

Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences

**Isolement et identification de
métabolites secondaires de
Ceratocystis fimbriata sp. *platani*, agent
pathogène du platane**

Travail de thèse présenté à la faculté des Sciences par
Nicolas Burki
Chimiste diplômé de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du titre de
Docteur ès Sciences

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Isolement et identification de métabolites secondaires de
Ceratocystis fimbriata sp. platani, agent pathogène
du platane

de M. Nicolas Bürki

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

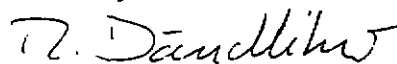
La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

Messieurs R. Tabacchi, R. Neier, J.-P. Métraux (Fribourg)
et A. Panconesi (Florence)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 25 avril 1996

Le doyen:



R. Dändliker

Remerciements

Le travail présenté dans cet ouvrage a été effectué d'octobre 1992 à avril 1996 dans les laboratoires de Chimie Organique Analytique de l'Université de Neuchâtel, sous la conduite de Monsieur le Professeur Raffaele Tabacchi.

Je tiens à le remercier pour m'avoir accueilli dans son groupe, pour la très grande confiance qu'il m'a témoignée et pour la liberté qu'il m'a laissée tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier

Tous les autres membres du jury de thèse (Messieurs les Professeurs R. Neier et J. P. Métraux, le Docteur A. Panconesi) ainsi que le Professeur Aniello Scala pour leur collaboration active dans l'aboutissement de ce travail et pour leurs nombreuses suggestions de recherches.

Tous les membres du groupe pour leur aide et leur constante bonne humeur. Mes remerciements vont tout particulièrement à Michel Monziona, Blaise Nicolet et Guy-Marie Dubin pour leur étroite collaboration dans les tâches d'assistanat.

Le Docteur Abdellatif Fkyerat pour sa participation dans les projets de synthèse et le Docteur Saturnin Claude pour ses conseils en matière de chromatographie.

Monsieur Linh-Lé et le Docteur Gérald Collet de la Station Agronomique Fédérale de Changins pour les cultures de cals et de microboutures de platane indispensables aux tests de toxicité.

Le Docteur Alberto Panconesi du Centro di studio per la Patologia delle specie legnose montane à Florence, pour l'obtention du matériel végétal infecté, et pour ses nombreuses informations relatives au platane et à son agent pathogène.

Monsieur le Professeur C. Gessler de l'ETHZ et la Docteur Maria Matasci-Stanga pour nous avoir fourni les souches tessinoises du pathogène.

Monsieur le Professeur Ivano Morelli de l'Université de Pise pour l'obtention des extraits organiques du matériel végétal étudié.

Monsieur Roland Stettler et ses collaboratrices du Laboratoire des Eaux de la Ville de Neuchâtel pour leurs précieux conseils en matière de cultures fongiques.

Les Docteurs Georges Skouroumounis et Meilleko Dai pour m'avoir si souvent épaulé et guidé dans mes recherches.

Juan-Luis Naveira pour sa participation dans l'élaboration de molécules complexes et pour son aide précieuse dans l'optimisation de conditions analytiques.

Ceux et celles de l'Institut qui, de par leur esprit de recherche et de fête, ont rendu ces trois années de thèse si motivantes et si constructives.

Enfin et surtout ma famille, pour son indispensable soutien dans les moments difficiles.

Abréviations utilisées

Pour des raisons de commodité, les abréviations suivantes ont été systématiquement utilisées tout au long de cet ouvrage :

AcOH	acide acétique
^{13}C -NMR	résonance magnétique nucléaire du carbone
CD	dichroïsme circulaire
COSY	spectre de corrélation ^1H - ^1H
d	doublet
DCI	ionisation chimique directe (NH_3)
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfer
DHP	3,4-dihydro-2H-pyrane
DSS	3-triméthylsilyle-1-propane sulfonate de sodium (anciennement 2,2 diméthyl-2 silapentane-5 sulfonate)
EI	ionisation par impact électronique
ϵ	coefficient d'extinction molaire (relatif)
EtOAc	acétate d'éthyle
EtOH	éthanol
Φ	ellipticité moléculaire [deg cm^{-1} mol $^{-1}$ ml \cdot 10]
GC	chromatographie en phase gazeuse
^1H -NMR	résonance magnétique nucléaire du proton
HETCOR	spectre de corrélation ^{13}C - ^1H
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
IR	infrarouge
LC	chromatographie liquide
LDA	diisopropylamidure de lithium
m	multiplet

m/z	rapport masse sur charge
MeOH	méthanol
MS	spectrométrie de masse
NOE	Nuclear Overhauser Effect
PM	poids moléculaire
q	quadruplet
RP-C18	phase inverse C18
rpm	rotations par minute
s	singulet
t	triplet
TBDMS	tertiobutyl-diméthylsilyle
t-BuOH	tertio-butanol
THF	tétrahydrofurane
THP	tétrahydropyranyle

Table des matières

	page
1. Introduction	1
1.1 Le chancre du platane	1
1.1.1 <i>Ceratocystis fimbriata</i> sp. <i>platani</i> , agent du chancre du platane	1
1.1.2 Aspects géographiques	1
1.1.3 Symptomatologie	2
1.1.4 Modes de pénétration	3
1.1.5 Mesures prophylactiques	3
1.2 Biologie de <i>Ceratocystis fimbriata</i> sp. <i>platani</i>	4
1.3 Résultats antérieurs	6
1.4 But du travail	8
2. Métabolites fongiques : isolement et identification	9
2.1 Souches fongiques	9
2.2 Cultures en milieu liquide et localisation des toxines	11
2.3 Procédure d'isolation des métabolites	15
2.4 Métabolites isolés	15
2.4.1 Métabolites fortement phytotoxiques	18
1) cis et trans 1(2H)-3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphtalénone (3)	18
2) acide p-aminobenzoïque (10)	23
2.4.2 Métabolites faiblement ou modérément phytotoxiques	25
1) cis et trans 1(2H)-3,4 dihydro-3,4,6,8 trihydroxynaphtalénone (2)	25
2) 1(2H)-3,4 dihydro-3,6,8 trihydroxynaphtalénone (4)	29
3) 6,8 dihydroxy-3 hydroxyméthyl-1H-2 benzopyrane-1 one (6)	30
4) 6 méthoxy-8 hydroxy-3 hydroxyméthyl-1H-2 benzopyrane-1 one (7)	32
5) 3S-3 (2'hydroxypropyl)-6,8 dihydroxy-1H-2 benzopyrane-1 one (8)	34
6) 3 méthyl-6 méthoxy-8 hydroxy-1H-2 benzopyrane-1 one (9)	36

2.4.3 Métabolites non phytotoxiques	37
1) Acide 3R-3 hydroxy-3,7 diméthyl-octène-6-oïque (1)	37
2) D-mannitol (5)	41
3) Acide (2E)-3 méthyl-5 hydroxypentène-2-oïque (11)	43
4) Acide orsellinique (12)	45
5) Monoamide de l'acide fumarique (13)	46
2.5 Dégradation de la 1(2H)-3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphtalénone	47
2.5.1 Identification et analyse	47
2.5.2 Etudes cinétiques de la dégradation basique de 3	48
1) Processus monomoléculaire	50
2) Processus bimoléculaire	51
3. Synthèses	58
3.1 Introduction	58
3.2 Schémas réactionnels	58
3.2.1 Acide 3,7 diméthyl-3 hydroxy-octène-6-oïque (racémate)	58
3.2.2 Acide 3R-3,7 diméthyl-3 hydroxy-octène-6-oïque	59
3.2.3 Analogues bromés de la 1(2H) 3,4 dihydro-4,8 dihydroxy naphtalénone et de son dérivé diacétate	61
3.2.4 1(2H) 3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphtalénone	64
3.2.5 2-hydroxyjuglone	64
3.2.6 3-hydroxyjuglone	65
3.2.7 Monoamide de l'acide fumarique	66
3.2.8 D-galactol, D-mannitol et D-allositol hexaacétates	66
4. Tests de toxicité	67
4.1 Test "sur feuille"	67
4.2 Test des pertes de masse	68
4.3 Test sur "carrés de feuilles"	70

5. Etude du matériel végétal	74
5.1 But de l'analyse	74
5.2 Procédure expérimentale	74
5.2.1 Provenance du matériel végétal	74
5.2.2 Extraction	75
5.2.3 Fractionnement	75
5.2.4 Résolution par HPLC	76
5.3 Résultats	76
5.3.1 Détection UV	76
5.3.2 Détection MS	81
6. Discussion	87
6.1 Résumé des résultats	87
6.2 Origine biogénétique des substances actives isolées	88
6.3 Relation biogénétique entre naphthalénone et mélanine	90
6.4 Mécanisme d'action des substances actives isolées	92
6.4.1 Isocoumarines	92
6.4.2 Naphthalénone	92
6.4.3 Acide p-aminobenzoïque	95
6.5 Réalité biologique des métabolites 3, 10 et 14	96
6.6 Relations hôtes-parasite	96
6.7 Validité et sensibilité des tests de toxicité	97
7. Perspectives et conclusions	99

8. Partie expérimentale	103
8.1 Appareillage	103
8.2 Synthèses	103
8.2.1 Synthèse de la 1(2H)-3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphtalénone (3)	103
8.2.2 Synthèse des analogues bromés de la 1(2H) 3,4-dihydro 4,8-dihydroxynaphtalénone et de son diacétate	105
8.2.3 Synthèse de la 2-hydroxyjuglone (14)	106
1) Via la 1(2H)-3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphtalénone	106
2) Via la juglone	107
8.2.4 Synthèse de la 3-hydroxyjuglone	107
8.2.5 Synthèses des D-galactol, D-mannitol et D-allositol hexaacétates	108
8.2.6 Synthèse du monoamide de l'acide fumarique (13)	109
8.2.7 Synthèse de l'acide 3,7 diméthyl-3 hydroxy-octène-6-oïque	109
1) Synthèse du racémate	109
2) Synthèse de l'énantiomère S	110
8.3 Cultures fongiques	112
8.3.1 Obtention des extraits bruts	112
8.3.2 Obtention de la mélanine	113
8.4 Tests de toxicité	113
9. Bibliographie	116

1. Introduction

1.1 Le chancre du platane

1.1.1 *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*, agent du chancre du platane

Décrit depuis près de 50 ans aux Etats-Unis, *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani* est reconnu aujourd'hui comme l'agent pathogène responsable du chancre du platane, une maladie d'origine fongique particulièrement virulente et responsable de la mort de plusieurs milliers d'arbres dans le monde. Son esthétisme, sa résistance naturelle aux diverses pollutions, font du platane un arbre urbain par excellence, très répandu dans les villes du sud de l'Europe. L'incursion d'un parasite aussi infectieux et aussi spécifique que *C. f. sp. platani* pose dès lors un problème de fond aux multiples cités qui en sont pourvues car, de près ou de loin, c'est une bonne part du paysage visuel urbain qui en dépend.

Implanté en Europe depuis près de 4 siècles, le platane compte 10 espèces distinctes : *P. chiapensis*, *P. terrii*, *P. lindeniana*, *P. mexicana*, *P. oaxacana*, *P. racemosa* et *P. wrightii*. Les trois principales sont *P. occidentalis*, *P. orientalis* et *P. acerifolia*, considéré comme un hybride des deux précédents^[1]. Une résistance naturelle, quoique réduite, existe chez *P. occidentalis*, une espèce hélas inaccoutumée aux rigueurs du climat européen^[2].

1.1.2 Aspects géographiques

Décrit la première fois dans les années trente aux Etats-Unis (New-Jersey, Washington), ce parasite a été introduit dans plusieurs ports sud-européens à la fin de la seconde guerre mondiale, à la faveur des échanges commerciaux avec le continent américain.

Longtemps resté stationnaire en Europe, cet agent a connu une progression inquiétante dès les années septante en Italie (Forte dei Marmi, 1971), en France (Marseille, 1974) puis en Espagne (Barcelone, 1974), Belgique et Turquie (1976). Dès 1986, le parasite est également signalé en Suisse^[3] où il reste cantonné aujourd'hui encore sur le versant méridional des Alpes (Tessin). A ce jour, plusieurs milliers de platanes des grands centres urbains ont péri suite à l'infection. Dans certaines villes (Marseille), la contamination touche plus de 13% des arbres, dans d'autres (Entraygues, Vaucluse), ce sont l'intégralité des domaines publics qui ont perdu leur population de platanes.

Encore que mal définie, la propagation est essentiellement due à l'activité humaine, travaux d'entretien des platanes et chantiers sous-jacents favorisant la contamination des souches saines via les ustensiles utilisés. Dans une moindre

mesure, le contact direct entre les racines de deux arbres et la circulation des insectes d'un individu à l'autre s'avèrent également infectieux^[4,5].

1.1.3 Symptomatologie

Durant la première année qui suit la contamination, les symptômes restent très difficilement perceptibles. Dès la deuxième année, une lésion étendue comparable à un hématome apparaît au niveau du tronc ou d'une branche. L'écorce nécrosée vire au brun-rouge, elle se crevasse profondément, se dessèche puis meurt; on ne constate à aucun moment une cicatrisation de l'arbre. Très rapidement, on observe des prolongements noirs vers le haut (1-2 mètres par an) qui accompagnent le dépérissement de nouvelles branches. Le feuillage supérieur reste pour ainsi dire intact aussi longtemps que le cambium n'est pas détruit sur toute la circonférence; ensuite, il se flétrit à son tour, jaunit puis disparaît progressivement :



Fig. 1a Platane chancré (stade terminal).



Fig. 1b Tronc chancré présentant une large surface crevassée.

En moyenne, un platane meurt 3 à 5 ans après sa contamination. Il ne subit de réels dommages que durant les mois de juillet et août de chaque année, c'est-à-dire durant la période la plus chaude de l'an. Dans son stade terminal, l'arbre ne possède plus de feuillage et noircit intégralement.

1.1.4 Modes de pénétration

Ceratocystis fimbriata sp. *platani* ne peut se développer que s'il est mis en contact direct avec des cellules vivantes^[6]. Le parasite déposé sur un lambeau d'écorce saine ne peut s'y implanter ni survivre. A la faveur d'une blessure, il colonise longitudinalement l'écorce et le bois (50 à 100 cm par an) et s'enfonce jusqu'au coeur de l'arbre en suivant les rayons médullaires (7.5 cm par an). De là, sa progression s'étend aux racines, au tronc ou aux branches encore épargnées. Il existe une relation directe entre la progression du parasite et la nécrose observée des tissus cellulaires. Aux dires de certains auteurs^[7], la pourriture du bois ne serait pas induite par le pathogène lui-même, mais par certains organismes secondaires ultérieurement installés dans le bois mort (saprophytes).

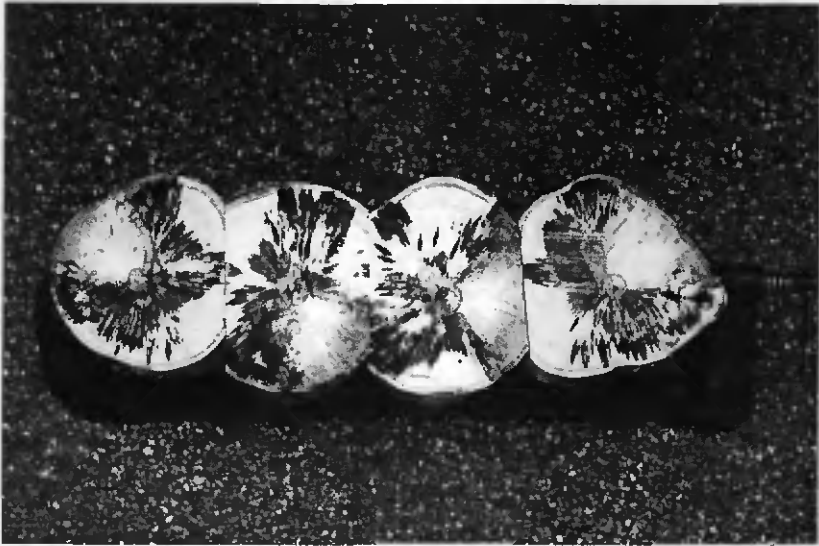


Figure 2 Coupes transversales du tronc d'un platane chancre.

1.1.5 Mesures prophylactiques

Aucun moyen n'existe à ce jour pour enrayer la progression du parasite. Néanmoins, des efforts considérables ont été fournis pour ralentir son avance et limiter le nombre de nouveaux foyers de la maladie. Ces mesures vont dans deux sens :

- 1) l'éradication des foyers infectieux, et
- 2) la sensibilisation du personnel employé dans l'entretien des platanes aux risques inhérents à leur activité.

A plus long terme, des programmes visent à résoudre le problème à la base en créant des platanes résistants à *C. f. sp. platani*, notamment de par l'obtention d'hybrides entre *P. orientalis* (très sensible à l'infection, mais accoutumé aux rigueurs du climat européen) et *P. occidentalis* (certes plus résistant, mais inadapté à notre climat).

1.2 Biologie de *Ceratocystis fimbriata sp. platani*

Ceratocystis fimbriata sp. platani fait partie de la vaste famille des *Ceratocystis*, microorganismes fongiques colonisant divers végétaux répartis dans le monde entier. Sa dénomination repose exclusivement sur des considérations morphologiques, le préfixe *cerato* signifiant "cornu", le suffixe *cystis* évoquant un "sac". La raison en revient à la forme particulière de ses organes de reproduction, les périthèces :

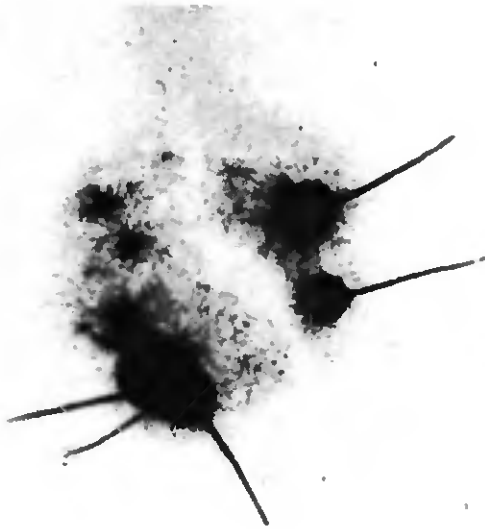


Figure 3 Périthèces

Les *Ceratocystis* comptent une soixantaine d'espèces, parmi lesquelles trente-neuf sont réputées biologiquement actives sur différentes plantes^[8]. On relèvera en particulier *C. ulmi* (attaquant spécifiquement l'orme), *C. minor*, *ips*, *huntii*, et *clavigera* (attaquant le pin), *C. paradoxa* (attaquant l'ananas et la canne à sucre), *C.*

major (attaquant le citronnier) ou *C. coerulescens* et *moniliformis*. A cette famille appartient également le genre *C. fimbriata* Ellis et Hals., décrit pour la première fois en 1890 par Ellis et Halsted^[9], et qui se subdivise à son tour en diverses espèces morphologiquement très semblables, mais très spécifiques de la plante-cible qu'elles affectent^[10]. Parmi celles-ci, on mentionnera l'hévéa, la patate douce, le crotalaire, le caféier, cacaoyer, platane, peuplier, chêne et cocotier^[11].

D'un point de vue biologique, *C. fimbriata* a toutes les caractéristiques d'un champignon, réseau mycélien (hyphes, conides) orné de fructifications (périthèces), à reproduction sporulée^[12]. Celle-ci peut s'accomplir de deux façons différentes :

- la reproduction asexuée : elle survient par divisions cellulaires simples au niveau des hyphes ou des conides (bras mycélien issu d'une aggrégation cellulaire). On distingue les endoconides des chlamydoportes :



Fig. 4a Chlamydoportes sur réseau mycélien

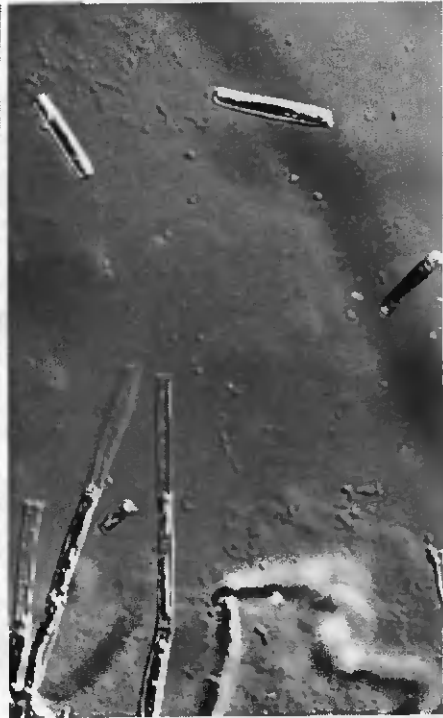


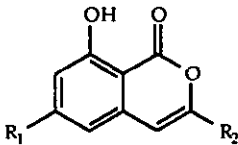
Fig. 4b Endoconides

Les endoconides se présentent sous la forme d'étroits bâtonnets cylindriques ($20 \times 4 \mu\text{m}$) ou encore d'entités pour ainsi dire sphériques ($6 \times 7 \mu\text{m}$). Les chlamydo-spores se présentent toujours sous la forme d'entités sphériques brunâtres (diamètre moyen $10 \mu\text{m}$); leur paroi est plus épaisse, elles coiffent généralement l'extrémité d'un bras du mycélium et - tout comme les endoconides - bourgeonnent à maturité pour donner naissance à une nouvelle génération de conides.

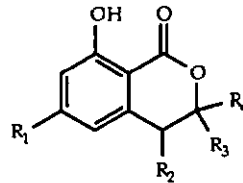
- la reproduction sexuée : elle concerne le périthèce, long fuseau terminé par une masse sphérique couverte d'hyphes. De cette fructification s'échappent les ascospores, cellules mononucléaires ($4-5 \mu\text{m}$) issues de divisions multiples, et finalement d'une fusion nucléaire au sein du périthèce. Ce dernier s'étend extérieurement (croissance et aggrégation des hyphes) au fur et à mesure que sa cavité intérieure se creuse (bourgeoisements et divisions subséquentes). De cette faculté de produire des spores sexuelles à l'intérieur de sacs appelés asques, *Ceratocystis fimbriata* tire son nom d'ascomycète.

1.3 Résultats antérieurs

Sur le plan chimique, de nombreux métabolites ont été isolés du genre *Ceratocystis*; aux côtés des composés volatiles, nous mentionnerons les isocoumarines (I) et 3,4 dihydroisocoumarines (II) sécrétées par *Ceratocystis clavigera*, *ips* et *huntii*^[13,14,15]. Des métabolites similaires ont également été isolés de *C. minor*^[16], *C. ulmi*^[17] et *C. fimbriata*^[18,19,20] :



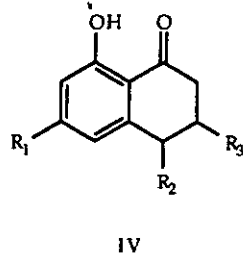
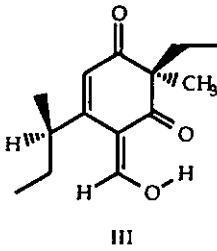
I



II

Ayer et al.^[15] signalent en outre une substance aromatique dénommée ceratenolone (III), un acétonide vraisemblablement impliqué dans la coloration bleue des tissus infectés; la complexation de cette molécule avec des ions ferriques Fe^{3+} forme effectivement un puissant chromophore bleu; les auteurs suggèrent dès lors une altération nuisible de la constitution minérale *in vivo*.

Enfin, Hemingway et al.^[16,21] rapportent quelques naphthalénones (IV) de *C. minor*, principalement scytalone et hydroxyscytalone; ces métabolites entrent comme intermédiaires dans la biosynthèse de la mélanine, un pigment noir jouant un rôle protecteur à l'égard du champignon (§ 6).



Indépendamment des nombreuses études biologiques touchant au parasite *C. fimbriata*, nous mentionnerons quatre travaux récents tout-à-fait représentatifs des recherches entreprises actuellement sur la maladie du chancre du platane. Les deux premiers font partie d'un vaste projet de recherche financé en Suisse et dirigé par le Dr. Cesare Gessler de l'ETH Zürich : il s'agit des travaux de *Sabine Witt*[22] et *Thomas Plattner*[23]. Ces documents s'appuient tous deux sur une hypothèse importante : celle que *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani* produit des métabolites toxiques à l'égard du platane. Sur cette base, ils se sont efforcés d'optimiser les conditions de culture *in vitro* du parasite en regard de sa production de toxine(s). Très vite cependant, les tests de toxicité utilisés se sont avérés inadéquats; peu sensibles, ils manquaient de reproductibilité. T. Plattner et M. S. Wolfe se sont dès lors attachés à développer un test d'activité biologique approprié permettant de quantifier l'activité phytotoxique des divers milieux de culture de *C. fimbriata* sp. *platani*.

Un autre projet concerne les travaux de S. Ake et al. de l'Université de Marseille [24] qui ont mis en évidence la production par le champignon d'une protéine encore non identifiée ("fimbriatan"), de poids moléculaire 15'000, et dont les effets sur le platane reproduisent ceux observés sur les arbres inoculés par le parasite. Cette importante découverte doit être mise en parallèle avec celle de S. Takai [25] en 1974 qui a isolé du milieu de culture de *C. ulmi* une protéine de bas poids moléculaire, reconnue aujourd'hui comme l'agent actif de ce champignon[26]. Néanmoins, concernant la fimbriatan, de troublantes questions restent ouvertes, car certaines manifestations de la maladie ne correspondent pas aux propriétés observées de la protéine. Ainsi les nécroses noires qui accompagnent la progression du parasite dans son hôte ne peuvent pas être dues à cette substance, car elle n'occasionne aucun symptôme analogue sur des cultures de cellules du platane (cals). Aucune mention n'est faite de son aptitude à altérer le feuillage de l'arbre (flétrissement), pourtant considéré comme une des principales caractéristiques de la maladie. De nouvelles études sont actuellement en cours (A. Panconesi, A. Scala, Centro di Studio per la Patologia delle Specie Legnose Montane, Firenze) qui tentent à la fois de quantifier l'action de divers fongicides sur le pathogène, et de dresser un parallèle entre la protéine toxique et les symptômes observés *in vivo*. Ces études devraient pouvoir mettre en

lumière le rôle exact joué par cette protéine dans le développement du chancre du platane.

Le dernier de ces travaux^[2] a trait aux relations hôte-parasite qui surviennent dans l'arbre contaminé. Les auteurs ont constaté que l'inoculation d'une souche modérément sensible de platane (*P. acerifolia*) induit la production de phytoalexines (deux hydroxycoumarines : l'umbelliférone et la scopolétine), molécules organiques généralement fongicides inhibant fortement la croissance mycélienne. Toutefois, cette production survient très tardivement, et surtout elle s'atténue très rapidement après une courte phase exponentielle. Les auteurs mettent ainsi en évidence une source de résistance dans une souche de platane hybride, résultante d'un couplage entre une espèce résistante et une autre qui ne l'est pas.

On relèvera des résistances analogues dans la patate douce^[11]; lors de son inoculation, cette dernière induit la production de phytoalexines (principalement furanoterpènes) qui inhibent fortement la croissance d'autres souches de *Ceratocystis* (souches "incompatibles"). Ces travaux mettent également en valeur des substances d'origine protéinique sécrétées par la plante-hôte, et qui provoquent l'agglutination des spores. Durant cette interaction hôte-parasite, la reconnaissance du parasite est accélérée et l'hôte induit la production massive de phytoalexines.

1.4 But du travail

L'essentiel des travaux postule l'existence d'une ou de plusieurs toxines, sécrétée(s) par le champignon et affectant de façon directe le platane. L'une d'entre elles a par ailleurs déjà été signalée ("fimbriatan"^[24]), elle joue vraisemblablement un rôle important dans le déclin de l'arbre mais son activité n'est à ce jour pas encore quantifiée. Il paraissait donc judicieux de vérifier cette hypothèse en cultivant le champignon dans un milieu adéquat (reconnu pour favoriser la métabolisation de composés phytotoxiques), en isolant ces principes actifs puis en les identifiant. Dans un second temps, la synthèse ou la procuration de ces matériaux nous permettrait de quantifier leur activité, éventuellement de jeter un parallèle avec les symptômes observés sur le platane contaminé. Cette recherche ne se veut pas exhaustive. Il est vraisemblablement plusieurs facteurs qui influencent le développement de la maladie (présence d'un ou de plusieurs agents phytotoxiques, obstruction mécanique des vaisseaux nourriciers par les thylles et hyphes fongiques, colonisation des tissus infectés par d'autres microorganismes ou intervention d'endophytes propres au platane); de ce fait, l'incursion d'une toxine pourrait ne constituer qu'une petite part du problème. Dans notre cas, nous nous sommes aidés d'un symptôme observé sur le platane pour guider notre recherche : l'apparition de surfaces nécrosées sur le bois colonisé par *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*.

2. Métabolites fongiques : Isolement et identification

2.1 Souches fongiques

Trois colonies distinctes de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani* ont été prélevées au Tessin dans la région de Cadenazzo. Leur dénomination sont Md7, prélevée à Madonna del Piano, coordonnées 707.770-93.960; Mulini, prélevée à Boggio sur Preganzona, coordonnées 714.240-95.610 et Curio, prélevée à Curio, coordonnées 709.935-95.835^[27]. Les deux premières concernent des platanes adultes dans un environnement exclusivement rural. Leur âge moyen se monte à respectivement 40 ans (Md7, Madonna del Piano) et 60 ans (Mulini). L'un côtoyait une route cantonale et a probablement été infecté lors de la pose d'une nouvelle ligne électrique à proximité. L'autre était entouré d'un champs cultivé, et sa contamination résulte vraisemblablement des nombreux travaux agricoles attenants. La troisième souche concerne un arbre en milieu citadin (Curio) âgé de 60 à 70 ans, inséré entre une place et la route cantonale. Sa contamination résulte quant à elle des nombreux travaux de soubassement effectués à proximité immédiate.

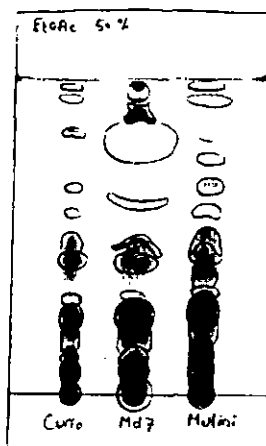


Figure 5 Chromatographie sur couche mince (Kieselgel 60, EtOAc-Hexane 1:1) des trois extraits bruts Curio, Md7 et Mulini.

Les cultures séparées de chacune de ces souches ont systématiquement abouti au même extrait brut, où apparaissent les mêmes métabolites (constatation par chromatographie sur couche mince, Figure 5).

