concernant leur synthèse. Il s'agit de la vernénone (5) [104, 105], de l'acide coriolique (9) [88, 106] de la scytalone (11) [105-109], de l'orthosporine (14) [96] et de la 6,8-dihydroxy-3-méthylisocoumarine (16) [110].

3.2 Schémas réactionnels

3.2.1 Synthèse du dérivé quinoxaline (18) de la leptosphaerodione (1)

Afin de confirmer la structure de type *ortho*-quinoïque de la leptosphaerodione (1), on procède à la synthèse de son dérivé quinoxaline (18), par réaction avec l'1,2-phénylènediamine, dans le méthanol et en présence de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ [111, 73].

Le solide orange obtenu est caractérisé par ^1H -RMN. Les signaux de la partie modifiée sont attribués par comparaison avec les données spectroscopiques du dérivé quinoxaline de l'obionine A [73].

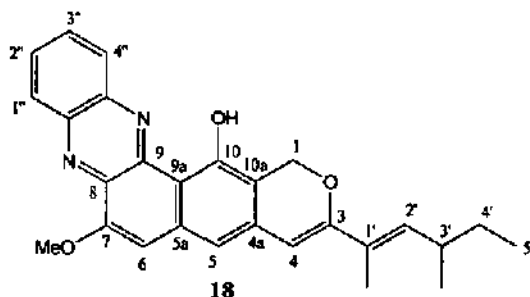


Figure 3.1 : structure du dérivé quinoxaline de la leptosphaerodione (18).

Analyse :

Formule brute : $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$

Poids moléculaire : 426

$^1\text{H-RMN}$: (400.138 MHz, CDCl_3) δ_{H} [ppm] : 14.46 (s, OH(10)); 8.47 (d, 1H, $J_{4,3'} = 7.50$ Hz, (4'')); 8.20 (dd, 1H, $J_{1,2'} = 8.3$ Hz, $J_{1,3'} = 1.5$ Hz, (1'')); 7.89 (m, 2H, (2'') et (3'')); 7.12 (s, 1H, (6)); 6.98 (s, 1H, (5)); 6.16 (large dd, 1H, $J = 9.8$ Hz et 1.2 Hz, (2'')); 6.06 (s, 1H, (4)); 5.50, 5.47 (AB, 2H, $J_{\text{AB}} = 13.3$ Hz, (1)); 4.21 (s, 3H, MeO); 2.45 (m, 1H, (3'')); 1.93 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz, Me-C(1'')); 1.30-1.42 (m, 2H, (4'')); 1.04 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, Me-C(3'')); 0.89 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, (5')).

SM (EI, 70 eV) m/z : 426 (M^+ , 14 %); 411 ($\text{M}^+ - \text{Me}$, 5 %); 397 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_5$, 4 %); 357 (8 %); 329 ($\text{M}^+ - \text{C}_7\text{H}_{13}$, 4 %); 207 (22 %); 98 (16 %); 83 (17 %); 69 (25 %); 55 (32 %); 44 (100 %).

D'une façon générale on observe un déblindage des signaux par rapport à la leptosphaerodione (1). Cet effet est plus prononcé pour la partie de la molécule où la réaction se produit. Les déplacements chimiques des protons de la chaîne alkylée n'ont pratiquement pas varié, tandis que par exemple le proton en position C(6) subit un déblindage de l'ordre de 0.8 ppm. La variation la plus grande est observée pour le groupe hydroxyle fixé en C(10) qui apparaît à 14.82 ppm, soit un déblindage de plus de 2 ppm par rapport à la leptosphaerodione (1). Cet effet est dû au remplacement d'un oxygène par un azote sur le carbone C(9).

Les déplacements chimiques des protons du cycle aromatique issu de la formation du dérivé quinoxaline correspondent assez bien aux résultats rapportés pour le dérivé de l'obionine A [73]. Tous les couplages ne sont toutefois pas décelables. Par exemple, les protons en position C(2'') et C(3'') ont pratiquement le même déplacement chimique et forment un multiplet non analysable au lieu de ddd comme le relatent Poch et Gloer [73]. Les couplages $J_{1,2'} = 8.3$ Hz, $J_{4,3'} = 7.5$ Hz et $J_{1,3'} = 1.5$ Hz sont tout de même mesurables.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse en mode EI présente un pic moléculaire à $m/z = 426$ qui confirme la formule brute $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$.

Scan: 140
Base: m/z 44, 8KPS TIC: 618890

RT.: 16.00

Mass: 870

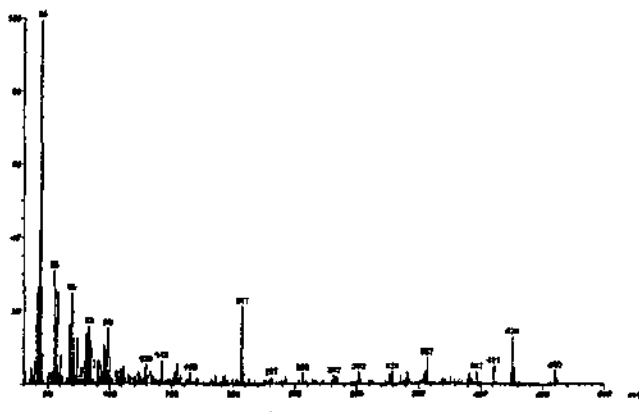


Figure 3.1.2 : spectre de masse EI du dérivé quinoxaline (18).

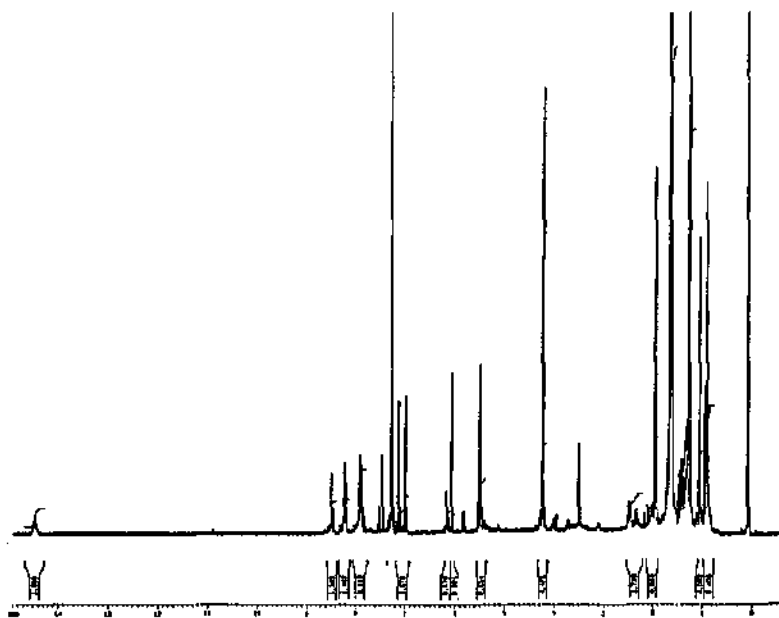


Figure 3.1.1 : spectre ^1H -RMN du dérivé quinoxaline (18).

3.2.2 Synthèse de l'*ortho*-dihydroquinone (2)

L'*ortho*-dihydroquinone (2), également identifiée par *Guerrero et al.* [70], se trouve être un dérivé de la leptosphaerodione (1), obtenu par simple addition d'acétone au groupe carbonyle en C(8). Il ne s'agit donc pas d'un produit naturel mais d'un dérivé synthétique formé suite à l'utilisation d'acétone dans le processus de purification de 1 et notamment la solubilisation des extraits.

Cette affirmation est vérifiée par HPLC (RP18) en comparant le chromatogramme d'un extrait brut à l'AcOEt avec le chromatogramme d'une fraction contenant 2 (figure 3.2). L'absence de 2 dans l'extrait brut confirme l'origine non naturelle de cette substance. La prohibition d'acétone dans le traitement des nombreux extraits réalisés après la découverte de cette réaction parasite, permet logiquement d'éviter totalement l'apparition de 2.

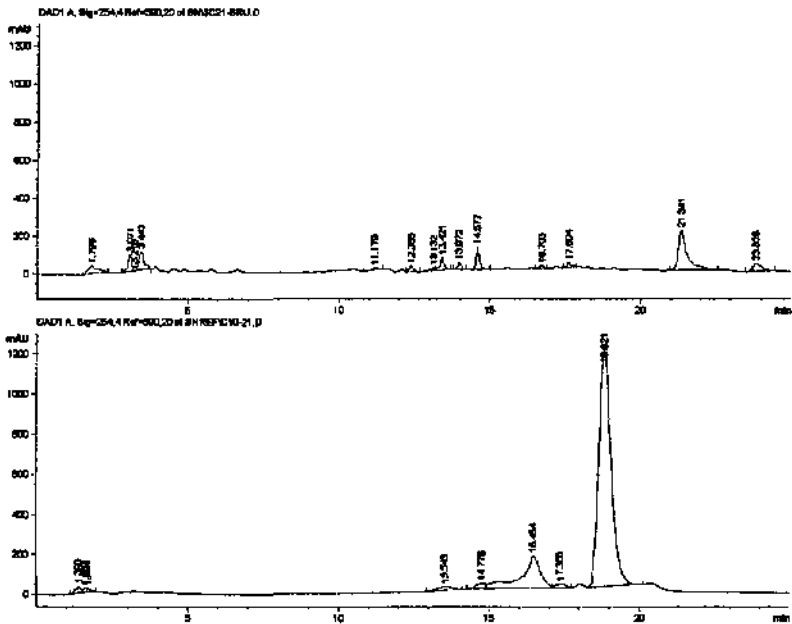


Figure 3.2: chromatogramme HPLC (en haut : extrait brut d'une culture de LA39 en milieu PDB, en bas : chromatogramme de l'*o*-dihydroquinone (2); programme standard).

L'hypothèse d'une réaction parasite est en outre confirmée par la synthèse de **2** à partir de la leptosphaerodione (**1**) par simple adjonction d'acétone. Après quelques jours de réaction, on remarque la transformation complète de **1** en **2**. Une suivie par CCM et par HPLC de cette réaction montre la dégradation progressive de **1** en **2** en 14 jours.

3.2.3 Synthèse de l'*ortho*-dihydroquinone deutérée (**19**)

Une dernière preuve de la réaction de la leptosphaerodione (**1**) avec l'acétone est obtenue par la synthèse de l'analogue deutéré de l'*o*-dihydroquinone (**19**) par l'utilisation d'acétone- d_6 . Pour cela, quelques milligrammes de **1** additionnés de quelques millilitres d'acétone deutérée sont laissés sous agitation, à température ambiante. Après un mois, la réaction n'est pas totale, mais la purification du mélange réactionnel par HPLC (acétonitrile et eau, colonne analytique RP18) permet tout de même d'obtenir suffisamment de dérivé deutéré pour procéder à un spectre $^1\text{H-RMN}$.

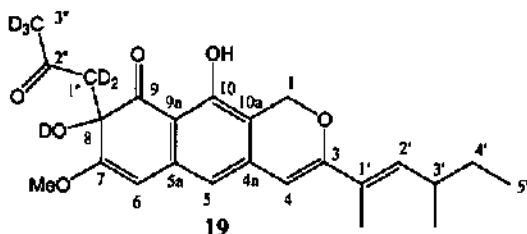


Figure 3.3 : structure du dérivé deutéré de l'*o*-dihydroquinone (**19**).

Analyse :

Formule brute : $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{D}_6\text{O}_6$

Poids moléculaire : 418

Temps de rétention (HPLC, programme standard) : 18.8 minutes

$^1\text{H-RMN}$: Voir tableau 3.1

Tableau 3.1 : comparaison des données spectroscopiques (¹H-RMN) de **2** avec son analogue deutéré (**19**).

	¹ H-RMN (300 MHz, CDCl ₃ , [ppm]) 19	¹ H-RMN (400.138 MHz, CDCl ₃ , [ppm]) 2
10	11.99 (s, OH)	11.99 (s, OH)
5	6.31 (s)	6.31 (s)
2'	6.15 (large d, J = 10.9 Hz)	6.15 (large dd, J = 9.9 et 1.1 Hz)
4	5.84 (s)	5.84 (s)
6	5.61 (s)	5.62 (s)
1	5.21, 5.13 (AB, J _{AB} = 13.1 Hz) <i>5.19, 5.16 (AB, J_{AB} = 13.1 Hz)^a</i>	5.21, 5.13 (AB, J _{AB} = 13.2 Hz) <i>5.18, 5.16 (AB, J_{AB} = 13.2 Hz)^a</i>
-	3.77 (s, OMe)	3.77 (s, OMe)
1"		3.105 (s) <i>3.101(s)</i>
3'	2.43 (m)	2.42 (m)
3"		2.18 (s)
Me-C(1')	1.86 (d, J = 1.2 Hz)	1.86 (d, J = 1.1 Hz)
4'	1.28-1.43 (m)	1.28-1.48 (m)
Me-C(3')	1.010 (d, J = 6.6 Hz) <i>1.006 (d, J = 6.6 Hz)</i>	1.010 (d, J = 6.6 Hz) <i>1.006 (d, J = 6.6 Hz)</i>
5'	0.865 (t, J = 7.5 Hz) <i>0.862 (t, J = 7.3 Hz)</i>	0.866 (t, J = 7.4 Hz) <i>0.863 (t, J = 7.3 Hz)</i>

a) En italique, valeurs des déplacements chimiques pour le second diastéréoisomère.

On remarque que les déplacements chimiques sont identiques à ceux observés pour l'*o*-dihydroquinone (**2**). Toutefois, les signaux correspondant aux groupes méthylène en C(1'') et méthyle en C(3'') ont logiquement disparu. On obtient à nouveau les deux diastéréoisomères.

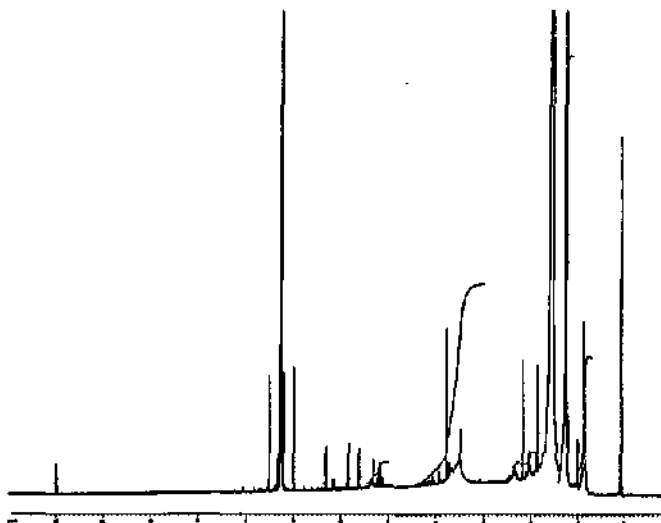


Figure 3.3.1 : spectre ^1H -RMN du dérivé deutéré de l'*o*-dihydroquinone (19).

3.2.4 Synthèse de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3)

Plusieurs réactions de condensation de méthanol ou d'éthanol avec des composés voisins de la leptosphaerodione (1) mais hydroxylés en position 1 sont décrites dans la littérature [100-103]. Un exemple est la réaction de l'anhydrofusarubine lactol avec le méthanol lors de sa purification par chromatographie sur couche mince [100] ou lors d'ajout de méthanol en milieu acide [101] (schéma 3.1).

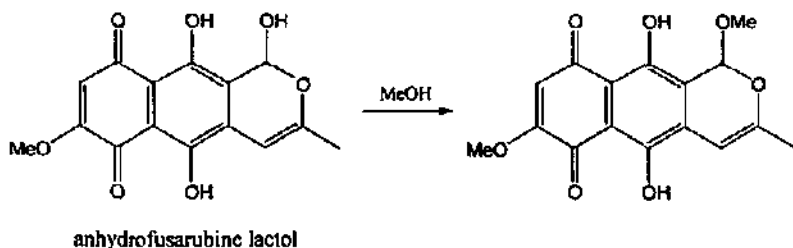


Schéma 3.1 : réaction de l'anhydrofusarubine lactol avec le méthanol pour donner le méthylacétal [100, 101].

Le même type de réaction est observé avec la fasciculiferine qui réagit avec de l'éthanol au cours de la procédure de purification par chromatographie préparative sur papier [102, 103]. Dans ce cas, les auteurs expliquent la réaction par la formation d'un ion oxonium stable, du fait de l'acidité du papier chromatographique (schéma 3.2).

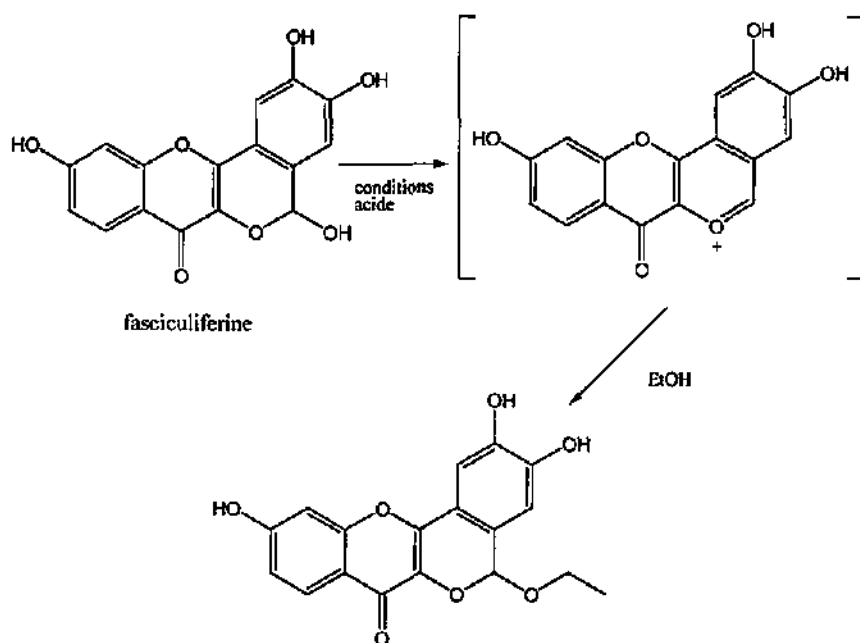


Schéma 3.2 : réaction de la fasciculiferine avec l'éthanol sous conditions acides [102].

Aucune référence de la littérature, à notre connaissance, ne décrit la réaction spontanée d'un groupement méthylène avec du méthanol ou de l'éthanol. Un seul exemple mentionne la photolyse oxydative de la pentaméthoxyquercétine dans le méthanol pour donner plusieurs produits dont la 5-méthoxy- β -photométhyl-quercétine, mais avec un très faible rendement (environ 1 %) [112]. Les auteurs ne décrivent toutefois pas le mécanisme de la réaction conduisant à ce dérivé. Ils suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une addition de méthanol sur la β -photométhylquercétine (schéma 3.3).

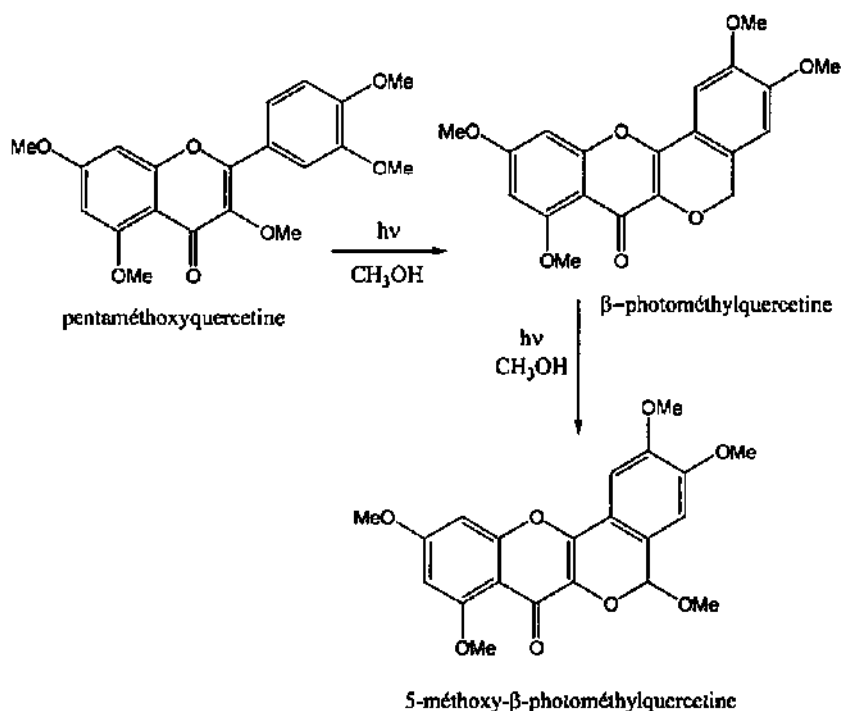


Schéma 3.3 : photolyse oxydative de la pentaméthoxyquercétine pour donner minoritairement la 5-méthoxy- β -photométhylquercétine [111].

Ainsi donc, si l'on part du principe que les deux dérivés 1-méthoxy- (3) et 1-éthoxyleptosphaerodione (4) sont bien des artefacts, cela implique l'existence de la 1-hydroxyleptosphaerodione que l'on peut aussi appeler leptosphaerodione lactol (20). La structure du leptosphaerodione lactol (20) est vérifiée par synthèse, via l'oxydation du groupement méthylène en position 1 à l'aide de dichloro-dicyanobenzoquinone (DDQ) dans le toluène (schéma 3.4) [102, 113].

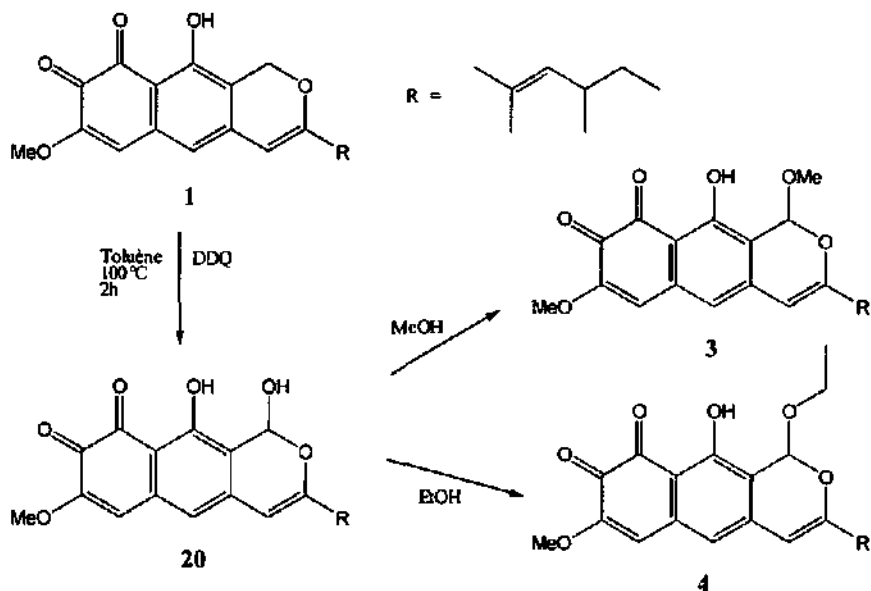


Schéma 3.4 : synthèse du leptosphaerodione lactol (20) et de ses dérivés méthoxy (3) et éthyloxy (4).

Lors d'essais dans le toluène comme seul solvant, il n'a pas été possible d'isoler le leptosphaerodione lactol (20). On obtient un mélange complexe de produits. Toutefois, l'ajout initial de méthanol dans le milieu réactionnel permet d'obtenir directement la 1-méthoxyleptosphaerodione (3). La présence de 3 est confirmée par le chromatogramme HPLC du mélange réactionnel (figure 3.4).

On remarque cependant, dans le mélange réactionnel de la synthèse, la présence de deux dérivés de la leptosphaerodione (1). Il s'agit vraisemblablement, de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3) et de la 1-éthoxyleptosphaerodione (4). Cette présomption est confirmée par la concordance des temps de rétentions ainsi que par les spectres UV (figure 3.5). Cette observation implique la présence vraisemblable d'éthanol dans le mélange réactionnel.

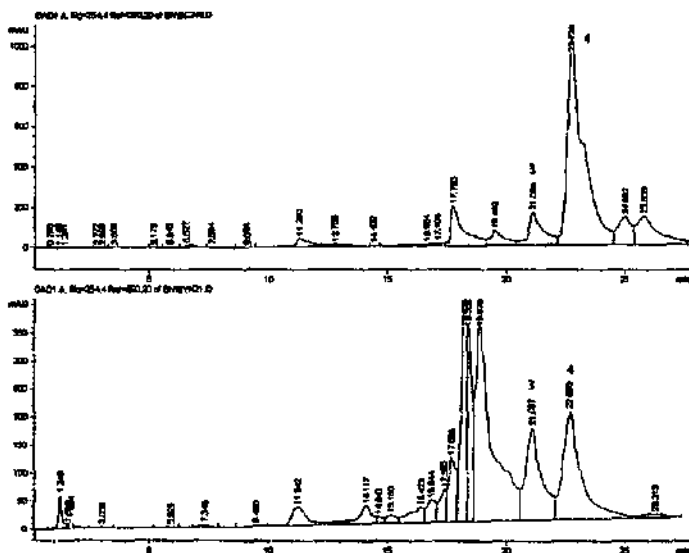


Figure 3.4 : chromatogrammes d'une fraction contenant 3 et 4, isolée de la souche LA39 (en haut) et du mélange réactionnel de la synthèse de 3 à partir de 1 (en bas). Temps de rétention de 3 : 21.1 minutes et de 4 : 22.8 minutes.

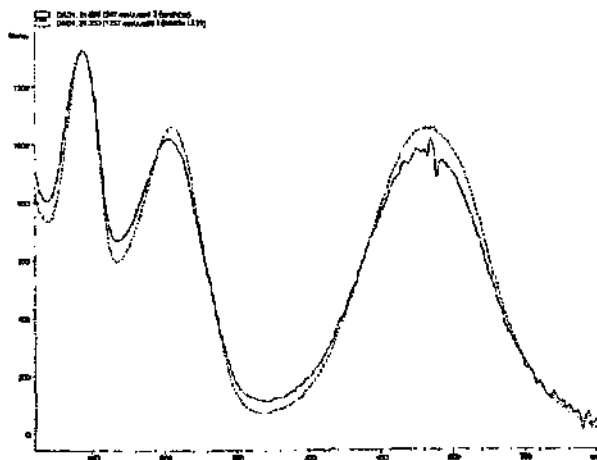


Figure 3.5 : comparaison des spectres UV/VIS de 3 issus de l'extraction d'une culture de la souche LA39 et synthétisé à partir de 1.