Dans un second temps, nous avons recouru à l'analyse d'une quatrième souche prélevée en Italie (Pietrasanta, Forte dei Marmi) sur le lieu même de la collecte du matériel végétal (chapitre 5). Le but était de vérifier par HPLC l'équivalence du contenu organique de deux souches géographiquement très distinctes (l'une tessinoise, l'autre italienne).

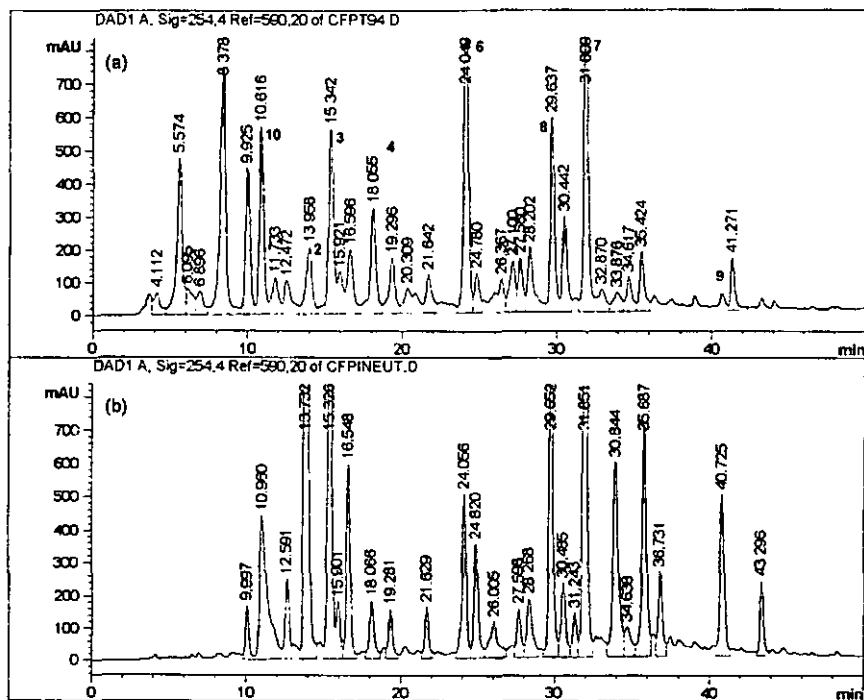


Figure 6 HPLC comparatives (selon programme § 5.3) des deux extraits organiques de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*. Les substances actives recensées sont indiquées conformément à leur numérotation dans cet ouvrage.

(a) Extrait brut de la souche tessinoise Md7

(b) Extrait brut de la souche italienne (Pietrasanta)

Une première divergence est apparue après quelques jours de croissance seulement; alors que les milieux de culture des souches tessinoises demeurent parfaitement inodores, ceux de la souche italienne développent très rapidement une forte et agréable odeur de banane. Ce fait est bien évidemment attribué à une production inégale en composés volatiles (esters carboxyliques simples). Pour la plupart des pics, les chromatogrammes (HPLC, Figure 6) s'avèrent très fortement semblables. On relèvera cependant l'absence de certains termes dans l'un ou l'autre des extraits, notamment les pics à 5.57, 8.38 et 27.10 minutes dans la variété italienne. On constate cependant de très fortes divergences dans l'intensité des différents pics.

Malgré ces quelques variations, nous n'avons pas jugé nécessaire de recourir à deux études séparées du même champignon. Pour des raisons de commodité, nous nous sommes dès lors toujours attachés à l'étude d'une seule de ces souches, la souche Md7 dont la croissance observée sur les milieux gélosés (malt agar) était toujours la plus rapide.

2.2 Cultures en milieu liquide et localisation des toxines

La procédure générale, décrite dans la partie expérimentale, est brièvement résumée ci-après (schéma 1).

A chaque étape de purification, les diverses fractions étaient soumises à un test de toxicité fort simple (décrit au § 4) destiné à localiser les agents toxiques. Les symptômes visuels d'une nécrose des tissus cellulaires (généralement brunissement de tout ou d'une partie des feuilles de microboutures) étaient alors relevés à intervalles réguliers de temps. Non quantitatif, ce test s'est avéré cependant très utile pour orienter les recherches vers les fractions les plus actives; il nous a également permis de classer les métabolites en fonction de leur activité biologique (chapitre 4, Tests de toxicité). Le tableau 1 présente ces quelques observations.

Comme on le constate très rapidement sur ce tableau, l'activité biologique se limite à deux ou trois fractions de polarité moyenne (E, F et G). L'expérience montrera par la suite que ce sont précisément ces fractions qui renferment les métabolites les plus phytotoxiques. Morphologiquement, lorsque les symptômes sont suffisamment conséquents, on observe au microscope optique des nécroses brunes localisées aux intersections du réseau vasculaire. Les cellules mortes apparaissent brunes, tout particulièrement les chloroplastes (habituellement verts) qui couvrent la face intérieure des membranes cellulaires.

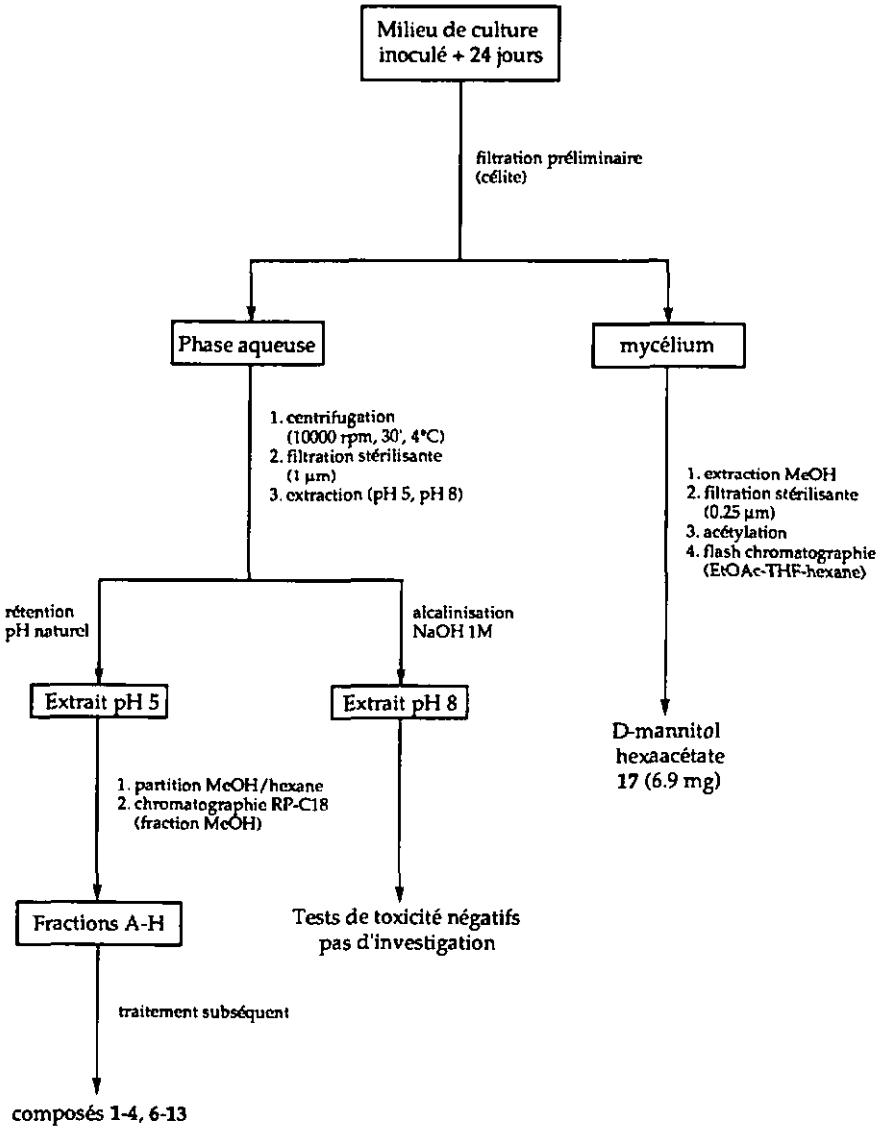


Schéma 1
Procédure générale d'extraction

Tableau 1 Localisation des toxines dans les fractions A à H (fractions classées par ordre de polarité décroissante)

Fraction	set conc. +12 heures	set conc. +20 heures	set conc. +35 heures	set conc. +139 heures	set dilué +139 heures
A	-	-	-	Fbt	fbt
B	-	-	-	N _{tige}	fbt
C	-	fbt	fbt	N _{tige}	-
D	-	fbt	fbt	N _{tige}	fbt
E	fN	fN	fN	FN	fbt
F	Fbt	Fbt/fN	Fbt/fN	FN/†	fbt
G	-	-	fbt	FN/†	-
H	-	-	-	-	-

Description des symptômes observés en fonction du temps; le set concentré se rapporte à des solutions 1 mg/ml des diverses fractions chromatographiques, le set dilué à des solutions 0.2 mg/ml. Tous les essais ont été effectués comparativement à des blancs EtOH 2%. Dans ce tableau, les symboles suivants sont utilisés :

- fbt, Fbt : faible (respectivement fort) brunissement de la tige (essentiellement au niveau de la coupure)
- N_{tige} : Nécroses brunes généralisées sur toutes les parties mentionnées de la plante (en l'occurrence, la tige)
- fN, FN : faibles (respectivement fortes) nécroses ponctuelles visibles sur l'ensemble de la plante
- † : Nécrose totale caractérisée par un brunissement généralisé de la plante

Une autre série de tests particulièrement intéressante a été menée sur les différentes phases issues du milieu de culture de *C. fimbriata* : on a comparé la toxicité relative de l'extrait organique (EO), des phases aqueuses préalablement extraites à l'acétate d'éthyle, puis lyophilisées (PAE) et des phases aqueuses brutes lyophilisées sans traitement préalable (PAB). Dans les deux derniers cas, on obtient un résidu noir amorphe essentiellement constitué de mélanine, qu'on peut dissoudre à nouveau pour obtenir des solutions de concentration définie en PAE et PAB. Les observations figurent dans le tableau suivant :

Tableau 2 Toxicité relative des fractions EO, PAE et PAB

Temps	EO		PAE			PAB		
	1 mg/ml	0.1 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	0.1 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml	0.1 mg/ml
16.5	-	-	Fl, N _{tige}	-	-	Fl, N _{tige}	Fl, fN	-
25	-	-	fbrv	fbt	-	fbrv	Fbrv, fN	-
40.5	fN	-	Fbrv	fbt	-	Fbrv	Fbrv, FN	-
108	FN	Fbt	Fbrv, Fbt	Fbt	-	Fbrv, Fbt	FN, Fbt	-

Tous les tests ont été menés à double comparativement à des blancs EtOH 2%. Les mêmes symboles ont été utilisés qu'au tableau 1; pour affiner la description, mentionnons encore les deux suivants :

Fl : flétrissement de la microbouture; cette manifestation est caractérisée par une perte de consistance de la feuille, voire même par l'apparition de plages translucides.

fbrv, Fbrv : faible (respectivement fort) brunissement du réseau vasculaire (nervures).

Comme les symptômes le montrent, une certaine toxicité est rattachée aux phases aqueuses, même préalablement extraites. Cette activité, bien que plus restreinte (10 mg/ml pour des effets comparables à ceux de l'extrait organique) concerne essentiellement la fraction PAB qui, très logiquement, cumule les effets de EO et PAE.

Néanmoins, une importante remarque doit être faite : vu la très forte concentration des phases aqueuses en mélanine noire, il est très difficile de différencier entre une véritable nécrose et une simple coloration des tissus. Or, les symptômes observés consistent essentiellement en un brunissement du réseau vasculaire, où cheminent habituellement les substances dissoutes pour accéder aux tissus. Il serait donc prématuré de tirer des conclusions quant à la toxicité des phases aqueuses : même le brunissement des tiges - considéré jusqu'alors comme une manifestation typiquement phytotoxique - pourrait n'être dû en réalité qu'à un effet de filtre, les substances polymériques noires de haut poids moléculaire restant fixées à l'embouchure des tiges.

Une brève expérience menée sur des microboutures de platane immergées dans une solution aqueuse de mélanine a montré, à une concentration de 1 mg/ml, un brunissement caractéristique de la tige au-niveau de la coupure, ce qui semblerait étayer l'hypothèse faite ci-dessus. La mélanine noire fut obtenue comme décrit en partie expérimentale (§ 8.3.2).

Néanmoins là encore ce résultat doit être pris avec circonspection, car la pureté de la mélanine obtenue n'a pas pu être certifiée. De plus, les traitements nécessaires à son isolement s'avèrent assez brutaux; on ne peut donc pas exclure une altération de sa constitution à ce niveau.

A l'inverse, la toxicité de l'extrait organique reste une certitude expérimentale que plusieurs essais ont confirmé; un effet de filtre n'est par ailleurs pas envisageable ici, car ces extraits ne contiennent pas de mélanine. Nous nous limiterons donc exclusivement à leur étude.

2.3 Procédure d'isolation des métabolites

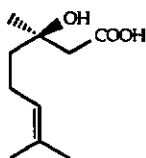
Les différentes fractions décrites en 2) furent ensuite soumises à plusieurs purifications avant d'aboutir aux composés 1 à 13. Le schéma 2 résume ces opérations. Toutes furent menées sur la base d'un extrait brut combiné de masse initiale $m_0 = 627$ mg. Les fractions B et H, qui toutes deux ne manifestaient aucune toxicité particulière, n'ont pas été examinées et ne figurent donc pas dans le schéma. On a enfin procédé à l'analyse de la fraction hexane (schéma 1) en GC/MS pour en identifier les composants volatiles; préalablement filtrée sur SUPELCLEAN® (cartouche de phase inverse) pour éliminer les acides et esters gras, puis directement appliquée en GC, la fraction s'avère contenir les substances suivantes (détection EI, 70 eV) :

butyrate d'isobutyle
6-méthyl-heptane-1-ol
octane-1-ol
tétrahydro-6-propyle- δ H-pyrane-2-one
β -citronellol

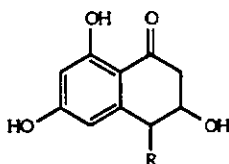
vu leur manque de toxicité, nous n'avons pas approfondi l'analyse de ces composés. Nous nous en tiendrons donc exclusivement aux composés organiques non-volatiles.

2.4 Métabolites isolés

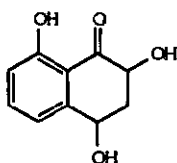
Ont été isolés du milieu de culture de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani* les composés suivants (1-13); tous à l'exception de 1 s'avèrent des composés connus précédemment isolés et décrits :



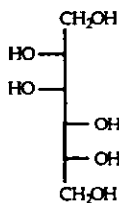
1



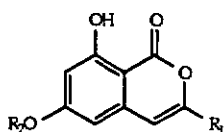
2 cis, trans R = OH
4 R = H



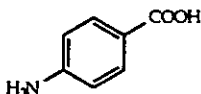
3 cis, trans



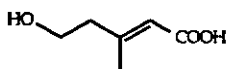
5



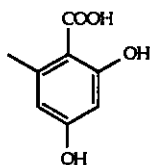
6 R₁ = CH₂OH, R₂ = H
7 R₁ = CH₂OH, R₂ = Me
8 R₁ = CH₂CHOHCH₃, R₂ = H
9 R₁ = CH₃, R₂ = Me



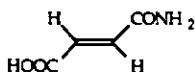
10



11



12



13

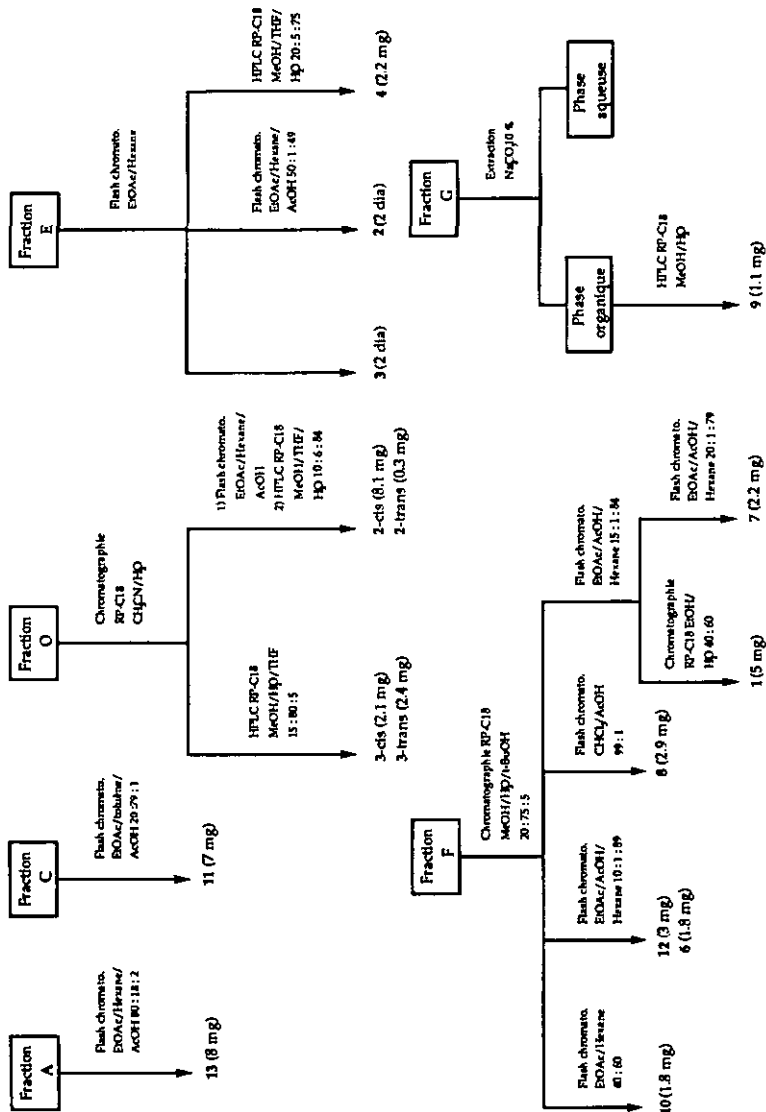


Schéma 2

Procédure générale de purification des métabolites

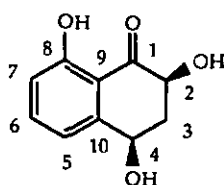
On classe ensuite ces différentes substances en fonction de leur activité biologique sur le platane, obtenant trois sous-groupes distincts :

2.4.1 Métabolites fortement phytotoxiques

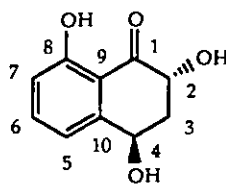
Issus des trois fractions chromatographiques les plus actives (D, E et F), les composés 3 et 10 occasionnent tous deux de profondes nécroses sur les tissus cellulaires du platane; ces symptômes seront décrits plus en détail au chapitre 4.

cis- et trans- 1(2H) 3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphthalénone (3)

Pour des raisons de clarté, et bien qu'ignorant la configuration absolue de ces deux molécules, nous n'avons à chaque fois représenté qu'un seul des deux énantiomères possibles :



3 cis



3 trans

Séparés l'un de l'autre au terme d'une purification par HPLC, on obtient les composés 3 cis (2.1 mg) et 3 trans (2.4 mg) sous forme de solides blancs brunissant rapidement à l'air. Tous deux développent une forte coloration verte par traitement à la vanilline, et émettent une vive fluorescence jaune par irradiation à 366 nm. Leurs spectres IR attestent dans les deux cas d'un squelette carboné comportant l'entité Ar-CO ($\nu_{3\text{-cis}} \text{ CO} = 1641 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_{3\text{-trans}} \text{ CO} = 1645 \text{ cm}^{-1}$).

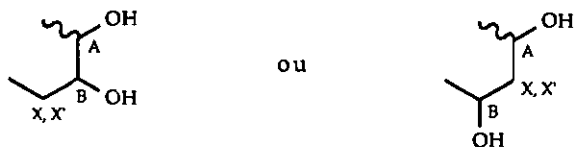
Tableau 3 δ (ppm) et J (Hz) observés par $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 200 MHz)
2,4 cis

proton	δ (ppm)	signal	J (Hz)
H ₂	4.43	dd	13.6, 5.2
H ₃	2.66	dt	11.7, 5.2
H _{3'}	2.02	dt	13.6, 11.7
H ₄	4.95	dd (b)	11.7, 5.2
H ₅	7.23	dt	8.0, 1.0
H ₆	7.57	t	8.0
H ₇	6.87	dt	8.0, 1.0
OH-8	11.60	s	-

2,4 trans

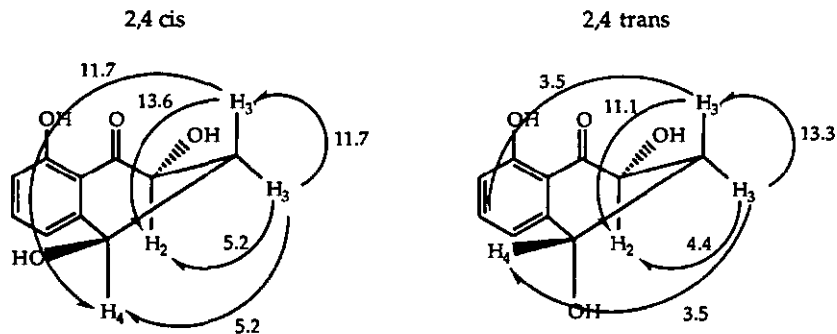
proton	δ (ppm)	signal	J (Hz)
H ₂	4.82	dd	4.4, 11.1
H ₃	2.52	ddd	3.5, 4.4, 13.3
H _{3'}	2.28	ddd	3.5, 11.1, 13.3
H ₄	5.0	t	3.5
H ₅	6.99	large d	7.4
H ₆	7.54	dd	7.4, 8.5
H ₇	6.93	dd	8.5, 1.1
OH-8	11.66	s	-

Les spectres $^1\text{H-NMR}$ indiquent trois protons aromatiques adjacents, un proton hydroxyle chélaté (respectivement 11.60 et 11.66 ppm) et quatre protons aliphatiques mutuellement couplés; les attributions ^1H furent tirées des données de la littérature^[28] et des expériences de corrélation homonucléaire (COSY-45, voir Tableau 3). On constate également la présence de deux protons mutuellement couplés (resp. 11.7 et 13.3 Hz) fixés sur le même carbone (resp. ^{13}C à 42.9 et 39.4 ppm, confirmation apportée par short-range HETCOR); cette propriété est caractéristique d'un méthylène à proximité d'un centre chiral. Les spectres ^{13}C révèlent quant à eux deux carbones aliphatiques déblindés (resp. 67.3 et 72.2 ppm, ainsi que 67.9 et 70.3 ppm) nécessairement fixés à un substituant électroattracteur. La perte caractéristique en masse des fragments aliphatiques $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ et $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ (engendrant les ions m/z 150 et 121) identifie finalement ces substituants comme des groupes hydroxyles. Dans les deux cas, on a donc :



L'absence observée de tout couplage entre H_A et H_B nous fait pencher pour la seconde de ces alternatives. Avec l'entité Ar-CO détectée en IR, on identifie ces molécules comme des naphthalénones 2,4,8 trihydroxylées.

Sur la base des couplages vicinaux $\text{J}_{\text{H}_2\text{H}_3}$ et $\text{J}_{\text{H}_3\text{H}_4}$, on déduit une configuration 2,4 cis dans le premier cas ($\text{J}_{\text{H}_2\text{H}_3} = 13.6$ Hz, $\text{J}_{\text{H}_3\text{H}_4} = 11.7$ Hz, tous deux caractéristiques d'un couplage axial-axial) et 2,4 trans dans le second ($\text{J}_{\text{H}_2\text{H}_3} = 11.1$ Hz caractéristique d'un couplage axial-équatorial, et $\text{J}_{\text{H}_3\text{H}_4} = 3.5$ Hz, caractéristique quant à lui d'un couplage axial-équatorial) :



Shéma 3

Couplages vicinaux (Hz) confirmant l'isomérisie cis et trans des deux molécules

L'isomérisation des deux composés est confirmée par l'identité parfaite des spectres UV, le fractionnement analogue des deux molécules en spectrométrie de masse et la similitude des spectres ^{13}C (tableau 4); l'attribution des signaux fut faite sur la base des expériences de corrélation hétéronucléaire en RMN (short-range et long-range HETCOR, 100 MHz). Ces valeurs n'ont jamais été décrites jusqu'alors.

Tableau 4 δ (ppm) observés par ^{13}C -NMR (MeOH-d₄, 100 MHz)

2,4 cis		2,4 trans	
carbone	δ (ppm)	carbone	δ (ppm)
C ₁	206.0	C ₁	206.4
C ₂	72.2	C ₂	70.3
C ₃	42.9	C ₃	39.4
C ₄	67.3	C ₄	67.9
C ₅	117.8	C ₅	121.6
C ₆	138.0	C ₆	138.7
C ₇	117.2	C ₇	118.9
C ₈	163.6	C ₈	164.0
C ₉	115.0	C ₉	115.2
C ₁₀	150.3	C ₁₀	146.8

La confirmation finale de leur diastéréomérisation est rendue quant à elle par la mesure du spectre CD de chacune des molécules (MeOH, c = 0.4 mg/ml). On y observe toute une moitié du domaine spectral rigoureusement identique pour les deux diastéréomères (400-280 nm); en revanche, dès 280 nm, les deux spectres sont mutuellement opposés et ce jusqu'aux très basses longueurs d'ondes.

ANALYSE

3 cis : MS : m/z (EI, 70 eV) 194 (72), 176 (M-H₂O, 68), 167 (MH-CO, 16), 149 (M-C₂H₄O, 69), 121 (M-C₃H₆O₂, 100); IR (fenêtre NaCl) : 3378 ($\nu_{\text{O-H}}$), 1641 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1574 ($\nu_{\text{C=C}}$ aromatique) et 1455 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$ cycle aromatique); UV (λ_{max} , MeOH) : 258 (ϵ rel. 100), 331 nm (40); CD (MeOH, c = $1.89 \cdot 10^{-3}$ M) $[\Phi]_{335} = -291$; $[\Phi]_{321} = 0$; $[\Phi]_{305} = +265$; $[\Phi]_{280} = 0$; $[\Phi]_{263} = +317$; $[\Phi]_{230} = +741$; $[\Phi]_{226} = 0$.

3 trans : MS : m/z (EI, 70 eV) 194 (52), 176 (72), 150 (53), 121 (100), 102 (M-C₆H₄O, 6); IR (fenêtre NaCl) : 3355, 1645, 1576, 1456 cm^{-1} ; UV (λ_{max} , MeOH) : 258 (ϵ rel. 100), 331 nm (40); CD (MeOH, c = $2.2 \cdot 10^{-3}$ M) $[\Phi]_{337} = -1759$; $[\Phi]_{321} = 0$; $[\Phi]_{304} = +1296$; $[\Phi]_{282} = 0$; $[\Phi]_{257} = -14352$; $[\Phi]_{230} = -1389$; $[\Phi]_{227} = 0$.

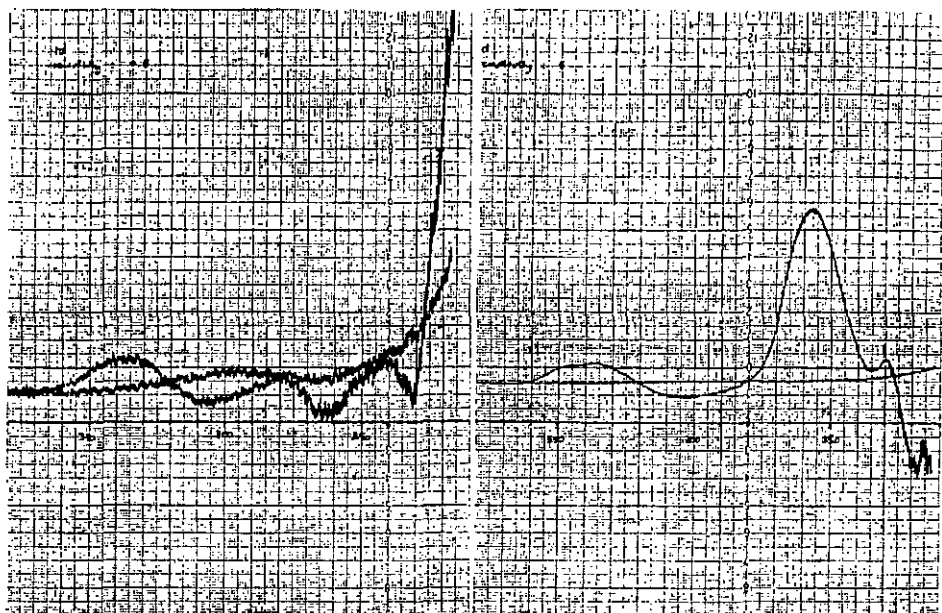


Figure 7 Spectres CD comparatifs des composés 3 cis (gauche) et 3 trans (droite)

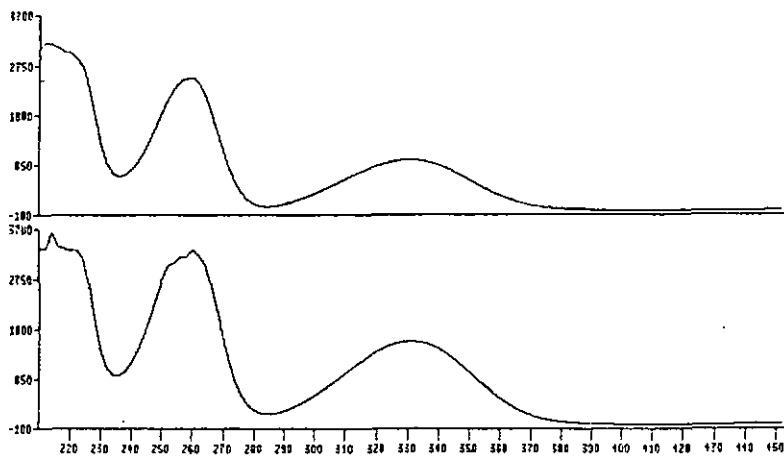


Figure 8 Spectres UV comparatifs des composés 3 cis (haut) et 3 trans (bas)

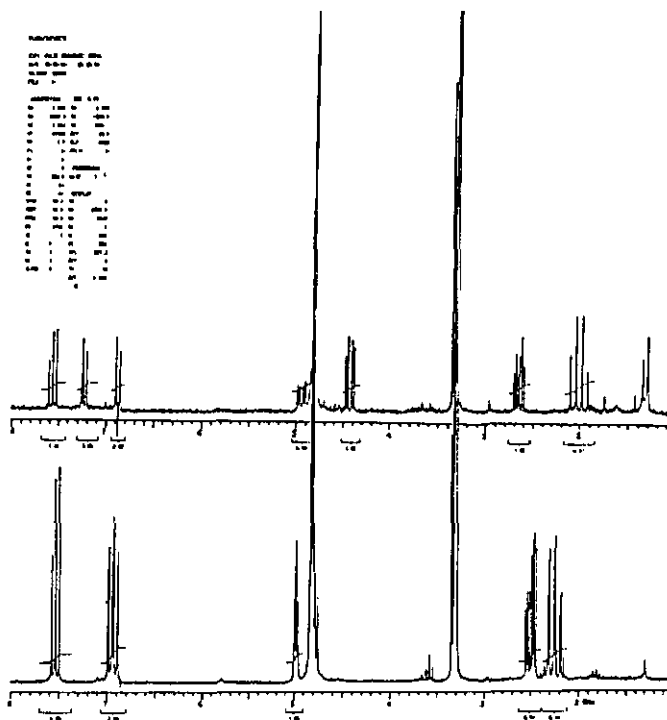
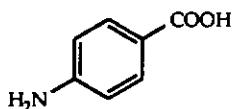


Figure 9 Spectres $^1\text{H-NMR}$ comparatifs des composés **3** cis (haut) et **3** trans (bas) (200 MHz, MeOH- d_4)

Ces deux composés ont été isolés de diverses souches fongiques (*Penicillium diversum* var. *aureum*^[28], *Mycosphaerella fijiensis*^[29] et *Verticillium dahliae*^[30]) où ils figurent systématiquement comme intermédiaires dans la biosynthèse de la mélanine. Le composé **3** s'est avéré toxique sur le bananier et le plantain^[29].

acide p-aminobenzoïque (10)

10

Issu de la fraction toxique F, le composé 10 (1.8 mg, solide blanc) développe une coloration jaune immédiate par traitement à la vanilline. Un pic moléculaire intense de m/z 137 atteste d'un composé azoté, avec des fragments caractéristiques de m/z 120 (M-OH), 109 (M-CO) et 92 (M-COOH). La présence d'un carboxyle est confirmée par des bandes IR à 3240, 1667, 1422 et 1312 cm^{-1} , caractéristiques de la vibration de valence du OH, du CO, de la déformation angulaire du groupe C-O-H et de la vibration de valence du CO-O. On distingue également les vibrations propres à un groupement amine NH_2 à 3460 (vibration de valence asymétrique du N-H), 3363 (vibration de valence symétrique du N-H), 1626 (déformation angulaire H-N-H) et 1174 cm^{-1} (vibration de valence du C-N couplée à celles des liaisons adjacentes). Un spectre $^1\text{H-RMN}$ relativement simple révèle deux apparents doublets de triplet, en réalité un système complexe de spins AA'XX' dans la région des aromatiques. On en déduit donc un noyau aromatique disubstitué comprenant une fonction carboxyle et une autre amine, et présentant une forte symétrie dans sa structure. Par comparaison avec des standards, on l'identifie finalement comme l'acide p-aminobenzoïque.

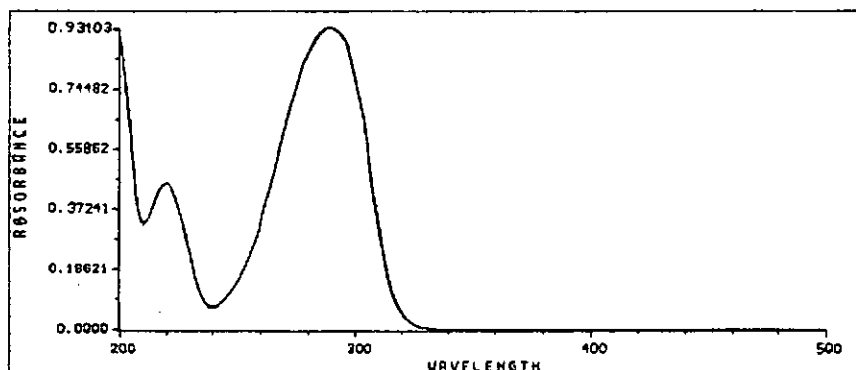


Figure 10 Spectre UV de 10

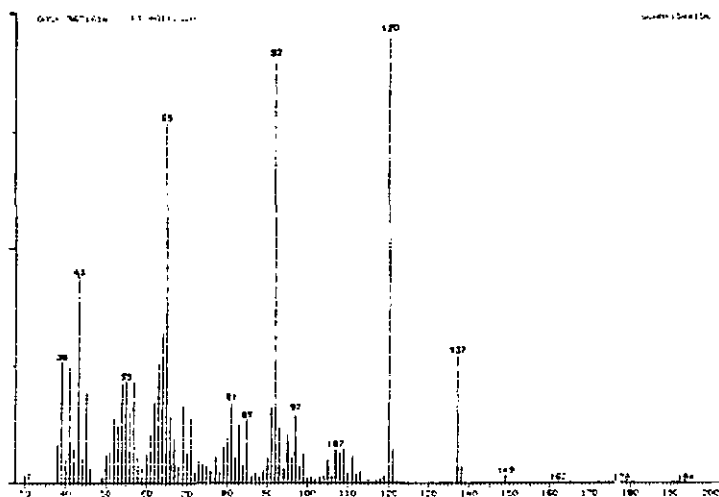


Figure 11 Spectre MS de 10 (EI, 70 eV)

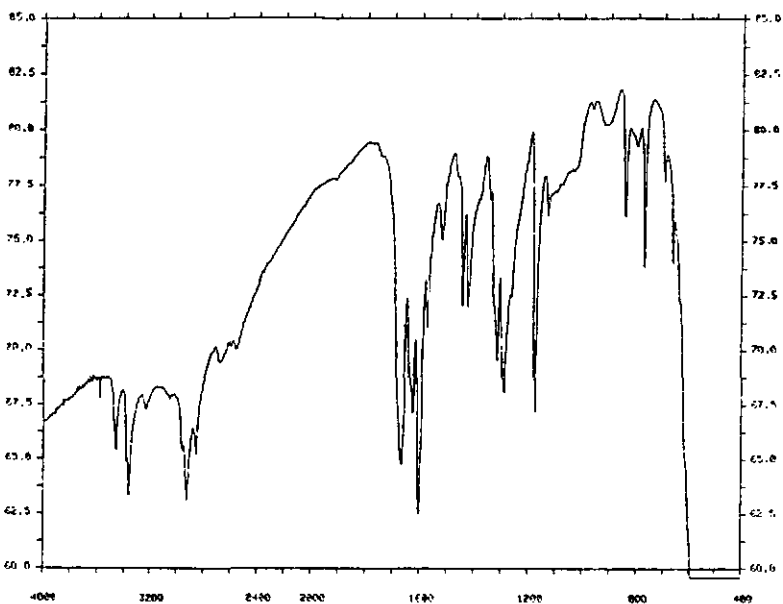


Figure 12 Spectre IR de 10

ANALYSE

MS : m/z (EI, 70 eV) 137 (27), 120 (100), 109 (8), 92 (91); $^1\text{H-NMR}$ (acétone- d_6 , 200 MHz) : 7.76 (m, 2H, $^3J_{\text{H}} = 8.6$ Hz), 6.68 (m, 2H, $^3J_{\text{H}} = 8.6$ Hz), 5.4 (large s, COOH), 2.82 (large s, NH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4 , 100 MHz) : 170.7 (COOH), 154.6, 132.8, 119.1, 114.4; IR (fenêtre NaCl) : 3460, 3363, 1667, 1626, 1603, 1422, 1312, 1174 cm^{-1} ; UV (λ_{max} , MeOH) : 220 (ϵ rel. 48), 288 nm (100).

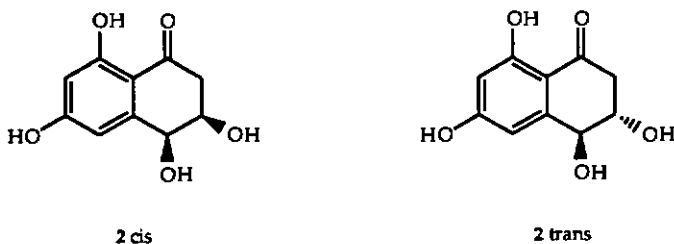
Ce composé constitue un produit final de biosynthèse^[65], isolé de très nombreuses sources naturelles; il est reconnu comme un agent de croissance pour de nombreux microorganismes et comme une vitamine essentielle (vitamine H)^[31] pour plusieurs animaux (rat, souris); en revanche, ingéré à fortes doses par le lapin ou par l'homme, il se trouve intégralement rejeté dans les urines sous la forme de son dérivé acétylamino^[32]; il n'a en revanche jamais été décrit comme une substance toxique à l'égard d'un végétal. Un compte-rendu plus détaillé de ses propriétés est présenté dans la référence [31].

2.4.2 Métabolites modérément ou faiblement phytotoxiques

Egalement issus des fractions chromatographiques manifestant une certaine toxicité, les composés 2, 4, 6, 7 et 8 manifestent tous, à une échelle différente, une activité phytotoxique sur le platane. Le composé 9 n'a pu être testé en raison de sa solubilité très réduite en phase aqueuse (sa concentration y est largement inférieure à 0.1 mg/ml, pour laquelle aucun symptôme phytotoxique n'est observé); on ignore donc tout de son activité réelle sur le platane.

cis- et trans- 1(2H) 3,4 dihydro-3,4,6,8 trihydroxynaphtalénone (2)

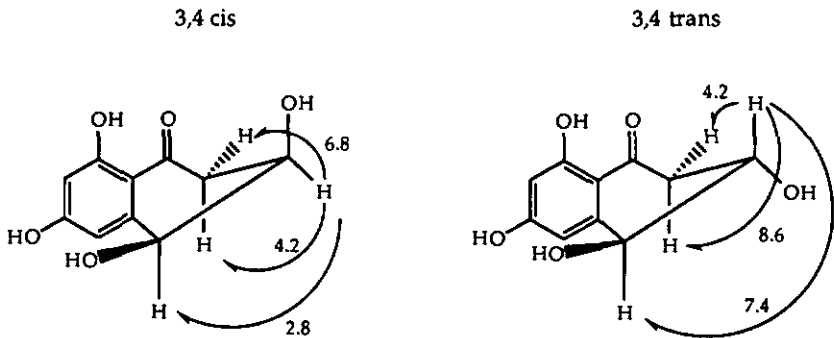
A nouveau, ignorant la configuration absolue de ces deux molécules, nous ne présentons à chaque fois qu'un seul des deux énantiomères possibles :



Issus de la fraction D, et séparés au terme d'une HPLC sur phase inverse, les deux composés présentent, tout comme 3 cis et 3 trans, des caractéristiques spectrales analogues. 2 cis (8.1 mg) et 2 trans (0.3 mg) se présentent tous deux sous forme de solides blancs émettant une vive fluorescence jaune par irradiation à 366 nm. Les spectres ^1H attestent à chaque fois d'un noyau aromatique tétrasubstitué comportant deux protons en méta l'un de l'autre. Les spectres ^{13}C , DEPT et ^1H révèlent quant à eux deux CHOH mutuellement couplés et un méthylène à

proximité d'un centre chiral (dédoublément des signaux des deux protons). Les spectres COSY des deux substances révèlent un réseau de couplages analogue entre les espèces 2 cis et 2 trans.

L'IR du composé majoritaire dévoile à nouveau une cétone conjuguée au cycle aromatique (1624 cm^{-1} et ^{13}C à 202 ppm, la fréquence IR étant vraisemblablement réduite par de nombreuses interactions H avec d'autres molécules) tandis que les spectres de masse, avec un pic moléculaire intense de m/z 210, confirment la substitution par quatre groupes hydroxyles. Deux spectres UV rigoureusement identiques permettent de les identifier comme la cis et la trans 1(2H) 3,4 dihydro-3,4,6,8 trihydroxynaphtalénone. En témoigne le couplage proton observé entre les deux CHO adjacents; de 2.8 Hz dans l'espèce cis (caractéristique d'un couplage axial-équatorial), il se monte à 7.4 Hz dans l'espèce trans, une valeur caractéristique d'un couplage axial-axial :



Shéma 4

Couplages vicinaux (Hz) confirmant les configurations cis et trans des 2 isomères

Outre deux spectres de masse très fortement similaires avec des pics simultanés de m/z 210, 192 ($M-H_2O$), 166 ($M-C_2H_4O$) et 137 ($MH^+-C_3H_6O_2$), on observe par dichroïsme circulaire un phénomène typique de deux diastéréomères : l'inversion du signe de l'une des bandes d'absorption à 320 nm (voir figure 13).

Tout comme 3 cis et 3 trans, on peut douter que ces diastéréomères soient simultanément produits par le microorganisme; il paraît plus probable que l'un d'entre eux soit spécifiquement biosynthétisé (en l'occurrence l'isomère 3,4 cis, stériquement plus encombré et thermodynamiquement moins favorable) et qu'une réaction S_N2 subséquente sur l'un ou sur l'autre des groupes hydroxyles engendre le second.

ANALYSE

2 cis : MS : m/z (EI, 70 eV) 210 (44), 192 (44), 166 (21), 150 (5), 137 (100); ¹H-NMR (MeOD-d₄, 200 MHz) : 12.76 (s, OH), 6.53 (dd, 2.0, 0.4 Hz), 6.15 (d, 2.0 Hz), 4.70 (large d, 2.8 Hz), 4.21 (ddd, 2.8, 4.2, 6.8 Hz), 2.88 (dd, 6.8, 13.0 Hz, couplage géminal), 2.81 ppm (dd, 4.2, 13.0 Hz); ¹³C-NMR (MeOH-d₄, 100 MHz) : 202.0, 168.2, 166.8, 148.2, 110.4, 109.6, 103.2, 71.8, 70.7, 43.6 ppm; IR (fenêtre NaCl) : 3402, 1624 (ν_{C=O}), 1463 (ν_{C=C} cycle aromatique), 1367 et 1269 cm⁻¹; UV (λ_{max}, MeOH) : 205 (ε rel. 100), 220 (66), 281 (95) et 314 nm (50); CD (MeOH, c=1.9·10⁻³M) [Φ]₃₀₅ = +3579; [Φ]₂₉₄ = 0; [Φ]₂₇₉ = -6684; [Φ]₂₃₇ = -3737; [Φ]₂₂₅ = 0.

2 trans : MS : m/z (EI, 70 eV) 210 (20), 192 (12), 166 (12), 150 (3), 137 (100); ¹H-NMR (MeOD-d₄, 200 MHz) : 12.80 (s, OH), 6.60 (dd, 2.2, 1.0 Hz), 6.18 (d, 2.2 Hz), 4.48 (large d, 7.4 Hz), 3.96 (ddd, 8.6, 4.2, 7.4 Hz), 2.96 (dd, 17.0, 4.2 Hz), 2.60 (dd, 17.0, 8.6 Hz); UV (λ_{max}, MeOH) : 205 (ε rel. 100), 220 (64), 281 (94) et 314 nm (45); CD (MeOH, c=1.43·10⁻³M) [Φ]₃₂₉ = -699; [Φ]₃₁₇ = -1119; [Φ]₃₀₅ = -629; [Φ]₂₇₉ = -9441; [Φ]₂₃₉ = -4545; [Φ]₂₂₈ = 0.

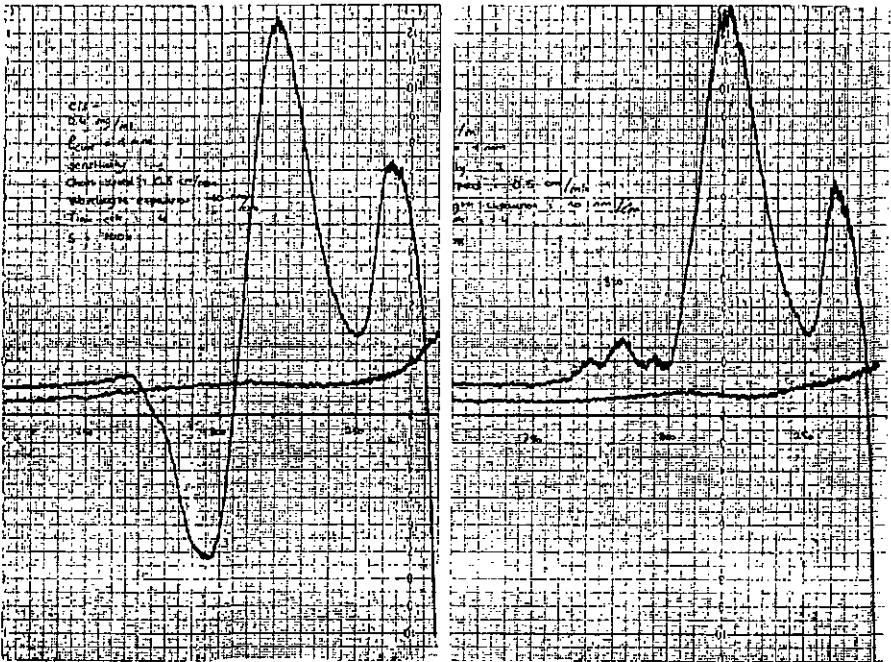


Figure 13 Spectres CD comparatifs (MeOH, resp. 0.4 et 0.3 mg/ml) des isomères 2 cis (gauche) et 2 trans (droite)

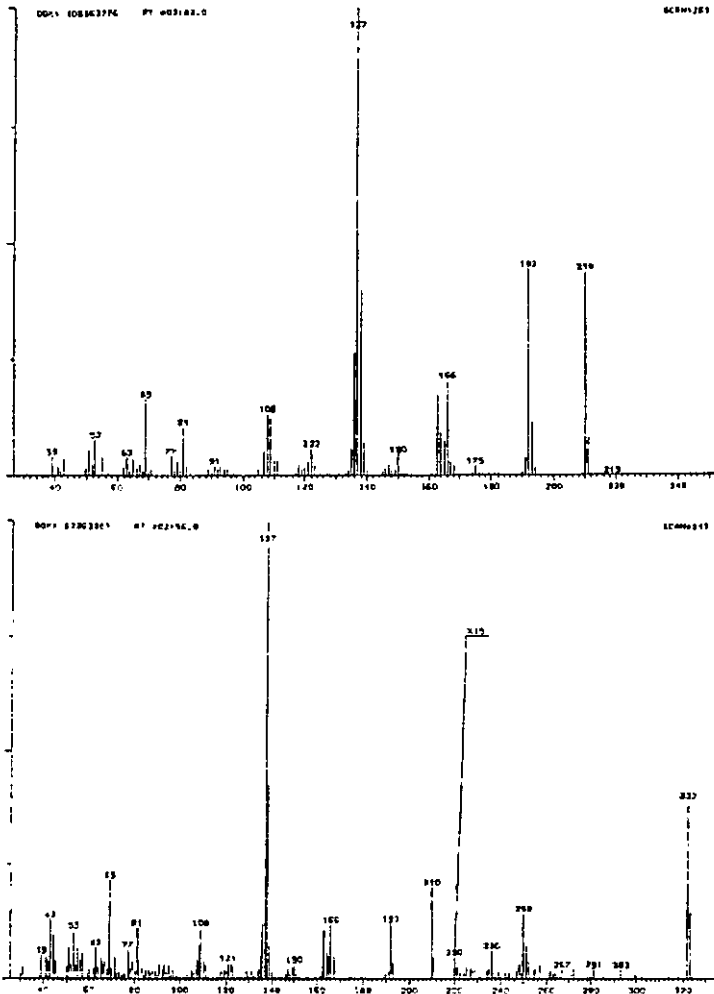
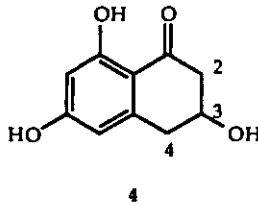


Figure 14 Spectres MS comparatifs (EI, 70eV) des isomères 2 cis (haut) et 2 trans (bas)

Impliqués dans la biosynthèse de la mélanine, ces composés sont des métabolites fréquemment isolés de cultures fongiques^[29,33]; l'isomère cis a été isolé pour la première fois de *Pyricularia oryzae* Cavara^[34].

1(2H) 3,4 dihydro-3,6,8 trihydroxynaphtalénone (4)



D'un second groupe de substances jaune fluorescentes à 366 nm, on a pu isoler 2.2 mg d'un solide blanc se révélant bleu-violet par traitement à la vanilline. Son spectre UV rappelle singulièrement celui de 2, mais son spectre $^1\text{H-NMR}$ s'en différencie dans la partie aliphatique avec deux méthylènes mutuellement couplés; du reste, les spectres ^{13}C , DEPT 135 et DEPT 90 attestent de cinq C quaternaires, trois C tertiaires et deux méthylènes. Une absorption caractéristique d'une cétone α,β -insaturée en IR (1621 cm^{-1}) confirme un squelette analogue à 2 et 3. Le spectre COSY révèle des corrélations homonucléaires complexes entre deux protons axiaux et deux autres équatoriaux, compliquées par leur couplage avec un cinquième proton à 4.22 ppm (CHOH). Quant à son spectre de masse, avec des pics de m/z 195 (M+H) et 177 (M-H $_2$ O), il confirme la trisubstitution par des hydroxyles. Sur la base des données de la littérature^[35], on l'identifie finalement comme la 1(2H) 3,4 dihydro-3,6,8 trihydroxynaphtalénone, communément nommée "scytalone".

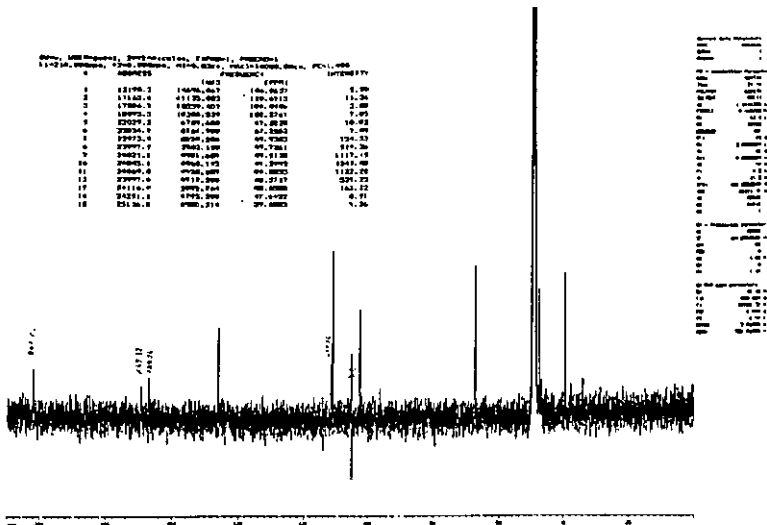


Figure 15 Spectre $^{13}\text{C-NMR}$ de 4 (MeOH-d₄, 100 MHz)

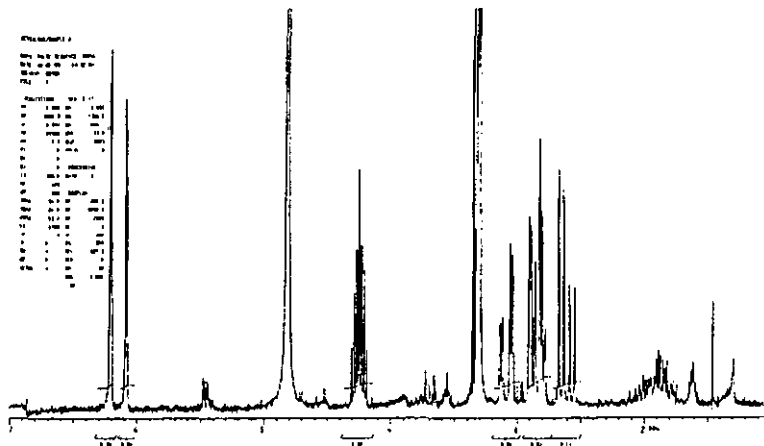


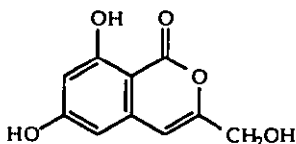
Figure 16 Spectre $^1\text{H-NMR}$ de 4 (MeOH- d_4 , 200 MHz)

ANALYSE

MS : m/z (EI, 70 eV) 195 (76), 177 (84), 150 (M-C₂H₄O, 100), 134 (M-C₃H₈O, 15), 122 (M-CO-H₂C=CHOH, 21); $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 200 MHz) : 6.20 (dt, 2.3, 1.2 Hz), 6.08 (d, 2.3 Hz), 4.22 (hept., 4.0 Hz, H-3), 3.1 (ddd, 16.6, 4.0, 1.2 Hz, H-4_{eq}), 2.86 (m, 2H), 2.60 (ddd, 16.6, 8.0, 0.7 Hz, H-2_{ax}); $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4 , 100 MHz) : 202, 169.3, 167.0, 146.0, 111.3, 110.7, 102.4, 67.3, 47.6, 39.6; IR (fenêtre KBr) : 3347 ($\nu_{\text{O-H}}$), 1621 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1464 ($\nu_{\text{C=C}}$ cycle aromatique), 1361 et 1271 cm^{-1} ; UV (λ_{max} , MeOH) : 215 (e rel. 100), 230 (78), 280 (100), 315 nm (47).

Ce produit, tout comme 2 et 3, est un intermédiaire dans la biosynthèse de la mélanine^[36]; il a été isolé pour la première fois d'un extrait de *Scytalidium* FY^[37]. Nous mentionnerons encore à titre de complément les travaux de *Bardshiri* et *Simpson* relatifs à la biosynthèse de la scytalone^[35].

6.8 dihydroxy-3-hydroxyméthyl-1H-2-benzopyrane-1-one (6)



6

Les tests de toxicité avaient mis en évidence une fraction modérément phytotoxique présentant par tlc des spots très clairement définis. De cette fraction ont été isolés 1.8 mg d'un solide blanc de poids moléculaire m/z = 208,

comportant deux protons aromatiques mutuellement couplés et un carbonyle α,β -insaturé (IR : 1686 cm^{-1}); un signal proton dans la région des aromatiques (6.59 ppm, t, 1 Hz) couplant très faiblement avec un méthylène fortement déblindé (4.40 ppm, d, $J = 1.1\text{ Hz}$, confirmation apportée par la mesure du spectre COSY) renforce l'hypothèse d'une double-liaison trisubstituée comportant un radical $\text{CH}_2\text{-X}$; un pic intense de $m/z = 177$, consécutif à la perte d'un fragment CH_3O , identifie ce substituant comme un groupe hydroxyméthyle CH_2OH ; on relèvera enfin un ion de masse 163 qui pourrait résulter d'une décarboxylation :

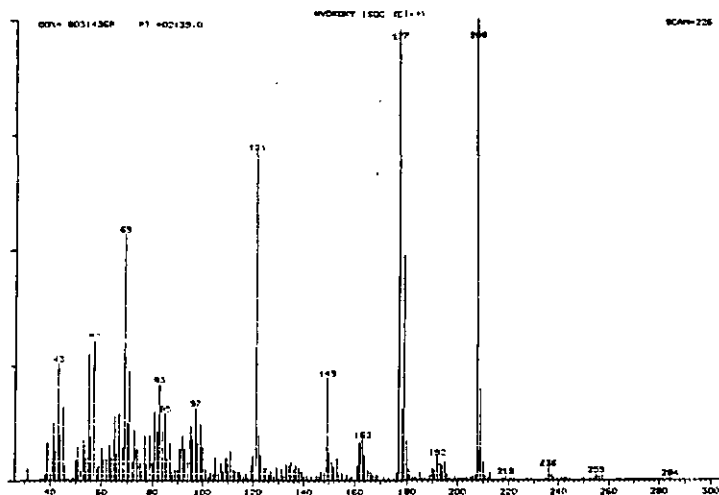


Figure 17 Spectre MS de 6 (EI, 70 eV)

Ce constat est renforcé par une forte bande IR à 1177 cm^{-1} consécutive à la vibration de valence asymétrique d'une liaison CO-O d'un acide ou d'un ester carboxylique. Un total de dix carbones, dont neuf dans la région des oléfiniques et un seul aliphatique (60.4 ppm, $\text{CH}_2\text{-O}$) permettent de l'identifier finalement comme la 6,8 dihydroxy-3-hydroxyméthyl-isocoumarine.

ANALYSE

MS : m/z (EI,+) 208 (100), 180 (M-CO, 49), 177 (M- CH_2OH , 98), 163 (M-CO-OH, 90), 149 (M-CO- CH_2OH , 23), 121 (M- $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3$, 72); $^1\text{H-NMR}$ (acétone- d_6 , 200 MHz) : 6.59 (t, 1.0 Hz), 6.48 (d, 2.2 Hz), 6.40 (d, 2.2 Hz), 4.40 (d, 1.0 Hz), 3.84 (s, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (acétone- d_6 , 100 MHz) : 166.2, 166.0, 164.0, 157.3, 139.8, 103.5, 103.2, 102.1, 99.0, 60.4; IR (fenêtre KBr) : 1686 (ν_{CO}), 1623 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$), 1177 cm^{-1} (as. $\nu_{\text{CO-O}}$); UV (λ_{max} , MeOH) 243 (ϵ rel. 100), 275 (16), 286 (épaulement, 13), 325 nm (15).

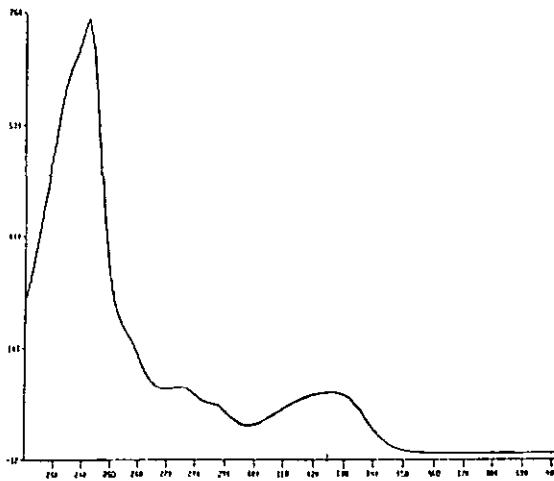
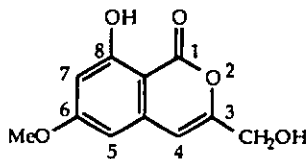


Figure 18 Spectre UV de 6

Fait intéressant, ce produit a été isolé pour la première fois d'une culture de *Ceratocystis minor*^[21].