CHAPITRE IV

MILIEUX DE CULTURE

4.1 Types de milieux

Dans ce travail, trois milieux de cultures ont été testés (figure 4.1). Une croissance satisfaisante du champignon n'a toutefois été obtenue que pour seulement deux d'entre eux. Il s'agit du milieu PDB dans lequel la majorité des cultures ont été réalisées, et d'autre part de celui modifié de *Richard* ou milieu V8 [114], testé en fin de travail, dans le but d'évaluer l'influence du milieu de culture sur la composition de l'extrait brut. Le troisième milieu, dit de *Kent & Ströbel* [115], a également été testé mais la croissance du champignon n'y était pas assez importante pour permettre l'obtention de suffisamment d'extrait brut (< 100 mg pour 10 litres de milieu liquide).

Milieu PDB (Potato Dextrose Broth, Difco, USA)

120 g	PDB
5 l	Eau désionisée

Milieu V8 (Campbell Grocery, Norfolk, England) [114]

500 ml	V8
15 g	CaCO ₃
4.5 l	Eau désionisée

Milieu Kent & Ströbel [115]

25 g	Saccharose
15 g	Asparagine
2.5 g	KH ₂ PO ₄
1.0 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
0.5 g	NaCl
5 l	Eau désionisée

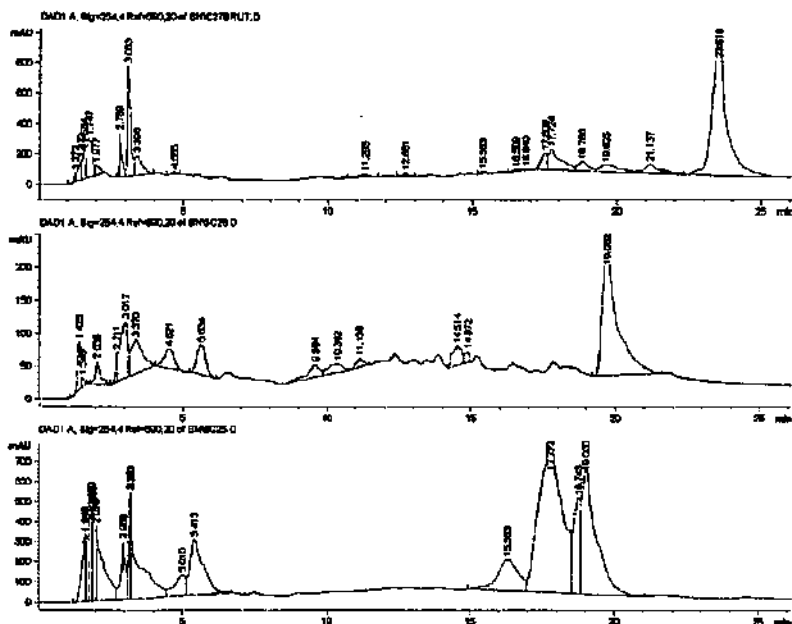


Figure 4.1 : chromatogrammes des extraits bruts de la souche LA39 dans les trois milieux de cultures (en haut : PDB, au milieu : V8, en bas : Kent & Ströbel, programme standard).

Tous les métabolites isolés, à une exception près, l'ont été à partir de cultures effectuées dans le milieu PDB. L'elsinochrome A (6) a quant à lui été obtenu à partir d'une culture en milieu V8.

Dans le cas de la souche LA 39, on remarque la présence majoritaire d'un composé, dans chacun des deux milieux PDB et V8. Il s'agit de la leptosphaerodione (1) pour le milieu PDB et de l'elsinochrome A (6) pour le milieu V8.

Pour la souche 214 Ca, seul des cultures en milieu PDB ont été réalisées. Là aussi on trouve un composé majoritaire, la cercosporine (7) (voir figure 2.3).

4.2 Culture en milieu V8

La culture de la souche LA39 en milieu V8 permet d'observer les variations de contenu des extraits bruts en fonction du milieu de culture utilisé.

Dans cette situation, le champignon se développe différemment. L'aspect du mycélium n'est pas le même. Il ne se présente pas sous la forme de boules brunes comme dans le milieu PDB (voir paragraphe 5.2) mais sous forme d'agglomérats verts-bruns. La quantité de mycélium est aussi plus faible. Le milieu liquide, fortement colorés (brun-rouge) dans le cas du PDB, n'est cette fois que faiblement coloré : il est jaune-brun. L'extraction à l'acétate d'éthyle des phases aqueuses conduit à l'obtention d'une faible quantité d'extrait brut, environ 100 mg pour 10 litres contre 150-450 mg pour le milieu PDB. L'extrait est faiblement coloré en milieu V8 contrairement au rouge-orange de l'extrait issu du milieu PDB.

L'analyse par HPLC de cet extrait brut permet de distinguer un produit majoritaire rouge intense possédant un spectre UV proche de la cercosporine (7) (figure 4.2). On remarque aussi l'absence de leptosphaerodione (1). Parallèlement, l'analyse de l'extrait brut du mycélium nous permet d'observer le même composé, mais dans des quantités largement plus importantes. La comparaison des spectres UV/VIS de l'elsinochrome A contenu dans le mycélium et dans l'extrait des phases aqueuses confirme cette identité (figure 4.3). La purification par chromatographie sur colonne, puis par HPLC de l'extrait du mycélium conduit à l'isolement de quantités suffisantes de ce produit pour réaliser une analyse spectroscopique permettant l'identification l'elsinochrome A (6) (voir paragraphe 2.6.1.6).

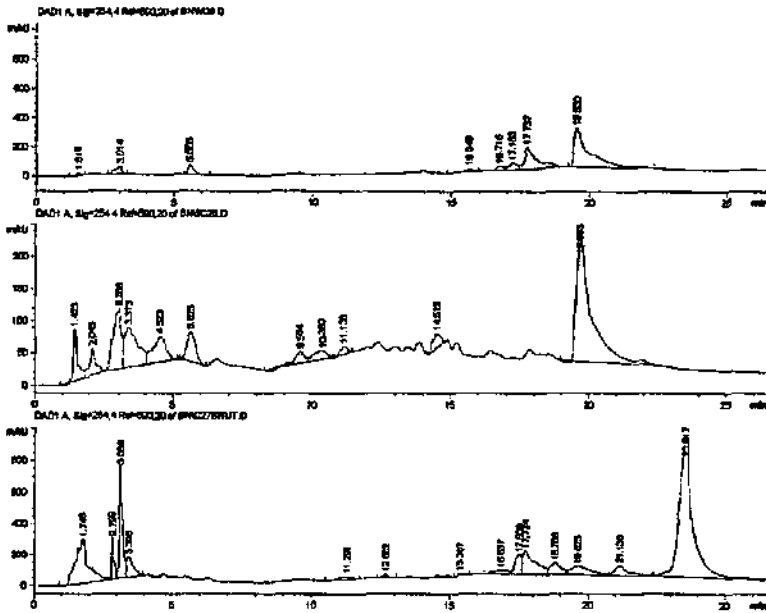


Figure 4.2 : chromatogrammes de la souche LA39 en milieu V8 et PDB (extrait brut du mycélium en milieu V8 (en haut); extrait brut des phases aqueuses en milieu V8 (au milieu); extrait brut des phases aqueuses en milieu PDB (en bas)).

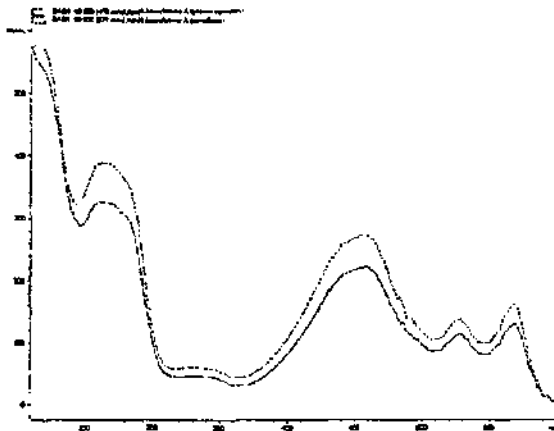


Figure 4.3 : spectres UV/VIS de l'elsinochrome A (6) contenu dans le mycélium (pointillé) et dans un extrait brut des phases aqueuses (trait plein).

L'obtention d'un composé parents de la cercosporine (7) mais produit par la souche LA39 soulève la question de l'influence du milieu nutritif sur la nature et la quantité des métabolites. La composition du milieu de culture n'influence-t-elle pas le rendement et les caractéristiques biologiques du champignon dès lors que d'importantes différences dans la production de métabolites secondaires s'observent, comme le suggère *Morin* [116].

La réponse expérimentale est fournie par *Pfirter* [57], lequel a comparé la pathogénicité des spores de l'isolat LA39 en fonction de trois milieux de culture : PDA (Potato Dextrose Agar), malt sur agar et V8 sur agar. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : effets du milieu de culture sur la pathogénicité des spores de *Stagonospora Convolvuli* (LA39) envers le liseron des champs (*Convolvulus arvensis*) [57].

Milieu de culture	Aire de la surface nécrosée (%)
V8	91.5
Malt	59.2
PDA	27.2

Les spores produites dans le milieu V8 sont plus actives et significativement plus pathogènes que celles produites en milieu PDA ou sur malt alors qu'elles ne sont pas morphologiquement différentes [57].

La culture de la souche LA39 en milieu V8 a été répétée trois fois de manière à tester la reproductibilité de nos résultats. Pour les trois extraits, on observe la présence d'elsinochrome A (6) ainsi que l'absence de leptosphaerodione (1) dans les extraits bruts des phases aqueuses et du mycélium. Ces essais, réalisés au terme de ce travail, n'ont pas permis, faute de temps, l'isolement et l'identification d'autres métabolites produits dans ces conditions. De même, la culture de la souche 214 Ca, en milieu V8, n'a pas été réalisées.

4.3 Etude de la composition chimique de cultures en boîtes de pétri en milieu V8 sur agar

L'analyse de la composition chimique de cultures en boîtes de pétri contenant la souche LA39 du champignon *Stagonospora convolvuli* en milieu V8 sur agar permet de vérifier la production d'elsinochrome A (6).

Pour cela on procède à l'extraction mécanique, au moyen d'acétate d'éthyle, du contenu de 5 boîtes de pétri. L'extrait brut est ensuite examiné par HPLC, en utilisant le programme standard d'analyse (voir paragraphe 9.1.3). Le chromatogramme obtenu, comparé à celui de l'extrait d'une culture de la souche LA39 en milieu V8, révèle la présence d'elsinochrome A (6) en quantités importantes (figure 4.4). Ce fait est également confirmé par la comparaison des spectre UV/VIS (figure 4.5).

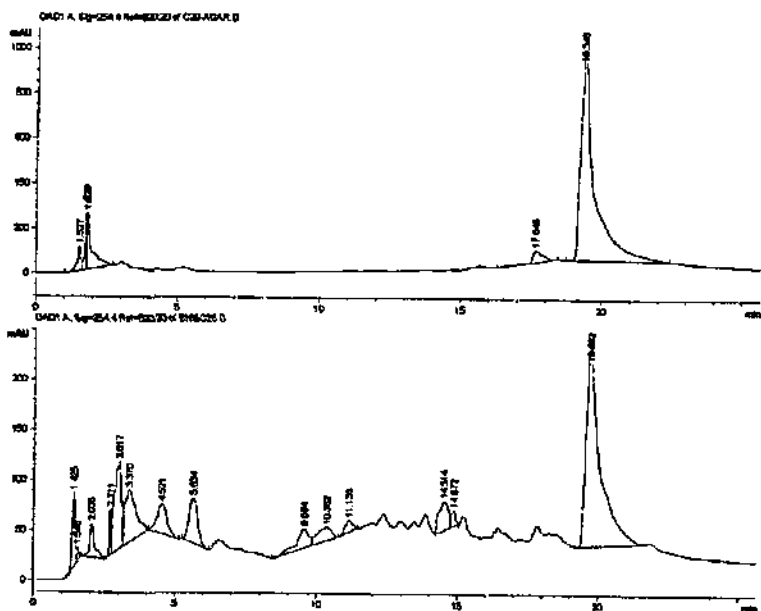


Figure 4.4 : chromatogrammes de l'extrait brut de boîtes de pétri en milieu solide V8 (en haut) et de l'extrait brut d'une culture en milieu liquide V8, de la souche LA39 (en bas).

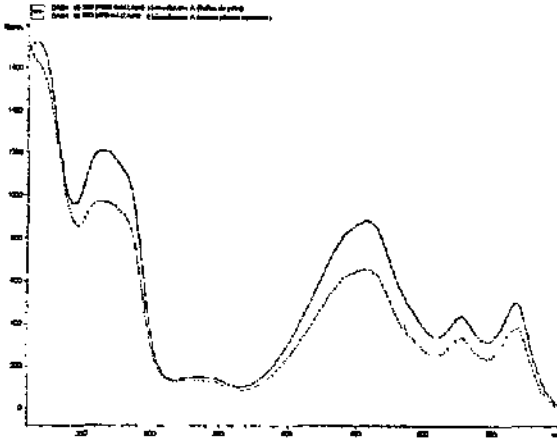


Figure 4.5 : spectres UV/VIS de l'elsinochrome A (6) isolé des boîtes de pétri (trait plein) et d'un extrait brut des phases aqueuses (trait tillé).

Ce résultat confirme aussi les conclusions de *Pfirter* [57] relatives à la pathogénicité accrue du champignon poussant en milieu V8 par rapport au milieu PDA notamment. L'elsinochrome A possède, au même titre que la cercosporine (7), une activité phytotoxique reconnue par ses facultés à générer de l'oxygène singulet (voir chapitre 5.2.1). Il est donc probable qu'il est à l'origine de l'augmentation de l'activité du champignon en milieu V8 par rapport au milieu PDB.

On observe de même qu'une culture de la souche LA39, en milieu PDB mais inoculée à l'aide de boîte de pétri cultivées milieu V8, conduit à la production de leptosphaerodione (1). On peut donc déduire que le champignon s'adapte au milieu nutritif et modifie en conséquence sa production de métabolites secondaires. Il faut toutefois relever que, dans ce cas, un certain retard dans le développement du champignon en milieu liquide se manifeste.

4.4 Localisation de la leptosphaerodione (1) dans les spores

La leptosphaerodione n'étant pas soluble dans l'eau, il est nécessaire qu'elle se trouve sous une autre forme dans le milieu aqueux, ou qu'elle soit protégée, au sein des spores, par exemple. Afin de vérifier cette hypothèse, on filtre deux fois sur papier filtre, puis de nouveau sur célite une partie des phases

aqueuses d'une culture de la souche LA39 en milieu PDB. La majorité des spores est ainsi retenue. Les phases aqueuses filtrées sur célite sont jaunes claires et transparentes contrairement à celles filtrées selon la méthode habituelle qui sont brunes rouges et opaques, en raison de la présence de nombreuses spores.

L'extraction des phases aqueuses obtenues par filtration selon les deux procédés (habituel, papier + célite) ainsi que celle réalisée à partir des spores retenues par les papiers filtres permet d'obtenir trois extraits. Ces derniers sont examinés par HPLC en utilisant le programme standard (figure 4.6).

Les chromatogrammes obtenus montrent l'absence de leptosphaerodione (1) dans les phases aqueuses filtrées sur célite mais sa présence dans les deux autres cas. La comparaison des spectres UV/VIS de la leptosphaerodione issue des spores et de l'extrait brut des phases aqueuses confirme ce résultat (figure 4.7) Ainsi l'hypothèse que la leptosphaerodione existe dans les spores et qu'elle n'est donc pas libre en phase aqueuse, se trouve confirmée.

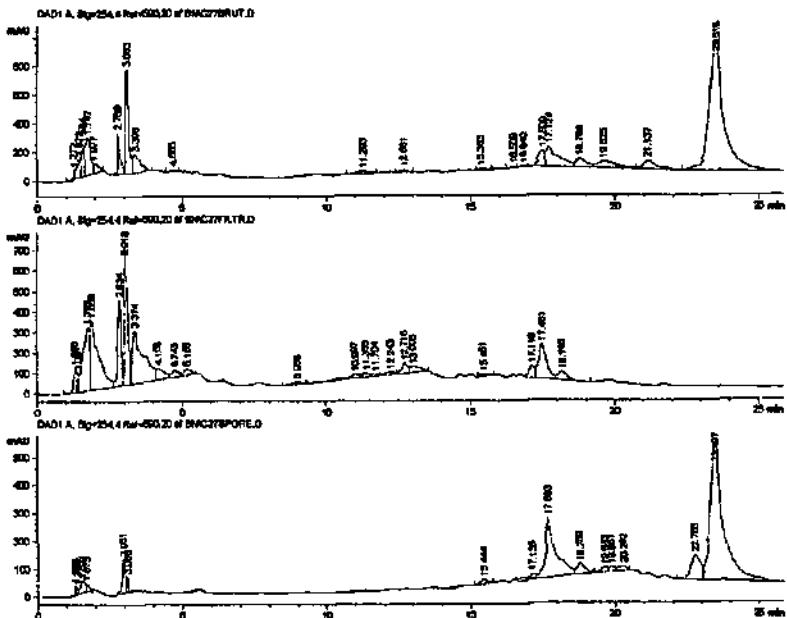


Figure 4.6 : chromatogrammes HPLC des extraits des phases aqueuses filtrées selon la procédure habituelle (en haut), filtrées sur célite (milieu) et des spores (en bas).

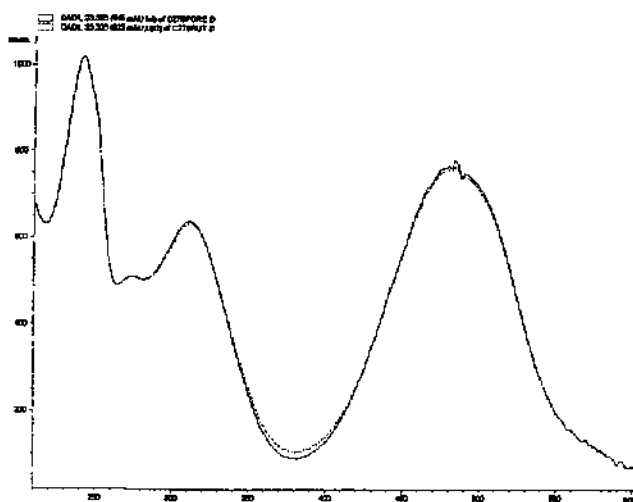


Figure 4.7 : spectres UV/VIS de la leptosphaerodione (1) isolée de spores (trait plein) et d'un extrait brut des phases aqueuses (trait tillé).

Ce type de test n'a pas été mené sur les extraits bruts des souches 214 ca et LA39 en milieu PDB et V8, respectivement. La faible solubilité en milieu aqueux de la cercosporine (7) et de l'elsinochrome A (6) donne à penser que ces métabolites devraient également être localisés dans les spores du champignon.

CHAPITRE V

TESTS BIOLOGIQUES

5.1 Introduction

Après l'isolement et l'identification de divers métabolites des deux souches du champignon *Stagonospora* sp., décrits au chapitre II, il est maintenant important de déterminer leur activité biologique vis-à-vis des liserons et, dans notre cas, tout particulièrement du liseron des champs (*Convolvulus arvensis*). A l'exception de la leptosphaerodione (1), la cercosporine (7) et l'elsinochrome A (6), les quantités isolées des autres métabolites sont trop faibles pour permettre des tests sur le matériel végétal. Par ailleurs, les très faibles concentrations, moins de 1 mg pour 40 litres de milieu de culture, pour la plupart, donne à penser que, sauf effet de synergie, leur action devrait être négligeable dans le comportement du champignon à l'endroit des liserons. Par conséquent, notre travail s'est concentré sur l'étude de l'activité biologique des trois composés majoritaires isolés, à savoir : la leptosphaerodione (1), la cercosporine (7) et l'elsinochrome A (6). Ces deux derniers ont une activité biologique reconnue (voir paragraphe 5.2.1). Les tests biologiques réalisés à partir de ces trois molécules permettent d'évaluer leur activité envers les liserons et/ou des plantules de tomate.

5.2 Activité biologique connue des métabolites isolés

5.2.1 Composés dérivés du perylène (6, 7, 8)

La production de nombreux composés quinoïques dérivés du perylène (voir paragraphe 7.1.1) par des champignons phytopathogènes conduit à penser que cette classe de substances joue un rôle dans l'action de ceux-ci sur les plantes. La classification des dérivés quinoïques du perylène comme toxines est compliquée par les difficultés à reproduire *in vivo* les symptômes causés par les microorganismes, à partir des composés purifiés [117]. Les produits de cette famille isolés dans ce travail sont l'elsinochrome A (6), la cercosporine (7) et l'isocercosporine (8).

La plupart des éléments de cette famille possèdent une activité photodynamique, c'est-à-dire qu'ils sont capables, en présence de lumière, de transférer à l'oxygène l'énergie de la lumière absorbée pour conduire à la production d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et de superoxyde O_2^- , tous deux très toxiques envers les cellules. Ils induisent la peroxydation des acides gras constituant la membrane cellulaire, mènent à la rupture de celle-ci, puis à la mort de la cellule [118]. Le composé le mieux décrit est la cercosporine (7). Elle possède une activité toxique quasi universelle envers les cellules, a des effets répertoriés sur des souris, des bactéries, des champignons, des plantes et même sur des cultures de cellules tumorales humaines [119].

Une activité biologique similaire est également enregistrée pour plusieurs autres dérivés du perylène, dont l'elsinochrome A (6) [78], le phleichrome (d, voir figure 7.2) [120, 121], l'isocercosporine (8) [122] ou l'hypocrelline A [123].

Des activités antimicrobiales, antifongiques et antivirales sont décrites pour les elsinochromes [78], la cercosporine [119], l'isocercosporine [124] ou le phleichrome [124]. Certains dérivés quinoïques du perylène, et notamment des dérivés de l'hypocrelline B, sont utilisés dans le cadre de photothérapies contre le cancer et permettent des essais précliniques prometteurs [125, 126]. Enfin, l'hypocrelline A, isolée du champignon médicinaux chinois *Hypocrella bambusae*, possède une activité antivirale contre le virus HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus*) humain par irradiation à la lumière [127].

La preuve de l'existence du stypotriol dans le milieu naturel a été réalisée par acétylation de l'extrait brut de l'algue. Seul le dérivé acétylé du stypotriol a pu être isolé, confirmant que la stypoldione est un artefact [130]. S'agissant de la leptosphaerodione (**1**), la même technique appliquée à l'extrait brut de la souche LA39, n'a pas conduit à l'obtention de dérivés identifiables, empêchant de conclure à l'existence d'un dérivé réduit de la leptosphaerodione en milieu naturel.

Un autre composé présentant une fonction *ortho*-quinoïque, Sch 68631 (figure 5.2), isolé du milieu de culture d'un champignon du genre *Sireptomyces* sp., présente une activité inhibitrice dès 2.5 µg/ml, envers une protéinase (NS3) de la classe des serines. Cet enzyme est impliqué dans la réplication du virus de l'hépatite C (HCV) [131]. Le mécanisme d'action de cette molécule reste inconnu et on ne peut donc pas affirmer que la fonction *ortho*-quinoïque joue un rôle clé dans son activité inhibitrice. A noter que des composés *para*-quinoïques tels que la phénicine ou l'antibiotique sakyomicine A sont inactifs vis-à-vis du virus HCV [131].

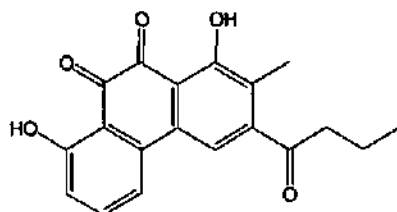


Figure 5.2 : structure de Sch 68631 [131].

La fonction hémicétal du leptosphaerodione lactol (**20**) est, elle aussi, très réactive, à preuve sa réaction spontanée avec le méthanol et l'éthanol, pour donner les dérivés 1-méthoxy- (**3**) et 1-éthoxyleptosphaerodione (**4**), respectivement (voir paragraphes 3.2.3 et 7.1.2.1). Cette molécule pourrait donc posséder une activité biologique. L'impossibilité de l'isoler a empêché la réalisation d'un test.

5.2.3 Naphthalénones (**5**, **10**, **11**, **12**)

Sur les quatre naphthalénones isolées dans ce travail, trois sont connues et bien décrites dans la littérature. La vermelone (**5**) et la scytalone (**11**) sont admises comme des intermédiaires dans la biosynthèse de la mélanine

(voir paragraphe 7.1.3). Un exemple mentionne un faible effet inhibiteur de la scytalone (11) sur la croissance de germes de laitues [132] alors que rien n'est relaté quant à une éventuelle activité de la vermelone (5), si l'on excepte un test positif sur des feuilles de caféier [76].

La littérature mentionne une réduction de la croissance de jeunes plants de riz induit par l'application de la naphthalénone 10 (isolée du champignon pathogène *Pyricularia oryzae*) à haute concentration. Toutefois, à faible concentration (100 ppm) 10 stimule la croissance des mêmes plants [89]. Une étude sur des souches mutantes de *P. oryzae* montre que 10 n'est pas un facteur déterminant dans le processus d'infection induit par le champignon [133]. Cette naphthalénone a également été isolée de fractions toxiques d'un champignon pathogène du peuplier (*Hypoxylon mammatum* (Wahl.) Miller) [134].

A travers ce rappel, on peut admettre que les naphthalénonnes isolées dans ce travail ne jouent vraisemblablement pas un rôle clé, sauf synergies éventuelles, dans le mode d'action du champignon envers les liserons.

5.2.4 Isocoumarines (13, 14, 15, 16, 17)

Les isocoumarines, composés principalement isolés de plantes ou de microorganismes, possèdent des activités biologiques variées [135]. On peut citer des travaux relatant des activités anti-inflammatoires [136], anticoagulantes [137], antimicrobiales [138-141], d'inhibiteurs enzymatiques [142] ou encore antiallergiques (antihistaminique) [139-41].

La plupart des substances constituant la famille des melléines ou 3,4-dihydroisocoumarines possèdent une activité biologique reconnue, [138, 143]. Certains auteurs avancent que plusieurs isocoumarines pourraient développer une activité au travers de leur métabolisation par la plante pour donner les melléines correspondantes [144, 145]. Un exemple est l'isocoumarine 16, isolée du champignon *Ceratocystis fimbriata*, ainsi que la melléine correspondante (3 -méthyl- 6 -méthoxy- 8 -hydroxy- 3,4 -dihydroisocoumarine) isolée de carottes infestées par le même champignon [144].

Les molécules 13 et 14, isolées du champignon *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea*, présentent une activité toxique avec des effets plus marqués pour 13 que 14 envers des feuilles de caféier [75, 76]. Les mêmes composés mais isolés du champignon *Ceratocystis fimbriata* var. *platani*, conduisent aussi à des nécroses plus ou moins importantes sur des feuilles de platanes pour des concentrations 0.5 mg/ml pour 13 et 1.0 mg/ml pour 14 [91].