6 méthoxy-8 hydroxy-3 hydroxyméthyl-1H-2-benzopyrane-1-one (7)



7

2.2 mg d'un solide blanc sont obtenus au terme d'une procédure de purification laborieuse; le composé possède un spectre UV pour ainsi identique à celui de 6 ce qui l'assimile à une isocoumarine; ses seules différences spectrales sont son poids moléculaire (m/z 222), et un signal proton supplémentaire à 3.92 ppm (s, 3H); l'apparition d'un carbone à 55.7 ppm prouve l'existence d'un méthoxy dans la molécule. A nouveau, le spectre MS est dominé par la perte d'un fragment CH_2OH (m/z 191) ce qui exclut la présence du méthyle sur le substituant en position 3; la rémanence du signal d'un OH chélaté en position 8 ($^1\text{H-NMR}$, CDCl_3 : 11.03 ppm) implique la présence forcée du méthoxy en position 6.

ANALYSE

MS : m/z (EI, 70 eV) 222 (96), 204 (M-H₂O, 2), 193 (M-H,CO, 57), 191 (M-CH₂OH, 100), 177 (M-OH-CO, 9), 163 (M-CO-CH₂OH, 20), 135 (M-C₃H₃O₃, 76); ¹H-NMR (acétone-d₆, 200 MHz) : 6.67 (large s), 6.60 (d, 2.3 Hz), 6.50 (d, 2.3 Hz), 4.41 (2H, d, 1.2 Hz), 3.92 ppm (3H, s); à noter ¹H-NMR (CDCl₃) : 11.03 ppm (s); ¹³C-NMR (acétone-d₆, 100 MHz) : 167.4, 166.0, 163.8, 157.7, 139.7, 103.2, 101.8, 100.7, 100.1, 60.4, 55.7 ppm; IR (fenêtre KBr) : 1684 (ν_{CO}), 1622 (ν_{C=C}), 1572 et 1165 cm⁻¹ (as. ν_{CO-O}); UV (λ_{max}, MeOH) 242 (ε rel. 100), 257 (épaulement, 17), 275 (11), 286 (épaulement, 8), 326 nm (10).

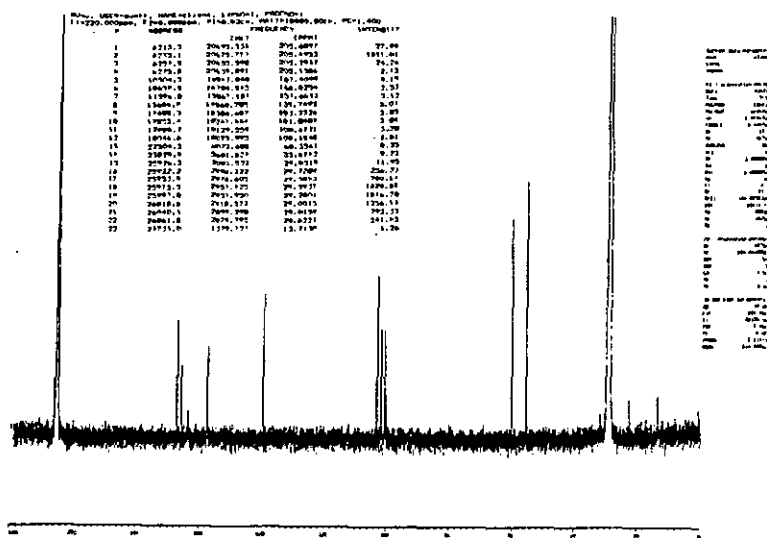
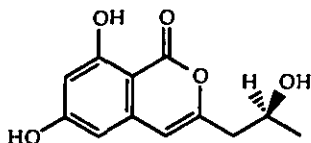


Figure 19 Spectre ¹³C-NMR de 7 (acétone-d₆, 100 MHz)

Tout comme 6, cette substance a été détectée dans le milieu de culture de nombreux champignons; à titre de référence, on citera Kumagai et al.[38].

(3S)-3 (2'hydroxypropyl)-6,8 dihydroxy-1H-2-benzopyrane-1-one (8)



8

2.9 mg d'un solide blanc sont également isolés de la fraction F; un spectre UV analogue à 6 et 7 permet à nouveau de lui attribuer la structure d'une isocoumarine. Les spectres $^1\text{H-NMR}$ et COSY dévoilent un système de spins plus complexe dans la région des aliphatiques. On y observe un proton déblindé à 4.29 ppm couplé à un méthyle (1.31 ppm, d, $J = 6.4$ Hz) et à un méthylène (2.94 ppm, m); le spectre $^{13}\text{C-NMR}$ (acétone- d_6 , 100 MHz) révèle effectivement trois carbones aliphatiques aux côtés des neuf carbones habituels de l'isocoumarine : 64.9 (CH-O), 43.3 (CH₂) et 23.0 ppm (CH₃). Le spectre de masse, avec un poids moléculaire de m/z 236, est largement dominé par la perte d'un fragment de m/z 44, CO₂ ou plus vraisemblablement CH₃CHO, car comme on le constate sur les spectres MS de 6 et de 7, la décarboxylation est un processus très limité dans les isocoumarines. Ces données sont compatibles avec un substituant 2-hydroxypropyle en position 3; le centre chiral qu'il comporte est responsable du splitting des protons méthylènes : non-équivalents, leur différence de déplacement chimique reste néanmoins faible comparée à leur fort couplage géminel (Figure 20 b). On a dès lors affaire à un système ABX comportant huit lignes pour la partie AB; les pics extérieurs de ce multiplet sont perdus dans le bruit de fond, deux autres coïncident et donnent lieu à un total de trois pics :

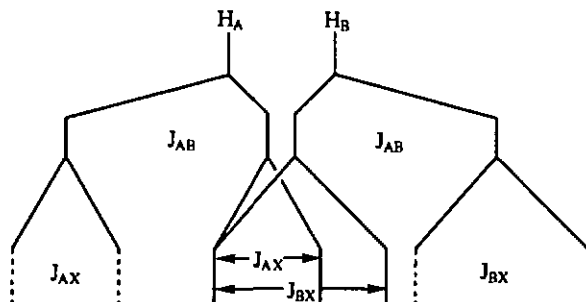


Schéma 5

Représentation des couplages associés aux protons méthylènes (H_1) de 8

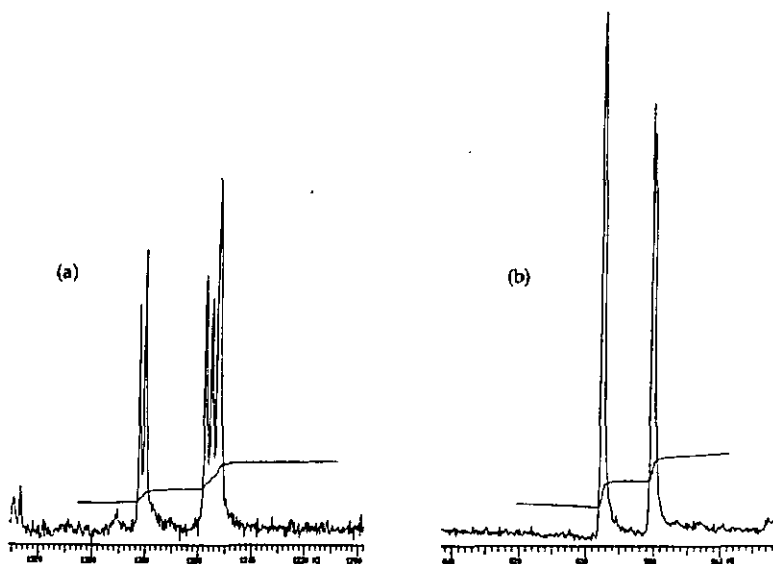


Figure 20 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) de **8**

- (a) portion oléfinique; les protons aromatiques forment deux doublets et le proton oléfinique un singlet.
 (b) portion aliphatique du doublet méthylène; seuls sont visibles sur ce spectre les couplages J_{AX} et J_{BX} tels que décrits dans le schéma 5.

La configuration absolue de **8** a pu être déterminée sur la base des travaux de *Ichihara* et al.[39], qui ont entrepris la synthèse et la résolution subséquente des deux énantiomères (+)**8** et (-)**8**. En ozonolysant l'énantiomère (+), on obtient un dérivé beaucoup plus simple, lequel, comparé à des standards de stéréochimie bien définie, permet d'attribuer la configuration *S* à l'énantiomère (+). Dans notre cas, l'obtention d'un $\alpha_{\text{D},20}$ de $+14.5^\circ$ (lit. $+17.5^\circ$) identifie **8** comme la (*S*)-3-(2'hydroxypropyl)-6,8 dihydroxyisocoumarine.

ANALYSE

MS : m/z (EI, 70 eV) 236 (47), 208 (M-CO, 20), 192 (M- CH_3CHO , 100), 177 (M- $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2$, 10), 164 (24), 146 (22), 121 (M- $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_3$, 13); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) : 11.08 (s), 8.03 (s, OH), 6.40 (d, 2.2 Hz), 6.28 (d, 2.2 Hz), 6.26 (s), 4.29 (m), 2.94 (2H, 2*dd), 2.61 (s, OH), 1.31 ppm (d, 6.4 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (acétone- d_6 , 100 MHz) : 166.5, 165.7, 163.9, 155.9, 140.3, 105.8, 102.7, 101.6, 99.0, 64.9, 43.3, 23.0; IR (fenêtre KBr) : 3194 (vOH), 1681 (vCO), 1625 (v $\text{C}=\text{C}$), 1173 cm^{-1} (as. vCO-O); UV (λ_{max} , CHCl_3) : 253 (e rel. 100), 277 (64), 288 (épaulement, 45), 329 nm (54); $\alpha_{\text{D},20}$ (MeOH, 0.016 M) = $+14.5^\circ$.

Cette substance a été isolée pour la première fois du milieu de culture de *Rhynchosporium orthosporum* où elle est décrite comme une toxine de l'herbe (orchard grass)^[39].

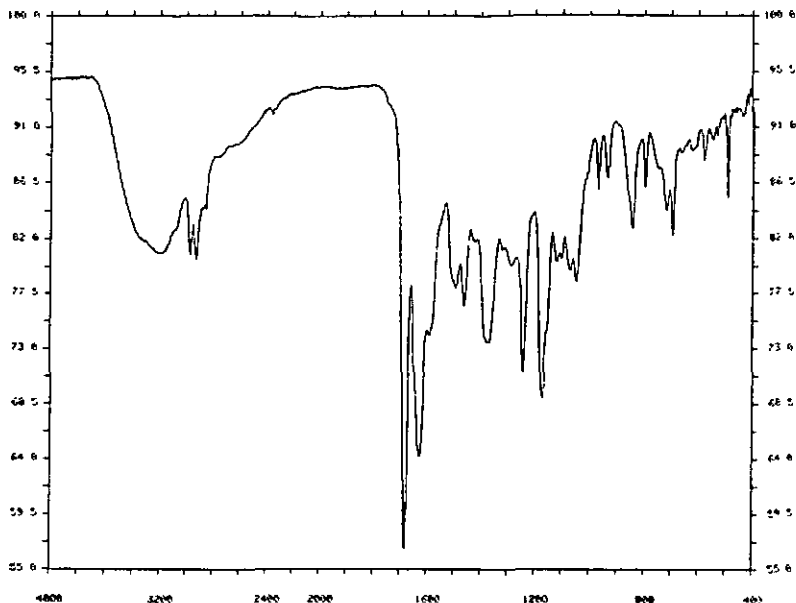
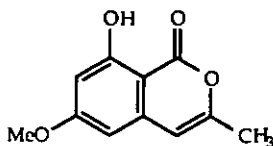


Figure 21 Spectre IR de 8
3 méthyl-6 méthoxy-8 hydroxy-1H-2-benzopyrane-1-one (9)



9

Seul métabolite présent en quantités suffisantes dans la fraction phytotoxique G, le composé 9 (1.1 mg) est un solide blanc qui présente par UV toutes les absorptions propres aux isocoumarines. On observe sur le spectre ¹H-NMR un méthoxy à 3.86 ppm et un méthyle très faiblement dédoublé à 2.26 ppm. Son irradiation provoque la réduction du quadruplet vinylique à 6.18 ppm en un singulet. Le spectre de masse, avec la perte d'un fragment de m/z 15, suggère la présence d'un méthyle en position 3. Avec la rémanence du signal d'un OH

chélaté (11.1 ppm, s, OH-8) et d'un couplage méta sur le cycle aromatique, on déduit la présence du méthoxy en position 6.

ANALYSE

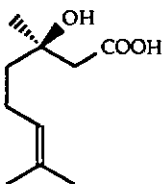
MS : m/z (EI, 70 eV) 206 (100), 191 (M-Me, 36), 177 (M-H-CO, 42), 163 (M-CO-CH₃, 17), 149 (5), 135 (35); ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) : 11.1 (s), 6.47 (d, 2.1 Hz), 6.29 (d, 2.1 Hz), 6.18 (q, 0.9 Hz), 3.86 (s, 3H), 2.26 ppm (d, 0.9 Hz); UV (λ_{max}, MeOH) : 243 (ε rel. 100), 256 (épaulement, 29), 277 (22), 288 (épaulement, 19), 324 nm (20).

Ce composé a été isolé pour la première fois d'une culture de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst^[18].

2.4.3 Métabolites non phytotoxiques

Issus des fractions non actives, ou conjointement à des composés plus actifs, les composés 1, 5, 11, 12, et 13 ont également été isolés puis identifiés. Il s'agit pour la plupart de composés simples constitutifs du microorganisme lui-même (5) ou résultant d'une biosynthèse primaire (11, 13).

Acide (3R)-3 hydroxy-3.7 diméthyl-octène-6-oïque (1)



1

Présente en quantités considérables dans le milieu de culture (> 1mg/l), une huile jaune très fortement polaire (5 mg) se révélant bleu sombre par traitement à la vanilline. Son spectre ¹H-NMR dévoile deux méthyles et un proton fixés sur un alcène (resp. 1.76, 1.70 et 5.19 ppm), ainsi que trois signaux méthylènes complexes. Cette hypothèse est renforcée par la mesure des spectres ¹³C, DEPT 90 et DEPT 135 qui dévoilent trois CH₃, trois CH₂, un CH et trois C quaternaires. Les spectres de corrélation homonucléaires (CO5Y-90 et COSY-45) permettent de distinguer deux systèmes de spins indépendants, =CH-(CH₂)₂ et un méthylène isolé mais nécessairement à proximité d'un centre chiral (inéquivalence des deux protons géminaux). Le spectre IR (sur fenêtre de NaCl) révèle un ion carboxylate COO⁻ (1559 et 1409 cm⁻¹ correspondant aux vibrations de valence asymétrique et symétrique du ion carboxylate), vraisemblablement en raison d'une déprotonation partielle de l'acide lors de son dépôt sur la fenêtre de NaCl. On y observe également une large bande caractéristique de l'élongation d'une liaison O-H (3307 cm⁻¹), mais peu d'évidences de la liaison oléfinique. Après une analyse

approfondie, le spectre de masse (DCI, NH_3) suggère un poids moléculaire de m/z 186 ce qui confirme les fonctions COOH (C-1) et hydroxyle (centre chiral C-3). Le composé est un dérivé de l'acide citronellique, l'acide 3-hydroxycitronellique ou 3,7 diméthyl-3 hydroxy-octène-6-oïque.

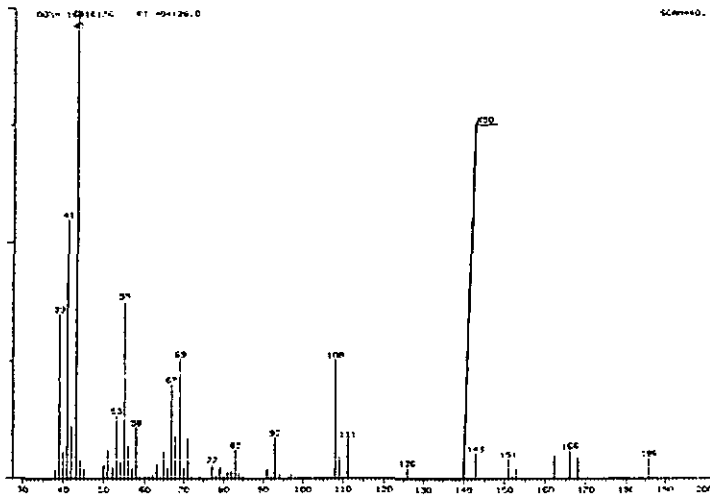


Figure 22 Spectre MS de 1 (EI, 70 eV)

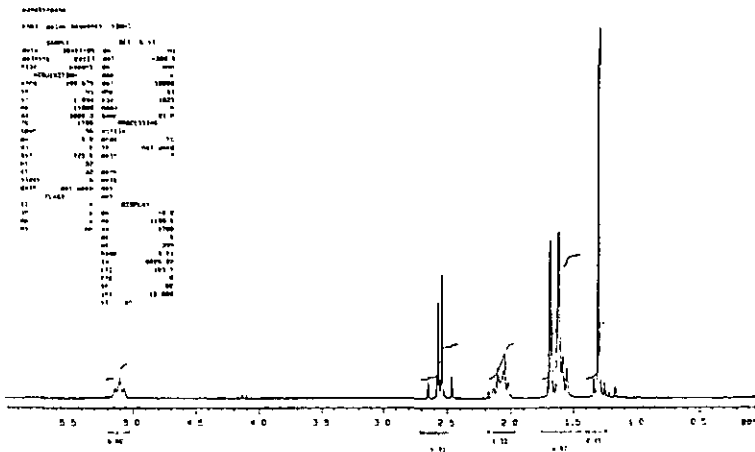
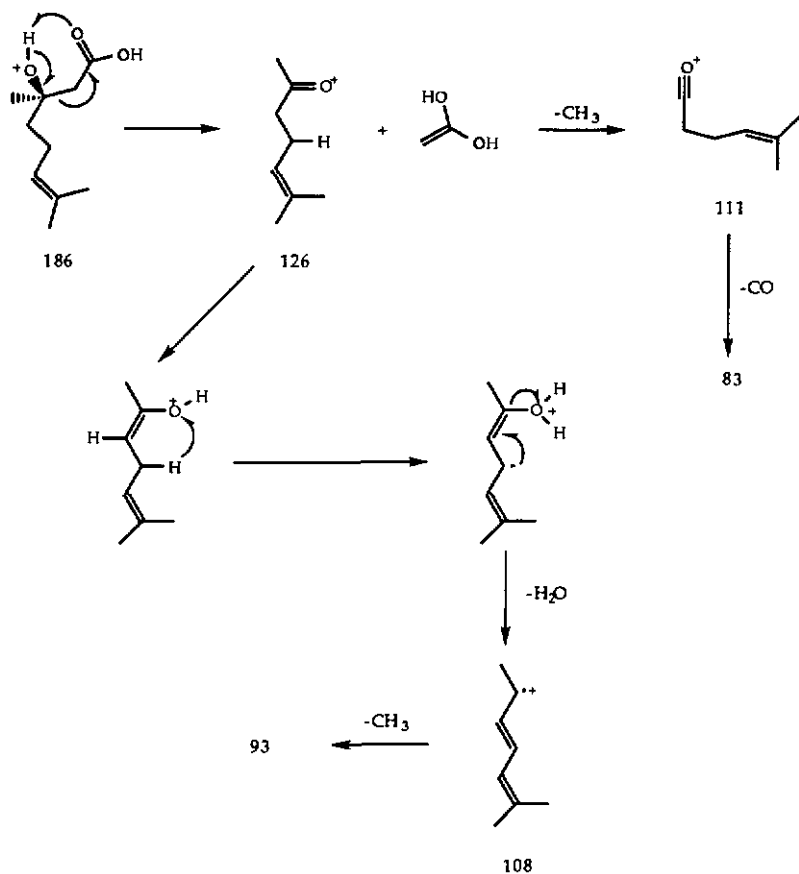


Figure 23 Spectre $^1\text{H-NMR}$ de 1 (CDCl_3 , 200 MHz)

Le fractionnement MS est assez particulier, dans le sens où son spectre coïncide pour ainsi dire totalement avec celui de la 6-méthyl-5-heptène-2-one, à l'exception d'un pic de très faible intensité de $m/z = 187$ (DCI, NH_3) attestant d'un

PM de 186 ($C_{10}H_{18}O_3$); en fait, le fractionnement opère suivant un réarrangement de Mac Lafferty inversé (avec élimination 1,3 d'acide acétique) et débouche précisément sur le cation 6-méthyl-5-heptène-2-onium (m/z 126); l'ensemble du spectre découle ensuite de ce ion plus stable :



Shéma 6
Mécanisme de fragmentation de 1

La stéréochimie de l'acide put être établie après la synthèse de son mélange racémique et de chacun de ses énantiomères (voir chapitres 3 et 8). La séparation de leur ester méthylique sur GC chirale nous permet ensuite de leur attribuer à chacun un temps de rétention qui, comparé avec celui (ou ceux) de l'échantillon naturel, nous fournit directement la configuration absolue et l'excès

énantiomérique. Dans notre cas, l'observation d'un temps de 46.87 minutes coïncide avec les 46.55 minutes de l'isomère R. L'expérience permet également de détecter une faible proportion (8%) de l'isomère S qui pourrait résulter d'une isomérisation partielle de l'énantiomère dans le bloc d'injection :

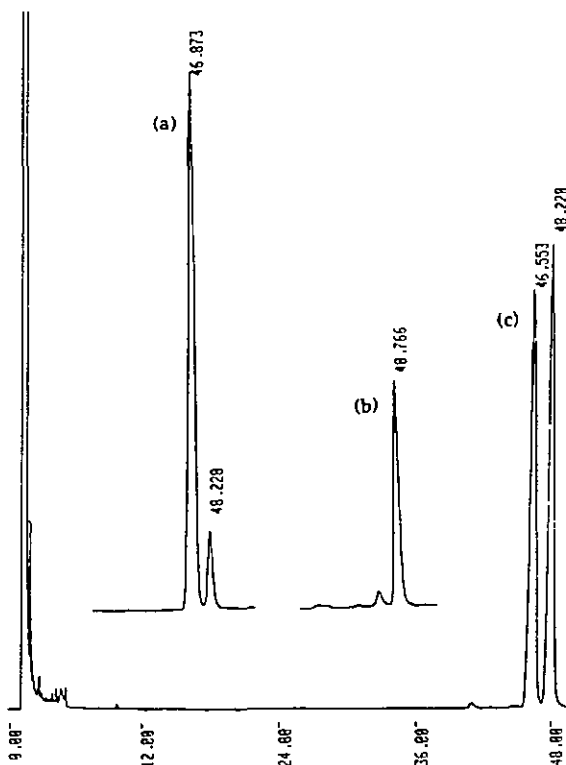


Figure 24 Résolution énantiomérique du dérivé méthylé de 1

(a) Chromatogramme de l'ester méthylique du produit naturel; analyse sur une colonne chirale heptakis(6-O-TBDMS-2,3-di-O-propyl)- β -CD, L 30 m, d_c 0.32 mm, d_f 0.25 μ m, gaz vecteur He 50cm/s, T_{inj} , 190°C, $T_{dét}$, 280°C, isotherme 85°C^[39]. Le pic mineur à 48.22' pourrait résulter d'une isomérisation partielle de l'énantiomère R dans le bloc d'injection.

(b) Chromatogramme comparatif de l'ester méthylique de l'énantiomère (3S) de synthèse.

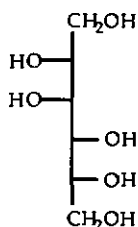
(c) Chromatogramme comparatif de l'ester racémique de synthèse; l'énantiomère R apparaît à 46.55', l'énantiomère S à 48.22'.

ANALYSE

MS : m/z (EI, 70 eV) 186 (0.3), 126 (9), 111 (33), 108 (100), 93 (35), 83 (24); (DCI, NH₃) 187 (3), 168 (M-H₂O, 0.6), 144 (26), 127 (100), 109 (39); ¹H-NMR (MeOH-d₄, 200 MHz) : 5.19 (large t, 7.0 Hz), 2.44 (d, 15 Hz), 2.34 (d, 15 Hz), 2.13 (m, 2H), 1.76 (s, CH₃), 1.70 (s, CH₃), 1.60 (m, 2H), 1.29 (s, CH₃); ¹³C-NMR (D₂O, standard interne DSS, 100 MHz) : 183.3, 136.1, 127.0, 74.5, 50.0, 43.8, 28.2, 27.5, 24.9, 19.4; IR (fenêtre NaCl) : 3307, 1559, 1409 cm⁻¹; UV (λ_{max}, MeOH) : 207 (ε rel. 100), 239 (47) et 282 nm (8); α_D, 25° (MeOH, c = 0.016 M) = -2.02°.

C'est la première fois que ce monoterpène est isolé et caractérisé sous cette forme. Sa configuration absolue elle-même n'a jamais été établie. Auparavant, *Madyastha* et al.^[41] avaient isolé et caractérisé l'ester méthylique d'une culture de *P. incognita*, mais sans préciser la stéréochimie.

D-Mannitol (5)



5

Par extraction prolongée au méthanol du mycélium noir issu du milieu de culture, on obtient une pâte jaunâtre essentiellement constituée de dérivés du glucose. Après acétylation et purification, on obtient 6.9 mg d'un solide blanc ne présentant que deux CH, un CH₂ et trois CH₃ (acétyles) tant en ¹H-NMR qu'en ¹³C-NMR; Toutefois, sa masse de 435 (M+1) atteste d'une molécule symétrique comprenant six carbones et six groupes acétyles. Sa structure est donc celle d'un sucre réduit comportant un axe ou un plan de symétrie. Son α_D, 20° de +19.7° nous indique la forme dextrogyre d'un polyol. Dans la nature, les substances remplissant toutes ces conditions se chiffrent à quatre : les D-galactol, D-mannitol, D-allositol et D-itol. Toutes comportent un élément de symétrie et font virer le plan de lumière polarisée à droite. Notre valeur de α_D pour l'hexaacétate ne nous permet hélas pas de l'identifier. La difficulté pourra finalement être contournée via la synthèse de chacun de leurs acétates et injection en chromatographie gazeuse^[42]. L'injection d'une mixture des quatres sucres réduits péracétylés (optimalisation de la séparation chromatographique), suivie de l'injection des standards et du dérivé naturel nous permettent finalement de l'identifier comme le D-mannitol hexaacétate 17 (Figure 25).

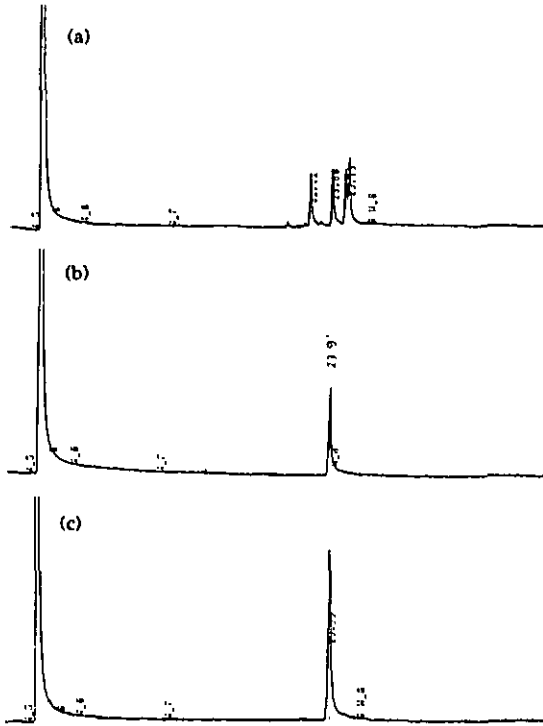


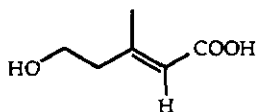
Figure 25 Identification de l'hexose peracétylé
 (a) Chromatogramme (GC) d'un mélange des quatre isomères peracétylés; analyse sur une colonne SE54-DF-0.25, d_c 0.32 mm, L 25m, d_f 0.27 μ m coiffée d'une précolonne SE54-MN, ID 0.32 mm, L 1m, d_f 0.25 μ m, T_{inj} , 230°, $T_{dét}$, 250° selon gradient 170° à 210°, 1°C/min.
 (b) GC du D-mannitol hexaacétate
 (c) GC comparative du dérivé naturel permettant de l'identifier au D-mannitol

ANALYSE

dérivé peracétylé 17 : MS (EI, 70 eV) 435 (8), 375 (M-AcO, 100), 361 (M-CH₂AcOH, 34), 289 (59), 259 (75), 217 (46); ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) : 5.43 (d, 8.8 Hz), 5.04 (m), 4.21 (dd, 12.6, 2.7 Hz), 4.03 (dd, 12.6, 5.2 Hz), 2.1 (s, CH₃), 2.08 (s, CH₃) et 2.05 ppm (s, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz) : 170.5, 169.9, 169.7, 67.9, 67.5, 61.9, 20.8, 20.7, 20.6 ppm; α_D , 20° (CHCl₃, 0.016 M) = +19.7°.

En tant que constituant des polysaccharides des membranes cellulaires, il n'est pas étonnant d'isoler le D-mannitol d'un extrait du mycélium. Nous ne nous attarderons donc pas davantage sur les raisons de sa présence dans le champignon.

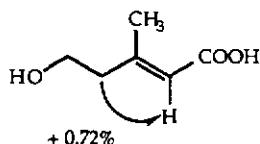
Acide (2E)-3-méthyl-5 hydroxy pentène-2-oïque (11)



11

7 mg d'une huile jaunâtre, UV active, se révélant bleu profond par traitement à la vanilline sont obtenus après chromatographie de la fraction non active C; cette substance polaire n'est guère soluble que dans l'acétone ou le méthanol. Les spectres $^1\text{H-NMR}$, COSY et les expériences de découplage homonucléaire mettent en lumière deux méthylènes mutuellement couplés, dont un faiblement avec un proton oléfinique (5.73 ppm). On distingue également un doublet méthyle couplé à ce même proton oléfinique. L'IR révèle un groupe carboxylique (vibration de valence du CO à 1692 cm^{-1} , élongation du CO-O couplée aux déformations de l'hydroxyle dans le plan à 1233 cm^{-1}) et confirme la présence d'une double liaison (élongation C=C à 1646 cm^{-1}). On a donc bel et bien une oléfine trisubstituée comportant un méthyle, un acide carboxylique et un méthylène couplé à un autre plus lointain. Un pic moléculaire de m/z 131 (M+H) doublé d'une forte perte d'eau (m/z 112) indique la présence d'un second groupe hydroxyle dans la molécule, en l'occurrence sur le méthylène le plus déblindé (3.72 ppm).

La question de l'orientation relative des substituants sur la double liaison peut être résolue via les couplages observés et une brève expérience NOE. Les deux substituants, méthyle et méthylène, couplent tous deux avec une valeur de 1.1 Hz au proton oléfinique. Un tel couplage n'est possible que si le substituant se trouve en cis ou en trans du proton; il s'ensuit que le groupe carboxylique et ce proton sont géminaux et que méthyle et méthylène occupent le carbone adjacent. Les spectres NOEDIF de 11 obtenus par irradiation du méthyle, puis du méthylène, révèlent un effet NOE négligeable sur le proton oléfinique dans le premier cas, et de 0.72% dans le second :



Shéma 7

Effets NOE (%) observés sur le proton oléfinique par irradiation des signaux méthyle (2.17 ppm) ou méthylène (2.37 ppm)

L'effet NOE étant d'autant plus fort que la distance séparant les deux protons d'intérêt est faible, on en conclut que méthylène et proton oléfinique sont mutuellement *cis*; il s'agit donc de l'acide (2E)-3-méthyl-5-hydroxy-pentène-2 oïque.

Le déplacement chimique et la multiplicité des protons permettent une attribution très claire de leurs signaux; les ^{13}C sont aisément identifiés au vu du spectre short-range HETCOR (acétone- d_6 , 50 MHz) qui permet de différencier les carbones oléfiniques C-2 (117.7 ppm, corrélation hétéronucléaire avec le proton à 5.73 ppm) et C-3 (158.4 ppm, pas de corrélation hétéronucléaire).

L'acide *trans*-3-méthyl-5-hydroxy pentène-2-oïque a été isolé du milieu de culture de nombreux champignons. Pour une revue plus détaillée de sa distribution au sein des microorganismes, on peut consulter avec avantage les travaux de Diekmann¹⁴³.

ANALYSE

MS : m/z (EI, 70 eV) 131 (3), 112 (71), 100 ($\text{MH}^+ - \text{CH}_2\text{OH}$, 100), 97 ($\text{M} - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$, 18), 85 ($\text{M} - \text{COOH}$, $\text{M} - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 41), 82 ($\text{M} - \text{CH}_2\text{OH} - \text{OH}$, 83); $^1\text{H-NMR}$ (acétone- d_6 , 200 MHz) : 5.73 (tq, 1.1 Hz), 3.72 (t, 6.3 Hz), 2.37 (dt, 6.3, 1.1 Hz), 2.17 ppm (d, 1.1 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (acétone- d_6 , 100 MHz) : 167.9 (C-1), 158.4 (C-3), 117.7 (C-2), 60.6 (C-5), 44.8 (C-4), 18.8 ppm (3-Me); IR (fenêtre KBr) : 1692, 1646, 1233, 1158 cm^{-1} .

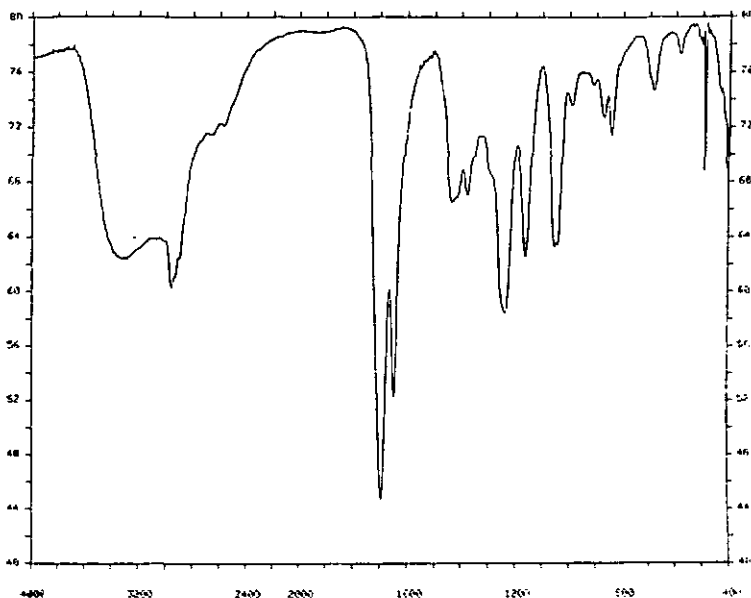


Figure 26 Spectre IR de 11

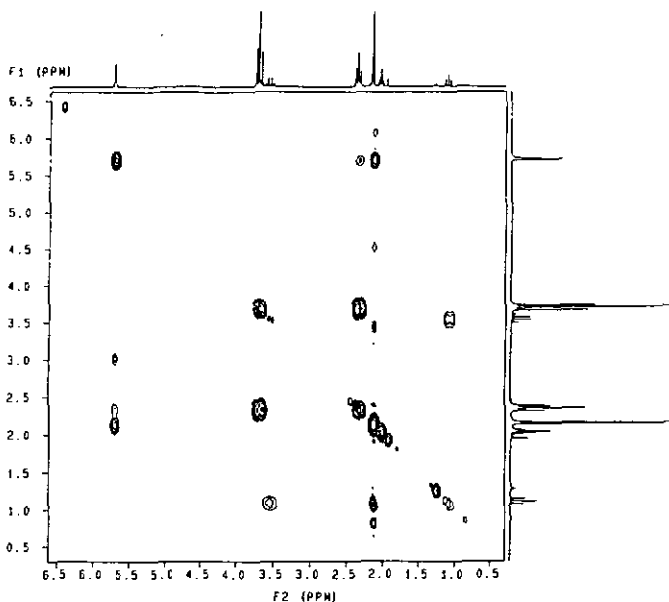
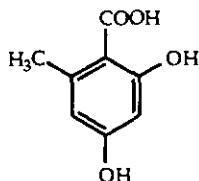


Figure 27 Spectre COSY de 11 (200 MHz, acétone-d₆)

Acide orsellinique (12)

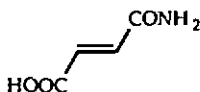


12

Isolés de la fraction F, 3 mg d'un solide blanc UV actif ne comprenant que trois signaux en ¹H-NMR; on y distingue deux protons aromatiques mutuellement en méta ($J = 2.6$ Hz, système AB) et un singulet méthyle à 2.53 ppm. L'IR est caractéristique d'un acide carboxylique avec la vibration de valence du carbonyle à 1640 cm^{-1} , la déformation dans le plan du groupe hydroxyle (1461 cm^{-1}) et l'élongation du CO-O à 1261 cm^{-1} . Du reste, le spectre de masse est dominé par la décarboxylation avec un pic intense à m/z 124; son poids moléculaire de m/z 168 et ses deux signaux ¹³C à 166.2 et 162.1 ppm identifient les deux derniers substituants comme des groupes hydroxyles. Les règles d'incrément en ¹³C-NMR permettent de très fortement soupçonner l'acide orsellinique; la comparaison avec les données de la littérature^[44,45] confirme cette hypothèse.

ANALYSE

MS : m/z (EI, 70 eV) 168 (1), 150 (2), 124 (100), 107 (M-CO₂-OH, 19), 95 (36); ¹H-NMR (acétone-d₆, 200 MHz) : 6.25 (d, 2.6 Hz), 6.20 (d, 2.6 Hz), 2.53 ppm (s, CH₃); ¹³C-NMR (acétone-d₆, 100 MHz) : 173.9, 166.2, 162.1, 144.2, 111.0, 100.7, 23.6 ppm; IR (fenêtre KBr) : 1640, 1625 (ν_{C=C}), 1461, 1364 (déformation angulaire du OH dans le plan), 1261, 839 et 799 cm⁻¹ (déformation angulaire du OH hors du plan); UV (λ_{max}, MeOH) : 258 (ε rel. 100), 296 nm (54).

Monoamide de l'acide fumarique (13)

13

On obtient 8 mg d'un solide blanc UV actif après chromatographie de la fraction non active A. Son spectre ¹H-NMR assez simple laisse entrevoir deux protons mutuellement couplés dans la région des aromatiques (7.0 et 6.7 ppm, d, 15.8 Hz) et un signal large et intense à 4.9 ppm. Toutefois, le spectre ¹³C, avec deux uniques signaux, écarte l'hypothèse d'un noyau arylique. Il s'agit donc d'une double liaison disubstituée en *trans*. Du reste, le spectre de masse, avec un poids moléculaire apparent de m/z 115, est parfaitement en accord avec cette suggestion. L'IR est marqué par deux bandes intenses à 3583 et 3346 cm⁻¹, caractéristiques de la vibration de valence d'une liaison N-H (NH libre et NH lié par ponts hydrogènes). On observe par ailleurs une bande intense à 1691 cm⁻¹, doublée d'une autre à 1665 cm⁻¹, qu'on attribue à l'élongation du CO et à la déformation du NH₂ d'un amide (bandes amide I et II). Une troisième bande à 1709 cm⁻¹ est attribuée quant à elle à l'élongation du CO d'un acide. Il s'agit donc du dérivé monoamide de l'acide fumarique, structure vérifiée par la synthèse subséquente du composé (§ 3 et 8).

ANALYSE

MS : m/z (EI, 70 eV) 115 (13), 99 (M-NH₂, 100), 97 (M-H₂O, 41), 87 (M-CO, 6), 81 (24), 71 (31); ¹H-NMR (MeOH-d₄, 200 MHz) : 7.0 (d, 15.8 Hz), 6.7 (d, 15.8 Hz), 4.1 (s); ¹³C-NMR (MeOH-d₄, 50 MHz) : 168.6 (COOH et CONH₂), 137.5 (2 C oléfiniques); IR (fenêtre NaCl) : 3583, 3346, 1709, 1691, 1665, 1431 (élongation du C-O couplée à une déformation de l'OH dans le plan), 1309 cm⁻¹.

2.5 Dégradation de la 1(2H) 3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphtalénone

2.5.1 Identification et analyse

On a très vite constaté les symptômes d'une dégradation spontanée de cette toxine en solution. Après peu de temps, des solutions aqueuses moyennement concentrées développaient un rougissement intense allant de pair avec la manifestation de symptômes phytotoxiques étendus sur le platane. Sur la base de cette observation, une hypothèse fut faite sur la production d'un dérivé sensiblement plus toxique à partir de la 2,4,8 trihydroxynaphtalénone. Nous nous sommes donc efforcés de déterminer sous quelles conditions cette substance se formait afin de l'identifier pleinement.

La naphthalénone demeurait stable par traitement acide, même prolongé; elle demeurait inaltérée par irradiation lumineuse (lampe à vapeurs de mercure), élévation de température ou exposition prolongée à l'oxygène atmosphérique. Seule la présence d'une base, même faible (proline), donnait lieu à un très rapide rougissement de la solution. On a dès lors constaté que cette dégradation était d'autant plus rapide que le pH de la solution était élevé. Ce fait, contredit par des mesures ultérieures de la cinétique de dégradation du composé 3 à deux pH différents (9 et 10), est abondamment discuté plus loin (§ 2.5.2). Des conditions expérimentales optimisées (voir § 8, partie expérimentale) nous ont finalement permis d'isoler cette substance et de l'analyser :

Solide rouge-orangé, elle se dissout instantanément dans l'eau lors d'une élévation du pH; simultanément, sa couleur en solution vire du jaune au rouge, ce qui traduit la présence d'un proton labile sur un chromophore étendu.

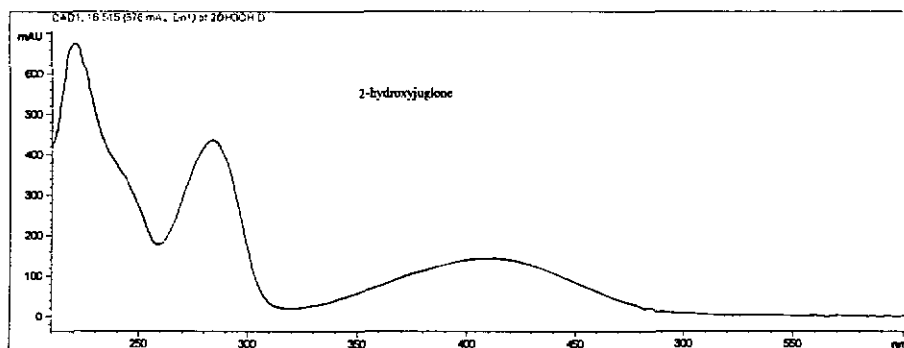
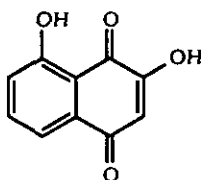


Figure 28 Spectre UV de 14 (MeOH)

Son spectre $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) reste très semblable à celui de la naphthalénone dont elle est issue, si ce n'est la complète disparition du système de protons aliphatiques entre 2 et 5 ppm. Seul apparaît un signal à 6.35 ppm dépourvu de tout couplage. Son spectre de masse, avec un poids moléculaire de m/z 190, est

dominé par la perte d'un CO (m/z 162), puis d'un deuxième (m/z 134), ce qui renforce l'hypothèse d'une oxydation du composé initial. Par acétylation, on obtient à nouveau une substance orange (34) comportant deux groupes acétyles (2.45 et 2.4 ppm, m/z 274) et le système habituel de protons aromatiques. Ces données spectroscopiques sont en accord avec deux dérivés possibles de la juglone, la 2- et la 3-hydroxyjuglone. Leur synthèse et leur résolution par HPLC permettront finalement de l'identifier comme la 2-hydroxyjuglone (14) (voir Figure 29) :



14

Fait intéressant, cette substance n'a jamais été détectée dans l'extrait organique du milieu de culture de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*; ce résultat n'est pas surprenant car le milieu fongique possède un pH de 5 pour lequel aucune dégradation n'est observée *in vitro*.

Rarement isolée, la 2-hydroxyjuglone est considérée, au même titre que les tétralones 2, 3 et 4 précédemment décrites, comme un intermédiaire potentiel dans la biosynthèse de la mélanine (voir § 6, discussion).

ANALYSE

MS : m/z (EI, 70 eV) 190 (90), 162 (M-CO, 2), 134 (M-2 CO, 1), 120 (M-C₃H₂O₂, 3), 92 (M-C₃H₂O₂-CO, 2); (DCI, NH₃) 208 (50), 191 (100), 162 (2), 134 (<1), 121 (14), 105 (<1); ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) : 11.1 ppm (s, OH), 7.64 (t), 7.63 (s, OH), 7.23 (d), 7.22 (d), 6.35 (s); ¹H-NMR (acétone-d₆, 200 MHz) : 7.78 (t, 8.0 Hz), 7.56 (d, 8.0 Hz), 7.25 (d, 8.0 Hz), 6.20 (s); IR 1729, 1628, 1570 et 1455 cm⁻¹; UV (λ_{max}, EtOH) : 220 (ε rel. 100), 240 (épaulement, 57), 282 (66), 402 nm (25) (forme acide); 248 (ε rel. 100), 280 (66), 448 nm (28) (forme basique).

2.5.2 Etudes cinétiques de la dégradation basique de 3

Une relation de cause à effet étant soupçonnée entre la substance 14 et la manifestation de symptômes phytotoxiques sur le platane, il paraissait utile de quantifier cette dégradation. Par quel mécanisme 3 est-elle convertie en 14 ? Quelles sont les conditions nécessaires à sa formation ? Globalement, la naphthalénone subit une oxydation, et celle-ci semble d'autant plus rapide que le pH est élevé. Au sein d'un platane adulte, le pH est systématiquement compris entre 7 et 8^[46]. On peut donc raisonnablement admettre que la concentration en

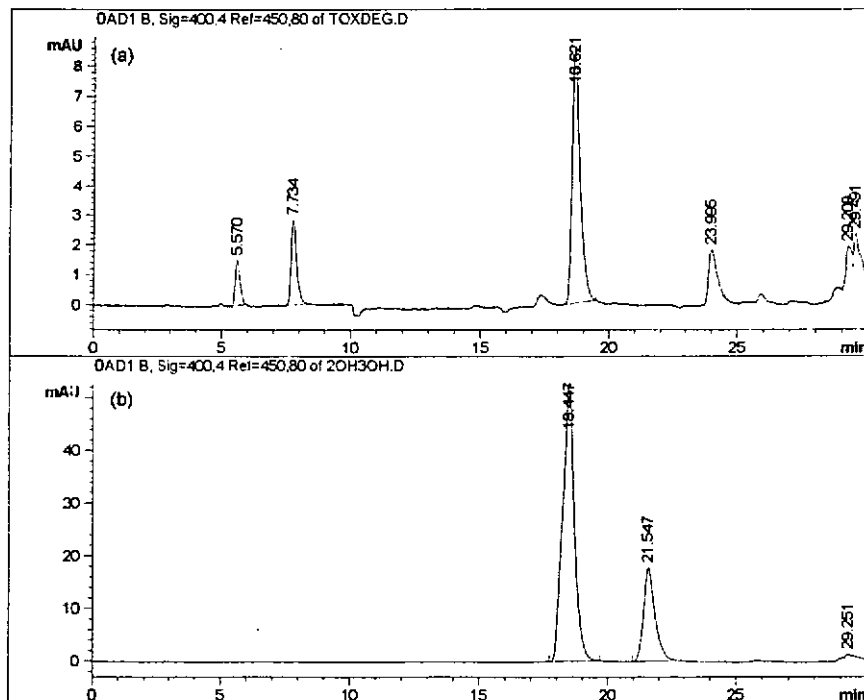


Figure 29 Détection et identification du produit de dégradation de la 1(2H) 3,4 dihydro-2,4,8-trihydroxynaphthalénone (3)
 (a) HPLC (solvant A = MeOH, AcOH 1%, solvant B = H₂O, AcOH 1%) d'une solution aqueuse de naphthalénone 3 (1 mg/ml) après quatre jours de contact avec une microbouture de platane. Gradient de 30% à 60% A (20'), puis de 60% à 80% A (5'), détection UV à 400 nm.
 (b) HPLC comparative d'un mélange de 2-hydroxyjuglone (18.4') et 3-hydroxyjuglone (21.6') synthétiques, permettant d'identifier 14 à la première d'entre elles.

ions hydroxyyles y est constante; enfin, à l'instar de tous les végétaux, un platane constitue un environnement éminemment oxydant; on admettra donc là aussi que la concentration en oxygène reste constante au sein de l'arbre, et qu'elle n'est que guère affectée par des réactions oxydatives telles que 3 → 14. Ces considérations physiologiques nous permettent de recourir à des solutions tamponnées pour étudier la dégradation "biomimétique" de 3.

Les solutions de naphthalénone à différentes concentrations (0.1, 0.5 et 1 mg/ml) sont maintenues à l'air, ce qui tout au moins garantit un apport constant d'oxygène. Leur absorbance à 500 nm, λ spécifique de la forme aprotique de la 2-hydroxyjuglone, est relevée à intervalles réguliers de temps, ce qui, comparée à

des courbes de calibration $c = f(A_{500})$, fournit la concentration de 14 à chaque instant. Les solutions ont été fixées à deux valeurs de pH, 9 et 10 (tampon borax 0.025 M), pour lesquelles une cinétique de dégradation est observée dans des temps raisonnables (moins de vingt-quatre heures). On admet dès lors deux hypothèses pour la formation de la quinone 14 : un processus monomoléculaire et un autre bimoléculaire.

1) Processus monomoléculaire (loi de premier ordre en A)

Si A représente la naphthalénone, et B la 2-hydroxyjuglone déprotonée, alors



$$v = k \cdot A \cdot [\text{OH}^-] \cdot [\text{O}_2] \quad (2)$$

ou
$$v = k' \cdot A \quad (3)$$

avec $k' = k \cdot [\text{OH}^-] \cdot [\text{O}_2]$, où k , $[\text{OH}^-]$ et $[\text{O}_2]$ sont des constantes. Alors :

$$-\frac{dA}{dt} = k' \cdot A$$

peut être réarrangé en

$$-\frac{dA}{A} = k' \cdot dt \quad (4)$$

L'expression (4) donne par intégration

$$-(\ln A - \ln A_0) = k' \cdot t$$

ou
$$\ln \frac{A_0}{A} = k' \cdot t \quad (5)$$

Dans notre cas, B est connu à chaque instant et on obtient A selon

$$A = A_0 - B \quad (6)$$

En reportant $\ln[A_0/A]$ en fonction de t , on doit obtenir une droite croissante de pente $m = k'$. C'est effectivement ce que l'on constate (Figure 30).

Ces deux droites confirment à priori une cinétique de dégradation de pseudo premier ordre en A dont le bilan serait



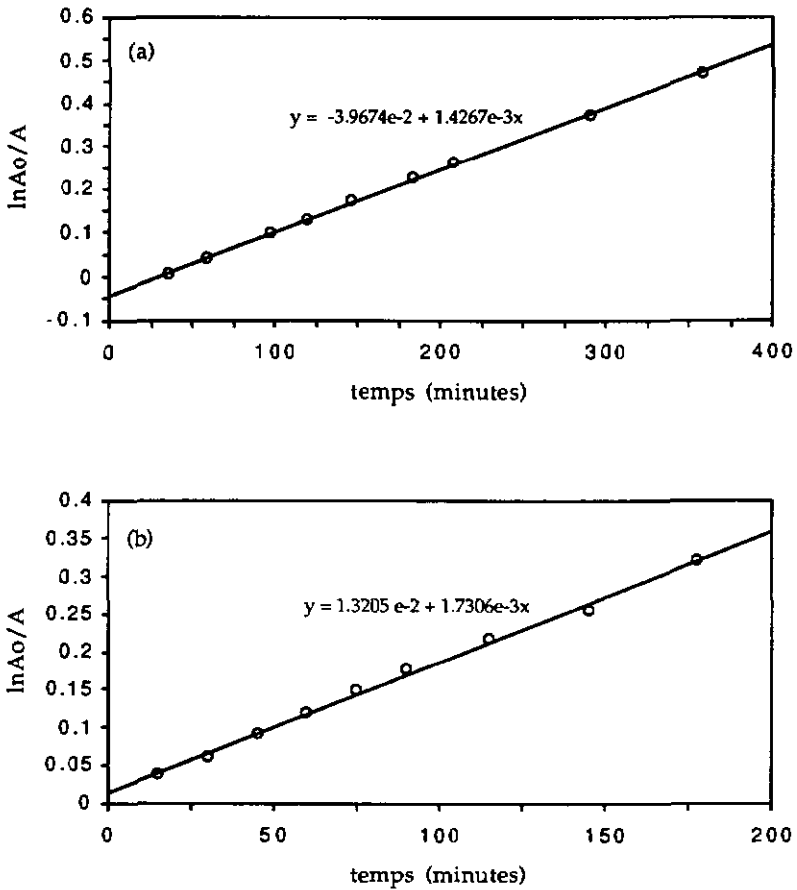


Figure 30 Représentations de la dégradation oxydative de 3 (1^{er} ordre en A)
 (a) cinétique à pH 9, $A_o = 0.1$ mg/ml
 (b) cinétique à pH 10, $A_o = 0.1$ mg/ml

2) Processus bimoléculaire (loi de second ordre en A)

Dans ce cas, le bilan réactionnel se résume à



où concrètement deux molécules de naphthalénone interagissent pour donner naissance à deux nouvelles substances B. De nombreux exemples tirés de la

littérature montrent que les processus oxydatifs sont fréquemment radicalaires et qu'ils comportent un transfert d'électron de la molécule réductrice vers l'oxydant. Dès lors

$$v = k \cdot [A]^2 \cdot [OH^\cdot] \cdot [O_2] \quad (9)$$

ou
$$v = k' \cdot [A]^2 \quad (10)$$

Par intégration de l'expression

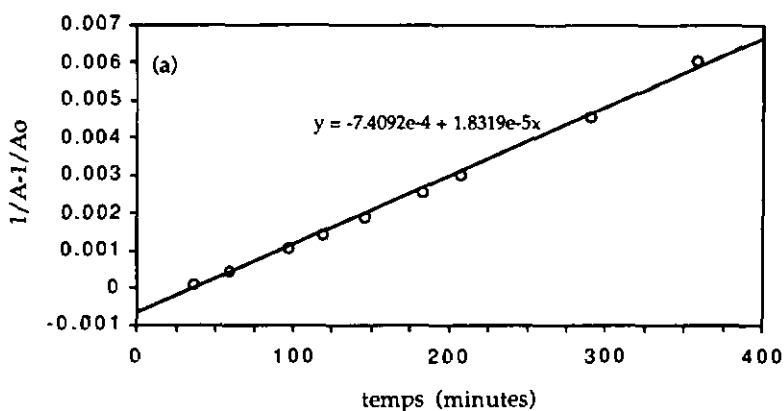
$$-\frac{dA}{A^2} = k' \cdot dt \quad (11)$$

on obtient finalement l'expression de la loi cinétique de second ordre :

$$\frac{1}{A} - \frac{1}{A_0} = k' \cdot t \quad (12)$$

En reportant $[1/A - 1/A_0]$ en fonction du temps, on observe à nouveau une relation linéaire caractéristique d'une cinétique de second ordre en A (Figure 31). Cette apparente contradiction n'est pas si surprenante, car on sait que pour de petites valeurs numériques (comprises entre 0 et 10^{-2}), le logarithme naturel d'une expression évolue en valeur absolue comme l'inverse de cette expression; dès lors, de (5) on tire :

$$\ln \frac{A_0}{A} = \ln A_0 - \ln A \approx \frac{1}{A} - \frac{1}{A_0} \quad (13)$$



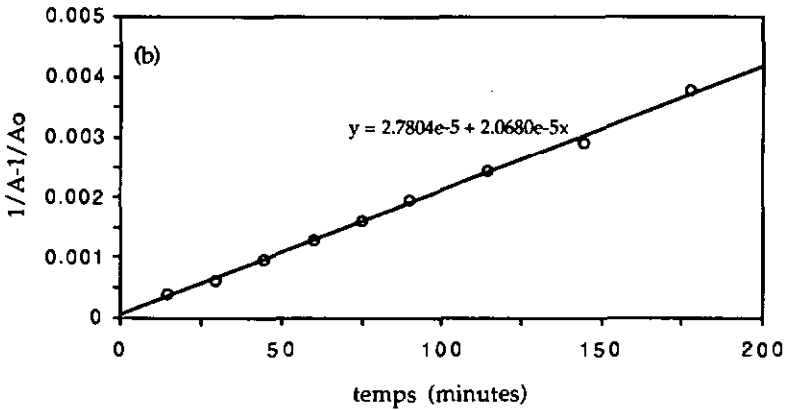
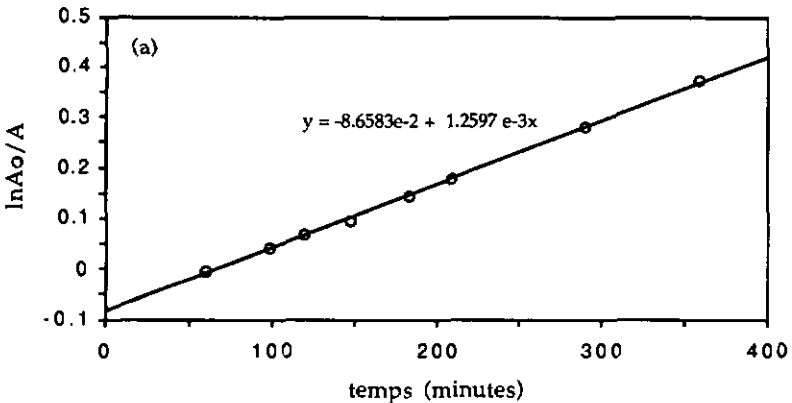


Figure 31 Représentations de la dégradation oxydative de 3 (2^{ème} ordre en A)
 (a) cinétique à pH 9, $A_0 = 0.1$ mg/ml
 (b) cinétique à pH 10, $A_0 = 0.1$ mg/ml

et cette dernière expression équivaut à (12).

Dans le cas présent, cette propriété nous interdit de nous prononcer sur l'ordre de la réaction. Faisons donc varier la concentration initiale A_0 de naphthalénone 3. Si l'on fixe cette valeur à 0.05 mg/ml et que l'on répète l'étude cinétique comme décrite ci-dessus, on observe cette fois-ci une loi exclusive de 1^{er} ordre, la relation de second ordre cessant d'être linéaire et devenant polynômiale :



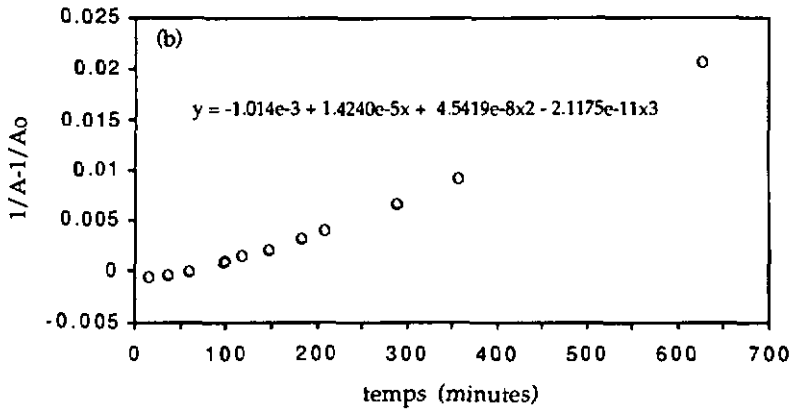


Figure 32 Représentations de la dégradation oxydative de 3 à pH 9 ($A_0 = 0.05$ mg/ml, courbes de 1^{er} et second ordre en A)

(a) application des valeurs mesurées à une loi cinétique de 1^{er} ordre en A

(b) application des valeurs mesurées à une loi cinétique de second ordre en A

La réaction est donc de premier ordre en A, et engage une seule molécule de naphtalénone à la fois. Cependant, les valeurs de cinétique obtenues sont tout à fait particulières; en effet, s'il y a dépendance du pH, on doit avoir

$$\frac{k'_{\text{pH } 10}}{k'_{\text{pH } 9}} = \frac{k \cdot [\text{O}_2] \cdot 10^{-4}}{k \cdot [\text{O}_2] \cdot 10^{-5}} = 10$$

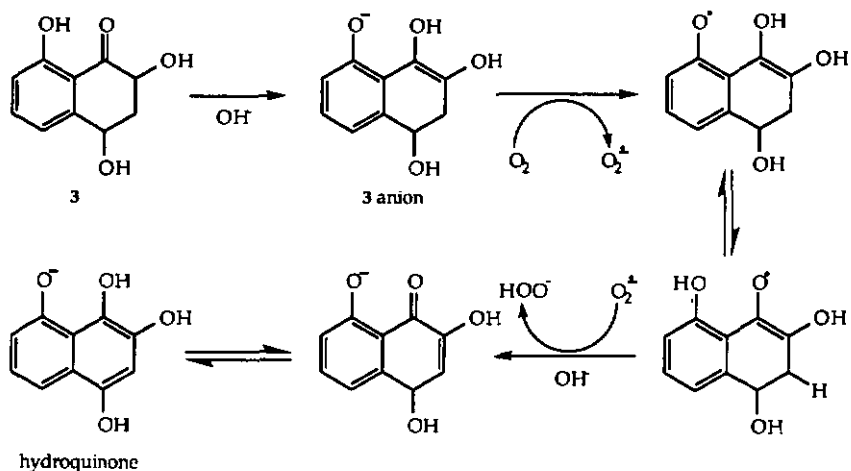
Or, en rapportant les deux pentes de la figure 30, on obtient

$$\frac{k'_{\text{pH } 10}}{k'_{\text{pH } 9}} = 1.2$$

ce qui semble indiquer que la dégradation oxydative est indépendante du pH. Dès lors, deux hypothèses :

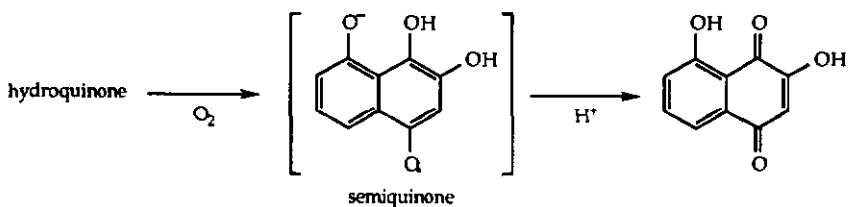
1) La réaction est d'ordre inférieur à 1 en $[\text{OH}^-]$. Cette hypothèse est peu probable car elle implique la participation de moins d'un hydroxyle dans l'abstraction d'un proton de 3.