L'orthosporine (14) a fait l'objet d'autres études que les travaux menés par *Gremaud* [75, 76] et *Burki* [91] sur des champignons pathogènes du caféier et du platane, respectivement. *Hallock et al.* [95] ont observé une toxicité de 14 pour des feuilles de maïs (*Zea mays* L., W64A-N), de digitère (*Digitaria ischaemum* Scherb.) et de soja (*Glycine max* L.) dès l'application de 1 µg (4 nmol) sur les feuilles de ces plantes. Pour d'autres végétaux tels que la pâquerette (*Echinochloa crus-galli* L.) ou l'amarante épineuse (*Amaranthus spinosus* L.), ils n'observent une activité qu'à partir de l'application 2 µg (8 nmol) et 5 µg (21 nmol) respectivement.

Quant au mode d'action des isocoumarines, on peut relever le mécanisme proposé par *Kam et al.* [137] et repris par *Burki* [91] qui explique le pouvoir d'inhibiteurs enzymatiques de ces composés par l'acylation d'une serine de l'enzyme (Ser-195) avec la fonction lactone de l'isocoumarine (schéma 5.1).

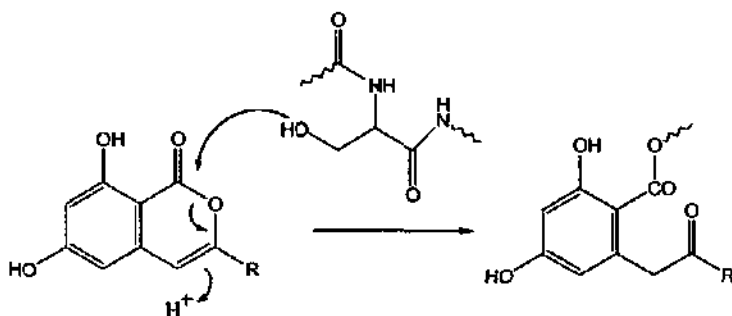


Schéma 5.1 : mécanisme proposé par *Kam et al.* [137] et *Burki* [91] sur le pouvoir d'inhibiteurs enzymatiques des isocoumarines.

Un autre travail mené sur la 6-méthoxymelléine par *Amin et al.* [138] indique que l'activité antimicrobienne de cette molécule est due à son interaction avec les liposomes multilamellaires des membranes cellulaires avec pour effet un dérèglement des fonctions associées à cette dernière.

5.3 Tests biologiques sur feuilles et pousses de liseron

Les tests biologiques préliminaires, effectués avec les extraits bruts et les fractions principales de la souche LA39 (voir paragraphe 2.4), sont répétés au moyen de la cercosporine (7) et de la leptosphaerodione (1) afin de déterminer l'activité de ces molécules sur les liserons et spécialement celui des champs (*Convolvulus arvensis*). Les tests n'ont été menés que sur une seule variété de liseron en raison de la mauvaise croissance en serre du liseron de haies (*Calystegia sepium*).

Pour cela, des solutions aqueuses, de concentrations différentes des deux molécules sont préparées. L'ajout de 2 % d'éthanol facilite la solubilisation. Des solutions aqueuses contenant 2 % d'éthanol servent de références. Des feuilles ainsi que de jeunes pousses de 3-6 cm, fraîchement coupées, de liseron des champs, sont placées dans ces solutions (figure 5.3). Des relevés par observations visuelles sont effectués quotidiennement sur l'état des feuilles et des pousses, cela pendant quatre jours (tableau 5.1). Les échantillons sont placés sous lumière artificielle continue (16h/24h).

Le même test est réalisé sur des plantules de tomates, dans ce cas, l'elsinochrome A (6) est également testé.



Figure 5.3 : test de toxicité sur des pousses de liseron des champs (*C. arvensis*).

Tableau 5.1 : résultats des tests biologiques sur les feuilles et pousses de liseron des champs.

Jour	Cercosporine 7 (0.5 mg/ml)		Cercosporine 7 (1.0 mg/ml)		Leptosphaerodione 1 (< 0.4 mg/ml)		Contrôle (2% EtOH)	
	feuilles	pousses	feuilles	pousses	feuilles	pousses	feuilles	pousses
1	+a	+a	+a	+a	-	-	-	-
2	+b	+b	+b	+b	+a	+a	-	-
3	+c	+++c	+d	+++d	+a	+a	-	-
4	+++e	+++e	+++e	+++e	+a	+a	+f	+f

- : négatif, + : faible effet, ++ : effet modéré, +++ : effet important, ++++ : effet très important

- a Noircissement du bout du pétiole.
- b Pétiole noir, brunissement de la nervure principale des feuilles, nécrose de la tige des pousses.
- c Pétiole nécrosé, jaunissement des feuilles, nécrose des parties immergées des feuilles.
- d Nécrose de la tige sur 1-3 cm, jaunissement des feuilles.
- e Nécrose complète des feuilles, jaunissement, dessèchement.
- f Jaunissement de certaines feuilles.

Du tableau 5.1, il ressort des effets prononcés pour la cercosporine (7) avec une nécrose rapide, après un jour déjà, des tiges et des pétioles. Cet effet résulte de l'éclatement des cellules suite à la peroxydation des acides gras des membranes par l'action de l'oxygène singulet, généré par les propriétés photosensitives de la cercosporine. La destruction des cellules des tiges en contact avec la toxine interrompt de l'alimentation des feuilles, ce qui conduit à leur jaunissement puis à leur flétrissement (figures 5.4 et 5.5). Dans le cas du test sur les plantules de tomates, on observe nettement le dessèchement des tiges qui condamne là aussi l'alimentation des feuilles (figure 5.6).

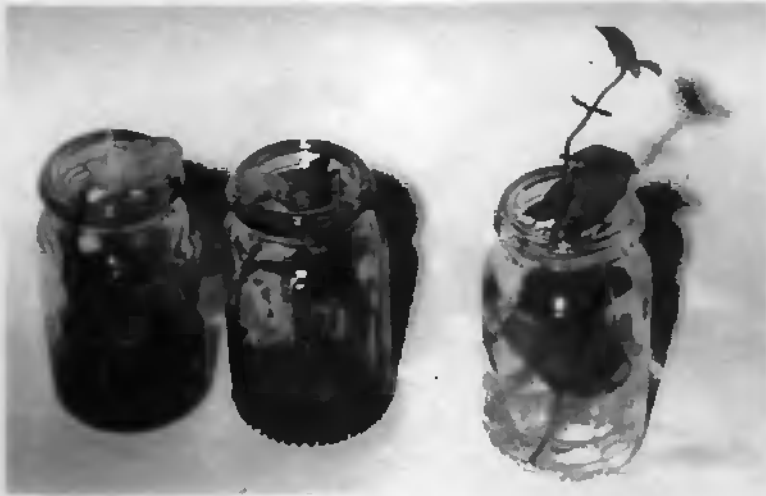


Figure 5.4 : effets de la cercosporine (7) (1 mg/ml) sur des pousses de liseron des champs (*C. arvensis*), après 3 jours (à droite : contrôle).

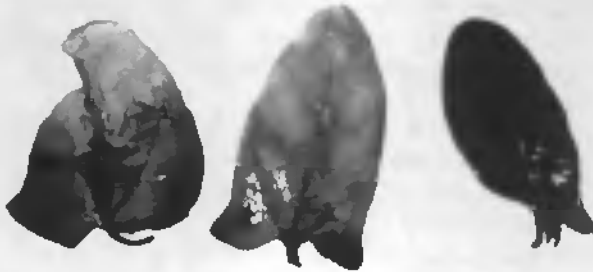


Figure 5.5 : effets de la cercosporine (7) (1 mg/ml) sur des feuilles de liseron des champs (*C. arvensis*), après 4 jours (à droite : contrôle).



Figure 5.6 : effets de la cercosporine (7) (1 mg/ml) sur des plantules de tomate, après 3 jours (à droite : contrôle).

Ces observations mettent en évidence que la cercosporine (7) n'est pas transportée dans la plante, mais agit en priorité sur les tissus directement en contact. Sa faible solubilité en milieu aqueux ainsi que sa probable présence uniquement dans les spores appuie ces observations.

Le test effectué avec la leptosphaerodione (1) n'est guère concluant, surtout en raison de la très faible solubilité de cette dernière en milieu aqueux. Un autre test est donc nécessaire (voir paragraphe 5.4). Les observations sur les feuilles et pousses de liseron ne permettent pas de conclure à un effet toxique visible. Le test sur les plantules de tomates permet tout de même d'observer le noircissement de l'extrémité des tiges (figure 5.7). La présence de la leptosphaerodione uniquement dans les spores du champignon (voir paragraphe 4.4) confirme qu'elle agit probablement en contact direct avec les tissus de la plante, mais de manière moins visible qu'avec la cercosporine (7) ou l'elsinochrome A (6).



Figure 5.7 : effets de la leptosphaerodione (1) sur des plantules de tomates, après 3 jours (à droite : contrôle).

L'elsinochrome A (6) est également testé mais uniquement sur des plantules de tomates. Les concentrations sont de 0.5 et 1.0 mg/ml avec 2 % d'éthanol. Les solutions de référence sont préparées dans les mêmes conditions. Comme pour la cercosporine (7) une nécrose des tiges est observée après un jour déjà pour les deux concentrations. On remarque de nouveau le dessèchement de la tige sur plusieurs centimètres suite à l'éclatement des cellules (figure 5.8).

L'elsinochrome A n'a pas été testé sur des feuilles et pousses de liseron par absence de matériel végétal à disposition. On peut tout de même estimer qu'il devrait conduire à des effets sur les liserons s'approchant de ceux de la cercosporine (7), vu son effet photosensitif reconnu [78] ainsi que son activité phytotoxique nette envers les plantules de tomate.



Figure 5.8 : effets de l'elsinochrome A (6) (0.5 mg/ml) sur des plantules de tomates, après 3 jours (à droite : contrôle).

5.4 Tests biologiques sur des plants de liseron

Les tests biologiques sur les plants de liserons ont tous été effectués à Zürich, au sein du groupe du professeur G. Défago, dans le cadre du travail de diplôme de Florence Marquis [20].

Etant donné la très faible solubilité de la leptosphaerodione (1) en milieu aqueux, une autre technique a été utilisée. Cette dernière consiste à sprayer une solution éthanolique (10 %) de leptosphaerodione, additionnée de spores du champignon *Stagonospora convolvuli*, souche LA39, sur des plants de liseron des champs (*Convolvulus arvensis*). Les effets sont mesurés par le calcul de la surface nécrosée des feuilles. Pour cela plusieurs concentrations entre 0.001 et 1 mg/ml sont choisies. Les plants de liserons présentent 5 à 7 feuilles. Six traitements sont effectués, à raison de 6 plants par traitement, l'expérience est répétée deux fois. L'application de spores de la souche LA39 seule sert de référence. Des tests préliminaires de résistance des feuilles de liseron et des spores de la souche LA39 à des solutions éthanoliques, ont montré qu'un pourcentage de 10 % n'a pas d'incidence sur la plante [20]. La résistance des

spores vis-à-vis de la leptosphaerodione a aussi été testée, on remarque qu'une concentration en leptosphaerodione (I) de 0.5 mg/ml n'influe pas sur la germination des spores [20].

Tableau 5.2 : concentrations de leptosphaerodione (I) utilisées dans le test.

Traitement	LA39 [spores/ml]	Leptosphaerodione (I) [mg/ml]	Surface foliaire nécrosée [%]
LA39	5×10^6	-	55.9
LA39 + lepto. 0.001	5×10^6	0.001	67.8
LA39 + lepto. 0.01	5×10^6	0.01	78.9
LA39 + lepto. 0.03	5×10^6	0.03	80.3
LA39 + lepto. 0.1	5×10^6	0.1	85.1
LA39 + lepto. 1	5×10^6	1	64.5

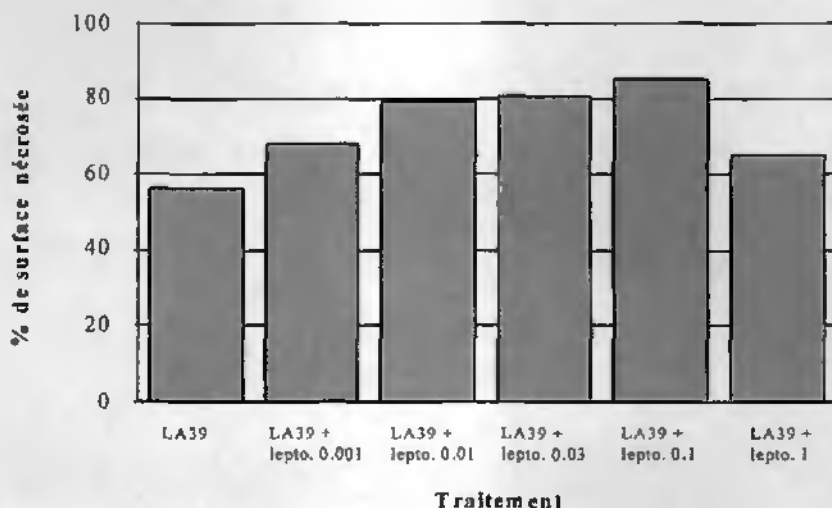


Figure 5.9 : pourcentage moyen de surface foliaire nécrosée, deux semaines après le traitement.

Le pourcentage de surface foliaire nécrosée augmente avec la concentration de la leptosphaerodione (1) jusqu'à ce que la concentration de celle-ci atteigne une valeur de 0.1 mg/ml. Il passe de 67.8 % à 85.1 % lorsque la concentration en leptosphaerodione passe de 0.001 à 0.1 mg/ml (figure 5.9). Il retombe à 64.5 % avec une concentration de 1 mg/ml. La surface nécrosée, pour le champignon seul, est de 55.9 %. Seuls les traitements effectués avec des concentrations en leptosphaerodione allant de 0.01 à 0.1 mg/ml, donnent des résultats statistiquement différents de celui obtenu avec la souche LA39 seule [20].

Les résultats du présent test montrent bien que la surface foliaire nécrosée augmente avec la concentration en leptosphaerodione (1) jusqu'à ce que celle-ci atteigne 0.1 mg/ml. Avec une concentration plus élevée, l'effet sur le liseron diminue et redevient identique à l'effet du champignon seul. Il y a donc un effet de synergie entre le champignon et la leptosphaerodione entre 0.01 et 0.1 mg/ml. On peut dès lors affirmer que la leptosphaerodione possède bel et bien une activité phytotoxique envers le liseron et spécialement celui des champs (*Convolvulus arvensis*).

CHAPITRE VI

MATERIEL VEGETAL

6.1 But de l'analyse

Après l'isolement et l'identification de métabolites issus de deux souches du champignon *Stagonospora* (chapitre II), puis la réalisation de tests biologiques afin de confirmer l'activité phytotoxique de certains d'entre eux (chapitre V), la troisième étape consiste en la recherche de ces derniers dans le matériel végétal.

Le but est de parvenir à retrouver la trace de ces métabolites dans le matériel végétal infesté et bien sûr d'en constater l'absence dans le végétal sain. La complexité du matériel végétal ainsi que la présence largement minoritaire de composés issus du champignon, implique l'utilisation d'une méthode analytique hautement sélective, en recourant, par exemple, à l'HPLC couplé avec un détecteur sensible, tel qu'un spectromètre de masse. Le fractionnement des échantillons, via une séparation préliminaire par chromatographie sur colonne, selon la même procédure que pour les extraits fongiques (paragraphe 2.5), est préalablement nécessaire.

6.2 Procédure expérimentale

Les résultats présentés dans ce chapitre concernent la recherche de la leptosphaerodione (1) et de l'elsinochrome A (6) dans des extraits de feuilles et tiges de liserons infectées par la souche LA39 du champignon *Stagonospora convolvuli*. L'analyse de plants infectés par la souche 214 Ca n'a pas été réalisée.

Les feuilles et tiges utilisées proviennent de plants de liseron des champs (*Convolvulus arvensis*) âgés d'un mois. Ces derniers sont infestés à l'aide du champignon. Ils sont ensuite laissés pendant deux semaines sous atmosphère humide (70 %) afin de favoriser le développement des symptômes. Des plants sains servent de références. Les feuilles et tiges sont récoltées, placées sous presse pendant deux jours et puis congelées. La préparation des échantillons est réalisée à Zurich [56].

Les prélèvements sont ensuite plongés dans de l'azote liquide, broyés à l'aide d'un mortier de manière à obtenir une fine poudre. L'extraction se fait l'aide d'acétate d'éthyle, par agitation mécanique. Elle est répétée trois fois. La procédure d'extraction est identique pour le matériel végétal sain et infesté.

Les extraits bruts sont chromatographiés sur colonne dans les mêmes conditions que les extraits du champignon (voir paragraphe 2.5). Des solvants de polarité croissante sont utilisés : hexane puis progressivement toluène, chloroforme et acétate d'éthyle. Les résidus les plus polaires sont récoltés à l'aide de méthanol.

6.3 HPLC

Des essais préliminaires sont tout d'abord réalisés en HPLC (RP 18), dans les conditions du programme standard d'analyse utilisé pour l'isolement des métabolites fongiques.

La comparaison des chromatogrammes des extraits bruts sains et malades (figure 6.1) permet logiquement d'observer des différences de composition. Pour les liserons malades, on remarque la présence de plusieurs produits ayant des temps de rétention entre 15 et 20 minutes. Il s'agit probablement de composés issus de la dégradation de la matière végétale. Il n'est pas impossible

que la plante génère aussi une ou plusieurs phytoalexines dans le but de contrer l'attaque fongique. L'analyse du contenu de ces extraits n'a toutefois pas été menée dans ce travail. Le chromatogramme de l'extrait brut des liserons sains ne présente quant à lui que très peu de composés absorbants à la longueur d'onde choisie de 254 nm.

La comparaison du chromatogramme de la leptosphaerodione (1) purifiée avec ceux des extraits bruts de liserons sains et malades ne permet pas de distinguer de signal correspondant à cette phytotoxine dans les chromatogrammes des extraits végétaux. La technique HPLC munie d'un détecteur de type DAD n'est donc pas suffisamment sensible pour détecter l'éventuelle présence de traces de 1 dans la matière végétale malade. Les mêmes constatations sont valables pour l'elsinochrome A (6).

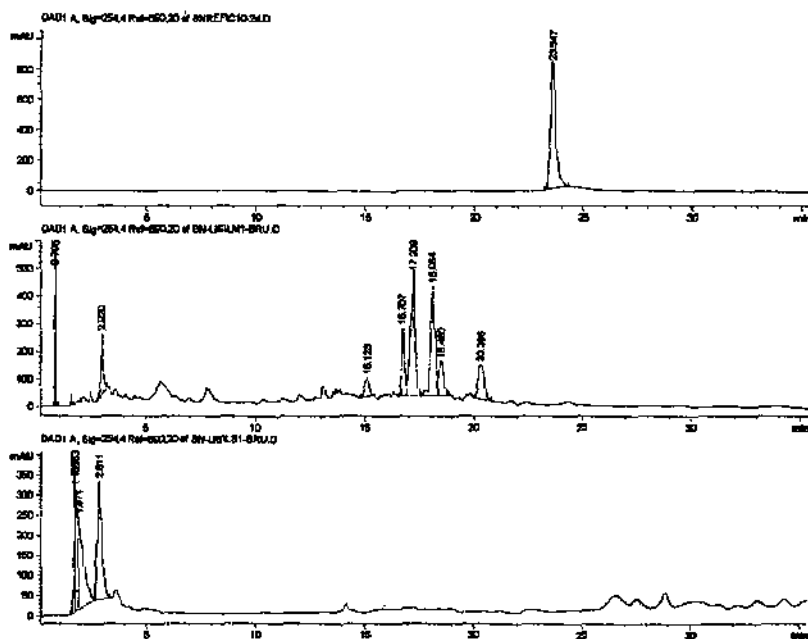


Figure 6.1 : chromatogrammes de la leptosphaerodione (1) (en haut), de l'extrait brut des liserons malades (au milieu) et sains (en bas).

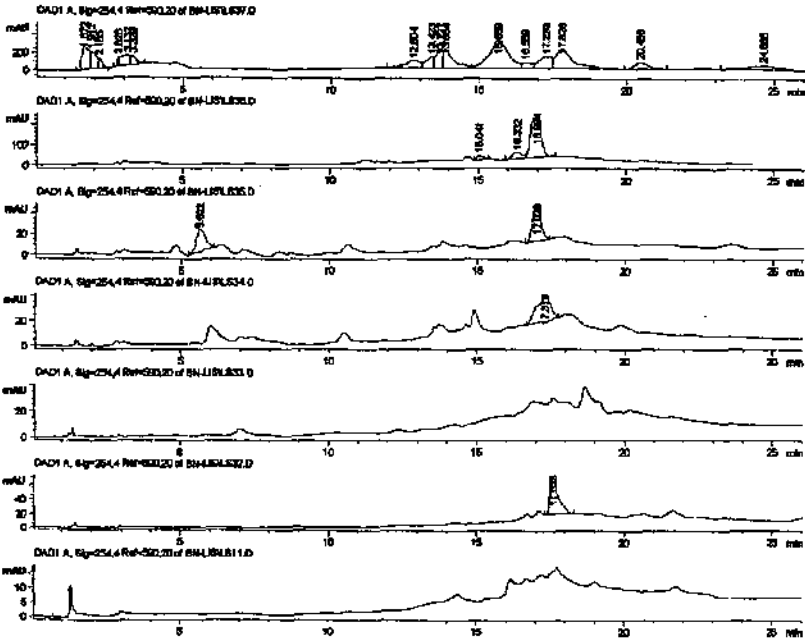


Figure 6.3 : chromatogrammes des principales fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait brut des liserons sains (de bas en haut, polarité croissante des fractions).

6.4 LC/MS

6.4.1 Introduction [146, 147]

L'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) est essentielle dans l'optique d'une détermination de structure *on-line*, de métabolites secondaires contenus dans un extrait végétal brut ou partiellement purifié. Le spectromètre de masse est un détecteur «universel», il permet la mise en évidence de n'importe quel composé par la mise au point de conditions d'ionisation adéquates. Ainsi, toute une série de composés difficilement détectables par d'autres méthodes (UV, fluorescence, électrochimie) sont analysables LC/MS.

Des extraits contenant des produits volatils, cas des huiles essentielles, sont analysés avec succès par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) depuis déjà plusieurs années. Les volatils ne forment qu'une très petite partie des métabolites secondaires de présents dans les végétaux. En effet, dans un extrait végétal, les composés sont majoritairement polaires, peu volatils et parfois thermolabiles, ils ne peuvent donc pas être directement analysés par GC/MS. Ils sont par contre séparables par HPLC. L'analyse en spectrométrie de masse de ces composés nécessite la mise au point d'interfaces permettant le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse.

A l'origine, les objectifs principaux du développement d'interfaces LC/MS visaient à faire du spectromètre de masse un détecteur universel pour l'HPLC. Un tel détecteur devait notamment être capable d'analyser des composés thermolabiles non analysables en GC/MS, d'analyser des produits non-volatils mais aussi d'abaisser les limites de détection grâce à la haute sensibilité de la technique ($< 10^{-12}$ g). Pour atteindre ces objectifs une interface idéale doit remplir les critères présentés au tableau 6.1.

Tableau 6.1 : caractéristiques d'un détecteur « idéal » pour l'HPLC [146, 148].

-
- Posséder une sensibilité importante et une réponse bien définie.
 - Répondre à tous les analytes ou avoir une réponse spécifique bien déterminée.
 - Etre insensible aux changements de température et de flux d'éluant.
 - Répondre indépendamment de la nature de la phase mobile utilisée.
 - Ne pas générer un élargissement des pics à la sortie de la colonne.
 - Etre sûr et facile d'utilisation.
 - Avoir une réponse quantitative linéaire.
 - Donner des informations qualitatives sur les pics détectés.
-

Pour remplir ces critères, de nombreux problèmes techniques se posent. Après 20 ans de recherche dans ce domaine, l'interface idéale remplissant toutes les caractéristiques décrites ci-dessus n'a actuellement pas encore été mise au point. En effet, techniquement parlant, l'introduction d'un liquide (éluant) à haut débit (< 1.5 ml/min), provenant de la chromatographie liquide, dans le haut vide régnant à l'intérieur d'un spectromètre de masse n'est pas aisée.

A l'heure actuelle, les recherches effectuées ont abouti à la mise au point d'un nombre important d'interfaces ouvrant la voie à l'analyse d'une très grande quantité de produits polaires ou non volatils à l'intérieur de matrices biologiques complexes. Ces interfaces ont chacune des caractéristiques propres et travaillent selon des modes d'ionisation différents.

Dans cette brève introduction, on se contentera de décrire l'interface utilisée dans ce travail. Il s'agit de l'électrospray (ESI, *ElectroSpray Ionisation*), apparue en 1985 [149] (figure 6.4).

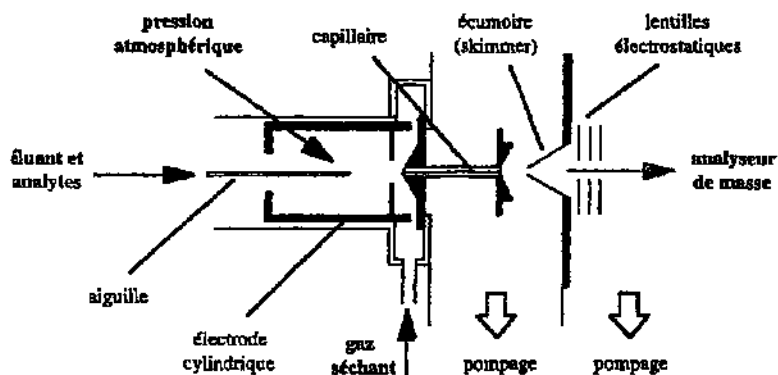


Figure 6.4 : principe d'une interface électrospray (ESI) [149].

Ce type d'interface appartient à la catégorie des interfaces à pression atmosphérique (API, *Atmospheric Pressure Ionisation*). Ces dernières fonctionnent selon un principe commun qui consiste à former des ions dans une source se trouvant à pression atmosphérique pour ensuite les introduire dans un analyseur où règne un vide poussé. Ces techniques exploitent un phénomène mis en évidence en 1917 par *Zeleny* : un potentiel électrique appliqué à un solvant émergent d'un capillaire provoque la désintégration de celui-ci en un nuage de fines gouttelettes de tailles uniformes de l'ordre du micromètre (figure 6.5). Ce processus, appelé électrospray, résulte de l'autoré pulsion des surfaces chargées électrostatiquement qui excèdent les forces de cohésion dues aux tensions superficielles. Une autre technique d'ionisation de cette catégorie fréquemment utilisée est l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).

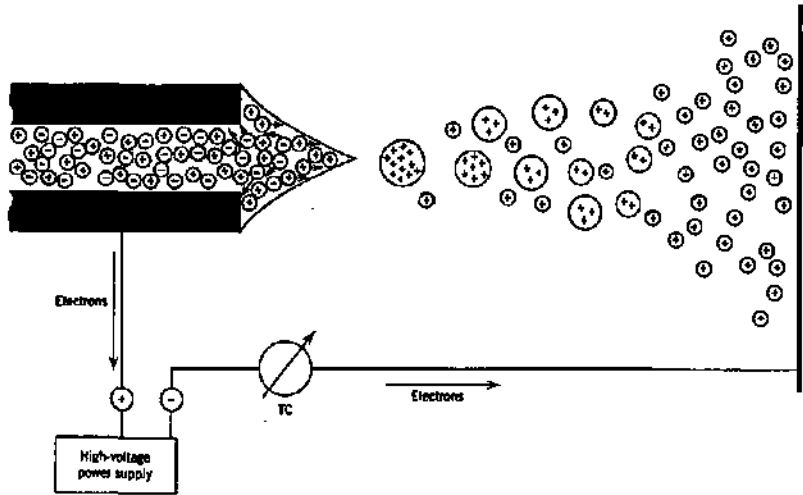


Figure 6.5 : processus de désintégration de gouttelettes en électrospray [150].

L'interface électrospray développée par *Whitehouse et al.* [149] exploite ce processus de la façon suivante : comme le montre le figure 6.4, l'éluant est amené dans une chambre à pression atmosphérique par une aiguille en acier inoxydable avec un débit de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Le solde du flux HPLC, soit 900 $\mu\text{l}/\text{min}$ est éliminé (*splitter*). Un potentiel est appliqué entre l'aiguille (reliée à la terre) et l'électrode cylindrique qui l'entoure. La phase mobile est alors «électrosprayée» à l'extrémité de l'aiguille et les gouttelettes sont dispersées par un flux d'azote à contre-courant (150 ml/min). Les vapeurs de solvant provenant de l'évaporation des gouttelettes sont rapidement éliminés par ce bain de gaz chaud. Les ions formés sont ensuite entraînés par un capillaire, dont les extrémités sont maintenues aux potentiels de - 4.5 kV (entrée) et 40 V (sortie) vers un deuxième chambre où un vide partiel (10^{-4} Torr) est établi. Le faisceau d'ions supersoniques ainsi formé passe ensuite à travers une écumeuse (*skimmer*), maintenu à un potentiel de -20 V. Ils sont finalement dirigés vers l'analyseur [149].

L'ESI peut être utilisée en mode positif ou négatif, en fonction des ions préformés en solution. Un potentiel positif est appliqué entre l'aiguille et l'électrode cylindrique pour analyser les ions positifs et inversement pour les

ions négatifs, ceci facilite l'éjection des gouttelettes. L'ionisation des analytes est nécessaire avant le passage dans le détecteur de masse. Cette situation nécessite, dans la plupart des cas l'emploi d'un tampon, dont le type et la force ont un effet notable sur la sensibilité [151].

Cette technique est notamment utilisée pour l'analyse de composés à hauts poids moléculaires, tels que des polymères naturels (protéines, peptides, glycoprotéines, nucléotides) mais aussi pour des produits pharmaceutiques ou des polymères industriels [151].

6.4.2 Analyse du matériel végétal

Il faut tout d'abord définir les conditions permettant une ionisation adéquate des molécules recherchées de manière à pouvoir ensuite les détecter au sein du matériel végétal. Les conditions des analyses HPLC sont identiques à celles utilisées avec les fractions fongiques (voir paragraphes 6.3 et 9.1.3).

L'analyse en ESI est réalisée en mode de détection positif en utilisant un tampon d'acide formique. Les spectres de masse en mode ESI de la leptosphaerodione (**1**, $M+1 = 355$) et de l'elsinochrome A (**6**, $M+1 = 545$) sont réalisés par injection directe à l'entrée de la source (figures 6.6 et 6.8). Sur chacun d'eux, on observe un important pic moléculaire protoné à $M+1 = 355$ pour **1** et respectivement $M+1 = 545$ pour **6**. Le spectre de masse en MS/MS de la leptosphaerodione (**1**) est également réalisé de cette manière, l'ion fils principal se situe à $m/z = 285$ (figure 6.7).

L'analyse en LC/MS des extraits bruts sains et malades ne donne pas de résultats satisfaisants, la détection des produits recherchés n'y est pas possible leurs concentrations étant trop faibles. Il est donc nécessaire de procéder à l'analyse des fractions issues de la séparation sur colonne chromatographique. Cinq fractions provenant des extraits de liserons malades sont sélectionnées, en fonction de leur polarité de manière à correspondre aux métabolites recherchés. Elles sont ensuite analysées en LC/MS. Il s'agit des fractions LMS-3 à LMS-7. Pour chaque injection, le courant ionique total ainsi qu'une sélection d'ion entre 544.5-545.5 (elsinochrome A, **6**), respectivement entre 354.5-355.5 (leptosphaerodione, **1**) sont présentés.

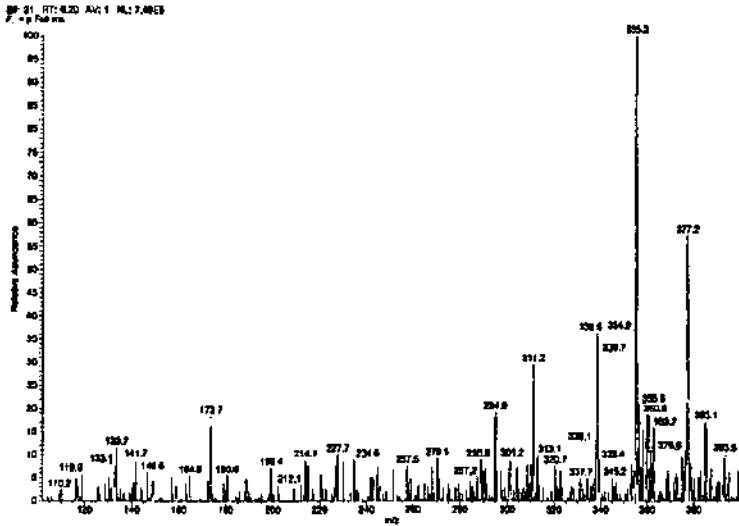


Figure 6.6 : spectre de masse ESI de la leptosphaerodione (1).

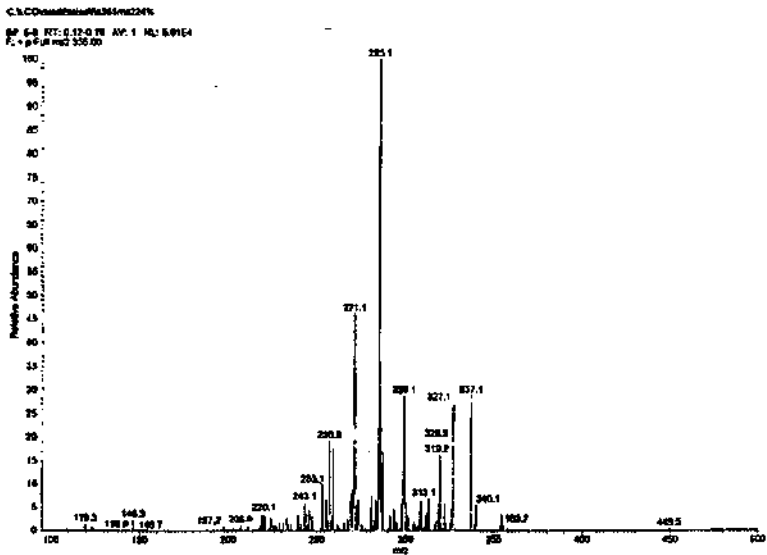


Figure 6.7 : spectre de masse ESI-MS/MS de la leptosphaerodione (1).

S#: 12 RT: 0.16 AV: 1 NL: 5.44E6
F: + c Full ms [150.00 - 800.00]

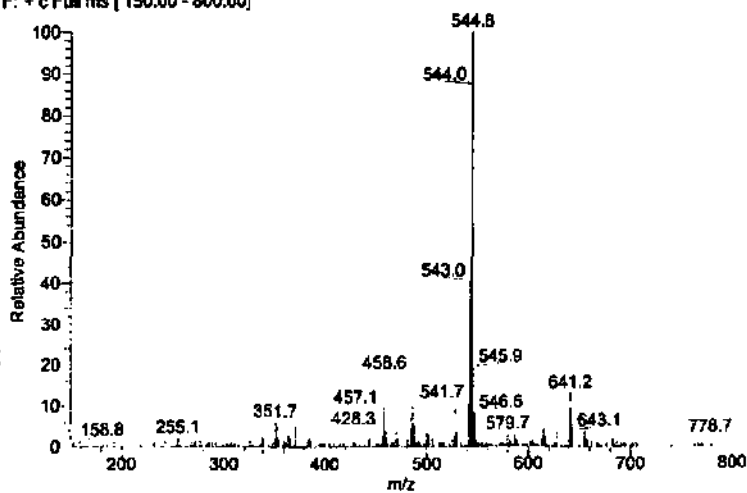


Figure 6.8 : spectre de masse ESI de l'elsinochrome A (6).

6.4.2.1 Analyse de la fraction LM5-3

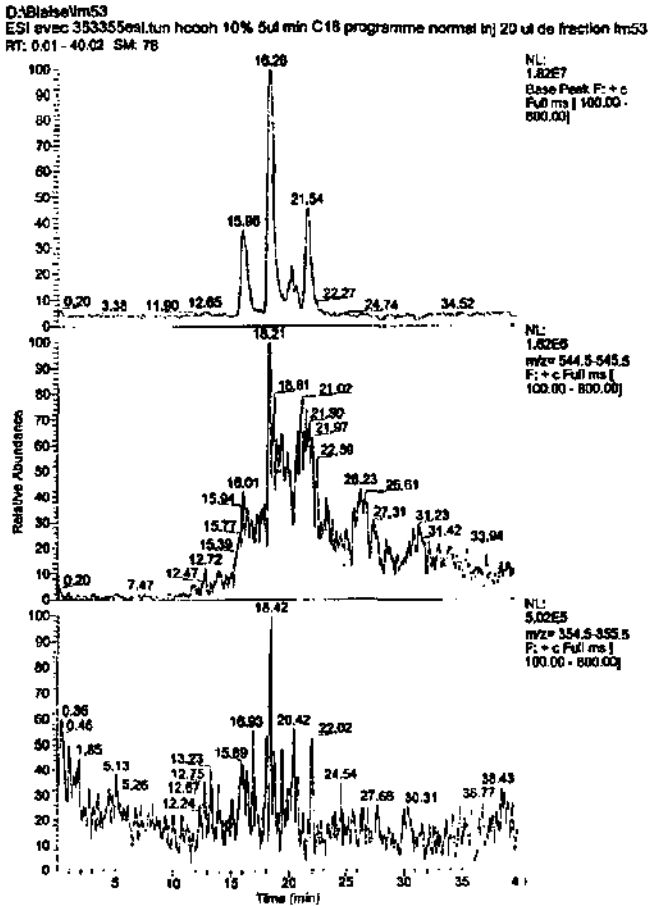


Figure 6.9 : courant ionique total (en haut), sélection d'ions : $m/z = 544.5-545.5$ (au milieu), sélection d'ions : $m/z = 354.5-355.5$ (en bas) de la fraction LM5-3.

Les spectres des ions sélectionnés de masses $m/z = 544.5-545.5$ et $354.5-355.5$ ne sont pas significatifs et ne permettent pas de conclure à la présence de l'un ou l'autre des composés recherchés.

6.4.2.2 Analyse de la fraction LMS-4

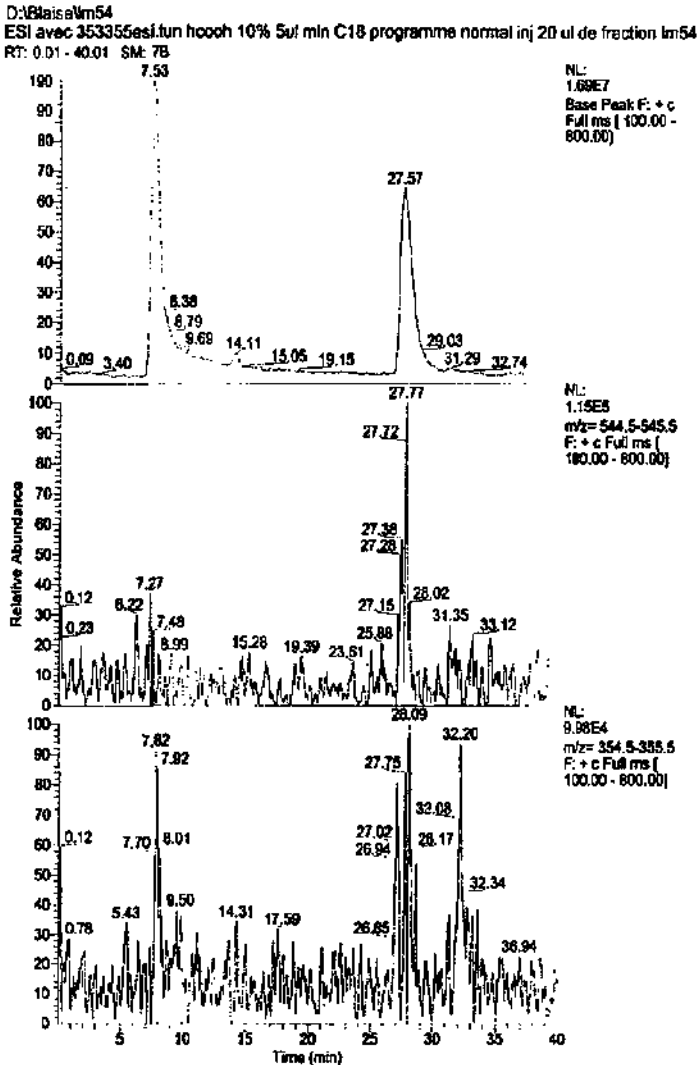


Figure 6.10 : courant ionique total (en haut), sélection d'ions : $m/z = 544.5-545.5$ (au milieu), sélection d'ions : $m/z = 354.5-355.5$ (en bas) de la fraction LMS-4.

Les spectres des ions sélectionnés de masse $m/z = 544.5-545.5$ et $354.5-355.5$ indiquent la présence d'ions, notamment pour des temps de rétention de l'ordre de 27-28 minutes.

Un tel temps ne correspond pas à ceux des deux produits attendus qui sont de 19.5 minutes pour l'elsinochrome A (6) et 23.6 minutes pour la leptosphaerodione (1), à l'état pur. De plus, le spectre de masse total pris entre 27.1 et 28.3 minutes ne correspond pas à celui de l'un ou l'autre des produits recherchés (figure 6.10.1). On ne peut donc pas conclure à la présence de l'un ou l'autre de ces composés dans cette fraction.

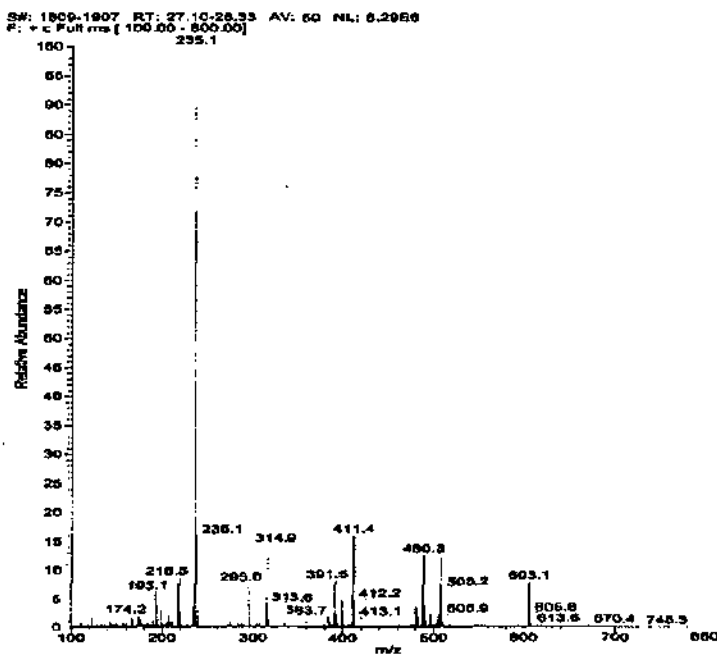


Figure 6.10.1 : spectre de masse ESI du pic à 27.6 minutes (27.1-28.3 minutes), de la fraction LM5-4.

6.4.2.3 Analyse de la fraction LM5-5

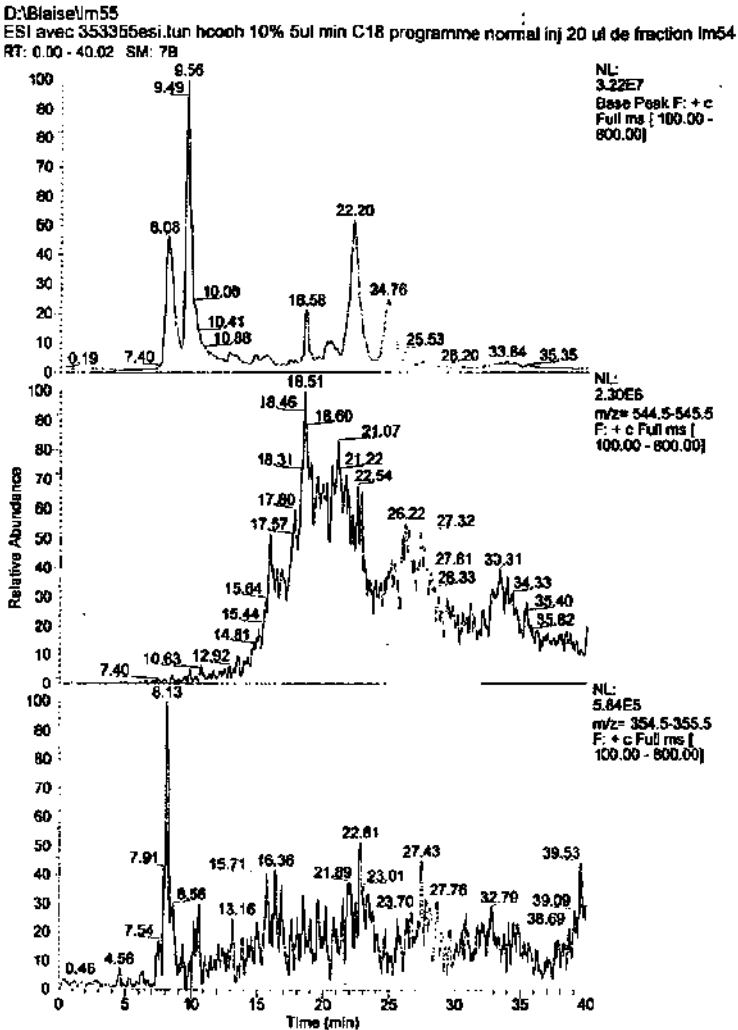


Figure 6.11 : courant ionique total (en haut), sélection d'ions : $m/z = 544.5-545.5$ (au milieu), sélection d'ions : $m/z = 354.5-355.5$ (en bas), de la fraction LM5-5.

La sélection d'ions de masse $m/z = 544.5-545.5$ indique la présence d'ions entre 17.5 et 22.5 minutes. Ces ions ne correspondent pas à un seul produit dans le courant ionique total. Toutefois, le spectre de masse pris entre 17.8 et 22.8 minutes indique que l'ion de masse $m/z = 545$ fait partie des fragments principaux (figure 6.11.1). Cette observation permet de suggérer la présence d'elsinochrome A (6) dans cette fraction. La présence d'ions significatifs sur une durée de près de cinq minutes montre que le produit a tendance à traîner sur la colonne. Cet état de fait rend difficile la réalisation d'une analyse en MS/MS de cette fraction. La sélection d'ions de masse $m/z = 354.5-355.5$ ne signale pas la présence significative d'ions correspondant au temps de rétention de la leptosphaerodione (1).

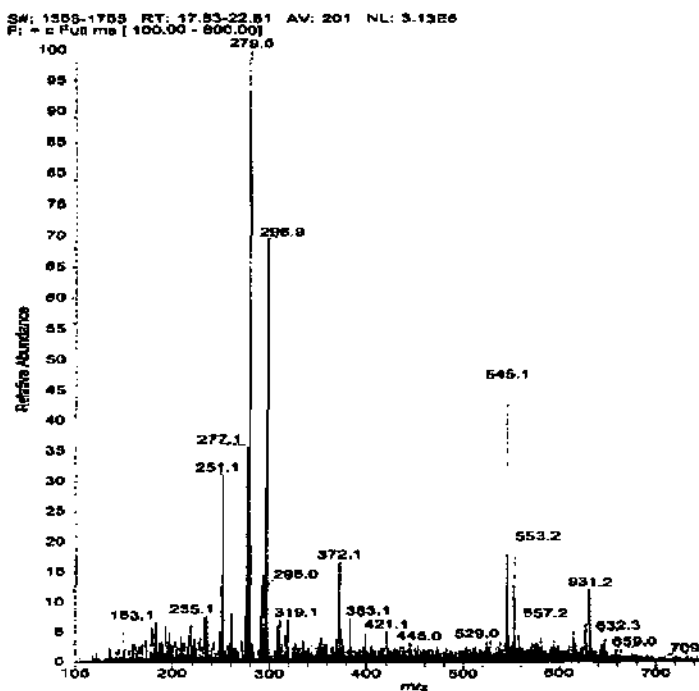


Figure 6.11.1 : spectre de masse (ESI) entre 17.8 et 22.8 minutes, de la fraction LM5-5.

6.4.2.4 Analyse de la fraction LM5-6

D:\Blaise\lm56
 programme standard, 20 ul hcooh 10% 3ul/min post-colonne tune sur 355 et sim sur 355
 RT: 0.01 - 30.02 SM: 7B

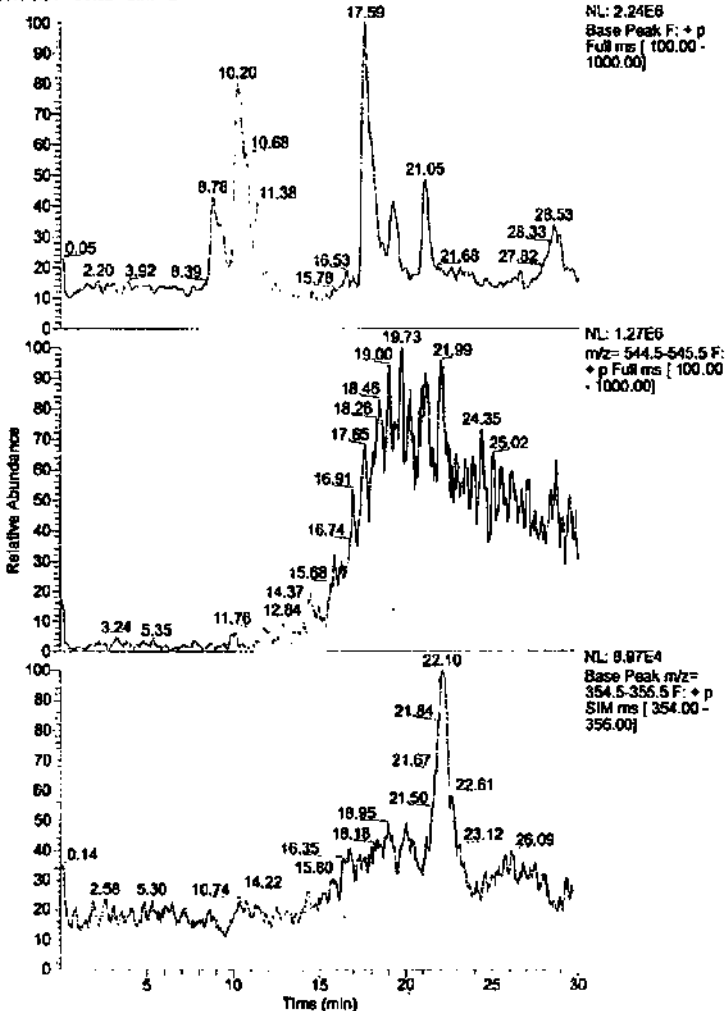


Figure 6.12 : courant ionique total (en haut), sélection d'ions : $m/z = 544.5-545.5$ (au milieu) et SIM : $m/z = 354.5-355.5$ (en bas), de la fraction LM5-6.

On remarque à nouveau un signal large et complexe dès 16.5 minutes pour la sélection d'ions de masse $m/z = 544.5-545.5$. La sélection d'ions entre $m/z = 354.5$ et 355.5 , issue d'une sélection d'ions en mode SIM (*Selected Ion Monitoring*) dans le domaine $m/z = 354-356$, montre la présence d'un signal significatif pour un temps de rétention de 22.1 minutes. Ce signal ne correspond pas à l'un ou l'autre des composés majoritairement présents dans le courant ionique total. Il représente un composant sous forme de trace du mélange présent. La relativement bonne concordance des temps de rétention appuie l'idée de la présence de leptosphaerodione (1) dans cette fraction.

L'utilisation de la MS/MS, dans le but de confirmer cette hypothèse par la recherche de l'ion caractéristique de masse $m/z = 285$, n'a malheureusement pas donné de résultats indiscutablement probants. Cela est vraisemblablement dû à la trop faible concentration du composé recherché dans l'extrait végétal. Il n'est donc pas possible d'affirmer formellement qu'il s'agit bien de la leptosphaerodione (1) même si les informations recueillies ci-dessus vont largement dans ce sens.

6.4.2.5 Analyse de la fraction LMS-7

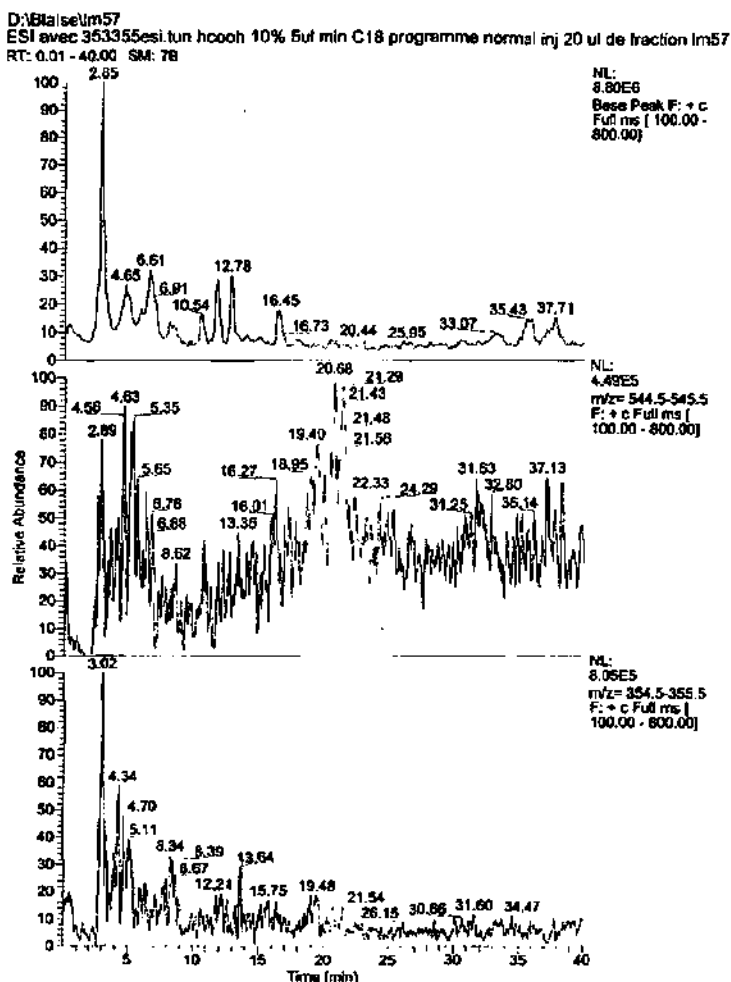


Figure 6.13 : courant ionique total (en haut), sélection d'ions : $m/z = 544.5-545.5$ (au milieu), sélection d'ions : $m/z = 354.5-355.5$ (en bas), de la fraction LMS-7.