2) Les ions hydroxydes n'entrent pas en jeu dans l'étape cinétiquement déterminante. Ce postulat repose sur de très nombreuses descriptions faites dans la littérature quant à l'oxydation des 1,2- et 1,4-diphénols en 1,2- et 1,4-quinones; toutes suggèrent l'existence d'un anion radical intermédiaire ("semiquinone") exclusivement stable en milieu alcalin^[47,48] :



Un tel mécanisme implique le transfert d'un électron d'une molécule de naphthalénone sur de l'oxygène, comme c'est généralement le cas lors des processus d'oxydation radicalaire. On relèvera les nombreuses formes tautomères que ces molécules admettent; elles permettent une excellente délocalisation des charges et des radicaux dans toute la structure, ce qui les rend particulièrement vulnérables aux oxydations.

L'anion ainsi nouvellement formé (hydroquinone) est à son tour facilement oxydé à l'air en un anion radical (semiquinone) stable en milieu alcalin^[47,48]; seule la réacidification brise ce complexe et entraîne l'oxydation finale du radical :



Si l'on en croit le mécanisme, le processus oxydatif opère selon une cinétique de premier ordre en A; il est globalement indépendant du pH. Certes, un milieu alcalin stabilise fortement les intermédiaires radicalaires (semiquinones); il permet également une abstraction plus aisée d'un électron de la naphthalénone initiale, mais en soi il n'accélère pas le processus : il le rend simplement possible. Le problème se résume dès lors à une barrière cinétique régie par le pKa de la naphthalénone 3, la réaction n'ayant lieu que lorsque le pH permet son anionisation. Les faibles quantités détectées à pH 7 résulteraient quant à elles

d'une interaction entre notre molécule et des principes nucléophiles (capteurs de protons) contenus dans les microboutures de platane.

L'hypothèse est renforcée par les spectres UV des solutions de toxine tamponnées; on y observe une forte absorption au-delà de 550 nm qu'on attribue au complexe radicalaire de la semiquinone; en effet, aucune des 2-hydroxyjuglones (protonée ou déprotonée) n'absorbe à une telle longueur d'onde (Figure 33). En revanche, par acidification de cette même solution, le complexe radicalaire se brise et on observe un spectre UV caractéristique de la 2-hydroxyjuglone protonée (Figure 34).

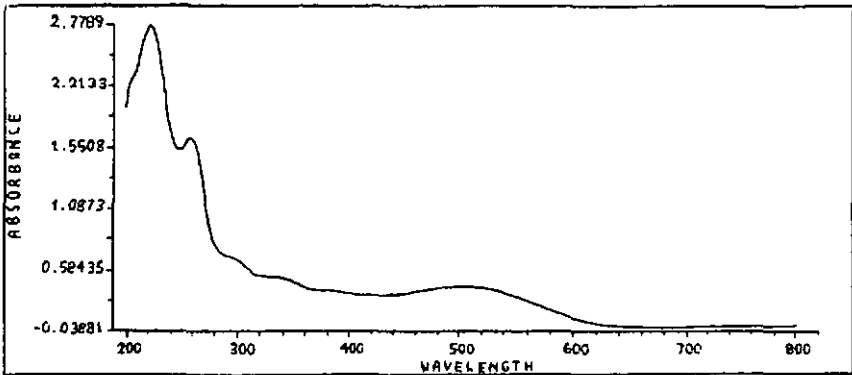


Figure 33 Spectre UV d'une solution de 3 (0.1 mg/ml) tamponnée à pH 10 et soumise à oxydation atmosphérique durant 18 heures.

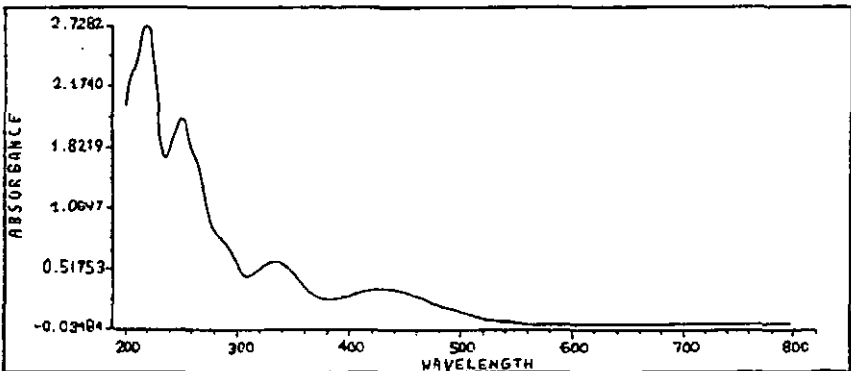


Figure 34 Spectre UV de la même solution après réacidification (CH_3COOH). On distingue les absorptions caractéristiques de la 2-hydroxyjuglone à ~250, 280 et 430 nm, et celles de la naphthalénone 3 à ~250 et 330 nm.

Il s'ensuit que l'espèce détectée en solution alcaline est l'anion radical, et non la forme déprotonée de la 2-hydroxyjuglone comme nous l'avions précédemment mentionné; nos valeurs de cinétique ne sont donc pas représentatives, car elles sont établies sur des calibrations faites avec des solutions tamponnées de 2-hydroxyjuglone, où n'apparaissent pas de tels complexes radicalaires. Ces résultats n'ont donc qu'une valeur mécanistique.

3. Synthèses

3.1 Introduction

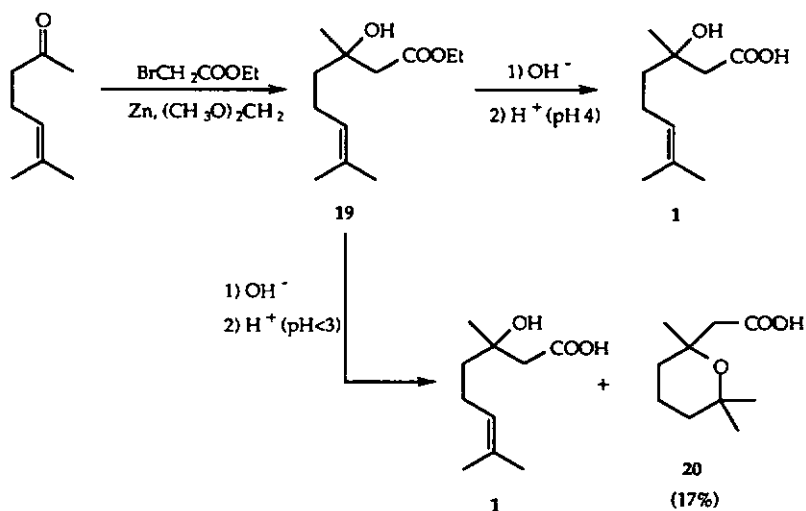
Dans le but de confirmer la structure de certains des produits isolés du milieu de culture de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*, nous avons recouru à leur synthèse. Cela concerne les composés **1** (dans sa forme racémique et énantiomérique pure), **3** et **13** ainsi que les dérivés **14** (2-hydroxyjuglone), **15** (3-hydroxyjuglone), **16**, **17** et **18** (resp. D-galactol-, D-mannitol- et D-allositol-hexaacétates). Les synthèses de **1** et de **13**, ainsi que de tous les dérivés bromés de la 1(2H) 3,4 dihydro-4,8 dihydroxy-naphtalénone sont inédites.

On trouvera ci-dessous les schémas généraux de synthèse et une brève discussion relative à l'énantiomère **1R**. Tous les modes opératoires figurent dans la partie expérimentale (§ 8).

3.2 Schémas réactionnels

3.2.1 Acide 3,7 diméthyl-3 hydroxy-octène-6-oïque (racémate)

Nécessaire à la confirmation de la pureté énantiomérique du composé isolé, la synthèse du racémate s'appuie sur une réaction de Reformatsky : addition d'un organozincique sur une fonction carbonyle :

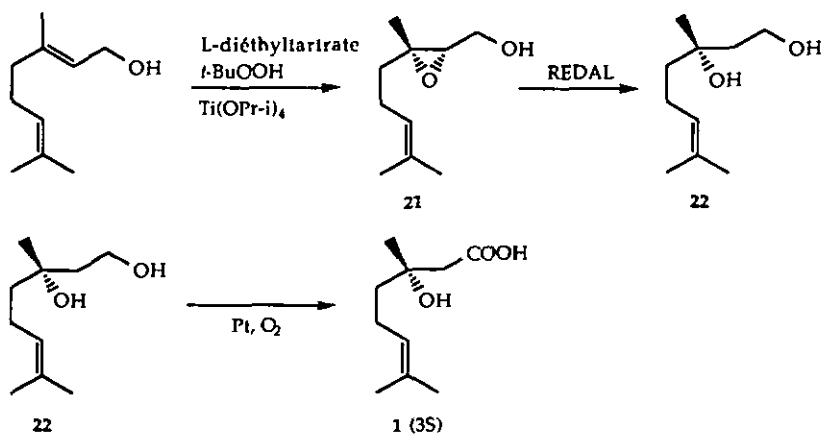


On relèvera la formation minoritaire de l'acide tétrahydro-2,6,6-triméthyl-2H-2-pyrane-acétique **20** lors d'une réacidification trop poussée de l'ester saponifié. Ce produit secondaire n'a en revanche jamais été décelé lors d'une reprotonation attentive du carboxylate (pH maintenu supérieur à 4 et température n'excédant pas 0°C).

Les données spectrales de l'acide de synthèse sont en parfait accord avec celles du produit naturel (voir partie expérimentale).

3.2.2 Acide (3R) (resp. 3S) 3,7 diméthyl-3 hydroxy-octène-6-oïque

Basés sur une époxydation assymétrique de Sharpless^[49], les deux énantiomères 3S et 3R purent être synthétisés moyennant l'utilisation de (+)-(R,R)-L-diéthyltartrate et (-)-(S,S)-D-diéthyltartrate respectivement. La réduction de l'époxyde formé, et l'oxydation subséquente de l'alcool primaire en acide carboxylique fournit les deux énantiomères purs; le schéma suivant décrit le cas de l'isomère 3S :



Dans l'époxydation de Sharpless, un intermédiaire dimérique du titane induit, après sa coordination avec l'hydroxyle allylique du substrat et un peroxyde, une époxydation énantiosélective de la double-liaison voisine (schéma 8). La symétrie du catalyseur est elle-même conditionnée par la chiralité de l'ester tartrique^[50], les substituants éthoxycarbonyles entraînant la coordination exclusive du substrat (indistinctement en α ou en β du complexe de titane) dans une orientation donnée; on minimise de la sorte les répulsions stériques :

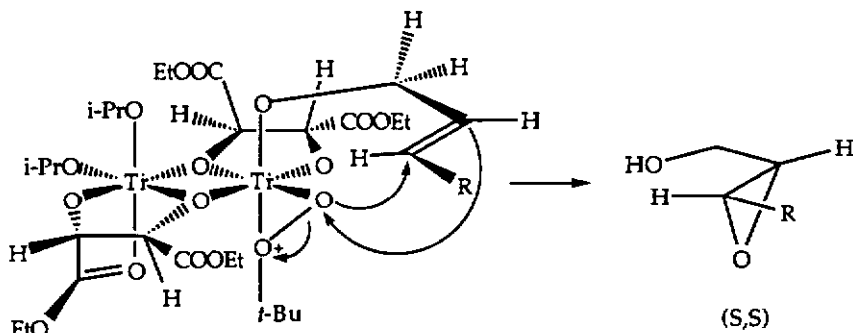
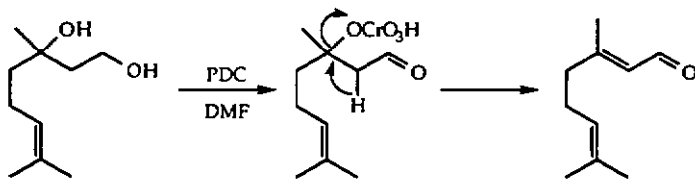


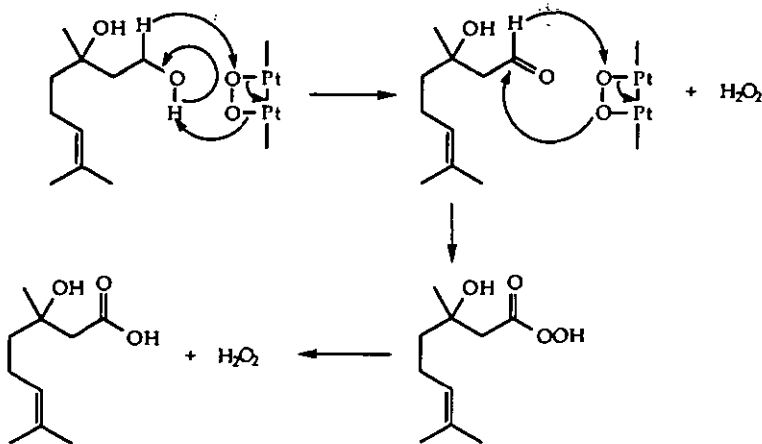
Schéma 8

Structure de l'intermédiaire chiral résultant de la coordination du (+)-(R,R)-L-diéthyltartrate sur le titane. Dans le cas présent, la coordination de l'hydroxyle allylique en α du plan moléculaire du catalyseur induit l'époxydation sous le plan moléculaire du substrat. Un cas analogue s'applique lors de la complexation du titane par l'isomère (-)-(S,S)-D du diéthyltartrate; seule la disposition de l'alcool allylique change, car elle est conditionnée par une orientation différente des substituants éthoxycarbonyles de l'ester tartrique.

L'ouverture régiosélective de l'époxyde s'obtient aisément par traitement au RED-AL (lithium bis(2-méthoxyéthoxy)aluminium hydrure) qui fixe l'hydroxyle en position 3. L'oxydation subséquente de l'alcool primaire en acide carboxylique est compliquée par la présence de cet hydroxyle; plusieurs oxydations (pyridinium dichromate PDC, PCC) se sont soldées par son élimination et débouchent sur le citral :



Il fallait donc se tourner vers un oxydant s'attaquant spécifiquement à l'hydroxyle primaire sans affecter l'alcool tertiaire, donc sans accroître son caractère nucléofuge; le platine finement divisé sous atmosphère d'oxygène remplit ces conditions et fournit l'acide recherché^[51]. Plusieurs mécanismes différents ont été postulés; l'un d'entre eux suggère la fixation directe d'oxygène sur le support métallique^[52] :



3.2.3 Analogues bromés de la 1(2H) 3,4 dihydro-4,8 dihydroxynaphtalénone et de son dérivé diacétate

Dans le but d'obtenir la naphthalénone 3, nous avons imaginé une variante de la procédure décrite par *Fujimoto et Satoh*^[53]; partant de leur premier intermédiaire de synthèse (1(2H) 3,4 dihydro-4,8 dihydroxynaphtalénone), la démarche revenait à bromer sélectivement la cétone obtenue en α . Dans un second temps, nous pensions substituer ce brome par un hydroxyle pour obtenir la naphthalénone voulue en trois étapes de synthèse. Cette procédure avait l'avantage d'éviter l'hydroxylation avec le peroxide de molybdène, une étape laborieuse tant sur le plan synthétique que de la purification; elle nécessitait en outre plusieurs protections et déprotections successives qui s'exercent généralement au détriment de la pureté. Qui plus est, les rendements décrits dans la littérature restent extrêmement bas^[53], ce qui n'en faisait pas une démarche séduisante. Nous avons donc privilégié des voies alternatives qui ne se sont hélas pas avérées appropriées.

En admettant même que la première étape se déroule conformément à nos attentes, nous aurions dû poursuivre la substitution nucléophile du brome par l'hydroxyle en milieu basique; or, ainsi que nous l'avons montré (§ 2.5), la molécule-cible n'est pas stable dans ces conditions, ce qui aurait entraîné sa décomposition *in situ*. Il aurait néanmoins été envisageable de substituer l'halogène par un acétate, puis d'hydrolyser le composé obtenu au moyen de iodure de triméthylsilyle.

L'étape de bromation s'inspire des travaux de *King et Ostrum*^[54]: ces auteurs mentionnent l'utilisation du bromure de cuivre (II) dans la bromation sélective des cétones aromatiques. Concrètement, deux molécules d'halogénure réagissent sur une molécule de cétone et sont entièrement converties en halogénure de

cuivre (I); on évite la dibromation en limitant le CuBr_2 à deux équivalents. La réaction est aisément suivie par simple observation du mélange réactionnel : CuBr_2 étant noir et CuBr blanc, on considère la réaction comme terminée lorsque la suspension est incolore. Le mécanisme proposé par Kosower et al.[55] prône la réduction simultanée des deux atomes de cuivre (II) via un double transfert d'électrons. Dans l'étape déterminante, les déplacements électroniques concernent un intermédiaire à six atomes, avec les deux sels de cuivre (II) arrangés en dimère :

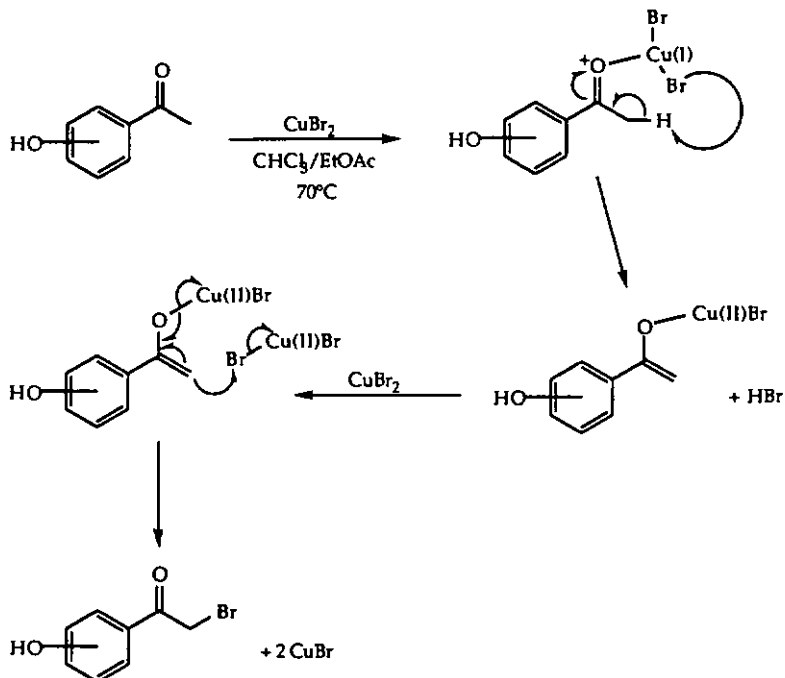
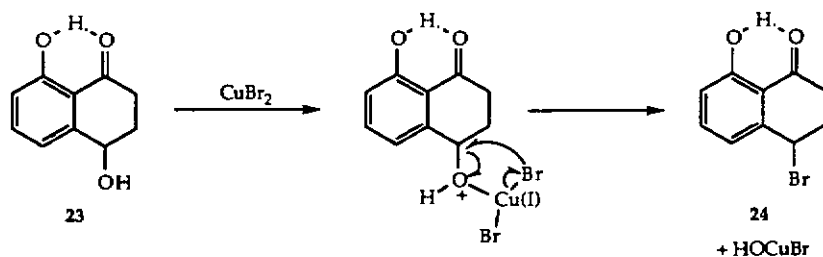


Schéma 9

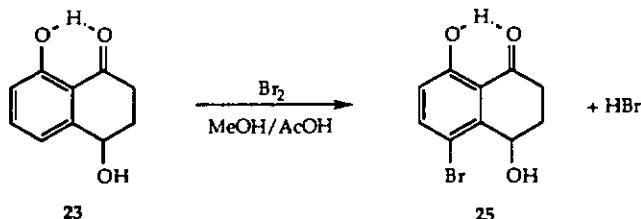
Mécanisme proposé pour l' α -bromation des cétones aromatiques.

Dans notre cas, la rémanence d'un précipité sombre après plusieurs heures de reflux (voir § 8) indique une réaction différente de celle attendue; et pour cause, le composé obtenu est un produit de substitution de la cétone initiale; la réaction de bromation est effectivement compliquée par la présence de l'alcool secondaire en position 4; son caractère électrodonneur à l'égard du cuivre (II) est vraisemblablement supérieur à celui de la cétone, ce qui entraîne la complexation du métal sur l'hydroxyle. L'inactivation du carbonyle est probablement due en

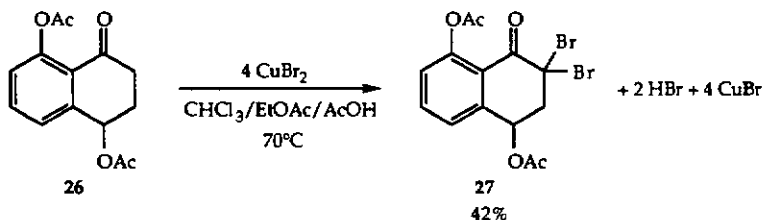
partie à sa forte liaison H avec le phénol en position 8 (singulet à 12.4 ppm en $^1\text{H-NMR}$) qui détourne la densité de charge négative sur l'hydrogène :



Ce mécanisme n'implique bien évidemment aucune oxydo-réduction, ce qui explique l'apparence sombre du précipité obtenu (ions cuivre (II)). Si l'on procède à une bromation classique au moyen de brome élémentaire, on constate là encore l'inactivité du carbonyle, le composé obtenu étant un produit de substitution aromatique :



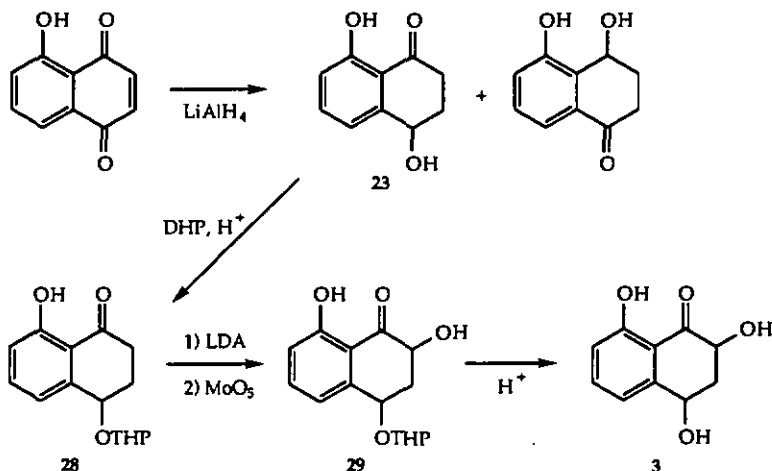
Il fallait donc activer le carbonyle tout en empêchant une substitution au niveau de l'alcool allylique secondaire. Ces deux corrections peuvent être apportées en protégeant les deux groupes hydroxyles, par exemple par acétylation. Les conséquences immédiates sont 1) une impossibilité pour la cétone de former une liaison H avec un hydroxyle adjacent, et 2) une impossibilité pour l'hydroxyle allylique de chélater un ion cuivre (II). On constate cette fois-ci le bon déroulement de la réaction, une décoloration complète du réactif solide survenant après douze heures :



La réaction désirée a eu effectivement lieu, mais elle ne s'interrompt pas après la première halogénéation. Seuls 50% du réactif initial ont réagi avec les deux équivalents de CuBr_2 à disposition. La seconde moitié a été convertie en des composés pour la plupart non identifiés.

3.2.4 1(2H) 3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphthalénone

Inspirée des travaux de Fujimoto et Satoh^[53], la synthèse de 3 s'opère selon le schéma suivant :

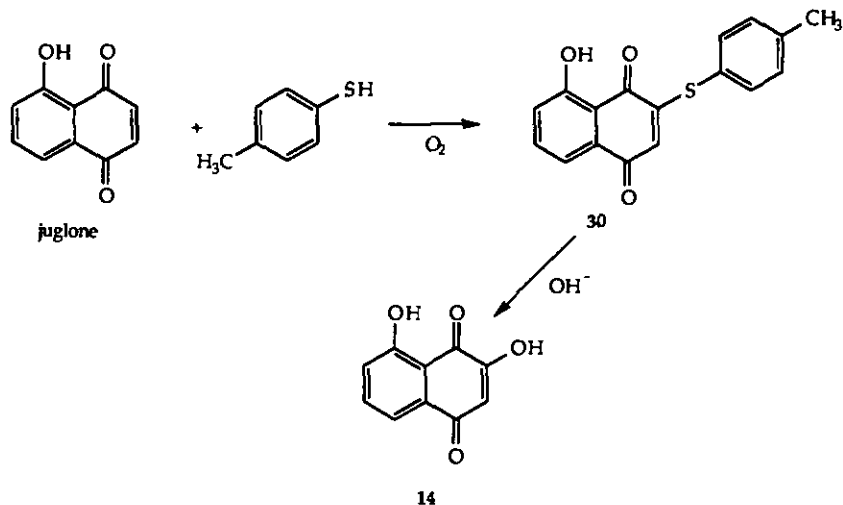


Dans l'étape de protection des hydroxyles en esters tétrahydropyranyles, on constate que l'OH phénolique n'est pas protégé. Il est possible que ce phénol ne soit pas suffisamment nucléophile pour réagir sur le cation oxonium du DHP. Il est également possible qu'une fois formé, l'ester phénolique se décompose rapidement, vraisemblablement lors de sa purification chromatographique sur silice.

Quoiqu'il en soit, une parfaite correspondance a été observée entre les deux diastéréomères isolés (3 cis, 3 trans) et leurs homologues de synthèse.

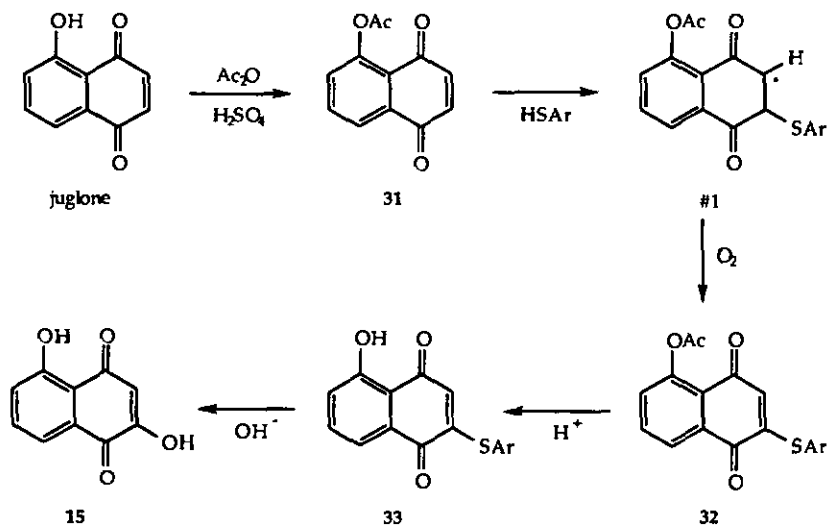
3.2.5 2-hydroxyjuglone

Réaction connue de longue date, l'addition de nucléophiles sur la juglone a habituellement lieu en position 2; c'est notamment le cas de composés thiolés et aminés qui s'ajoutent ainsi sur le carbone le plus électrophile^[56,57] :



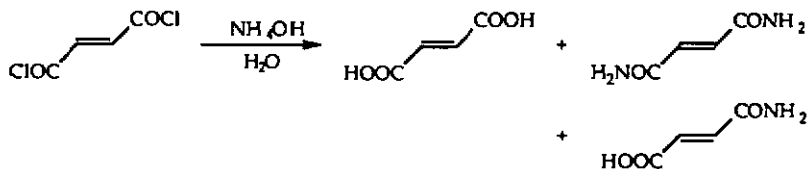
3.2.6 3-hydroxyjuglone

A l'inverse de la juglone, l'acétate de juglone subit des additions nucléophiles en position 3; toute mésomérie étant désormais impossible entre l'acétyle en 8 et la cétone en 1, le mécanisme est soupçonné radicalaire et implique l'intermédiaire #1[56] :



3.2.7 Monoamide de l'acide fumarique

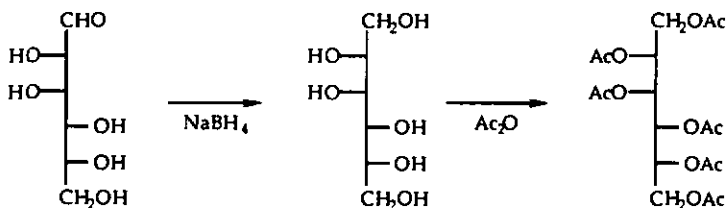
Effectué très simplement au moyen d'ammoniaque et du dichlorure de fumaroyle, le monoamide est produit de façon très minoritaire aux côtés de l'acide libre et du diamide :



13

3.2.8 D-galactol, D-mannitol et D-allositol hexaacétates

Basées sur une réduction des sucres correspondants, puis sur leur acétylation, ces synthèses ont déjà fait l'objet de plusieurs publications et ne seront donc pas approfondies :



D-mannose

17

Les synthèses de 16 et 18 s'effectuent de la même manière à partir des D-galactose et D-allose.

4. Tests de toxicité

4.1 Test "sur feuille"

Tels que décrits plus loin (voir § 8, Partie expérimentale), trois types de tests de toxicité furent menés. Le premier (test dit "de la feuille") s'avère peu sensible; il possède néanmoins l'avantage de ne consommer qu'une faible quantité de matériaux biologiques actifs.