Les sélections d'ions de masse $m/z = 544.5-545.5$ et $m/z = 354.5-355.5$ ne présentent pas d'ions significatifs permettant d'envisager de la présence de l'un ou l'autre des composés recherchés.

CHAPITRE VII

DISCUSSION

7.1 Composés isolés

7.1.1 Composés quinoïques dérivés du perylène [117]

Trois des molécules isolées dans ce travail font partie des composés quinoïques naturels dérivés du perylène : il s'agit de la cercosporine (7), de l'isocercosporine (8) et de l'elsinochrome A (6). Cette famille représente un petit groupe de pigments biologiquement actifs et facilement isolables à partir de sources naturelles. Leur squelette de base est le perylène (a) qui fut obtenu synthétiquement en 1910 [152] et identifié, plus tard, comme composant mineur du goudron de charbon [153] (figure 7.1).

La chimie du perylène a été étudiée par *Zinke* dès 1919. Cet auteur décrit plusieurs quinones et en particulier le composé jaune, perylène-3,10-quinone (b) [154], duquel découlent pratiquement tous les composés quinoïques naturels dérivés du perylène. Le dérivé 4,9-dihydroxy (c) fut aussi préparé par *Zinke* [155], mais sa structure ne sera décrite que plus tard [156] (figure 7.1).

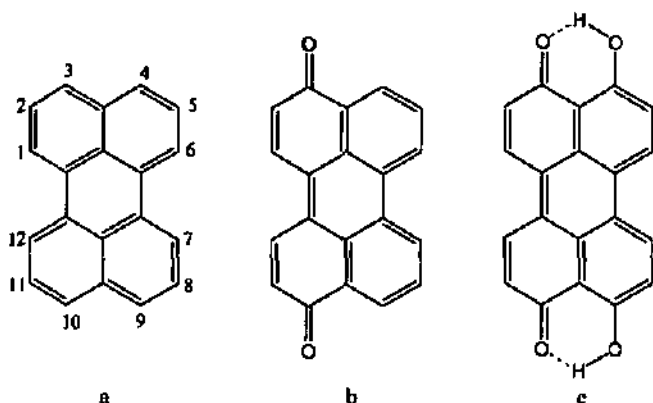
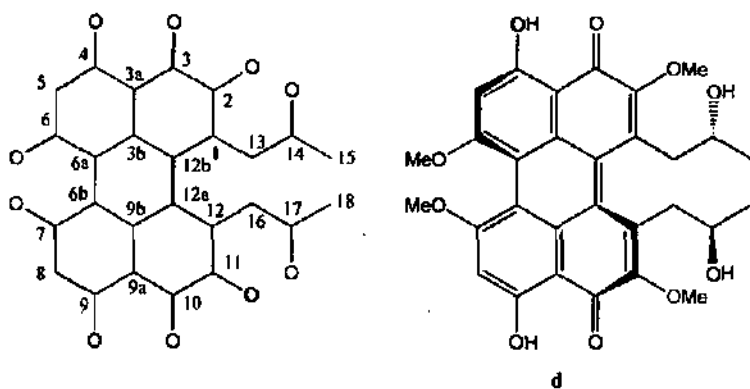


Figure 7.1 : perylène (a) et ses dérivés quinoïques les plus simples (b, c).

La plupart des composés quinoïques dérivés du perylène se regroupent en trois classes :

A) *Composés en C₂₀ sans substituant carboné* : Cette catégorie regroupe le composé parent (c) et d'autres composés partiellement réduits produits par des moisissures du genre *Alternaria* et *Stemphylium*.

B) *Composés quinoïques issus de champignons comportant des substituants carbonés* : Pratiquement tous les pigments de cette classe sont dérivés du squelette 1, le phleichrome (d, figure 7.2) et la cercosporine (7) en sont les plus importants.



Squelette 1

Figure 7.2 : phleichrome (d).

Certains de ces pigments, renferment des cycles additionnels provenant de l'interaction des deux chaînes en C(3) au cours de la biosynthèse. C'est le cas de l'elsinochrome A (6). Les représentants de cette classe sont produits par une large variété de champignons, pour la plupart phytopathogènes. Il apparaît que les dommages causés sur les plantes hôtes découlent d'une action photodynamique (voir paragraphe 5.2.1). Ces composés présentent des substituants sur le squelette du perylène, ces derniers sont arrangés de manière symétrique par rapport à un axe C₂. Ils présentent pratiquement tous des groupements hydroxyles phénoliques en positions 4 et 9, chélatés avec les groupements carbonyles voisins.

C) *Composés quinoïques dérivés du perylène isolés de pucerons* : Les pigments de ce groupe ont été isolés de pucerons, toutefois seul la rhodoaphine [157] préexiste dans les insectes vivants. Les erythroaphines sont quant à elles formées *post-mortem*, suite à des transformations enzymatiques sur des précurseurs natifs, les protoaphines, qui ne contiennent pas encore le système polycyclique du perylène [158, 159].

Dans la suite de la discussion sur les propriétés de ces composés, seul les représentants de la classe B seront considérés vu que les métabolites isolés dans ce travail y appartiennent.

7.1.1.1 Stéréochimie

La plupart des dérivés du perylène d'origine fongique, possèdent des substituants induisant des contraintes stériques suffisantes pour forcer le système polycyclique à adopter une structure hélicoïdale non planaire. Cette hélicité conduit à un phénomène de chiralité axiale. Si la partie non chromophorique de la molécule contient des atomes de carbone asymétriques, on observe une diastéréoisomérisation [80].

L'exemple de la cercosporine (7), qui s'isomérisse thermiquement pour donner son diastéréoisomère isocercosporine (8), s'explique par l'inversion de l'hélice [82, 83, 86]. Etant donné que ce processus intervient les deux diastéréoisomères, il est nécessaire que les deux atomes de carbone asymétriques des chaînes latérales aient la même configuration [85]. Les mêmes considérations sont valables pour le couple phleichrome (d) et isophleichrome [160].

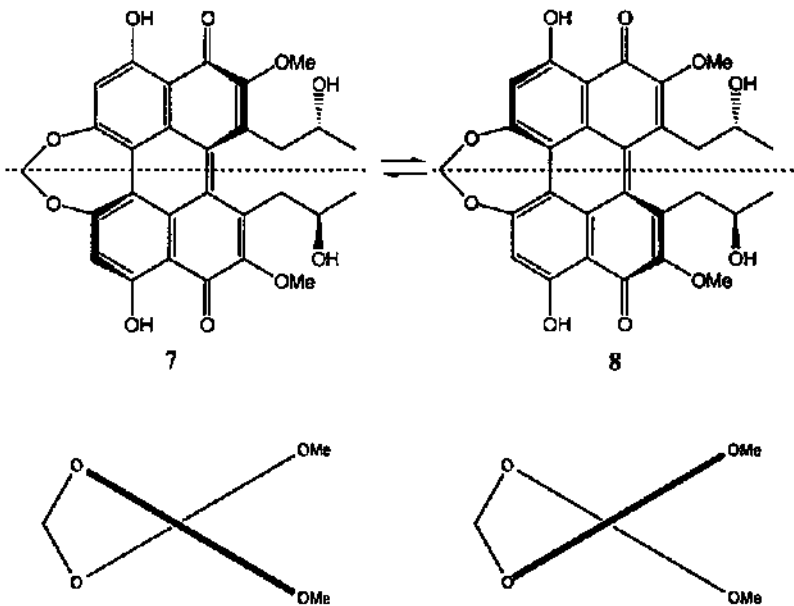


Schéma 7.1 : non coplanarité des structures de la cercosporine (7) et de l'isocercosporine (8). En bas, représentation symbolisée des deux stéréoisomères [85].

Les elsinochromes [78, 161] présentent un cycle additionnel à six membres formé par la liaison entre les carbones C(13) et C(16) de la cercosporine. Tous les elsinochromes sont optiquement actifs, cette activité peut être causée par les carbones asymétriques C(13), C(16), et ou la noncoplanarité fixe du chromophore, comme pour la cercosporine (7) et le phleichrome (d). Au contraire de ces deux derniers composés qui s'isomérisent thermiquement, l'elsinochrome A (6) est plutôt stable thermiquement.

L'elsinochrome A (6) possède une configuration rigide *trans*-diaxiale des chaînes latérales, car la *trans*-diéquatoriale conduirait à de fortes interactions stériques avec les groupes méthoxy fixés en C(3) et C(11). La symétrie de la molécule selon un axe C_2 implique l'équivalence chimique de deux protons benzyliques en C(13) et C(16) ainsi que leur orientation *trans*. Ces deux protons étant magnétiquement non-équivalents, il est possible de déterminer leur couplage par l'analyse des pics satellites ^{13}C du spectre 1H -RMN [81].

L'obtention d'une valeur de 1.6 Hz pour ce couplage correspond à une orientation rigide *trans*-diéquatoriale des deux protons, avec un angle diédrique d'environ 80°, en accord avec les résultats obtenus à l'état solide [162, 163].

7.1.1.2 Tautomérie

Le composé parent de la majorité des composés quinoïques dérivés du perylène, le 4,9-dihydroxypérylène-3,10-quinone (c) et ses dérivés présentent un tautomérisme phénol-quinone. Ce processus peut être représenté par un équilibre rapide entre quatre formes tautomères A, B, C et D. Pour les composés possédant un axe de symétrie C_2 , les formes C et D sont équivalentes [80]. C'est le cas pour la cercosporine (7), l'isocercosporine (8) et l'elsinochrome A (6).

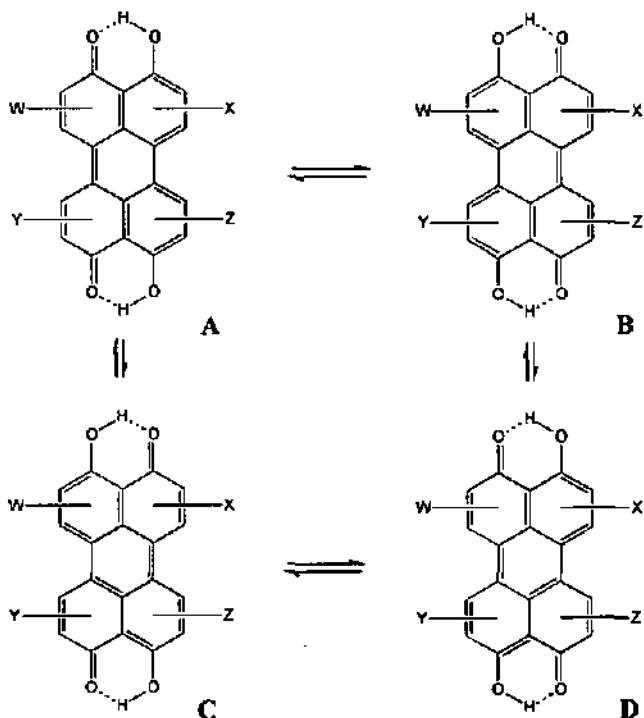


Schéma 7.2 : formes tautomères des dérivés quinoïques du perylène [117].

Puisqu'un équilibre rapide est observé pour les dérivés substitués, le pourcentage des différentes formes tautomères ne peut être estimé que par la mesure de paramètres physiques constituant le reflet de la contribution de chacune des formes tautomères. Les populations de chaque tautomère sont obtenues par la mesure du couplage J_{C-H} entre les protons des groupes hydroxyles avec les carbones adjacents, C(3, 10) et C(4, 9). Les facteurs les plus importants gouvernant l'équilibre des formes tautomères sont : les effets des substituants, la force de la liaison hydrogène intramoléculaire phénol-quinone, la non planarité du motif perylénique ainsi que des effets de solvation et d'aggrégation [80]. Dans le cas de l'elsinochrome A (6), le calcul des rapports entre chacune des formes tautomères en solution dans le chloroforme montre un équilibre entre les formes tautomères A et B. Par contre, dans l'acétone, la forme A est majoritaire (environ 64 %) [80]. La cercosporine et l'isocercosporine existent majoritairement sous la forme A en solution dans le chloroforme ou l'acétone. La présence d'une faible part du tautomère B (moins de 10 %) n'est toutefois pas exclue [80]. La détermination de la structure aux rayons X de la cercosporine [164, 165] et de l'elsinochrome A [162, 163] montre que ces deux composés sont présents sous la forme tautomère A à l'état solide.

7.1.1.3 Biosynthèse

En se basant sur des critères structuraux tels que la distribution des oxygènes, tous les dérivés quinoïques naturels du perylène sont des polycétides. La structure symétrique de la plupart d'entre eux suggère que la biosynthèse se fait par le couplage de deux polyhydroxynaphtalènes. L'isolement de 4,4',5,5'-tetrahydroxydinaphtyle (e) des sporophores du champignon *Daldinia concentrica* ainsi que son oxydation enzymatique en 4,9-dihydroxyperylén-3,10-quinone (c) sont relatés dans la littérature [166]. Il apparaît également que le dinaphtyle (e) est lui-même biosynthétisé par couplage oxydatif symétrique de deux molécules de 1,8-dihydroxynaphtalène (f). De plus, la biosynthèse du 1,8-dihydroxynaphtalène (f) via une voie polycétidique est facilement envisageable. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'un mutant de *D. concentrica*, ne produisant pas de pigment noir, engendre le mono- (g) et diméthylether (h) du 1,8-dihydroxynaphtalène [167], tandis qu'un autre produit les dérivés (i) et (j) par suite du blocage de la réaction de cyclisation donnant naissance au second cycle benzénique du système naphthalénique (schéma 7.3).

La confirmation expérimentale de cette voie biogénétique n'a été obtenue que pour seulement quelques rares dérivés quinoïques naturels du perylène. L'enrichissement de l'elsinochrome A (6) avec de l' ^{14}C -acétate puis sa dégradation chimique partielle vont dans le sens de la voie biosynthétique

proposée ci-dessus [168]. Des résultats similaires ont été obtenus avec la cercosporine (7) par incorporation de 1-¹³C-acétate, 2-¹³C-acétate et ¹³C-formate [85, 169] (schéma 7.4).

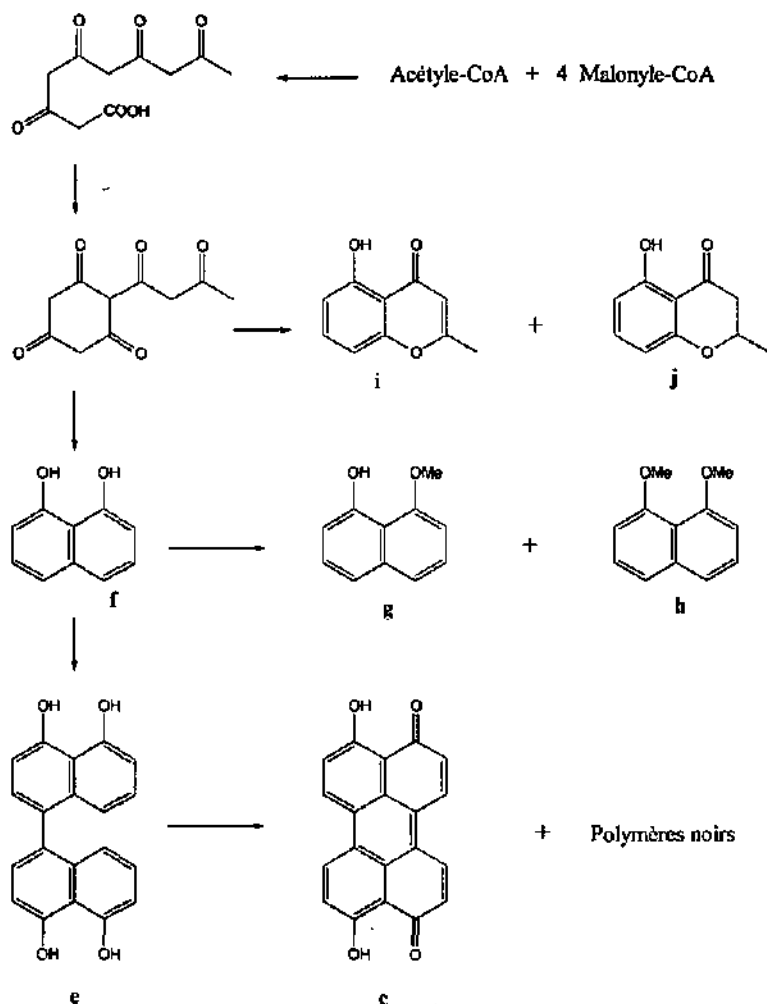


Schéma 7.3 : biosynthèse de métabolites aromatiques de *D. concentrica* [168].

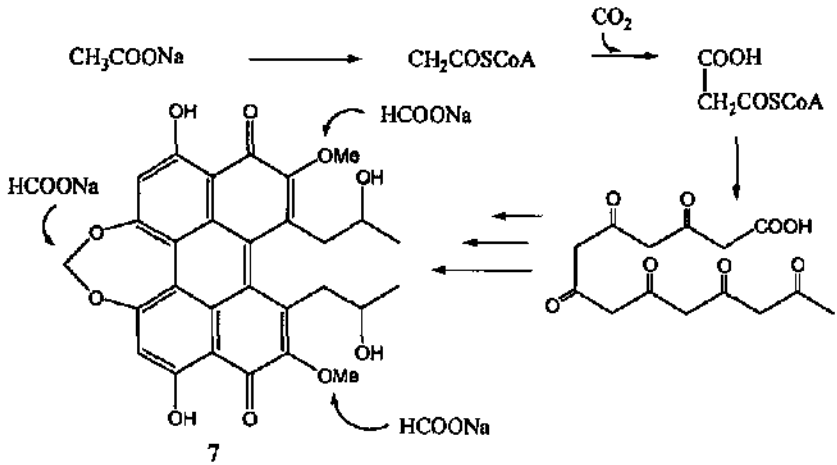


Schéma 7.4 : biosynthèse de la cercosporine (7).

7.1.2 Leptosphaerodione et dérivés

Peu d'informations sont disponibles sur les propriétés de la leptosphaerodione (1) et de son produit de condensation aldolique, l'*o*-dihydroquinone (2). Une seule référence de la littérature en fait état [70]. Plusieurs analogies permettent tout de même d'évaluer la réactivité de la fonction *ortho*-quinonique.

Le leptosphaerodione lactol (20) ainsi que ses dérivés par condensation avec du méthanol (3) et de l'éthanol (4) sont de nouvelles molécules pour lesquelles n'existent que des informations par analogie avec des composés de structures voisines [100-103] (paragraphe 3.2.3).

7.1.2.1 Réactivité

Réactivité de la fonction ortho-quinone

La première mention dans la littérature d'une réaction entre un composé *ortho*-quinonique et de l'acétone remonte à 1882. Elle concernait la réaction de la 9,10-phenanthraquinone, en présence d'ammoniaque. Le produit de condensation aldolique n'avait toutefois pas été décrit formellement [170]. L'étude de la réactivité de la fonction *ortho*-quinone avec des composés méthyle-cétoniques a été menée par Magnusson en 1958 [171, 172], suite à une découverte fortuite, lors de la purification par colonne chromatographique sur

oxyde d'aluminium de la 3,8-diméthoxy-1,2-naphtoquinone (**k**) avec l'acétone comme éluant. Ces auteurs ont constaté qu'il se produisait en effet une condensation aldolique entre l'acétone et la naphtoquinone. Cette réaction est catalysée par des résidus alcalins présents dans l'oxyde d'aluminium (schéma 7.5).

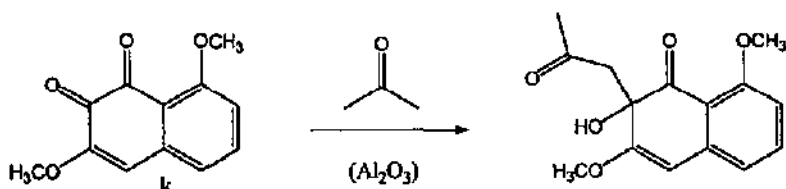


Schéma 7.5 : réaction de la 3,8-diméthoxy-1,2-naphtoquinone (**k**) avec l'acétone [171].

La réaction de l'acétone avec l'*ortho*-benzoquinone ainsi qu'avec plusieurs dérivés alkylés et alkoxylés de cette dernière a ensuite été étudiée de manière systématique [172]. Le mécanisme proposé fait intervenir l'oxyde d'aluminium comme base de Lewis (schéma 7.6).

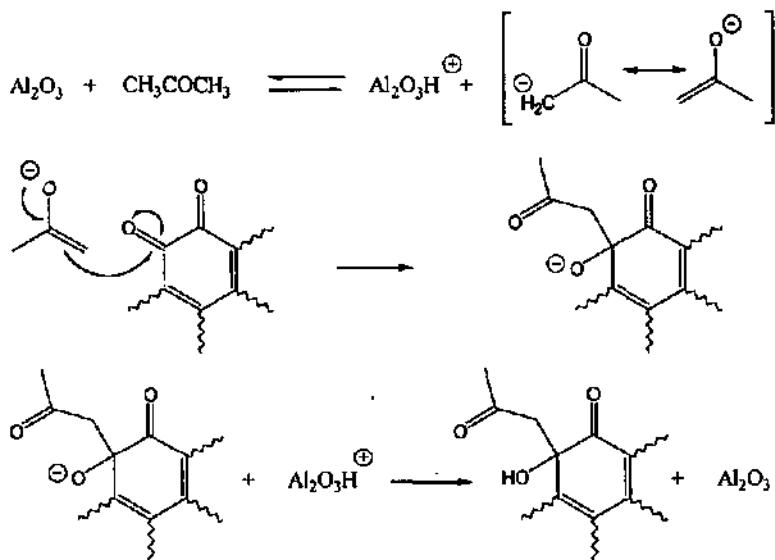


Schéma 7.6 : mécanisme de la condensation aldolique de l'acétone sur des dérivés *ortho*-quinoniques [172].

L'énolate attaque préférentiellement le plus positif des deux carbones carbonyles. Cette caractéristique dépend des effets inductifs et mésomères des substituants du cycle de l'*ortho*-benzoquinone. Dans le cas de la leptosphaerodione (1) (schéma 7.7), l'effet mésomère favorise l'addition en position 8 pour deux structures de résonance (m et n) et en position 9 pour la troisième (o). Les structures m et n affaiblissent le caractère carbonyle en position 9, donnant comparativement un caractère plus positif au carbone en position 8. De plus, l'effet électro-attracteur du groupe méthoxy en position 7, contribue à rendre l'atome de carbone en position 8 plus positif que celui en position 9. L'empêchement stérique induit par la chélation du groupement carbonyle en position 9 avec le groupe hydroxyle en position 10 renforce encore la prédominance de la réaction en position 8.

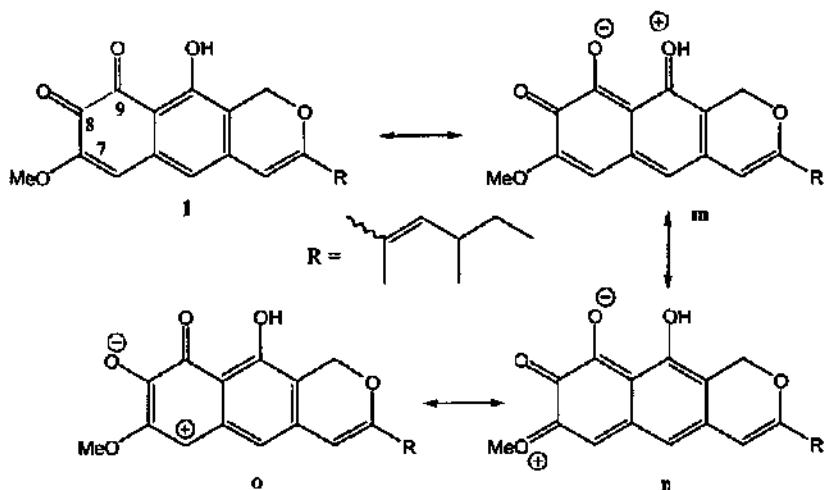


Schéma 7.7 : structures de résonance des groupements carbonyles de la leptosphaerodione (m, n et o).

On trouve, dans la littérature plusieurs exemples de réactions d'aldolisation de composés *ortho*-quinoniques avec l'acétone ou d'autres cétones méthyliques. On peut citer le cas de la cyclohexan-1,2-dione en présence de carbonate de potassium, qui réagit avec l'acétone, la butan-2-one ou l'acétophénone pour donner les produits d'aldolisation correspondants [173].

Un autre exemple est le coenzyme PQQ (pyrroloquinoline quinone cofactor) ou methoxatine (p, figure 7.3) qui réagit également avec l'acétone. L'addition nucléophile sur un des carbones carbonyles de la quinone représente une étape clef dans les réactions redox du PQQ avec les amines [174], les acides aminés [174], les hydrazines [174, 175] ou les thiols [176, 177]. Sa capacité à réagir avec les amines permet de le considérer comme le cofacteur organique de nombreuses oxydases d'amines, déhydrogénases bactériennes d'amines méthylées, et oxydases d'amines méthylées [178]. Des études récentes sur le mode d'action des tels enzymes ont permis de prendre en compte leur structure *ortho*-quinoïque et, par la même, d'obtenir de nombreuses informations sur la structure de leurs sites actifs [178].

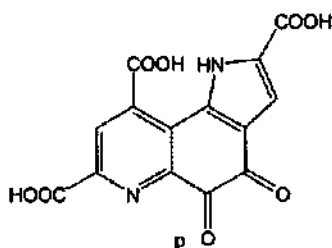


Figure 7.3 : coenzyme PQQ ou methoxatine (p).

L'activité du PQQ n'est pas uniquement due à la présence de la fonction *ortho*-quinoïque. Il a été démontré que les cycles adjacents (pyridine et pyrrole) et leurs substituants, jouent un rôle essentiel dans l'efficacité du PQQ dans la catalyse basique de l'oxydation des amines *in vitro* [179, 180]. L'évaluation des propriétés catalytiques de divers dérivés synthétiques du PQQ est examinée par comparaison de la réactivité de leurs fonctions *ortho*-quinoïques envers l'acétone [179, 180].

D'autres cofacteurs, tels que le TTQ (Tryptophane Tryptophyl Quinone) et le LTQ (Lysine Tyrosyl Quinone), présentent des propriétés catalytiques envers l'oxydation des amines. Ces deux coenzymes possèdent également une fonction *ortho*-quinoïque, ce qui conforte l'hypothèse du rôle important joué par celle-ci dans la catalyse de l'oxydation des amines [181].

Réactivité de la fonction hémiacétal

La méthoxyleptosphaerodione (3) et l'éthoxyleptosphaerodione (4) sont des artefacts issus de la réaction spontanée du leptosphaerodione lactol (20) avec le méthanol, respectivement l'éthanol. La réactivité de la fonction hémiacétale de 20 est décrite au paragraphe 3.2.3.

Réaction de la leptosphaerodione (1) avec le DDQ

La synthèse par oxydation de la leptosphaerodione (1) à l'aide de DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone) a permis de confirmer la structure de la 1-méthoxyleptosphaerodione (3) (voir paragraphe 3.2.3).

Cette réaction implique l'arrachement d'un hydrure en position 1, catalysé par le DDQ, pour former un intermédiaire quinoïde. Il se produit tout d'abord, un transfert d'hydrure sur un oxygène quinoïde du DDQ, suivi du transfert d'un proton à l'ion phénolate [182] (schéma 7.9). L'intermédiaire quinoïde ainsi obtenu, peut ensuite dimériser, polymériser [183, 184] ou être trappé par addition de méthanol ou d'éthanol [182-185], pour finalement donner les dérivés 1-méthoxy- (3) et la 1-éthoxyleptosphaerodione (4) respectivement.

La réactivité de l'intermédiaire quinoïde, explique l'obtention d'un mélange complexe de produits lorsque la réaction est réalisée en l'absence d'alcool (paragraphe 3.2.3).

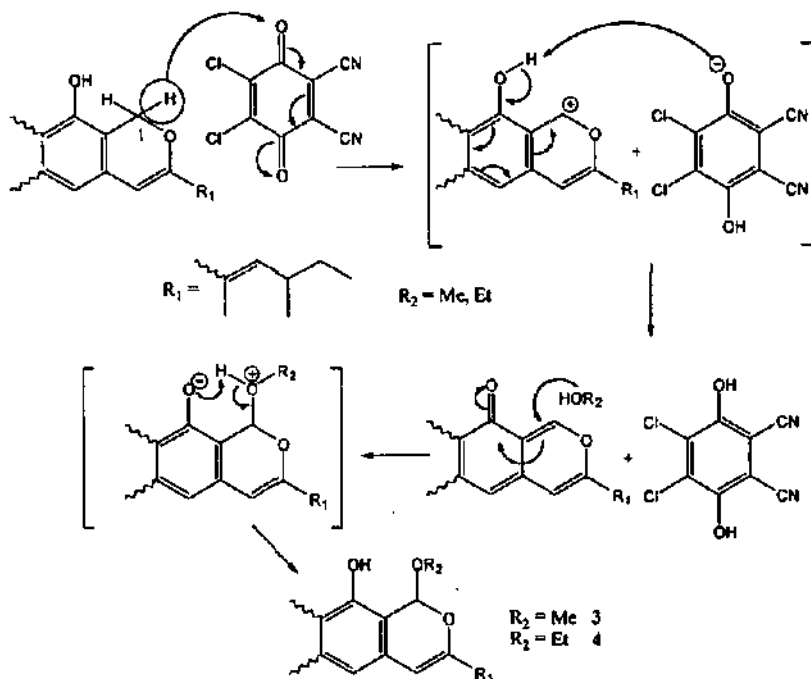


Schéma 7.9 : mécanisme supposé de la réaction de la leptosphaerodione (1) avec le DDQ [182-185].

7.1.2.2 Biosynthèse

Guerriero et al. [70], suggèrent une voie dérivant d'un nonacétide (q) pour la biosynthèse leptosphaerodione (1), via des condensations intramoléculaires suivies d'oxydations et de réductions (schéma 7.10).

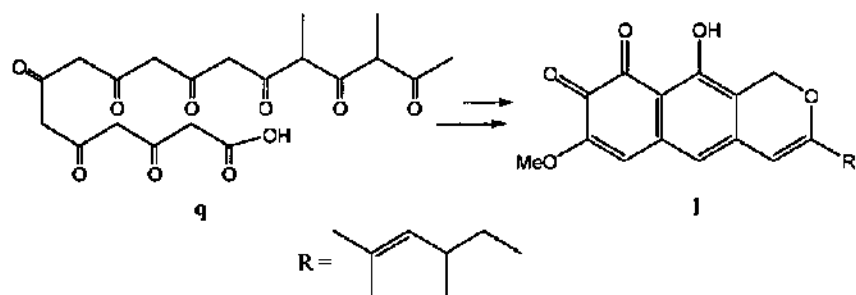


Schéma 7.10 : voie biosynthétique polycétidique menant à la leptosphaerodione (1), [70].

Une voie biosynthétique valable pour la leptosphaerodione (1) et le leptosphaerodione lactol (20) peut toutefois être proposée, par analogie avec des composés voisins décrits dans la littérature (schéma 7.11). L'anhydrofusarubine (w) [186] et l'anhydrofusarubine lactol (v) [100, 187, 188] isolés du champignon pathogène *Nectria haematococca* Berk. et Br. (Wr.), remplissent ces critères, et ont fait l'objet d'études biosynthétiques approfondies.

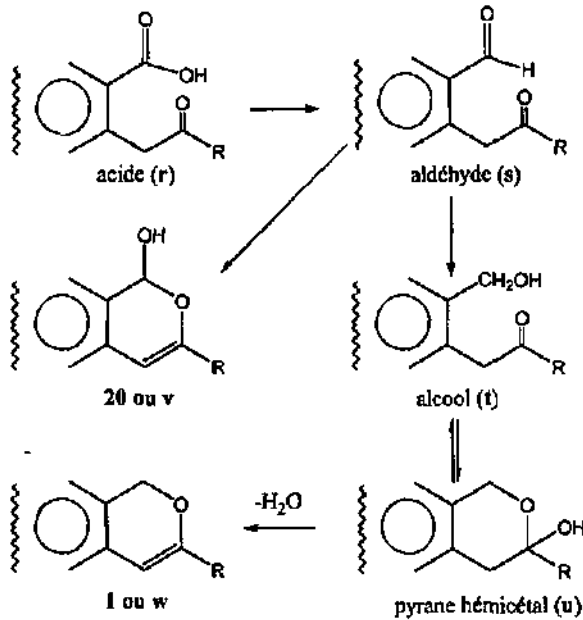


Schéma 7.11 : voie biosynthétique possible pour la leptosphaerodione (1) et le leptosphaerodione lactol (20), par analogie avec les postulations pour v et w de Parisot *et al.* [100, 186-188].

Le précurseur commun est l'acide fusarubinoïque (r) [186]. Il dérive lui-même d'une voie polycétidique (heptacétidique pour l'anhydrofusarubine et nonacétidique pour la leptosphaerodione, schéma 7.10). Cet acide est ensuite réduit en l'aldéhyde correspondant (s) [100, 187]. Ce dernier peut alors former le cycle γ -pyrone [186-189] pour donner le lactol correspondant (anhydrofusarubine lactol (v) ou leptosphaerodione lactol (20)). Cette addition d'un aldéhyde sur l'énol pour donner le lactol correspondant, constitue une étape clef de la biosynthèse des pigments de type γ -pyrone [187]. Une réduction supplémentaire de la fonction aldéhyde (s) conduit à l'alcool correspondant (t) [186], forme ouverte du pyrane hémiacétalique (u) qui ensuite subit une déshydratation pour donner l'anhydrofusarubine (w) et la leptosphaerodione (1) respectivement [186].

L'étude du milieu de culture du champignon *Nectria haematococca* a montré que l'anhydrofusarubine lactol (v) apparaissait très tôt dans le milieu de culture du champignon, bien avant l'anhydrofusarubine (w) [100] Cette observation appui la voie biosynthétique proposée au schéma 7.11.

Une autre analogie, inspirée de la postulation de *Van Heerden et al.* [102], sur la biosynthèse du fasciculiferine lactol, laisse penser que le leptosphaerodione lactol (**20**) aurait une origine biogénétique via un intermédiaire quinoïque dérivé de la leptosphaerodione (**1**). Un mécanisme oxydatif (schéma 7.12) présentant un intermédiaire analogue à celui obtenu lors de la synthèse avec le DDQ (schéma 7.9) serait impliqué.

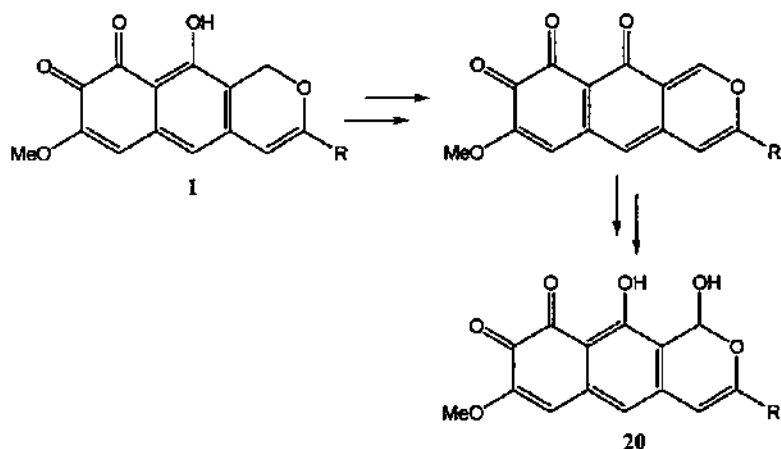


Schéma 7.12 : possible origine biosynthétique du leptosphaerodione lactol (**20**) à partir de la leptosphaerodione (**1**), par analogie avec la proposition de *Van Heerden et al.* [102].

L'isolement de nombreux intermédiaires ainsi que les nombreux travaux menés sur la biosynthèse des métabolites isolés du champignon *Nectria haematococca* [100, 186-188], laissent prévaloir la première analogie (schéma 7.11) par rapport à la postulation de *Van Heerden et al.* [102].

7.1.3 Naphtalénones

Les naphthalénones et tout particulièrement la scytalone (**11**) et la vermelone (**5**), constituent des intermédiaires clés dans la biosynthèse de la mélanine fongique [74, 190-193]. Il s'agit d'un pigment polymérique noir produit notamment dans les parois des spores [91, 193]. Il joue un rôle protecteur pour les microorganismes en les protégeant contre le rayonnement

UV et contre la dessiccation (il est très hydrosoluble) [91]. Il est issu d'une voie biosynthétique pentacétidique [74, 190] présentée au schéma 7.13. Des études biosynthétiques à l'aide de précurseurs marqués ([1-¹³C]-, [2-¹³C]-, [1,2-¹³C₂]- et [2-²H₃]-acétates), ont confirmé l'origine pentacétidique de la scytalone (11) [194, 195].

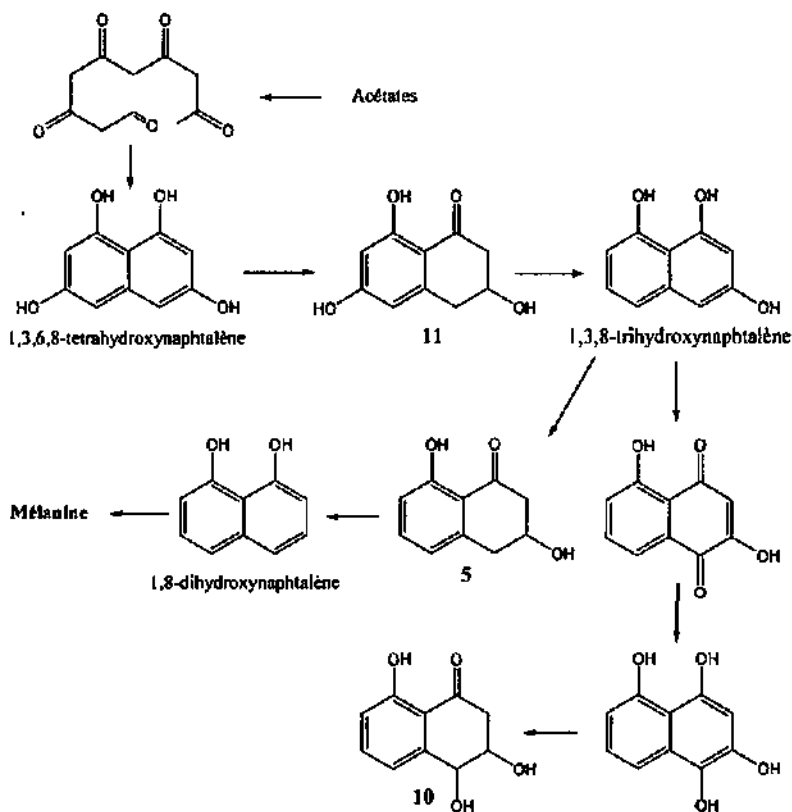


Schéma 7.13 : voie pentacétidique menant à la biosynthèse de la mélanine [91, 190].

Certaines naphtalénone ne sont pas issues de la voie biosynthétique directe mais proviennent de déviation, suite à des modifications enzymatiques sur l'un au l'autre des intermédiaires biogénétiques [91]. C'est le cas de 10, qui dérive du 1,3,8-trihydroxynaphtalène (schéma 7.13). Ce genre de composés

n'est pas nécessaire à la mélanisation. Ils s'accumulent dans le milieu ou sont convertis en d'autres dérivés. Les relations biogénétiques entre les diverses naphthalénone et la voie biosynthétique directe menant à la mélanine a fait l'objet de plusieurs travaux menés sur des souches fongiques mutantes mélanodéficientes [190, 191, 193, 196, 197].

7.1.4 Isocoumarines

Le terme isocoumarine correspond au nom trivial du composé parent 1*H*-2-benzopyran-1-one (**x**, $R_{1-6} = H$) (figure 7.14) qui constitue le modèle de base de cette classe de composés. Le composé réduit 3,4-dihydro-1*H*-2-benzopyran-1-one (**y**, $R'_{1-8} = H$) et aussi le parent de nombreux dérivés de ce groupe.

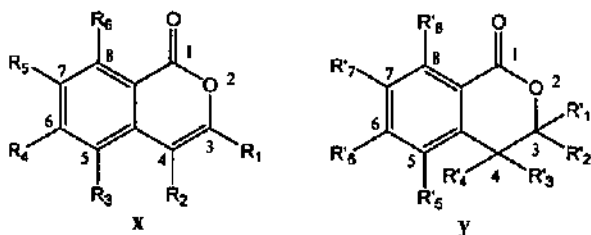


Figure 7.14: 1*H*-2-benzopyran-1-one (**x**, $R_{1-6} = H$) et 3,4-dihydro-1*H*-2-benzopyran-1-one (**y**, $R'_{1-8} = H$) composés parents des isocoumarines.

Les isocoumarines naturelles dérivent principalement du métabolisme secondaire de plantes et de microorganismes (champignons, bactéries, lichens). On trouve aussi des exemples parmi les phéromones d'insectes ou les venins de serpents [197, 198]. Leur synthèse a fait l'objet de recherches en raison de leur intérêt en qualité d'agent actif (voir chapitre 5.2.4), mais aussi dans le but de confirmer leurs structures, ou d'obtenir des intermédiaires dans la synthèse d'autres types de composés. Plusieurs revues ont été publiées à ce sujet. La première, publiée par Barry [198], remonte à 1964. La plus récente, publiée par Napolitano date, à notre connaissance, de 1997 [199]. Elle regroupe de nombreuses références et exemples sur de multiples travaux antérieurs.

Les isocoumarines peuvent être classées d'après la voie de synthèse employée pour les obtenir. On distingue en fait deux classes principales : les composés pour lesquels la structure carbonée est obtenue à partir d'un

précurseur où le cycle aromatique est déjà formé, et ceux pour lesquels ce dernier n'est formé que dans la dernière étape de synthèse du squelette carboné [199]. Les isocoumarines naturelles sont, quant à elles, réparties en trois groupes principaux, celles dérivées de :

- 1*H*-2-benzopyran-1-one (x)
- 3,4-dihydro-1*H*-2-benzopyran-1-one (y)
- présentant un ou plusieurs cycles additionnels sur la structure de base [135].

7.1.4.1 Biosynthèse

Les cinq isocoumarines (13, 14, 15, 16, 17) isolées dans ce travail sont toutes issues de voies polycétidiques. Les composés 16 et 13 sont connus comme intermédiaires de la biosynthèse de la cytogénine (z), un antibiotique isolé du champignon *Streptovorticillium eurocidium* [200]. L'étude de la biosynthèse de ce dernier, à l'aide d'acétates marqués au ^{14}C , prouve qu'il dérive d'une voie pentacétidique dû à la condensation tête-queue de cinq unités acétate (figure 7.15).

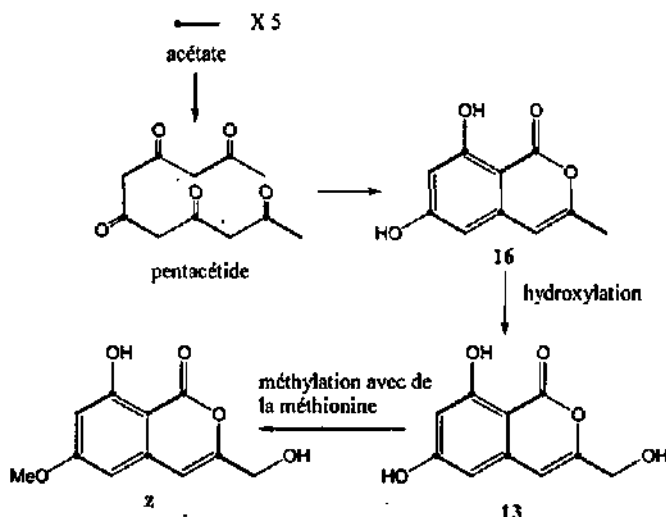


Figure 7.15 : biosynthèse de la cytogénine (z) et de ses intermédiaires 16 et 13 [200].

L'*ortho*-méthyldiaporthine (14) ainsi que l'isocoumarine (15) dérivent d'une voie biogénétique hexacétidique [201] (figure 7.16). La citreoisocoumarine (17) dérive, quant à elle, d'une voie heptacétidique [99] (figure 7.16).

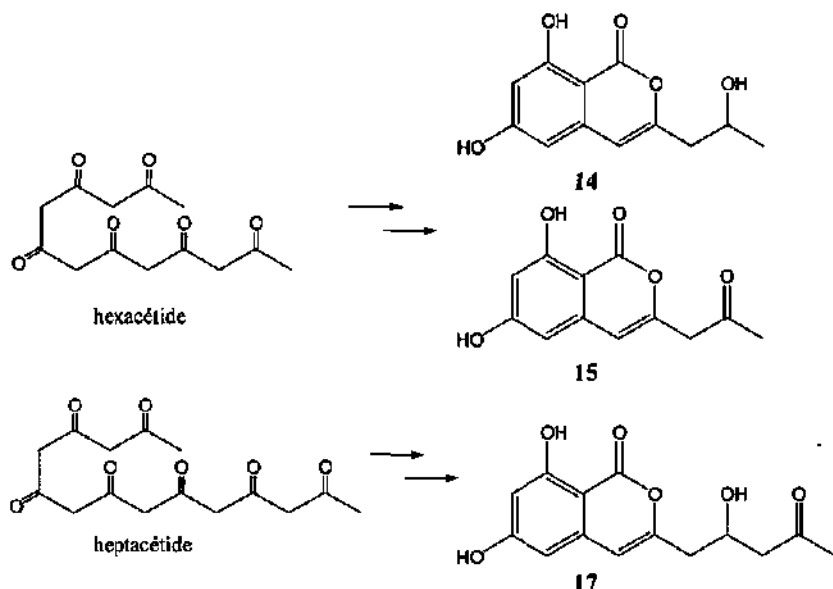


Figure 7.16 : voies hexa- et heptacétidiques des isocoumarines 14, 15 et 17 respectivement [99, 201].

7.1.5 Acide coriolique

Ce composé est connu pour jouer un rôle physiologique au sein des cellules animales et végétales [88]. L'énantiomère 13*S*, isolé de plants de riz (*Oryza sativa* L.) est notamment connu pour être impliqué dans la défense de cette plante contre le champignon *Pyricularia oryzae*, par inhibition de la croissance du pathogène [202]. L'autre énantiomère 13*R*, initialement isolé d'une plante (*Coriola nepalensis* [87]) et nommé acide (+)-coriolique a également été trouvé dans les mitochondries cardiaques [203].

D'autre part, le racémate a récemment montré des facultés à influencer les interactions entre les plaquettes sanguines et les cellules endothéliales. Il pourrait ainsi jouer un rôle important dans le contrôle des thromboses [204].

Ce composé, dont la structure définitive n'a été déterminée qu'en fin de travail, il n'a pas fait l'objet d'étude, par des tests biologiques. Ses éventuelles propriétés envers les liserons restent ainsi inconnues.

On remarque aussi que, d'une part, ce composé est isolé pour la première fois d'un champignon phytopathogène et que, d'autre part, on le retrouve en compagnie de métabolites isolés de *Pyricularia oryzae* (10, 16) [202]. Ces deux remarques soulèvent plusieurs questions quant à sa fonction de phytoalexine du riz (*Oryza sativa* L.). Ces dernières restent toutefois sans réponse dans ce travail.

Sur le plan biosynthétique, l'acide coriolique (9) est issu de l'hydroperoxydation de l'acide linoléique par l'action d'enzymes de type lipoxygénases suivit de la réduction de l'hydroperoxyde (figure 7.17) [88].

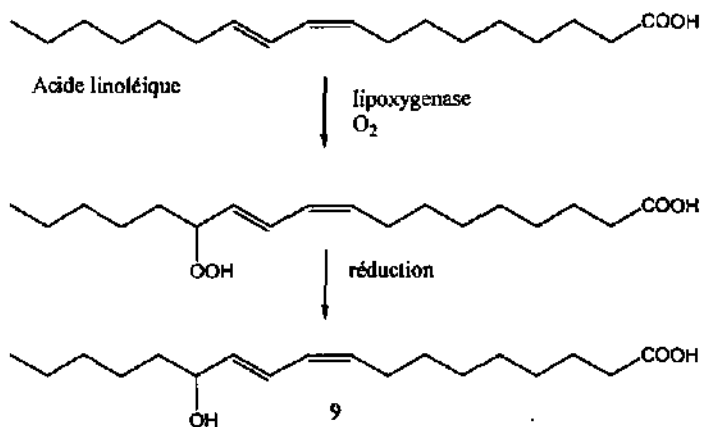


Figure 7.17 : biosynthèse de l'acide coriolique (9).

7.2 Activité biologique

Des quatorze produits naturels isolés dans ce travail, seul trois étaient en quantités suffisantes pour permettre la réalisation de tests biologiques. Les trois molécules testées, la leptosphaerodione (1), la cercosporine (7) et l'elsinochrome A (6) constituent, à chaque fois, le produit majoritaire de l'extrait brut étudié : milieux PDB des souches LA39 et 214 Ca, milieu V8 de LA39, respectivement. Les tests biologiques, réalisés sur la matière végétale, confirment l'activité de ces molécules envers des feuilles et pousses de liseron et/ou des plantules de tomate.

La trop faible solubilité de la leptosphaerodione (1) en milieu aqueux n'a pas permis la réalisation d'un test fiable sur des feuilles ou pousses de liseron. Cependant, un autre test, mené sur des plants de liseron par sprayage de spores du champignon additionnées de solutions de leptosphaerodione (1) de diverses concentrations, permet d'observer une synergie de cette dernière avec les spores. Ainsi une augmentation de la nécrose des feuilles allant jusqu'à 50 % a été enregistrée. L'effet synergique est statistiquement différent pour des concentrations 0.01-0.1 mg/ml en phytotoxine.

La présence de leptosphaerodione (1) dans les spores et non dans les phases aqueuses de la souche LA39 en milieu PDB, laisse penser que cette dernière développe son activité toxique par contact direct avec le matériel végétal. La leptosphaerodione (1) jouerait vraisemblablement un rôle de première ligne. En quelque sorte, elle créerait une brèche dans le matériel végétal permettant ainsi l'implantation de la spore ainsi que son développement. La destruction rapide des cellules végétales constitue une source de nourriture favorisant la croissance du champignon.

Le mode d'action, des deux autres composés, dérivés du perylène (6 et 7), se caractérise par une nécrose rapide des tiges et pétioles. Ainsi ces molécules agissent directement au contact de la matière végétale sans transiter dans la plante. L'hypothèse de la localisation de la cercosporine (7) et de l'elsinochrome A (6) dans les spores, même si elle n'a pas été prouvée, paraît très plausible, leur solubilité en milieu aqueux étant aussi très faible. Ces dernières jouent ainsi, vraisemblablement, un rôle similaire à la leptosphaerodione (1) au contact de la plante.

7.3 Milieux de culture

Les différences observées dans la production de métabolites secondaires entre les cultures de la souche LA39 en milieu PDB et V8, avec la production notamment de leptosphaerodione (1) et d'elsinochrome A (6) respectivement, soulèvent plusieurs questions.

On peut tout d'abord s'intéresser aux capacités d'adaptation du champignon à produire des métabolites très différents. On remarque ainsi qu'une souche, cultivée en milieu solide V8 et renfermant de l'elsinochrome A (6), conduit à la production de leptosphaerodione (1) suite à son inoculation en milieu liquide de PDB. L'extrait ne présente alors plus de trace facilement

décelable d'elsinochrome A. Ces observations impliquent que le champignon possède la faculté de modifier facilement son métabolisme en fonction des éléments nutritifs présents dans le milieu de culture.

Ceci soulève aussi la question de savoir quel rôle joue réellement la composition du milieu de culture en sachant que les molécules en question sont toutes deux issues d'une voie polycétidique. Ce travail ne donne pas de véritable réponse, vu qu'aucune recherche n'a été menée sur la composition des milieux de culture. On peut juste mentionner que le milieu V8 est à base de divers jus de légumes naturels (tomate, carotte, céleri, betterave, persil, laitue, cresson, épinard) alors que le milieu PDB, moins complexe, renferme majoritairement du glucose issu de pommes-de-terre.

Une question de fond ressort des variations observées entre les milieux, testés. Il s'agit de savoir ce qui se passe réellement dans la nature ou l'alimentation du champignon est encore différente et varie en fonction du milieu de développement du champignon. On peut citer d'autres facteurs tout aussi difficile à prendre en compte, tels que les conditions météorologiques, la température et l'ensoleillement. Un début de réponse est apporté par l'étude du matériel végétal, discutée au paragraphe 7.4.