Appliqué aux composés purs obtenus, il nous a permis d'établir un ordre de phytotoxicité. Au terme de ce test, seuls huit composés se sont révélés actifs (composés 2 cis, 3 cis, 3 trans, 4, 6, 7, 8 et 10) avec une distinction particulière des composés 3 et 10. Le tableau suivant résume ces observations :

Tableau 5 Test de la feuille appliqué aux composés actifs recensés

Composé	+(25-30)h	+(40-60)h	+144 h	c (mg/ml)
2 cis	Fbt	Fbt	Fbt	1
3 cis	fN	FN	FN*	1
3 trans	fN	N _p *	†*	1
4	Fl/fN	fbt/fN	FN	0.5
6	Fbt	Fbt*	Fbt/fN _p *	0.5
7	-	-	fbt	0.5
8	fbt	fbt	fbt	1
10	Fbt/N _p	Fbt/FN	†*	1

Description des symptômes observés en fonction du temps; essais menés comparativement à des blancs EtOH 2%. Dans ce tableau, les symboles suivants ont été largement utilisés :

- fbt, Fbt : faible (respectivement fort) brunissement de la tige (essentiellement au niveau de la coupure)
- Fl : Flétrissement généralisé de la feuille, sans qu'un brunissement n'apparaisse
- N(p) : Nécroses brunes généralisées (ou ponctuelles) sur toutes les parties immergées de la feuille
- fN(p), FN(p) : faibles (respectivement fortes) nécroses généralisées ou ponctuelles visibles sur l'ensemble de la plante
- † : Nécrose totale caractérisée par un brunissement généralisé de toute la feuille
- * : Effets également observés sur les échantillons les plus dilués (respectivement 0.25 mg/ml pour 3 cis et 3 trans, et 0.1 mg/ml pour 6 et 10)

Si l'on en croit l'amplitude des symptômes observés, ce sont essentiellement les composés 3 cis, 3 trans et 10 qui manifestent la plus forte activité. Pour la plupart, les autres métabolites n'engendrent que quelques nécroses ponctuelles et un brunissement plus ou moins étendu de la tige.

On relèvera avec intérêt que les deux naphthalénone 3 cis et 3 trans occasionnent indistinctement les mêmes dommages sur le platane, ce qui semble indiquer une activité indépendante de la stéréochimie de la molécule.

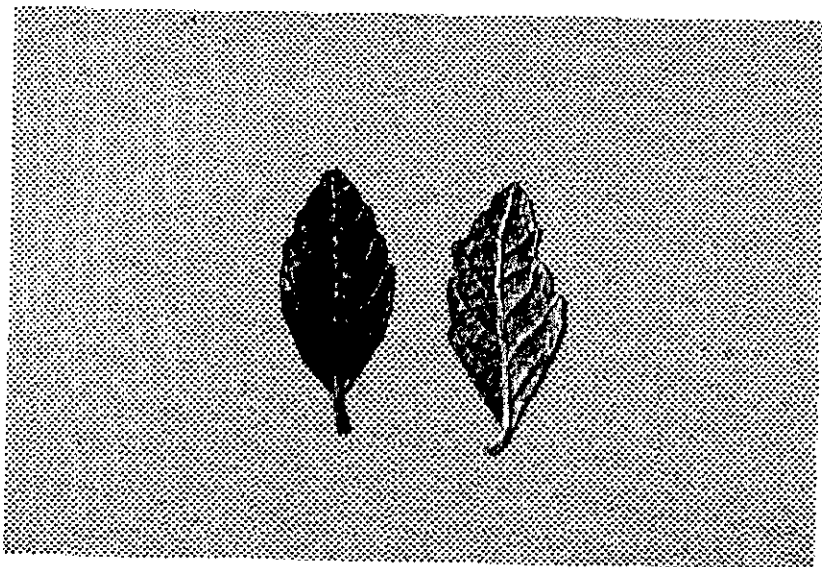


Figure 35 Test sur feuille appliqué à une solution 1000 ppm en naphthalénone 3 (gauche) comparativement à un blanc maintenu dans de l'éthanol aqueux à 2% (symptômes observés après 144 heures de contact).

4.2 Test des pertes de masse

L'identification des substances les plus nocives (3, 10, 14) et leur synthèse subséquente nous ont permis d'affiner les tests de toxicité et de quantifier leur activité. Le test des pertes de masse décrit en partie expérimentale donne un aperçu graphique de cette activité sans pour autant en accroître la sensibilité. Du reste, les trois figures suivantes le confirment : les variations de masse n'excèdent guère plus de 20% de la masse initiale :

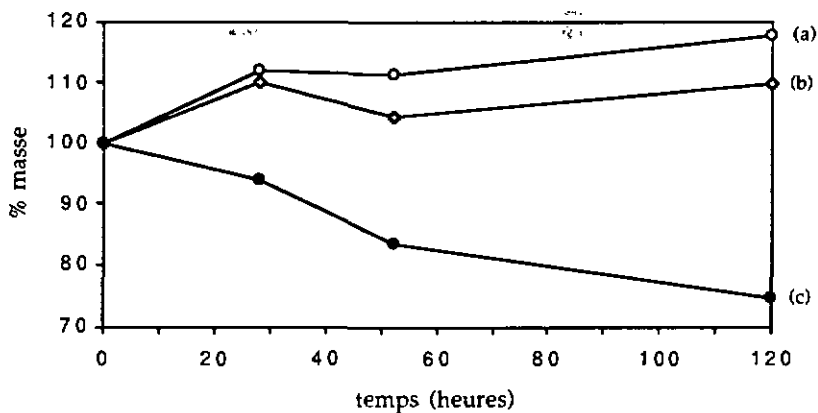


Figure 36 Graphe représentant le % de masse acquis (ou perdu) en fonction du temps, valeurs rapportées aux 100% de masse initiale. Chaque courbe est le résultat pondéré de quatre séries de mesures.

(a) blanc (EtOH aqueux 2%)

(b) sol. 2,4,8-trihydroxynaphtalénone 0.1 mg/ml (mélange racémique)

(c) sol. 2,4,8-trihydroxynaphtalénone 1 mg/ml (mélange racémique)

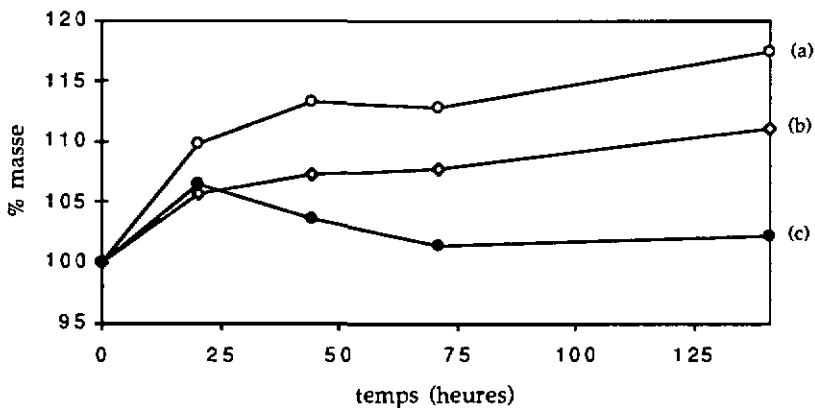


Figure 37 Graphe représentant le % de masse acquis (ou perdu) en fonction du temps, valeurs rapportées aux 100% de masse initiale. Chaque courbe est le résultat pondéré de quatre séries de mesures.

(a) blanc (EtOH aqueux 2%)

(b) et (c) sol. 2-hydroxyjuglone 50 et 200 µg/ml

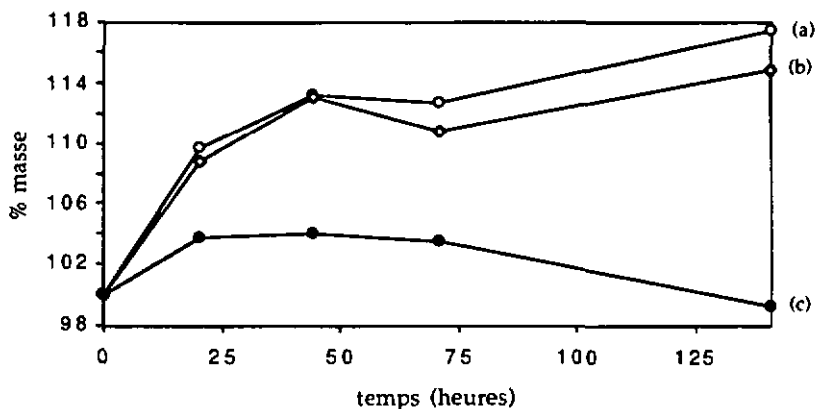


Figure 38 Graphe représentant le % de masse acquis (ou perdu) en fonction du temps, valeurs rapportées aux 100% de masse initiale. Chaque courbe est le résultat pondéré de quatre séries de mesures.

- (a) blanc (EtOH aqueux 2%)
- (b) sol. acide p-aminobenzoïque 0.1 mg/ml
- (c) sol. acide p-aminobenzoïque 1 mg/ml

On constate à nouveau une forte activité de la 2,4,8-trihydroxynaphtalénone, mais seulement à forte concentration (1 mg/ml); les solutions plus diluées, comme c'est également le cas pour les composés 10 et 14, ne font qu'atténuer la croissance normale des microboutures. Les faibles variations de masse inhérentes à ce test ne prennent donc un sens que lorsqu'elles sont comparées avec celles des blancs.

4.3 Test sur "carrés de feuilles"

Ce test également décrit dans la partie expérimentale permet de gagner considérablement en sensibilité; bien que d'un genre nouveau, il s'inspire des procédures décrites par *Ho Park et al.*[58] ou *Sugawara et al.*[59], lesquels entaillent volontairement des tissus végétaux avant de les soumettre aux éventuelles toxines. La mesure très précise des surfaces nécrosées permet de distinguer les effets de deux concentrations même très proches. (50 et 100 µg/ml, 0.5 et 1 mg/ml). De fait, c'est le plus précieux des tests biologiques utilisés tout au long de ce travail. Les courbes suivantes présentent l'extension observée des surfaces nécrosées sur des fragments de 1 cm² de feuilles de platane immergées dans des solutions-test. Les symptômes sont à nouveau relevés comparativement à des blancs maintenus dans de l'éthanol aqueux à 2% :

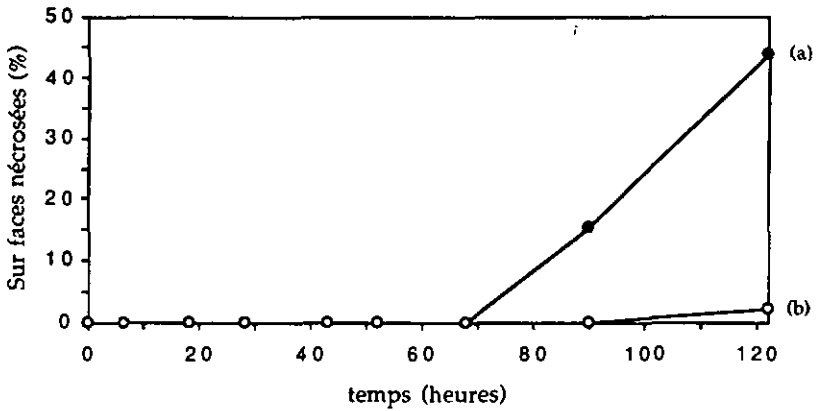


Figure 39 Surfaces nécrosées (mm² ou %) relevées sur des fragments de 1 cm² de feuilles de platane
 (a) sol. 2,4,8-trihydroxynaphthalénone 1 mg/ml (mélange racémique)
 (b) sol. 2,4,8-trihydroxynaphthalénone 0.5 mg/ml (mélange racémique)

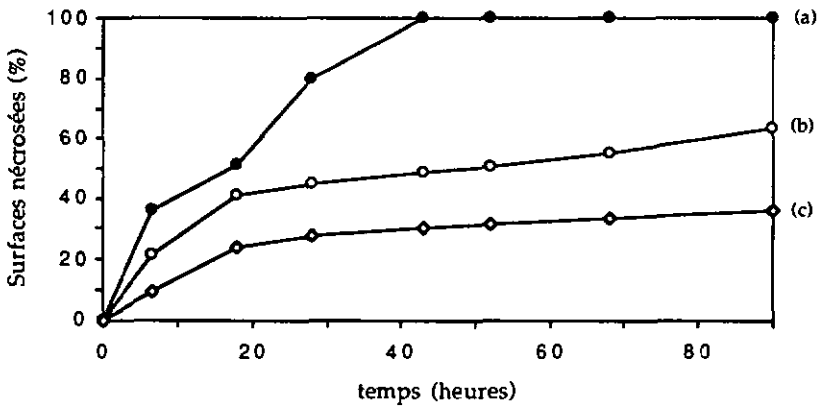


Figure 40 Surfaces nécrosées (mm² ou %) relevées sur des fragments de 1 cm² de feuilles de platane
 (a) sol. 2-hydroxyjuglone 500 µg/ml
 (b) sol. 2-hydroxyjuglone 100 µg/ml
 (c) sol. 2-hydroxyjuglone 50 µg/ml

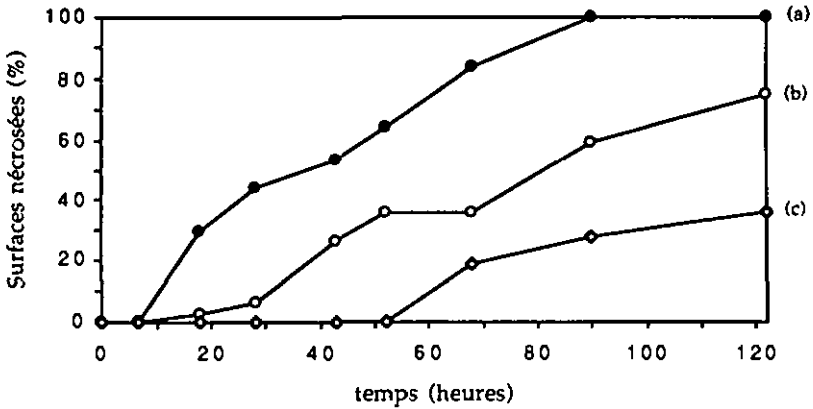


Figure 41 Surfaces nécrosées (mm² ou %) relevées sur des fragments de 1 cm² de feuilles de platane

- (a) sol. acide p-aminobenzoïque 1 mg/ml
- (b) sol. acide p-aminobenzoïque 0,5 mg/ml
- (c) sol. acide p-aminobenzoïque 0,1 mg/ml

A la différence du second test, la 2-hydroxyjuglone s'avère la substance la plus active, capable de nécroser intégralement le fragment carré en moins de 50 heures. Mais plus que cela, le test met en lumière le retard des symptômes causés par la 2,4,8-trihydroxynaphtalénone, et leur progression anormalement rapide au-delà de trois jours. Cette apparente période de latence contraste très fortement avec l'effet foudroyant de la 2-hydroxyjuglone, elle-même issue de la naphtalénone par le processus que l'on sait (cf § 2.5).

Ce constat renforce encore l'hypothèse faite jusqu'alors : dégradation oxydative aboutissant sur un composé éminemment plus toxique et qui engendrerait des effets nécrotiques sitôt son seuil d'activité atteint (environ 20 ppm après trois jours). La 2-hydroxyjuglone se présente donc bel et bien comme la toxine la plus active.

Quant à l'acide p-aminobenzoïque, il engendre des effets tout-à-fait analogues à ceux observés dans le premier et le second test. En terme de concentration pour un effet identique, son activité est plus forte que celle de la 2,4,8-trihydroxynaphtalénone (facteur 10), mais plus restreinte que celle de la 2-hydroxyjuglone (facteur 1/2). Aucun synergisme n'a été observé entre ces trois différentes substances.

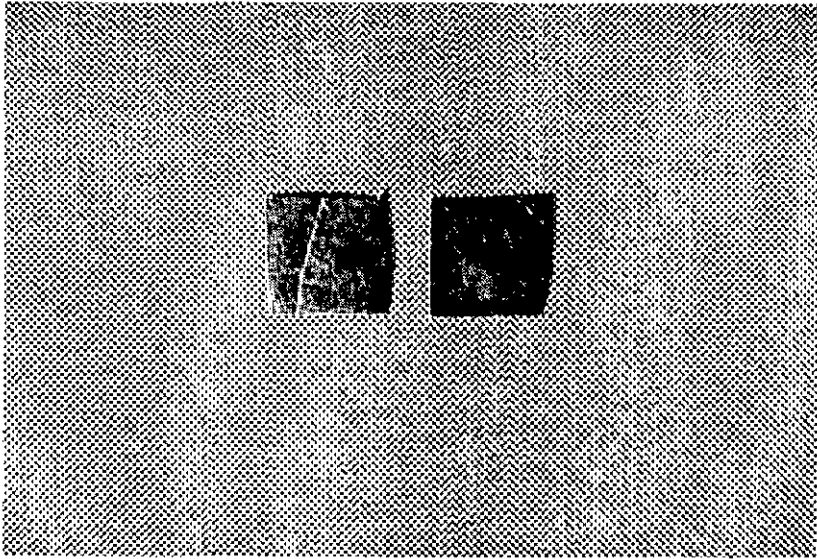


Figure 42 Test sur "carrés de feuilles" appliqué à une solution 500 ppm en 2-hydroxyjuglone (droite) comparativement à un blanc maintenu dans de l'éthanol aqueux à 2% (symptômes observés après 8 heures de contact).

5. Etude du matériel végétal

5.1 But de l'analyse

L'étude de l'extrait organique du milieu de culture de *Ceratocystis fimbriati* sp. *platani* nous a permis d'identifier deux substances biologiquement actives, l'acide p-aminobenzoïque (10) et la 1(2H) 3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphtalénone (3), ainsi que plusieurs métabolites modérément ou faiblement actifs, principalement isocoumarines ou tétralones.

Nous avons également pu constater la dégradation oxydative de 3 en 2-hydroxyjuglone (14), une substance très fortement phytotoxique qui rationalise l'activité apparemment discontinue de la naphthalénone en solution.

De toutes ces molécules, il nous paraissait ensuite indispensable de définir celles qui entrent effectivement en jeu *in vivo*. Nous servant pour cela des standards isolés du milieu fongique, nous avons alors procédé à une étude systématique du contenu organique du platane contaminé par *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*.

5.2 Procédure expérimentale

5.2.1 Provenance du matériel végétal

Tout le matériel végétal investigué fut récolté dans la station expérimentale "la Versiliana", commune de Pietrasanta, Forte dei Marmi, Italie. Les analyses concernent des spécimens adultes de *Platanus orientalis* de hauteur comprise entre 10 et 12 mètres. Ces arbres furent artificiellement contaminés en janvier 1995 par l'injection d'une suspension de spores 2 à 4 cm sous l'écorce. Pour régulariser la progression du parasite, les injections sont répétées chaque 15 cm sur tout le pourtour de l'arbre, à 1 mètre de sa base. Environ six mois après l'inoculation (juillet 1995), l'un de ces arbres est abattu et son tronc régulièrement sectionné, permettant d'y visualiser la progression du pathogène. Deux types de bois sont dès lors considérés :

- les parties encore vivantes de l'arbre, mais déjà colonisées par le parasite. Ces plages sont caractérisées par un aspect noirâtre de la cellulose (périthèces et nécroses); on y perçoit déjà de rares plages blanches où des champignons saprophytes commencent à s'implanter. Ce lieu de colonisation vivante, dénommé "malato", constitue le matériel végétal infecté (figure 43).

- d'autre part les parties encore saines et vivantes de l'arbre malade, situées plus en amont du front de progression du parasite. La cellulose y a son aspect naturel, rien ne permet de la différencier de celle d'un arbre sain. Ce matériel végétal,

dénommé "pianta malata", nous permettra de vérifier ou non la diffusion des éventuelles toxines au sein de l'arbre.

Pour comparaison, un platane sain est abattu; son bois constitue le matériel sain (intitulé "sano") et nous servira de blanc dans l'investigation des métabolites fongiques. Les tronçons d'intérêt sont ensuite débarassés de leur écorce et réduits en sciure au moyen d'un rabot électrique. Cette sciure est répartie dans des sachets, lesquels sont conservés à 4°C sous mention "sano", "pianta malata" ou "malato".

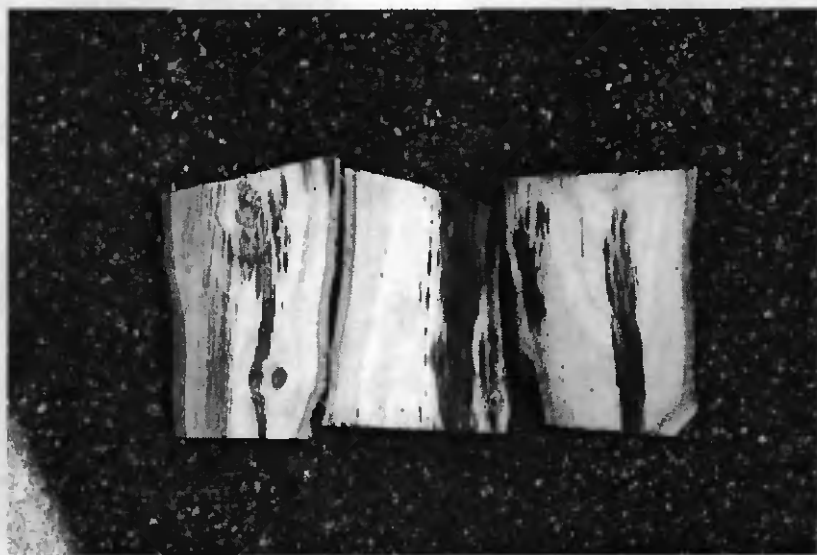


Figure 43 Type de bois sélectionné pour l'obtention des extraits "malato"; dans le cas présent, coupes longitudinales du tronc d'un platane cancré.

5.2.2 Extraction

1.5 kg de chaque type de bois sont extraits en continu à l'acétone 24 heures durant (SOXHLET), par portions de 500 grammes. Suivant la nature du bois, l'extrait s'avère une poudre brun marron (malato) ou une huile sombre (pianta malata, sano), essentiellement constituées d'un solide insoluble dans les solvants organiques usuels. Ces extraits ont été obtenus à l'Université de Pise (Italie) dans le groupe de recherche du professeur I. Morelli.

5.2.3 Fractionnement

A ce niveau de l'analyse, les extraits sont encore beaucoup trop complexes pour permettre une bonne résolution des pics par HPLC. Ceux-ci sont donc soumis à

une séparation chromatographique sur silice, éluant hexane/EtOAc/AcOH 1%, en élevant graduellement la teneur en acétate d'éthyle. Les fractions les plus polaires, jugées encore trop complexes, sont soumises à une seconde chromatographie sur silice (EtOAc/hexane); on obtient de la sorte huit fractions principales, A-D + EF1-4 qui sont séparément filtrées sur SUPELCLEAN® au moyen d'acétonitrile, peu avant l'analyse par HPLC.

5.2.4 Résolution par HPLC

Les substances sous investigation s'avèrent trop polaires pour être étudiées par GC, d'où la nécessité de les séparer par chromatographie liquide. Toutes contiennent un noyau aromatique; on peut donc dans un premier temps utiliser un détecteur UV pour optimiser les conditions de séparation. La confirmation finale sera quant à elle apportée par la LC/MS des fractions suspectes.

Un mélange ternaire de solvants (méthanol/acide acétique/eau) en phase inverse fournit les meilleurs résultats; il nous permet de répartir les neuf molécules d'intérêt sur près de trente minutes, et minimise autant que possible leur coélution avec les métabolites propres au platane.

5.3 Résultats

5.3.1 Détection UV

Dans un premier temps, limitons notre étude à chacun des extraits bruts décrits sous § 5.2.2. Bien que non quantitative, cette analyse révèle quelques faits intéressants (figure 44) :

1) Dans l'ensemble, on constate une parfaite similitude d'un extrait à l'autre; du reste, les HPLC comparatives le montrent très clairement et confirment des processus biosynthétiques rigoureusement identiques d'un individu à l'autre.

2) Un certain nombre de pics mineurs (temps de rétention mesurés : 26.17', 40.50', 42.03', 43.04', 48.78') apparaissent exclusivement dans les extraits "malato" et/ou "pianta malata". Il serait toutefois prématuré de les considérer comme le résultat d'une relation hôte-parasite, de petites différences de contenu étant toujours possibles d'un arbre à l'autre.

3) Enfin, pour deux autres substances (marquées d'un x dans la figure 44, temps de rétention mesurés 27.18 et 44.10'), on constate une diminution très nette d'intensité en passant de l'échantillon "malato" à "pianta malata" puis "sano". Ces variations sont quant à elles très significatives d'une interaction hôte-parasite. Dans l'extrait "malato", les intensités des pics à 27.18 et 44.10' sont effectivement dix fois supérieures à celles observées dans l'extrait "sano". Aucune de ces deux substances n'a été identifiée; seul le pic à 26.16', exclusivement présent dans l'extrait "malato", a pu être identifié comme l'umbelliférone, une phytoalexine récemment détectée dans *P. acerifolia* infecté par *Ceratocystis fimbriata* sp. *platanil*^[2] :

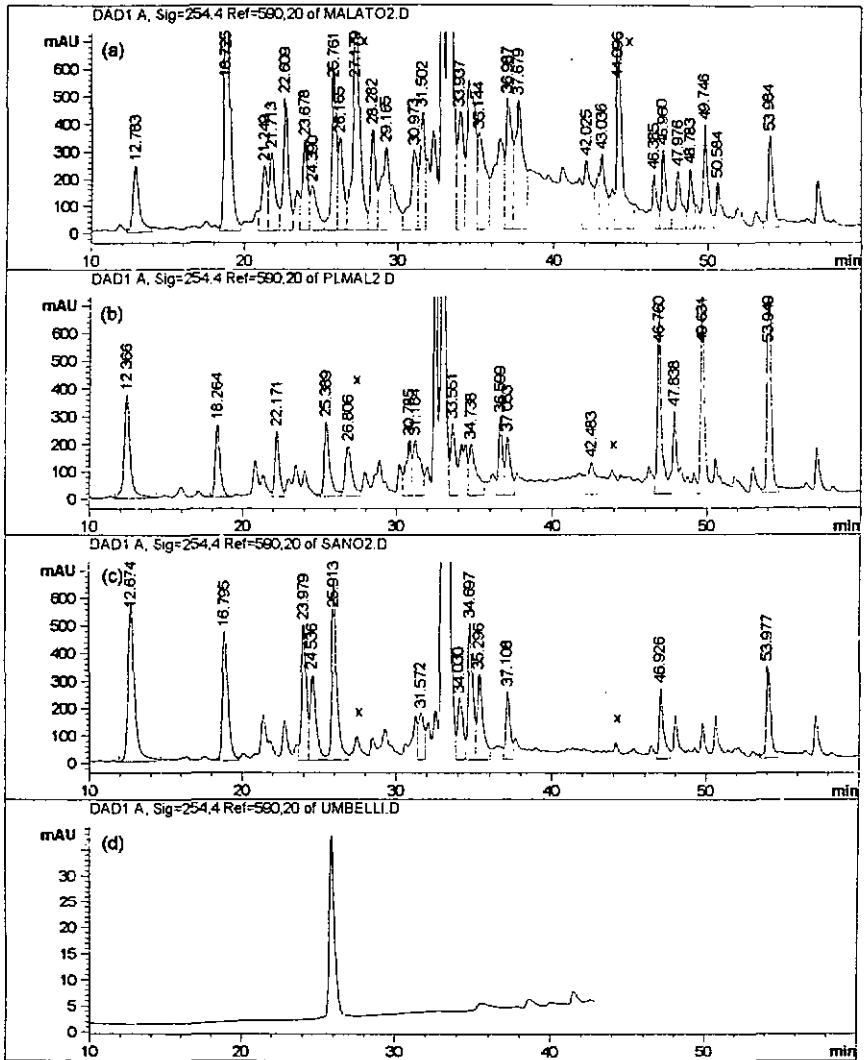
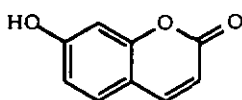
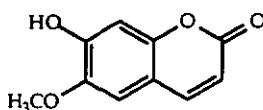


Figure 44 Analyse comparative du contenu chimique des trois différents extraits organiques "malato", "pianta malata" et "sano".
 (a) HPLC (RP-C18, Solvant A = MeOH, AcOH 1% et B = eau, AcOH 1% selon gradient 10% A à 60% A (30'), puis 60% A à 100% A (20')) de l'extrait "malato".
 (b) HPLC comparative de l'extrait "pianta malata".
 (c) HPLC comparative de l'extrait "sano".
 (d) HPLC comparative de l'umbelliférone commerciale

Ces résultats montrent qu'il existe des réponses de l'arbre à l'intrusion du pathogène, mais qu'elles ne sont pas à même de bloquer ou de restreindre son développement. La coumarine identifiée (umbelliférone I) et la scopolétine (II) sont produites par *P. acerifolia* en réponse à son infection par *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*[2]. Ce sont toutes deux des molécules fongistatiques ($ID_{50} = 0.6 \mu\text{mol/ml}$), capables d'inhiber à près de 100% la croissance du parasite. Mais ainsi que l'ont montré ces auteurs, leur émission dans la plante survient trop tardivement pour induire une défense efficace.



I



II

Cette hypothèse est confirmée par la détection exclusive de l'umbelliférone dans les parties directement colonisées de *P. orientalis* : même à un stade très avancé de la maladie, l'arbre n'est pas à même d'engendrer cette molécule au-delà du foyer infectieux (dans notre cas, l'extrait "pianta malata"). Ainsi, seule une exposition directe au pathogène entraîne cette réponse défensive de l'arbre.