En ce qui concerne l'activité biologique des autres produits isolés des deux souches étudiées, on ne peut pas exclure la présence de synergies entre divers composés ou les rôles divers joués par certains d'entre eux. Pour reprendre l'effet de molécules testées ci-dessus, on peut très bien imaginer que suite à une première attaque des cellules de la plante, d'autres composés interviennent et jouent un rôle différent dans la destruction du végétal.

7.4 Matériel végétal

Les analyses menées en LC/MS sur le matériel végétal ne permettent pas de conclure formellement à la présence de leptosphaerodione (1) ou d'elsinochrome A (6) dans les fractions étudiées. La présence d'un ion typique à $m/z = 355 (M+1)$ donne de bonnes raisons de croire à la présence de 1 dans l'une des fractions étudiées. Cependant, les trop faibles quantités présentes n'ont pas permis la réalisation d'une analyse en MS/MS de manière à confirmer cette hypothèse. L'ion $m/z = 545 (M+1)$, présent dans une autre fraction peut correspondre à la présence de traces d'elsinochrome A (6). Là aussi les faibles quantités à disposition n'ont pas permis une analyse en MS/MS.

Au regard des remarques formulées au paragraphe 7.3 quant à l'adaptation du champignon aux conditions de nutrition, il paraît plutôt étrange d'observer à la fois la présence de leptosphaerodione (1) et d'elsinochrome A (6) dans les extraits de liserons malades. Les spores pour infester les liserons proviennent de cultures du champignon sur milieu solide (agar) à base de V8. On peut ainsi imaginer l'éventuelle présence de spores non germées sur les plants, ces dernières renfermant de l'elsinochrome A (6) produit par le champignon en milieu V8 dans les boîtes de pétri. En se basant sur cette remarque, la présence éventuelle d'elsinochrome A (6) dans les fractions infestées étudiées ne serait qu'un artefact.

En partant de cette hypothèse, la présence de leptosphaerodione (1), serait due à la production, par le champignon, de cette molécule après l'attaque de la matière végétale et l'apport d'éléments nutritifs provenant de la plante. Ainsi les molécules d'elsinochrome A (6) présentes dans les spores sprayées joueraient un rôle lors de l'attaque initiale avant d'être remplacées par les produits métabolisés dans les spores.

Il faut toutefois signaler que les spores ont été préparées dans des conditions artificielles et les tests effectués sous serre avec des plants de liseron cultivés. Il n'est dès lors pas véritablement possible extrapoler nos observations avec ce qui se passe dans la nature.

CHAPITRE VIII

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'analyse du milieu de culture de la souche LA39 du champignon *Stagonospora Convolvuli* a permis d'isoler six métabolites secondaires (1-6) et de postuler d'existence d'un septième (20). Trois de ces composés se sont révélés être des artefacts (2, 3 et 4) résultant de réactions avec des solvants (acétone, méthanol et éthanol) au cours de la procédure de purification. Les molécules 3 et 4 sont nouvelles.

Les composés (18 et 19) ont été synthétisés afin de confirmer la structure ainsi que la réactivité envers l'acétone de la leptosphaerodione (1), le produit majoritairement isolé de cette souche, en milieu PDB.

Onze autres substances (7-17) sont issues de l'analyse de la souche 214 Ca, du champignon *Stagonospora* sp. Parmi celles-ci, on relève l'isolement de deux nouveaux produits naturels, l'un de la famille des naphthalénones (12) et l'autre de celle des isocoumarines (15).

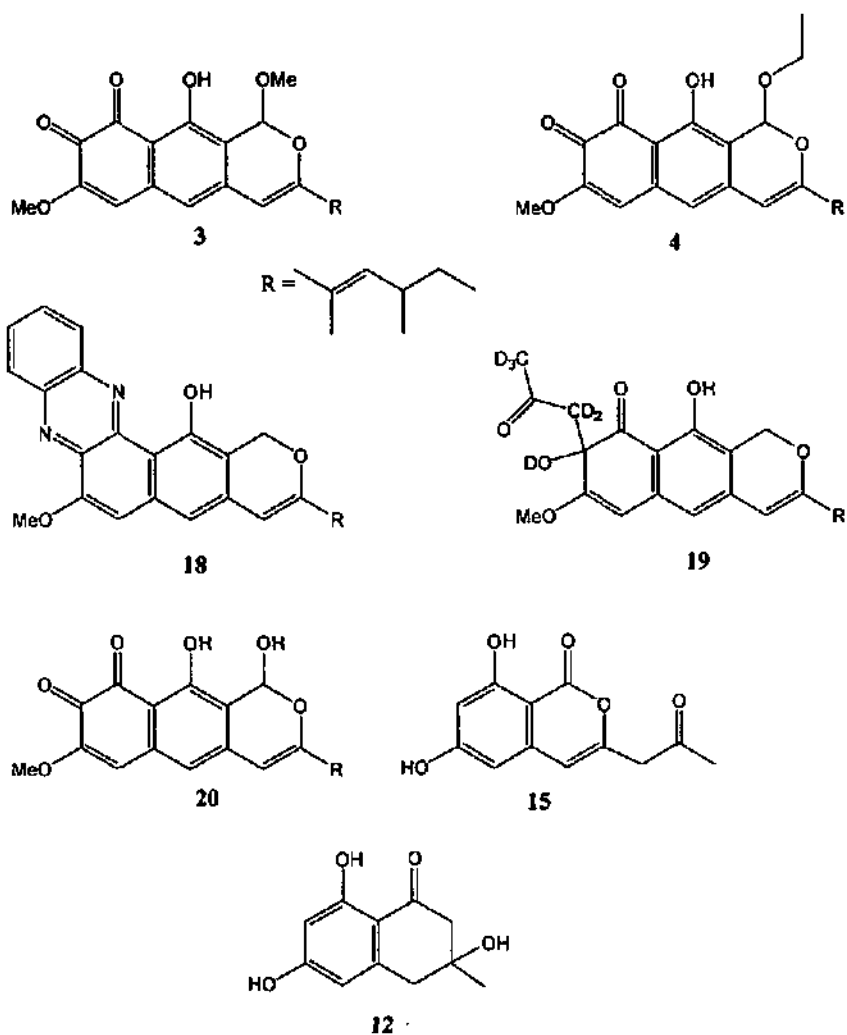


Figure 8.1 : nouveaux composés isolés ou obtenus à partir des souches LA39 (3, 4, 18, 19 et 20) et 214 Ca (12 et 15).

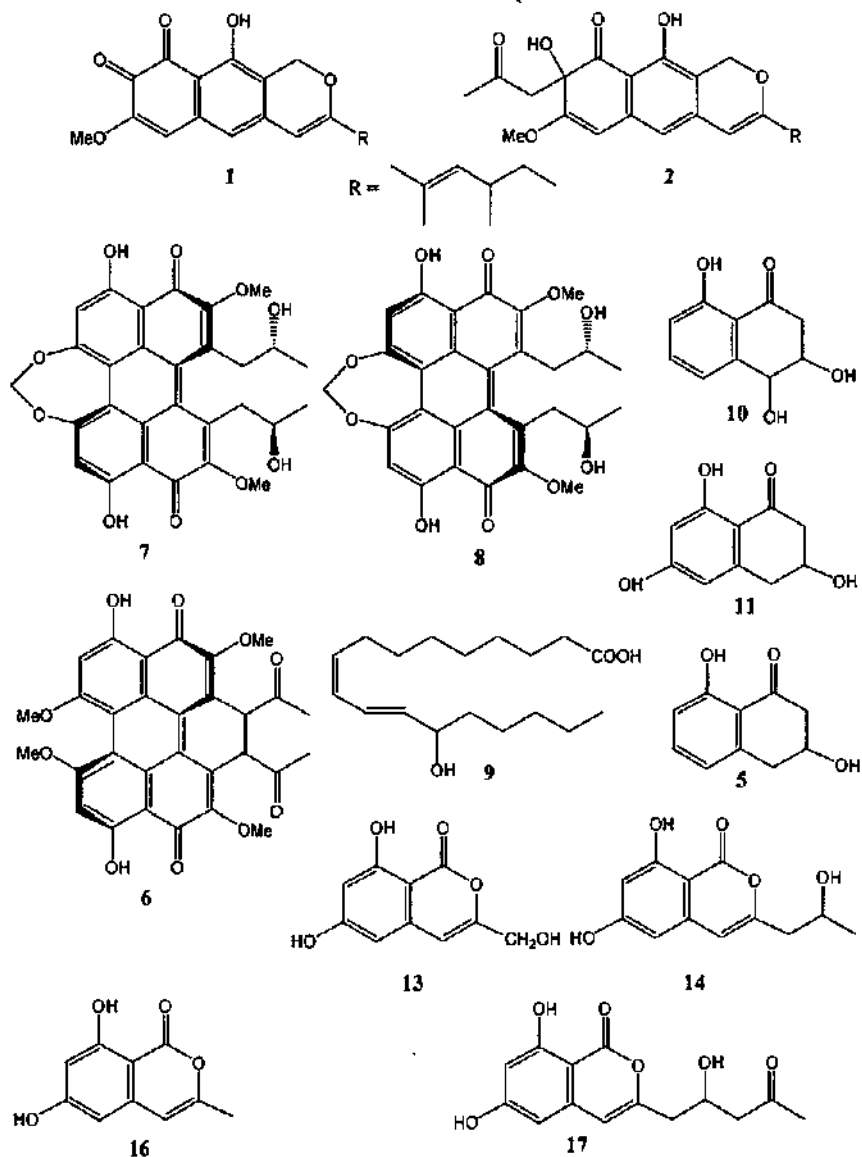


Figure 8.2 : composés connus isolés des souches LA39 (1, 2, 5 et 6) et 214 Ca (7-11, 13, 14, 16 et 17).

La première étape de ce travail consistait en l'isolement et l'identification de métabolites phytotoxiques envers les liserons des champs et des haies engendrés par deux souches d'un champignon du genre *Stagonospora*. Les 20 molécules obtenues sont présentées aux figures 8.1 et 8.2.

La seconde étape visait à évaluer l'activité biologique de certaines d'entre elles. Trois composés ont pu être testés (1, 6 et 7) sur du matériel végétal. Tous présentent une activité biologique marquée envers des feuilles et pousses de liseron des champs (*Convolvulus arvensis*) et/ou des plantules de tomates. En particulier, la synergie entre la leptosphaerodione (1) et des spores de la souche LA39 a été prouvée sur des plants de liseron des champs.

Après l'isolement, l'identification, puis la mise en évidence ou la confirmation de l'activité biologique de certains composés isolés, l'étape suivante a été la recherche de ces derniers au sein du matériel végétal infesté. L'utilisation de la LC/MS aura permis de révéler la présence de leptosphaerodione (1) et probablement d'elsinochrome A (6), sous forme de traces, dans deux des fractions étudiées.

Ce travail a aussi révélé les risques inhérents à la procédure d'extraction, d'isolement et d'identification de métabolites naturels. Les réactions observées avec des solvants usuels (acétone, méthanol et éthanol) démontrent clairement que certains composés, une fois séparés de leurs matrices végétales, peuvent conduire à la formation d'artefacts. De telles réactions ne sont malheureusement pas toujours faciles à mettre en évidence ce qui augmente le risque de méprises.

L'analyse du matériel végétal sain en LC/MS n'a pas été effectuée. Elle aurait présenté l'avantage de pouvoir comparer les deux sortes d'extraits. Celle-ci aurait, peut-être, permis la mise en évidence de la présence d'éventuelles phytoalexines, produites par la plante en réponse à l'attaque fongique, ou l'identification d'autres métabolites générés par le champignon suite à son développement au dépend de la plante.

Un autre enseignement tiré est le rôle essentiel du milieu nutritif sur le métabolisme du champignon. Ce constat impose une grande prudence lors de l'interprétation de résultats issus d'investigations menées sur un milieu artificiel, plus ou moins conforme au naturel.

Une étude plus poussée de la composition de ces milieux et de leurs rôles dans le métabolisme du champignon représenterait une suite logique au présent travail.

La mise au point d'un milieu mixte PDB-V8 pourrait constituer le point de départ d'une telle recherche. Une autre voie consisterait en la définition d'un milieu de culture se rapprochant au mieux des conditions naturelles.

Le développement d'un milieu nutritif à même de permettre la mise au point d'un mycoherbicide efficace contre le liseron passe par la connaissance de son rôle dans la production de métabolites actifs par le pathogène. Il s'agirait de favoriser la production de phytotoxines suffisamment actives afin d'optimiser au maximum « l'attaque initiale » et donc faciliter aussi l'action du pathogène sur la plante.

CHAPITRE IX

PARTIE EXPERIMENTALE

9.1 Techniques expérimentales

9.1.1 Généralités

Les solvants utilisés pour l'extraction, la solubilisation des échantillons et la chromatographie sur colonne (hexane, toluène, AcOEt, chloroforme, méthanol, éthanol, acétone) sont de qualité technique. Avant usage, ils ont été purifiés par distillation sur colonne vigreux.

La provenance et la pureté des produits commerciaux utilisés dans ce travail sont rapportées dans le tableau 9.1.

Tableau 9.1 : provenance et pureté des principaux réactifs et produits utilisés dans ce travail.

Produit	Provenance	Pureté
1,2-phénylènediamine	Fluka	purum
acétone	Fluka	puriss
2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ)	Fluka	purum
CaCO ₃	Siegfried	
Saccharose	Fluka	> 98 %
Asparagine	Fluka	> 99 %
KH ₂ PO ₄	Fluka	puriss
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Fluka	purum
NaCl	Fluka	purum
Sable	Fluka	purum

9.1.2 Chromatographie sur colonne

Toutes les chromatographies sur colonne 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 sur une colonne en verre de 20 x 300 mm et les purifications subséquentes des fractions sur des colonnes en verre de 10 x 150-300 mm. L'extrait à purifier a été solubilisé dans un solvant, additionné d'un peu de silice, puis il a été éliminé. Ceci a permis de déposer l'extrait sous forme sèche en tête de colonne. L'ajout d'une couche de sable d'environ 1 cm a servi à protéger la silice lors de l'adjonction de solvant d'éluion.

9.1.3 HPLC

Les extraits et fractions analysés par HPLC ont été préalablement filtrés sur des précolonnes RP-18 de type Supelclean (LC-18 SPE, 3 ml, Supelco, Bellefonte, USA), en utilisant du méthanol comme éluant.

Les analyses en HPLC ont été réalisées sur un appareil de type HP 1050 (Hewlett-Packard) couplé à un détecteur à barrettes de diodes (DAD) HP 1040A. Une colonne analytique en phase inverse RP-18 (Nucleosil 100-7-C18 (7 μ m), 250 x 4.6 mm, Bischoff, Leonberg, D), munie d'une précolonne (Nucleosil 100-7-C18 (7 μ m), 20 x 4 mm) a été employée.

Les solvants utilisés ont été filtrés préalablement sur membrane Millipore nylon 66 (0.45 μ m x 47 mm, Supelco, Bellefonte, USA), et dégazés en continu à l'hélium (Carbagas, CH). Les phases mobiles (acétonitrile et méthanol) étaient de qualité HPLC et provenaient des maisons Fluka AG (Buchs, CH) et Maechler AG (Reinach, CH) respectivement. De l'eau bidistillée a été utilisée.

Les temps de rétention des différents composés isolés correspondent aux conditions du programme standard d'analyse ci-dessous. Le débit était de 1.2 ml/min et la quantité injectée de 20 μ l.

CH ₃ CN (%)	H ₂ O (%)	Temps (Min)
70	30	0
70	30	5
50	50	10
80	20	15

9.1.4 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres ¹H-RMN, ¹³C-RMN, COSY 45, DEPT 135, HETCOR SR, COLOC ainsi que les découplages ont été effectués sur un spectromètre Bruker AMX-400 (400 MHz). Les solvants deutérés utilisés étaient le CDCl₃, le méthanol-d₄ et l'acétone-d₆ provenant de Cambridge Isotope Laboratories Inc. (CIL, Andover, USA). Le pic du solvant a servi de référence : 7.26 ppm pour le CDCl₃, 2.04 ppm pour l'acétone-d₆ et 3.4 ppm pour le méthanol-d₄. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm. La multiplicité des signaux est désignée par les abréviations suivantes : s = singulet, d = doublet, m = multiplet, q = quadruplet, dd = doublet de doublet, dt = doublet de triplet, dq = doublet de quadruplet, ddd = doublet de doublet de doublet. On a observé des systèmes d'ordres supérieurs de type AB, ABX et ABXCD. Tous les échantillons ont été solubilisés dans un minimum de solvant deutéré et filtrés sur de l'ouate.

9.1.5 Spectrométrie de masse

9.1.5.1 Modes EI et DCI

Les spectres de masse ont été réalisés sur un triple quadrupôle Delsi-Nermag R30-10, en mode EI ou DCI. Dans le deuxième cas, l'échantillon était déposé sur un filament de tungstène chauffé à plus de 600 °C en quelques secondes. Le gaz utilisé était l'ammoniac.

9.1.5.2 Haute résolution

Le poids moléculaire de la cercosporine (7) a été déterminé au moyen de la spectrométrie de masse à haute résolution (Bruker) équipée d'une source ESI. La détection a été réalisée en mode positif.

9.1.5.3 LC/MS

L'appareil utilisé était un LCQ Finnigan couplé à un système HPLC Hewlett-Packard, HP 1100. La source, de type ESI, fonctionnait à pression atmosphérique.

Le flux HPLC était de 1 ml/min, mais seul 10 %, soit 100 µl/min pénétraient dans la source. La détection a été réalisée en mode positif, à l'aide d'un tampon d'acide formique 10 % dans l'eau à raison de 3 µl/min. Le pourcentage effectif en acide formique était de 0.3 %.

Le type de colonne et les conditions HPLC étaient identiques à ceux utilisés pour l'analyse des extraits fongiques. Le volume d'échantillon injecté était 20 µl, ce qui correspond à une concentration d'environ 1 mg/ml d'extrait végétal dans le méthanol. Certains échantillons ont été préparés à des concentrations supérieures.

9.1.6 Spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouges ont été réalisés au moyen d'un appareil Perkin-Elmer FT-IR 1720X, en milieu de KBr et enregistrés de 4000 à 400 cm⁻¹.

9.2 Cultures fongiques

9.2.1 Milieux de culture

Les milieux de culture ont été préparés par portions de 5 litres dans de grands récipients. La solution a ensuite été répartie dans des erlemeyers de 500 ml à raison d'environ 300 ml par flacon. Ces derniers étaient munis d'une chicane en verre permettant à la fois une meilleure agitation et une meilleure oxygénation du milieu. Les flacons étaient fermés à l'aide de bouchons d'ouate, surmontés d'une feuille d'aluminium, puis autoclavés à 121°C pendant 15 minutes. Le papier d'aluminium a permis d'éviter que l'humidité imbibe l'ouate. Il était enlevé juste après l'autoclavage.

9.2.2 Inoculation

Le champignon a été inoculé dans le milieu liquide sous flux laminaire. Le col des flacons ainsi que les ustensiles utilisés pour l'inoculation ont été passés à la flamme afin d'être stérilisés. L'inoculum cultivés sur milieu de PDA (Potato Dextrose Agar), a été découpé à l'emporte-pièce afin d'obtenir des pastilles d'agar d'un diamètre d'environ 1 cm. Les trois pastilles inoculées dans chaque flacon ont été prélevées dans des endroits différents de la boîte de pétri.

Les erlenmeyers ont ensuite été agités à 120 tours/min, sur un appareil d'agitation de type Lab-Shaker (A. Kühner AG, Basel, CH), à la lumière du jour et à température ambiante (18-25 °C) pendant trois semaines.

9.2.3 Extraction

Après trois semaines de culture, le milieu liquide était filtré sur Büchner, à l'aide d'un papier filtre. Cette opération a permis de séparer le mycélium des phases aqueuses tout en laissant passer une majorité des spores. Une technique de filtration spéciale, décrite au paragraphe 4.4, a été utilisée lors de la détection de la leptosphaerodione (1) dans les spores.

L'ajout de NaCl aux phases aqueuses a servi à limiter la formation d'émulsion. Ces phases ont ensuite été extraites plusieurs fois à l'aide d'AcOEt. La présence de spores dans la phase aqueuse a conduit à la formation d'émulsions. Ces dernières ont été mises à part puis filtrées sur büchner afin d'éliminer les amalgames de spores à l'origine de ce phénomène. Les différentes phases organiques obtenues ont été réunies puis évaporées à sec.

Le mycélium a été extrait à l'aide d'un dispositif d'agitation mécanique, a près avoir ajouté environ 500 ml d'AcOEt. Le tout a été laissé sous agitation dans un bécher pendant une heure. Le mycélium a ensuite été filtré sur bûchner de manière à récupérer les phases organiques. Cette extraction a été répétée plusieurs fois.

9.3 Tests biologiques

9.3.1 Matériel végétal

Des plants de liseron de champs (*Convolvulus arvensis*) et de liseron de haies (*Calystegia sepium*), destinés aux tests sur feuilles et sur pousses, ont été cultivés en pots à partir de graines traitées de manières à obtenir une meilleure germination. Les graines de liserons ont été pregermées par trempage une heure dans H_2SO_4 concentré, filtrées sur un filtre en porcelaine, lavées avec de l'eau bidistillée stérile et rincées avec de l'eau de javel 5 % puis du H_2O_2 10 %. Elles ont finalement été rincées avec de l'eau bidistillée stérile puis déposées sur un milieu agar-eau pendant 2 jours à l'obscurité [20]. Le traitement des graines a été effectué à l'ETHZ de Zürich [56]. Les graines de liseron de champs utilisées appartenaient à l'écotype USA et provenaient de Valley Seed Service (Fresno, USA). Quant aux graines de liseron des haies, elles provenaient de Zürich. Les cultures ont été effectuées dans les serres du jardin botanique de l'Université de Neuchâtel, au Vallon de l'Ermitage à Neuchâtel. Les feuilles et les pousses nécessaires aux tests, ont été prélevées à l'aide d'un cutter juste avant leur réalisation et transportées dans de l'eau.

Les plantules de tomates utilisées dans ce travail étaient issues de graines de la variété Bonny-Best (Mauser, Winterthur, CH), cultivées au Jardin Botanique de l'Université. Les tests ont été effectués avec des plantules ne présentant que les deux cotylédons et mesurant entre 5 et 7 cm, mais présentant deux feuilles en plus des cotylédons dans le cas des essais avec l'elsinochrome A (6).

Les tests biologiques sur les plants de liserons ont été effectués à l'ETHZ de Zürich [56]. Dans ce cas, les graines pregermées étaient plantées dans des pots remplis avec un mélange constitué de trois mesures de terreau pour horticulture pour une de sable de quartz. Les pots étaient placés en serre à 70 % d'humidité relative, avec 16 heures de lumière à 22 °C et 8 heures de nuit à 17 °C. Les plantes étaient maintenues dans ces conditions jusqu'à ce qu'elles présentent 5 à 7 feuilles [20].

9.3.2 Procédure

9.3.2.1 Tests sur feuilles, pousses et plantules

Les extraits bruts, les fractions et les produits à tester ont été solubilisés dans un minimum d'éthanol. De l'eau désionisée a ensuite été ajoutée de manière à obtenir un pourcentage d'éthanol entre 2 et 3 %. Les concentrations des extraits ont varié mais dans la fourchette de 0.5 à 2 mg/ml. Lors des tests effectués sur les produits purs, d'importants problèmes de solubilité avec la cercosporine (7) et surtout la leptosphaerodione (1) ont été rencontrés, ce qui a empêché la détermination précise des concentrations. Pour chaque test, des échantillons de contrôle étaient préparés, ils renfermaient des solutions aqueuses contenant 2 à 3 % d'éthanol, suivant les cas. Les observations n'étaient que visuelles et concernaient l'état du limbe des feuilles ainsi que des pétioles et tiges. Elles étaient quotidiennement. Les tests duraient de trois à cinq jours.

9.4 Etude du matériel végétal

Des tiges et feuilles de liseron des champs (*C. arvensis*) ont été employées dans l'étude du matériel végétal. Les plants étaient infestés par la souche LA39 du champignon *Stagonospora convolvuli*. Des plants sains de liseron des champs servaient de références.

Les plants étaient élevés en serre, pendant un mois. L'infestation par la souche LA39 a été réalisée par sprayage d'une solution huileuse de spores (10^7 spores/ml) produites en milieu solide V8. Ils étaient ensuite laissés à 20 °C et 70 % d'humidité pendant deux semaines.

Les feuilles et tiges étaient récoltées, séchées sous presse pendant deux jours, puis conservées au congélateur à - 18 °C. La préparation des échantillons a été réalisée à Zürich [56]. Avant l'extraction, les échantillons étaient tout d'abord plongés dans de l'azote liquide avant d'être pilées dans un mortier, de manière à obtenir une fine poudre.

De l'acétate d'éthyle était ajouté à cette poudre, puis laissé sous agitation mécanique pendant une heure. Une filtration a permis de récupérer les phases organiques. L'extraction était répétée plusieurs fois. La même procédure a été appliquée pour les tiges et feuilles saines et infestées.

CHAPITRE X

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J.-B. Molin, Flore Poétique Ancienne, 1856, Ed J.-B. Baillière, Paris, 31-2.
- [2] S. Burgos, Effet d'un Semis de Trèfle Violet (*Trifolium partense*) et d'un Champignon pathogène (*Stagonospora* sp.) sur le Liseron (*Calystegia sepium*), Travail de Diplôme, ETH Zürich, 1996.
- [3] N. Fellay, Interaction entre des Herbicides et l'Agent de Lutte Biologique *Stagonospora* sp. sur Différents Types de Liserons, Travail de Diplôme, ETH Zürich, 1996.
- [4] J. Maillet, *Phytoma – Défense de Cultures*, 1988, 399, 11-15.
- [5] H. Correvon, Fleurs des Champs et des Bois, Delachaux et Niestlé, Neuchâtel, 127.
- [6] Chateaubriand, Révolutions anciennes, Chap. XIII, 12.

- [7] E. Gadeceau, *Fleurs des Moissons et des Cuhures*, 1914, P. Lechevalier, Paris, 7 et 76.
- [8] G. Bonnier, *Flore Complète Illustrée en Couleurs de France, Suisse et Belgique*, Librairie Générale de l'Enseignement, Editeur E. Orlhac, Paris, *Tome 12*, 125-7.
- [9] F.G. Todd, F.R. Stermitz, P. Schultheis, A.P. Knight, J. Traub-Dargatz, *Phytochem.*, 1995, 39/2, 301-3.
- [10] W.C. Evans, A. Somanabandhu, *Phytochem.*, 1974, 13, 519-20.
- [11] D. Tepfer, A. Goldmann, N. Pamboukdjian, M. Maille, A. Lepingle, D. Chevalier, J. Dénarié, C. Rosenberg, *J. of Bacteriol.*, 1988, 1153-61.
- [12] P.-H. Ducrot, J.Y. Lallemand, *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31/27, 3879-82.
- [13] A. Goldmann, M.-L. Milat, P.-H. Ducrot, J.-Y. Lallemand, M. Maille, A. Lepingle, I. Charpin, D. Tepfer, *Phytochem.*, 1990, 29/7, 2125-7.
- [14] A. Goldmann, B. Message, D. Tepfer, R.J. Molyneux, O. Duclos, F.-D. Boyer, Y.T. Pan, A.D. Elbein, *J. Nat. Prod.*, 1996, 59, 1137-42.
- [15] L.G. Holm, *et al.*, *Convolvulus arvensis* L., *The World Worst Weeds*, Honolulu, Hawaii, University Press of Hawaii, 1977, 98-103.
- [16] F.L. Timmons, *Agronomy J.*, 1949, 130-3.
- [17] A. Van Ast, J.M. Van Groenendael, *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 1993, 58/3a, 973-81.
- [18] D.F. Farr, G.F. Bill, G.P. Chamuris, A.Y. Rossman, *Fungi on Plants and Plant Products in the United States*, 1989, St Paul, MN : APS Press
- [19] D. Schroeder, H. Mueller-Schaerer, C.S.A. Stinson, *Weed Research*, 1993, 33, 449-58.
- [20] F. Marquis, *Amélioration de l'Efficacité de l'Agent de Lutte Biologique Stagonospora convolvuli*, Souche LA39 contre le Liseron des Champs, Travail de Diplôme, ETH Zürich, 1998.

- [21] G. Tamaki H.R. Moffitt, J.E. Turner, *Environ. Entomol.*, 1975, 4/2, 274-6.
- [22] J.M. Feldmann, O. Gracia, *Phytopath. Z.*, 1977, 90, 87-90.
- [23] H.-U. Ammon, Proc. *EWRS Symposium, Economic Weed Control*, 1986, 371-8.
- [24] F.L. Timmons, *Weed Science*, 1970, 18, 294-306.
- [25] P. Westra, P. Chapman, P.W. Stahlman, S.D. Miller, P.K. Fay, *Weed Technol.*, 1992, 6, 949-55.
- [26] M.G. Schönhals, A.F. Wiese, M.L. Wood, *Weed Technol.*, 1990, 4, 771-5.
- [27] L.A. Derscheid, J.F. Stritzke, W.G. Wright, *Weed Sci.*, 1970, 18/5, 590-6.
- [28] D.G. Swan, *Weed Sci.*, 1982, 30/5, 4776-80.
- [29] A.F. Wiese, B.W. Bean, C.D. Salisbury, M.G. Schönhals, S. Amosson, *Weed Sci.*, 1997, 45, 288-95.
- [30] D. Ulrich, Etude pour la développement d'un mycoherbicide contre le lieron des champs (*Convolvulus arvensis*), Travail de Diplôme, ETH Zürich, 1987.
- [31] K. Hurlle, *Integrated Pest Management Reviews*, 1997, 2/2, 87-9.
- [32] A.K. Watson, *Weeds*, 1989, 3, 64-73.
- [33] H. Müller-Schärer, P.C. Scheepens, *Integrated Pest Management Reviews*, 1997, 2/2, 45-50.
- [34] G. Durrieu, S. Hasan, *Cryptogamie Mycol.*, 1992, 13/3, 149-57.
- [35] J.M. Cullen, P.F. Kable, M. Catt, *Nature*, 1973, 244/17, 462-4.
- [36] J.M. Cullen, Proc. VI Int. Symp. Biol. Contr. Weeds, 1985, Ed. E.S. Agric. Can., Vancouver, Canada, 145-52.

- [37] H.A. Pflirter, G. Défago, *Bio. Sci. and Technol.*, 1998, 8, 93-101.
- [38] D.W. French, D.B. Schroeder, *Forest Science*, 1969, 15/2, 198-203.
- [39] J.T. Daniel, G.E. Templeton, R.J. Smith Jr., W.T. Fox, *Weed Science*, 1973, 21/4, 303-7.
- [40] D.O. TeBeest, G.E. Templeton, *Plant Disease*, 1985, 69/1, 6-10.
- [41] H. Müller-Schärer, J. Frantzen, *Weed Research*, 1996, 36, 483-91.
- [42] J. Frentzen, P.E. Hatcher, *Integrated Pest Management Reviews*, 1997, 2/2, 77-85.
- [43] M.P. Parrella, L.T. Kok, *Entomol. Soc. Am.*, 1978, 7/6, 803-6.
- [44] R. Wang, L.T. Kok, *Environ. Entomol.*, 1986, 15/4, 834-8.
- [45] S.S. Rosenthal, N. Hostettler, *Entomophaga*, 1980, 25/4, 381-8.
- [46] P.W. Tipping, G. Campobasso, *Weed Technol.*, 1997, 11, 731-3.
- [47] P.E. Boldt, R. Sobhian, *Environ. Entomol.*, 1993, 22/1, 234-7.
- [48] C. Craemer, *African Entomol.*, 1995, 3/2, 213-5.
- [49] D.K. Heiny, *Mycotaxon.*, 1990, XXXVI/2, 457-71.
- [50] D.K. Heiny, *Phytopathol.*, 1991, 81/8, 905-9.
- [51] J. Ormeno-Nunez, R.D. Reeleder, A.K. Watson, *Plant Disease*, 1988, 72/4, 338-42.
- [52] J. Ormeno-Nunez, R.D. Reeleder, A.K. Watson, *Can. J. Bot.*, 1988, 66, 2228-33.
- [53] L. Morin, A.K. Watson, R.D. Reeleder, *Weed Science*, 1989, 37, 830-5.
- [54] S. Vogelgsang, A.K. Watson, K. Hurle, *Z. PflKrankh. PflSchutz*, 1994, XIV, 253-60.

- [55] Y. S. Tsantrizos, K. K. Ogilvie, A.K. Watson, *Can. J. Chem.*, **1992**, *70*, 2276-84.
- [56] G. Défago, H.A. Pfirter, D. Guntli, F. Marquis, Action COST 816, Institut für Phytomedizin/Pathologie, ETH Zürich.
- [57] H.A. Pfirter, H.-U. Ammon, D. Guntli, M.P. Greaves, G. Défago, *Integrated Pest Management Reviews*, **1997**, *2/2*, 61-9.
- [58] H.A. Pfirter, The potential of *Stagonospora convolvuli* as a Mycoherbicide for field bindweed, Thèse de doctorat, ETH Zürich, **1999**.
- [59] G.J. Cunnell, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **1957**, *40/4*, 443-55.
- [60] D. Schaffner, Untersuchungen zur Entwicklung eines Mykoherbizides gegen *Calystegia sepium* L., Diplomarbeit, ETHZ Zürich, **1989**.
- [61] H.L. Barnett, B.B. Hunter, *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4^{ième} édition, Macmillan Publishing Company, New York, 180-1.
- [62] F. Marquis, Etude de l'Extrait Brut de la Toxine Produite par *Stagonospora convolvuli* Souche LA39 sur le Liseron des Champs (*Convolvulus arvensis*), Travail de Semestre, ETH Zürich, **1998**.
- [63] J. Sachse, *J. of Chromato.*, **1992**, *609*, 349-53.
- [64] M. Devys, J.-F. Bousquet, A. Kollmann, M. Barbier, *Compt. Rend. Acad. Sc. Paris*, **1978**, *286/C*, 457-8.
- [65] M. Devys, M. Barbier, A. Kollmann, J.-F. Bousquet, *Phytochem.*, **1992**, *31/12*, 4393-4.
- [66] M. Devys, J.-F. Bousquet, A. Kollmann, M. Barbier, *Phytochem.*, **1980**, *19*, 2221-2.
- [67] M. Devys, M. Barbier, J.-F. Bousquet, A. Kollmann, *Phytochem.*, **1994**, *35/3*, 825-6.
- [68] R.E. Schwartz, G.L. Helms, E.A. Bolessa, K.E. Wilson, R.A. Giacobbe, J.S. Tkacz, G.F. Bills, J.M. Liesch, D.L. Zink, J.E. Curotto, B. Pramanik, J.C. Onishi, *Tetrahedron*, **1994**, *50/6*, 1675-86.

- [69] P.H.M. Harrison, D.W. Hugues, R.W. Riddoch, *Chem. Commun.*, **1998**, 273-4.
- [70] A. Guerriero, M. D'Ambrosio, V. Cuomo, F. Pietra, *Helv. Chim. Acta*, **1991**, *74*, 1445-50.
- [71] H. Seto, M. Tanabe, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, *8*, 651-4.
- [72] E. Yoshida, H. Fujimoto, M. Baba, M. Yamazaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **1995**, *43/8*, 1307-10.
- [73] G.K. Poch, J.B. Gloer, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30/27*, 3483-6.
- [74] R.D. Stipanovic, A.A. Bell, *J. Org. Chem.*, **1976**, *41/14*, 2468-9.
- [75] G. Gremaud, *Nat. Prod. Lett.*, **1994**, *4*, 95-103.
- [76] G. Gremaud, Isolement et Identification de Métabolites Secondaires de *Ceratocystis Fimbriata* var. *Coffea*, Champignon parasite du caféier, Thèse de Doctorat, Université de Neuchâtel, **1994**.
- [77] G. Gremaud, R. Tabacchi, *Phytochem.*, **1996**, *42/6*, 1547-9.
- [78] U. Weiss, H. Flon, W.C. Burger, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1957**, *69*, 311-19.
- [79] R.J.J.C. Lousberg, C.A. Salemink, U. Weiss, T.J. Batterham, *J. Chem Soc. (C)*, **1969**, 1219-27.
- [80] A. Arnone, L. Merlini, R. Mondelli, G. Nasini, E. Ragg, L. Scaglioni, U. Weiss, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1993**, *2*, 1447-54.
- [81] A. Arnone, L. Merlini, R. Mondelli, G. Nasini, E. Ragg, L. Scaglioni, *Gazz. Chim. Ital.*, **1993**, *123*, 131-6.
- [82] S. Kuyama, T. Tamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79/5*, 5725-6.
- [83] S. Kuyama, T. Tamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79/5*, 5726-9.
- [84] R.J.J.C. Lousberg, U. Weiss, C.A. Salemink, A. Arnone, L. Merlini, G. Nasini, *Chem. Commun.*, **1971**, 1463-4.

- [85] S. Yamazaki, T. Ogawa, *Agric. Biol. Chem.*, 1972, 36, 1707-18.
- [86] R.O. Mumma, F.L. Lukezic, M.G. Kelly, *Phytochem.*, 1973, 12, 917-22.
- [87] W.H. Tallent, J. Harris, I.A. Wolff, R.E. Lundin, *Tetrahedron Lett.*, 1966, 36, 4329-34.
- [88] M. Gargouri, M.D. Legoy, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1997, 74/6, 641-5.
- [89] S. Iwasaki, H. Muro, S. Nozoe, S. Okuda, Z. Sato, *Tetrahedron Lett.*, 1972, 1, 13-16.
- [90] J.A. Findlay, D. Kwan, *Can. J. Chem.* 1973, 51, 1617-19.
- [91] N. Burki, Isolement et Identification de Métabolites Secondaires de *Ceratocystis fimbriata* sp. *Platani*, Agent Pathogène du Platane, Thèse de Doctorat, Université de Neuchâtel, 1996.
- [92] M. Gill, A. Gimenez, A.G. Jhingran, A.F. Smrdel, *Phytochem.*, 1989, 28, 2647.
- [93] M. Gill, A. Gimenez, *Phytochem.*, 1991, 30/3, 951-5.
- [94] G.W. Mc Graw, R.W. Hemingway, *Phytochem.*, 1977, 16, 1315-16.
- [95] Y.F. Hallock, J. Clardy, D.S. Kenfield, G. Strobel, *Phytochem.*, 1988, 27/10, 3123-25.
- [96] A. Ichihara, M. Hashimoto, T. Hirai, I. Takeda, Y. Sasamura, S. Sakamura, R. Sato, A. Tajimi, *Chem. Lett.*, 1989, 1495-8.
- [97] S. Lai, Y. Shizuri, S. Yamamura, K. Kawai, H. Furukawa, *Heterocycles*, 1991, 32/2, 297-305.
- [98] W.A. Ayer, L. M. Browne, M.-C. Feng, H. Orszanska, H. Saeedi-Ghomi, *Can. J. Chem.*, 1986, 64, 904-9.
- [99] A. Watanabe, Y. Ono, I. Fujii, U. Sakawa, M.E. Mayorga, W.E. Timberlake, Y. Ebizuka, *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 7733-6.

- [100] D. Parisot, M. Devys, M. Barbier, *Phytochem.*, **1989**, *28/11*, 3240-1.
- [101] J.H. Tatum, R.A. Baker, R.E. Berry, *Phytochem.* **1989**, *28/1*, 283-4.
- [102] F.R. Van Heerden, E.V. Brandt, D.G. Roux, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *46*, 4507-10.
- [103] F.R. Van Heerden, E.V. Brandt, D. Ferreira, D.G. Roux, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1981**, 2483-90.
- [104] K. Ichinose, J. Kiyono, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, *41/11*, 2015-21.
- [105] E. Viviani, J.P. Vors, M. Gaudry, A. Marquet, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1993**, *130/3*, 395-404.
- [106] C.A. Moustakis, D.K. Weerasinghe, P. Mosset, J.R. Falck, C. Mioskowski, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27/3*, 303-4.
- [107] E. Viviani, M. Gaudry, *Tetrahedron*, **1990**, *46/8*, 2827-34.
- [108] K. Ichinose, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, *37/10*, 2873-5.
- [109] F. Viviani, M. Gaudry, A. Marquet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1990**, 1255-9.
- [110] J.K. Kendall, T.H. Fisher, *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 4218-20.
- [111] G. Read, P. Shu, L.C. Vining, R.H. Haskins, *Can. J. Chem.*, **1959**, *37*, 731-6.
- [112] A.C. Waiss, Jr. R.E. Robert, E. Lundin, A. Lee, J. Corse, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89/24*, 6213-18.
- [113] G.M. Buchan, J.W.A. Findlay, A.B. Turner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1975**, 126-7.
- [114] S.S. Kent, G.A. Ströbel, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **1976**, *67/2*, 354-8.
- [115] L. Morin, A.K. Watson, R.D. Reeleder, *Can. J. Microbiol.*, **1990**, *36*, 86-91.

- [116] L. Morin, *Plant Protection Quaterly*, **1992**, *7/4*, 143-8.
- [117] U. Weiss, L. Merlini, G. Nasini, *Fortschritte des Chemie Organischer Naturstoffe*, **1987**, *52*, 1-71.
- [118] R.A. Clark, T.R. Stephens, E.F. Bowden, M.E. Daub, *J. of Electroanal. Chem.*, **1995**, *389*, 205-8.
- [119] M.E. Daub, M. Ehrenshaft, *Physiol. Plant.*, **1993**, *89*, 227-36.
- [120] Y. Mino, T. Idonuma, R. Sakai, *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **1979**, *45*, 463.
- [121] T. Yoshihara, T. Shimanuki, T. Araki, S. Sakamura, *Agr. Biol. Chem.*, **1975**, *39*, 1683.
- [122] F. Macri, A. Vianello, *Agr. Biol. Chem.*, **1980**, *44*, 2967-70.
- [123] C. Wei-Shin, C. Yuan-Teng, W. Xiang-Yi, E. Friedrichs, H. Puff, E. Breitmaier, *Liebigs Ann. Chem.*, **1981**, 1880.
- [124] J. B. Hudson, V. Imperial, R.P. Haugland, Z. Diwu, *Photochem. Photobiol.*, **1997**, *65/2*, 352-4.
- [125] J.W. Lown, *Can. J. Chem.*, **1997**, *75*, 99-119.
- [126] G. G. Miller, K. Brown, Å.M. Ballangrud, A. Barajas, Z. Xiao, J. Tulip, J.W. Lown, J. M. Leithoff, M.J. Allalunis-Turner, R.D. Mehta, R.B. Moore, *Photochem. Photobiol.*, **1997**, *65/4*, 714-22.
- [127] J.B. Hudson, J. Zhou, J. Chen, L. Harris, L. Yip, G.H.N. Towers, *Photochem. Photobiol.*, **1994**, *60*, 253.
- [128] W.H. Gerwick, W. Fenical, N. Fritsch, J. Clardy, *Tetrahedron lett.*, **1979**, *2*, 145-8.
- [129] H. Sun, W. Fenical, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *8*, 685-8.
- [130] W.H. Gerwick, W. Fenical, *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 22-7.

- [131] M. Chu, R. Mierzwa, I. Truumees, A. King, M. Patel, R. Berrie, A. Hart, N. Butkiewicz, B. DasMahapatra, T.-M. Chan, M.S. Puar, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37/40, 7229-32.
- [132] Y. Jaio, T. Yoshihara, M. Akimoto, A. Ichihara, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1994**, 58/4, 784-5.
- [133] N.A. Valvilova, M.V. Ustinova, T.M. Voinova, N.N. Stepanichenko, L.N. Ten, S.Z. Mukhamedzhanov, V.G. Dzhavakhiya, *Khim. Prir. Soedin., Engl. Trans.*, **1989**, 487-91.
- [134] K. Borgschulte, S. Rebuffat, W. Trowitzsch-Kienast, D. Schomburg, J. Pinon, B. Bodo, *Tetrahedron*, **1991**, 47/39, 8351-60.
- [135] I.-R. Rahman, M. Arfan, G.A. Khan, *J. Chem. Soc. Pak.*, **1998**, 20/1, 76-87.
- [136] T. Furuta, Y. Fukuyama, Y. Asakawa, *Phytochem.*, **1986**, 25/2, 517-20.
- [137] C.M. Kam, K. Fujikawa, J.C. Powers, *Biochem.*, **1988**, 27, 2547-57.
- [138] M. Amin, F. Kurosaki, A. Nishi, *J. Gen. Microbiol.*, **1988**, 134, 241-6.
- [139] M. Yoshikawa, E. Uchida, N. Chatani, H. Kobayashi, H. Haitoh, Y. Okuno, H. Matsuda, J. Yamahara, N. Murakami, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, 40, 3352-4.
- [140] M. Yoshikawa, E. Uchida, N. Chatani, N. Murakami, J. Yamahara, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, 40, 3121-3.
- [141] M. Yoshikawa, H. Matsuda, H. Shimoda, E. Hanada, Y. Naitoh, A. Miki, J. Yamahara, N. Murakami, *Chem. Pharm. Bull.*, **1996**, 44, 1440-7.
- [142] M. Yamazaki, Y. Satoh, Y. Maebayashi, Y. Horie, *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36, 670-5.
- [143] T. Okuno, S. Oikawa, T. Goto, K. Sawai, H. Shirahama, T. Matsumoto, *Agr. Biol. Chem.*, **1986**, 50, 997-1001.
- [144] R.F. Curtis, *Experientia*, **1968**, 24/12, 1187-8.

- [145] K. Kameda, H. Aoki, H. Tanaka, M. Namiki, *Agr. Biol. Chem.*, **1973**, *27/9*, 2137-46.
- [146] J.-L. Wolfender, Investigation Phytochimique et Analyse par Chromatographie Liquide - Spectrométrie de Masse de quatre Espèces du Genre *Chironia* (Gentianaceae), Thèse de Doctorat, Université de Lausanne, 1993.
- [147] S. Rodriguez, Investigation Phytochimique d'Espèces de la famille gentianaceae guidée par chromatographie liquide - spectrométrie de masse/résonance magnétique nucléaire, Thèse de Doctorat, Université de Lausanne, 1997.
- [148] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, Introduction to Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, New York, 1974, 136.
- [149] C.M. Whitehouse, R.N. Dreyer, M. Yamashita, J.B. Fenn, *Anal. Chem.*, **1985**, *57*, 675-9.
- [150] A.T. Blades, et al., *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 2210.
- [151] G.-M. Dubin, Isolement et identification de métabolites secondaires phytotoxiques de *Stereum hirsutum*, un des champignons impliqués dans un maladie de la vigne, l'ESCA, Thèse de Doctorat, Université de Neuchâtel, 1998.
- [152] R. Schöll, C. Seer, R. Weitzenboeck, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1910**, *43*, 2202.
- [153] J. W. Cook, C. L. Hewett, I. Hieger, **1933**, *J. Chem. Soc.*, 396.
- [154] A. Zinke, R. Wenger, *Monatsh. Chem.*, **1930**, *56*, 143 et articles précédents.
- [155] A. Zinke, W. Hirsch, E. Brozek, *Monatsh. Chem.*, **1929**, *51*, 205 .
- [156] A. Calderbank, A.W. Johnson, A.R. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1954**, 1285.
- [157] J.H. Bowie, D.W. Cameron, *J. Chem. Soc. (C)*, **1967**, 704.
- [158] D.W. Cameron, R.I.T. Cromartie, D.G.I. Kingston, L. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 51.

- [159] D.W. Cameron, L. Todd, *Oxidative Coupling of Phenols*, eds. W.I. Taylor and A.R. Battersby, Arnold, London, 1967.
- [160] A. Arnone, L. Camarda, G. Nasini, L. Merlini, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1985, 1387.
- [161] U. Weiss, H. Ziffer, T.J. Batterham, M. Blumer, W.H.L. Hackeng, H. Copier, C.A. Salemink, *Canad. J. Microbiol.*, 1965, 11, 57-66.
- [162] S.V. Meille, L. Malpezzi, G. Allegra, G. Nasini, U. Weiss, *Acta Crystallogr., Sect. C, Cryst. Struct. Commun.*, 1989, 45, 628-32.
- [163] H.J. Mebius, H. Krabbendam, J.M. Duisenberg, *Acta Crystallogr., Sect. C, Cryst. Struct. Commun.*, 1990, 46, 267-71.
- [164] G. Nasini, L. Merlini, G.D. Andreotti, G. Bocelli, P. Sgarabotto, *Tetrahedron*, 1982, 38, 2787-96.
- [165] D. Mentzafos, A. Terzis, S.E. Filippakis, *Cryst. Struct. Commun.*, 1982, 11, 71.
- [166] D.C. Allport, J.D. Bu'Lock, *J. Chem. Soc.*, 1958, 4090-94.
- [167] D.C. Allport, J. D. Bu'Lock, *J. Chem. Soc.*, 1960, 654-62.
- [168] C.-T. Chen, K. Nakanishi, S. Natori, *Chem. Pharm. Bull.*, 1966, 14, 1434-9.
- [169] A. Okubo, S. Yamazaki, K. Fuwa, *Agr. Biol. Chem.*, 1975, 39, 1173-5.
- [170] F.A. Japp, F.W. Streatfeild, *J. Chem. Soc.*, 1882, 41, 270-7.
- [171] R. Magnusson, *Acta Chem. Scand.*, 1958, 12/4, 791-2.
- [172] R. Magnusson, *Acta Chem. Scand.*, 1960, 14/7, 1643-53.
- [173] G.M. Strunz, C.-M. Yu, *Can. J. Chem.*, 1988, 66, 1981-3.
- [174] Y. Ohshiro, S. Itoh, *Bioorg. Chem.*, 1991, 19, 169-89.

- [175] M. Mure, K. Nii, T. Inoue, S. Itoh, Y. Ohshiro, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1990**, 315-20.
- [176] S. Itoh, N. Kato, Y. Ohshiro, T. Agawa, *Chem. Lett.*, **1985**, 135-6.
- [177] S. Itoh, N. Kato, M. Mure, Y. Ohshiro, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1987**, *60*, 420-2.
- [178] S. Itoh, M. Mure, M. Ogino, Y. Ohshiro, *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 6857-65.
- [179] S. Itoh, Y. Fukui, M. Ogino, S. Haranou, M. Komatsu, Y. Ohshiro, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 2788-93.
- [180] S. Itoh, Y. Fukui, S. Haranou, M. Ogino, M. Komatsu, Y. Ohshiro, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 4452-7.
- [181] K. Kano, M. Nakagawa, K. Takagi, T. Ikeda, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1997**, 1111-9.
- [182] J. March, *Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure*, **1992**, 4^{ème} édition, John Wiley & Sons, New York, 1163.
- [183] A.B. Turner, *Quater. Rev.*, **1964**, *8*, 347-60.
- [184] G.M. Buchan, J.W.A. Findlay, A.B. Turner, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1975**, 126-7.
- [185] J.W.A. Findlay, A.B. Turner, *J. Chem. Soc. (C)*, **1971**, 23-9.
- [186] D. Parisot, M. Devys, M. Barbier, *Phytochem.*, **1988**, *27/9*, 3002-4.
- [187] D. Parisot, M. Devys, M. Barbier, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1991**, 2280-1.
- [188] D. Parisot, M. Devys, M. Barbier, *Phytochem.*, **1992**, *31/12*, 4357-8.
- [189] W.B. Turner, D.C. Aldrige, *Fungal Metabolites II*, **1983**, Academic Press, London, 114.
- [190] M.H. Wheeler, R.D. Stipanovic, *Exp. Mycol.*, **1979**, *3*, 340-50.

- [191] L.N. Ten, N.N. Stepanichenko, V.M. Shevtoska, S.Z. Mukhamedzhanov, A.G. Kas'yanenko, O.S. Otroshchenki, *Khim. Prir. Soedin.*, 1980, 3, 393-7.
- [192] A.A. Bell, R.D. Stipanovic, J.E. Puhalla, *Tetrahedron*, 1976, 32, 1353-6.
- [193] A.A. Bell, J.E. Puhalla, W.J. Tolmsoff, R.D. Stipanovic, *Can. J. Microbiol.*, 1976, 22, 787-99.
- [194] D.C. Aldrige, A.B. Davies, M.R. Jackson, W.B. Turner, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1974, 1540-1.
- [195] U. Sankawa, H. Shimada, T. Sato, T. Kinoshita, K. Yamasaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 1981, 29/12, 3536-42.
- [196] A.A. Stierle, R. Upadhyay, J. Hershenhorn, G.A. Strobel, G. Molina, *Experientia*, 1991, 47, 853-9.
- [197] G.A. Greenblatt, M.H. Wheeler, *J. Liq. Chromatog.*, 1986, 9, 971-81.
- [198] R.D. Barry, *Chem. Rev.*, 1964, 64, 229-60.
- [199] E. Napolitano, *Org. Prep. Proc. Int.*, 1997, 29/6, 631-64.
- [200] H. Kumagai, M. Amemiya, H. Naganawa, T. Sawa, M. Ishizuka, T. Takeuchi, *J. of Antibiot.*, 1994, 47/4, 440-6.
- [201] S.I. Sviridov, *Khim. Prir. Soedin.*, 1991, 4, 471-5; *Chem. Nat. Comp. (Engl. Trans.)*, 1991, 27/4, 410-3.
- [202] T. Kato, Y. Yamaguchi, T. Hirano, T. Yokoyama, T. Ugehara, T. Namai, S. Yamanaka, N. Harada, *Chem. Lett.* 1984, 409-12.
- [203] G.A. Blondin, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1975, 264, 98-111.
- [204] C. Chan, P.B. Cox, S.M. Roberts, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1988, 971-2 et références 5 de cet article.