Nous n'avons pas pu identifier les deux pics majeurs présents dans l'extrait "malato"; des injections comparatives de standards nous ont montré qu'il ne s'agit ni d'acide salicylique (un éliciteur de résistance détecté dans de nombreuses plantes en réponse à une agression extérieure[88,89], voir § 6), ni d'un de ses précurseurs biosynthétiques (acide benzoïque, acide trans-cinnamique ou phénylalanine). Leur spectre UV est représenté ci-dessous (figures 45 et 46) :

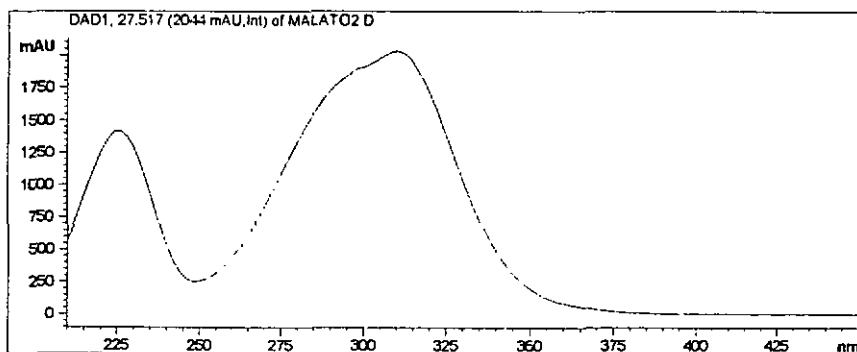


Figure 45 Spectre UV du composé de temps de rétention 27.18' (figure 44)

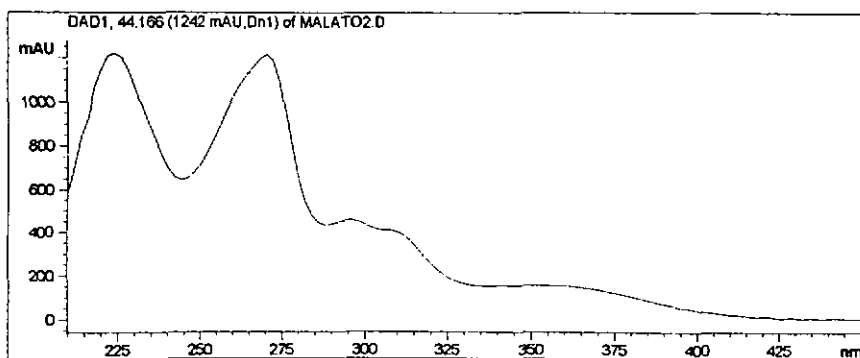
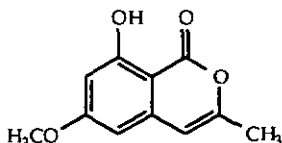


Figure 46 Spectre UV du composé de temps de rétention 44.10' (figure 44)

La chromatographie liquide de l'une des fractions les plus apolaires de l'extrait "malato" (fraction B) révèle un pic conséquent à 40.6 minutes dont le spectre UV et le temps de rétention coïncident parfaitement avec ceux de la 3-méthyl-5 méthoxy-6 hydroxyisocoumarine (9), une substance isolée du milieu de culture de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani* (§ 2) :



9

Ce pic n'apparaît pas dans les fractions correspondantes des extraits "sano" et "pianta malata" ce qui limite là aussi sa présence à la partie contaminée de l'arbre malade (figure 47) :

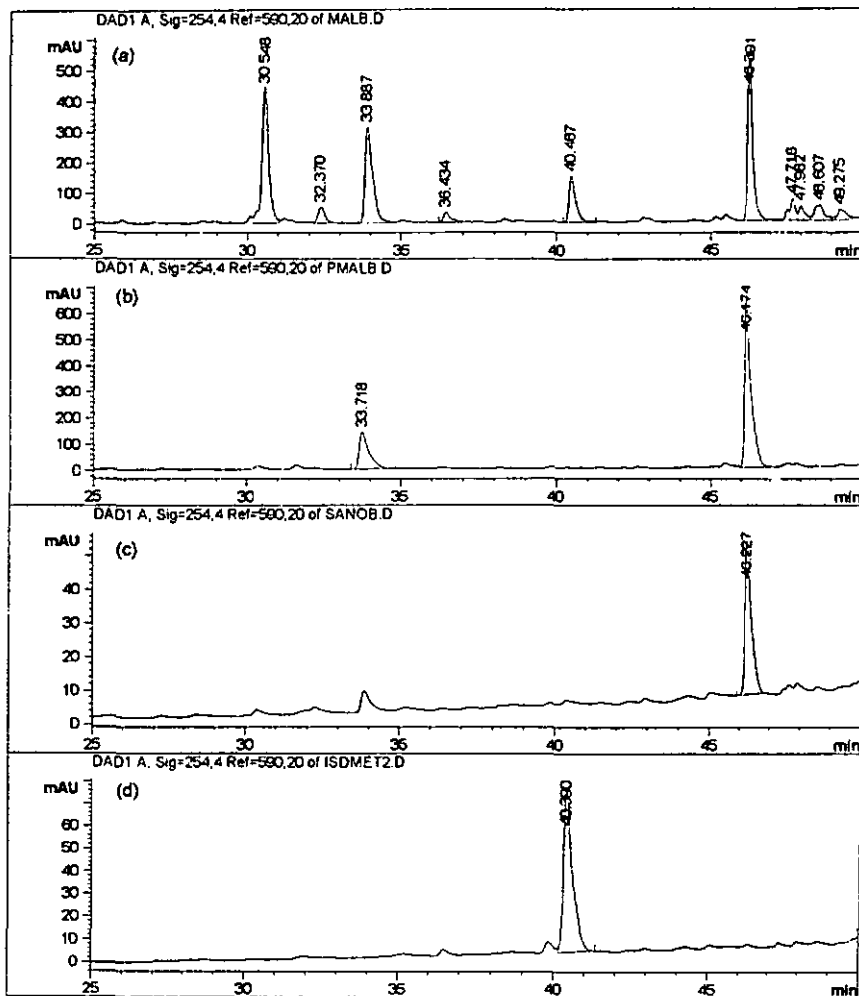


Figure 47 Détection de l'isocoumarine 9 dans l'extrait organique "malato"
 (a) HPLC (RP-C18, Solvant A = MeOH, AcOH 1% et B = eau, AcOH 1% selon gradient 10% A à 60% A (30'), puis 60% A à 100% A (20')) de la fraction apolaire B de l'extrait "malato".
 (b) HPLC comparative de la fraction B de l'extrait "planta malata".
 (c) HPLC comparative de la fraction B de l'extrait "sano".
 (d) HPLC comparative de l'isocoumarine 9 de synthèse.

Comme présentés sur la figure suivante, les spectres UV du pic incriminé et du standard de synthèse s'avèrent rigoureusement identiques, ce qui nous évite une analyse plus approfondie de ce métabolite :

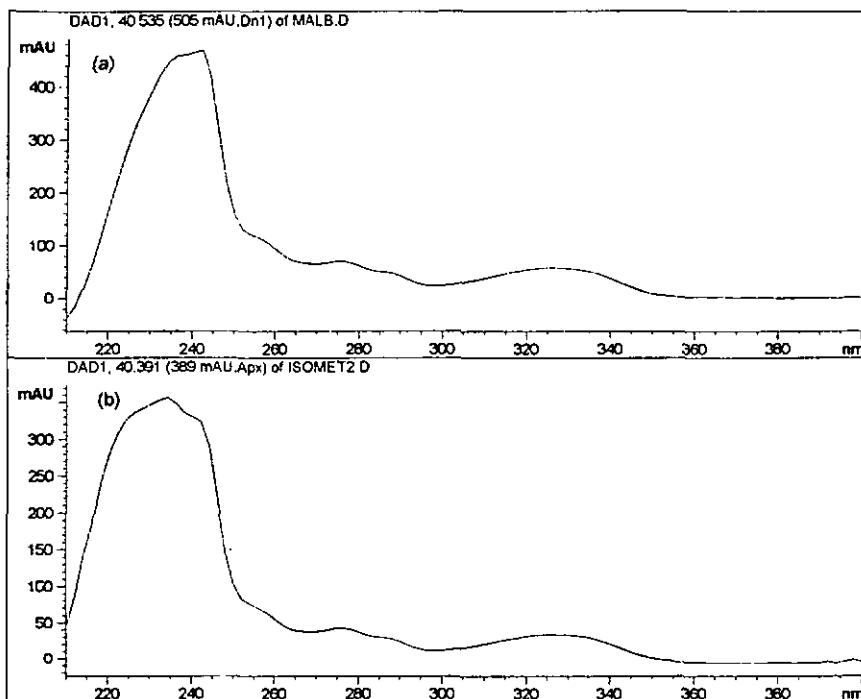


Figure 48 Spectres UV comparatifs du pic incriminé (a) et du standard de synthèse (b) identifiant l'isocoumarine 9 dans l'extrait de platane contaminé par *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*.

Il ne nous a en revanche pas été possible de détecter ainsi d'autres métabolites fongiques dans les diverses fractions de l'extrait "malato", ces pics étant soit d'intensité trop faible, soit partiellement couverts par d'autres composés propres au platane. Il fallait donc recourir à une méthode d'analyse plus sensible et appropriée aux exigences de nos échantillons : polarité élevée et faible volatilité. La LC/MS remplit ces conditions en connectant directement un système de chromatographie liquide (HPLC) à un détecteur très sensible et sélectif.

5.3.2 Détection MS

Le montage est généralement constitué d'une HPLC couplée à un analyseur de masse conventionnel (quadropôle) via un interface ES ou APCI (electrospray ou atmospheric pressure chemical ionization, schéma 10 et 11)⁶⁰¹.

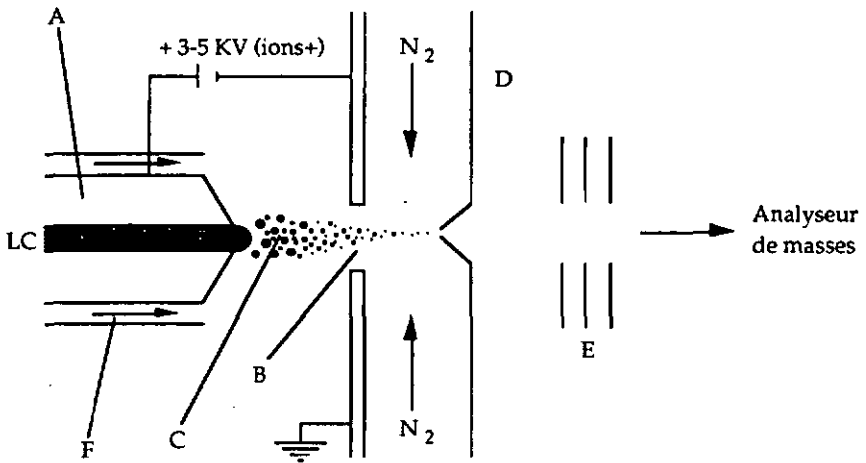


Schéma 10

Interface ES (électrospray) en LC/MS (les symboles sont décrits dans le texte).

Dans l'électrospray, une petite proportion des effluants de la LC (1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$) sont acheminés dans un capillaire en acier A (0.1-0.15 mm de diamètre interne), et émergent au voisinage d'une surface métallique percée d'un orifice B. Un potentiel positif ou négatif (suivant le type d'ions étudiés, positifs ou négatifs) est appliqué au capillaire relativement à cette surface.

Un cône de liquide commence à se former à l'extrémité du conduit, et sous l'influence du champ électrique qui sépare les charges au sein du solvant, de fines gouttelettes d'ions solvatés C (positives ou négatives suivant le potentiel appliqué) sont arrachées du liquide en direction de l'orifice^[61,62]. Lors de leur approche, ces gouttelettes chargées se fractionnent encore en entités plus petites; les ions sont finalement complètement désolvatés par passage dans un flux d'azote chaud (80°C), peu avant leur entrée dans l'enceinte évacuée D du compartiment MS. A ce niveau, des lentilles E focalisent et dirigent les ions formés vers le premier quadropôle.

Cette ionisation chimique à pression atmosphérique est assistée par la présence du solvant qui limite l'ionisation aux seules espèces H^+ et $[\text{M}+\text{H}]^+$ en mode positif. Elle évite le couplage direct entre la colonne et l'enceinte évacuée, qui s'exerce toujours au détriment de la séparation chromatographique. Facultativement, un courant de gaz F est appliqué parallèlement au capillaire incident, lequel nébulise les effluants de la LC de manière beaucoup plus effective. La différence de potentiel appliqué charge par la suite ces gouttelettes

comme précédemment décrit. On parle dans ce cas d'une "ion spray chemical ionization"^[63].

De telles techniques d'ionisation ne s'appliquent qu'à des molécules déjà ionisées ou facilement ionisables en solution (composés ioniques, phénols, protéines ou peptides etc.). De ce fait, le pH de l'éluant (choix du tampon) joue un rôle prépondérant dans l'apparition des charges en solution.

L'interface API (ou plus précisément APCI, car là encore l'ionisation est assistée par les effluants chromatographiques de la LC) possède toutes les caractéristiques de l'électrospray, mais le mode d'ionisation varie quelque peu (schéma 11). A la sortie du capillaire, un courant de gaz F nébulise les effluants; ceux-ci sont convertis en un spray de particules neutres G dans un tube de quartz H chauffé à 120°C. La matrice ainsi formée est ionisée par "décharge Corona" (I) dans une enceinte maintenue à pression atmosphérique; concrètement, les substances y sont ionisées par transfert de proton en mode positif ($m/z [M+H]^+$) et par transfert d'électron ou élimination de proton en mode négatif ($m/z [M-H]^-$). Les espèces chargées sont ensuite extraites au moyen d'un champs électrique J qui les dirige au-travers d'un flux d'azote dans le compartiment D :

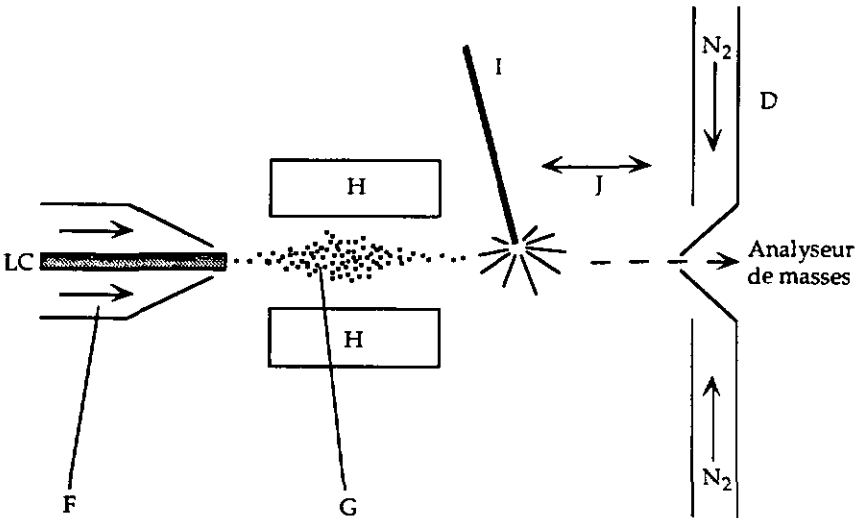


Schéma 11

Interface APCI (atmosphérique pressure chemical ionization) en LC/MS (les symboles sont décrits dans le texte).

La relative douceur des conditions utilisées (ionisation dans une matrice de solvant) ne permet pas toujours de fragmenter plus avant les ions moléculaires

formés, ce qui prive l'utilisateur de nombreuses informations structurales importantes. Le problème est habituellement contourné via l'utilisation d'une chambre supplémentaire d'ionisation (collisionally induced dissociation cell CID, schéma 12) qui permet la fragmentation des ions moléculaires :

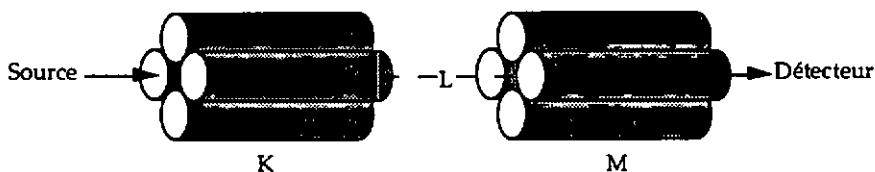


Schéma 12

Localisation de la "collisionally induced dissociation cell" (CID) pour la fragmentation des ions moléculaires (les symboles sont décrits dans le texte).

Dès leur sortie du premier quadrupôle K, les ions séparés sont dirigés dans une enceinte L où règne une faible pression d'un gaz inerte (généralement $3 \cdot 10^{-3}$ torr en hélium ou argon^[64]). La collision se déroule habituellement dans un second quadrupôle destiné à focaliser les ions formés sur le suivant). Dans leurs collisions avec les molécules de gaz, les ions précurseurs convertissent une partie de leur énergie cinétique en énergie interne suffisante pour casser leur structure. Les ions-fragments qui en résultent sont à leur tour séparés dans un troisième quadrupôle M qui fera correspondre à chaque ion moléculaire son spectre de masse. C'est le principe de la détection MS/MS.

Deux des fractions chromatographiques de l'extrait de bois malade (EF1 et EF3, voir § 5.2.3) ont été soumises à une LC/MS, interface API comme précédemment décrit. Compte tenu de leur polarité, ces deux fractions comportent un maximum de chances de contenir les neuf substances d'intérêt. Nous avons systématiquement recherché les métabolites en sélectionnant leurs ions moléculaires et fragments caractéristiques ("selected ion monitoring" SIM), puis en comparant le spectre de masse des pics incriminés avec celui des standards. Toutes les études préliminaires se sont hélas avérées négatives dans le sens où aucun des métabolites actifs n'y a été décelé de façon irréfutable. On constate néanmoins des similitudes structurales évidentes entre un pic éluant après 21.02 minutes dans la fraction EF3 et l'isocoumarine 7 (6 méthoxy-8 hydroxy-3 hydroxyméthyl-1H-2-benzopyrane-1 one) éluant après 30.57 minutes dans les mêmes conditions. Les différences observées dans les temps de rétention suffisent à elles seules à écarter le métabolite 7, mais le fractionnement très similaire en MS suggère une structure analogue (isomère ou molécule plus complexe contenant cette même entité isocoumarine). La figure 49 présente un spectre de masse, avec des fragments caractéristiques de m/z 245.2, 223.2, 177.2, 159.2 et 117.0. La plupart de ces fragments peuvent être aisément rationalisés au

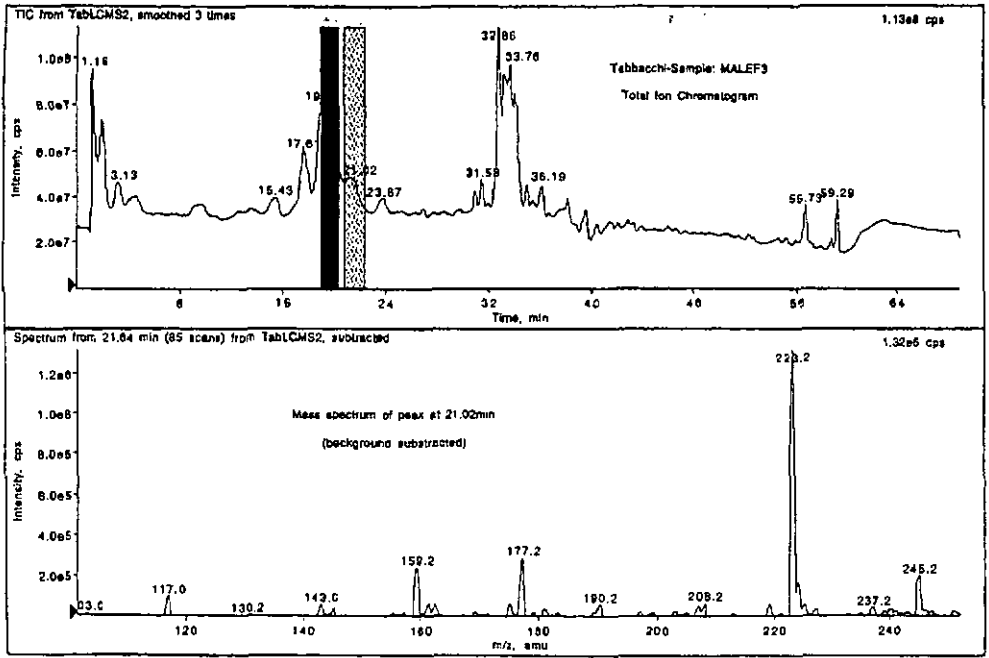


Figure 49 LC/MS (RP-C18, gradient 10 à 70% en MeOH-AcOH 1% sur 50 minutes, débit 300 μ l/min, tous ions confondus) de la fraction EF3 de l'extrait malato (haut). En contrebas, spectre MS de la substance éluant après 21.02 minutes.

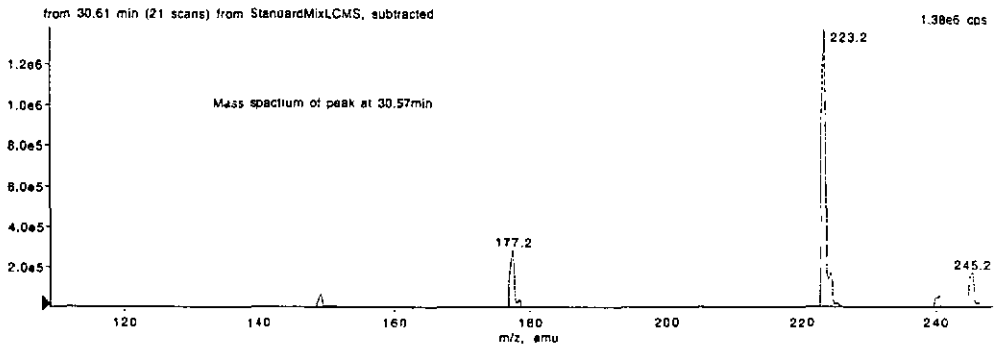


Figure 50 Spectre MS comparatif de l'isocoumarine 7, obtenu dans les mêmes conditions d'éluion et d'ionisation que la fraction EF3 (figure 49).

vu de la structure de 7. A l'inverse, les pics de m/z 159.2 et 117.0 restent inexplicables, sans doute issus d'une fragmentation propre à la molécule et à ses substituants. La figure 50 présente pour comparaison le spectre MS du standard 7 (RT 30.57 minutes) obtenu dans les mêmes conditions d'élution et d'ionisation. On y distingue un pic à m/z 245.2 qu'on attribue à l'addition d'un atome de sodium (m/z 23) sur l'entité isocoumarine. Un pic de m/z 177.2 est attribué quant à lui à la perte successive d'un carbonyle et d'une molécule d'eau, ou encore d'un hydroxyméthyle et d'un méthyle comme on l'observe sur l'isocoumarine 7. Là encore, des études structurales plus approfondies mériteraient d'être entreprises afin d'établir d'éventuels liens entre nos composés fongiques et ces molécules détectées *in vivo*.

6. Discussion

6.1 Résumé des résultats

Notre étude systématique des métabolites de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani* nous a permis d'identifier huit substances actives. La plupart d'entre elles (principalement isocoumarines et naphthalénones) manifestent une activité relativement faible à des concentrations pourtant élevées. Deux d'entre elles induisent toutefois rapidement une forte nécrose des tissus végétaux : l'acide p-aminobenzoïque et la 1(2H) 3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphthalénone :

- l'acide p-aminobenzoïque (10) semble bien constituer en soi une toxine à l'égard du platane; ses effets sont rapides et ses solutions restent constamment homogènes. Nos tests de toxicité lui reconnaissent une influence pathologique à 50 µg/ml (brunissement extérieur des fragments végétaux).

- la 1(2H) 3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphthalénone (3) est apparemment labile; ses effets nécrotiques ne sont pas immédiats (§ 4), chacun de ses deux diastéréomères manifestent la même activité; enfin, la molécule est sujette à l'oxydation, comme l'attestent ses solutions qui rougissent au cours du temps. Ces symptômes sont conformes avec l'intrusion d'une tierce molécule dans le processus de toxification. Dans nos essais, la naphthalénone 3 est reconnue active à 500 µg/ml (noircissement extérieur des tissus, brunissement des chloroplastes).

De tels symptômes ont été relevés dans la littérature comme faisant suite à l'intrusion du pathogène dans les tissus végétaux^[7,24]. Au niveau purement biologique, *Mutto, Ferrata et D'Ambral*^[65] décrivent les séquences précises d'événements menant à la mort cellulaire : altération (perforation) des membranes plasmiques, dépôts sombres extra- puis intracellulaires et finalement désagrégation de la membrane nucléaire.

Nous avons ensuite mis en évidence une 1,4-naphtoquinone sans doute issue de 3 via un processus d'oxydation radicalaire. Cette molécule s'avère très fortement active (20 µg/ml) et ses effets reproduisent ceux observés avec la naphthalénone 3 à plus forte concentration. Vu la très faible sensibilité de nos tests, ces 20 ppm constituent déjà une activité biologique considérable.

De plus, les conditions dans lesquelles cette substance se forme correspondent aux conditions biologiques rencontrées dans le platane : milieu certes faiblement alcalin (pH<8) mais très fortement oxydant. La 2-hydroxyjuglone (14) pourrait donc être un métabolite présent *in vivo*. Nous ne l'avons cependant jamais

détectée dans les milieux de culture de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*. On ne peut donc pas la considérer comme une phytotoxine au sens strict du terme.

L'analyse du matériel végétal infecté ne nous a permis d'y déceler aucune de ces trois substances. La seule molécule détectée en fortes quantités fut l'isocoumarine 9, un métabolite apolaire et insoluble dans l'eau dont l'activité biologique n'a pour cette raison pas encore pu être déterminée. Une deuxième molécule d'origine non fongique a été détectée, il s'agit de l'umbelliférone, coumarine récemment reconnue comme une phytoalexine produite par l'espèce *P. acerifolia* en réponse à son infection par *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*²¹. Sa présence reste exclusivement limitée aux tissus végétaux contaminés par le pathogène.

Enfin, nous mentionnerons brièvement l'isolation et l'identification d'un nouveau monoterpène. La synthèse subséquente de son mélange racémique, puis de son énantiomère pur nous a permis de lui attribuer la configuration absolue 3R; ce composé s'est avéré inactif sur le platane.

6.2 Origine biogénétique des substances actives isolées

Toutes, à l'exception de l'acide p-aminobenzoïque (10), sont issues de la voie des acétonides, condensations aldoliques d'acides thio-ester maloniques sur une entité acétyl-coenzyme A. Seule la nature de leur cyclisation distingue ces différents métabolites (cyclisations O-alkyle menant aux isocoumarines et C-alkyle menant aux naphthalénones) :

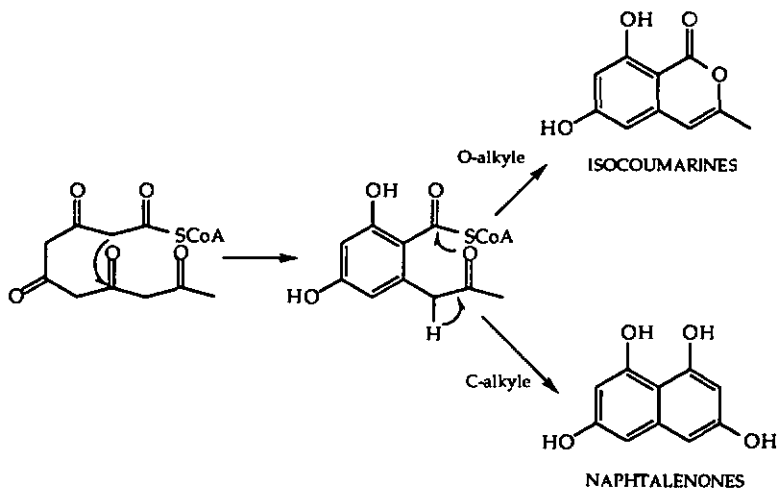
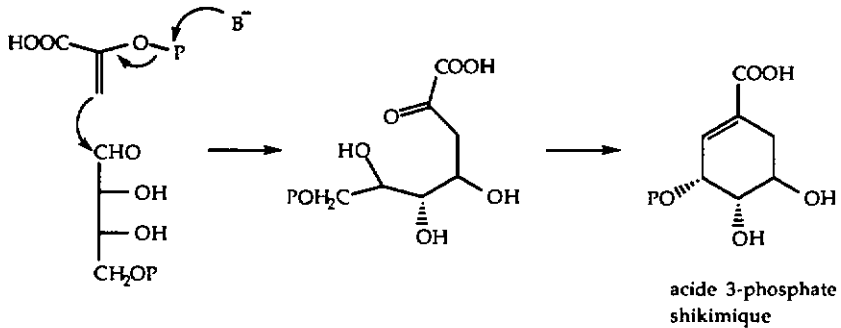


Schéma 13

Biosynthèse générale des isocoumarines et naphthalénones

A ces cyclisations s'ajoutent ensuite toute une série de processus secondaires tels qu'éliminations (déshydrogénases), oxydations, réductions (hydrogénases), substitutions ou alkylations (l'exemple le plus connu est la méthylation effectuée via la S-adénosyl-méthionine) qui permettent de diversifier à volonté les premiers termes d'une classe de composés.

L'acide p-aminobenzoïque quant à lui adopte la voie de l'acide shikimique, condensation de l'acide phosphoénol-pyruvique sur le D-érythrose-4-phosphate^[66] :



La participation d'une nouvelle molécule d'acide phosphoénol-pyruvique conduit à un adduit, qui après plusieurs réactions, débouche sur l'acide aminé :

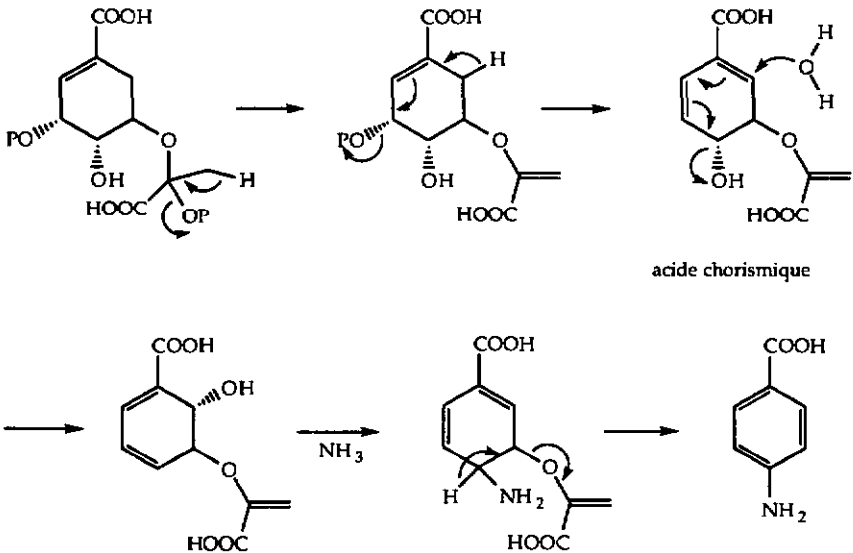


Schéma 14 Biosynthèse spécifique de l'acide p-aminobenzoïque

6.3 Relation biogénétique entre naphthalénones et mélanine

Toutes les naphthalénones isolées ont en commun la biosynthèse de la *mélanine*, un pigment noir de haut poids moléculaire engendré dans les parois cellulaires des hyphes et des spores fongiques.

Ce pigment résulte exclusivement d'une polymérisation du 1,8-dihydroxynaphthalène sur lui-même^[33,67] et n'a d'autres buts que de protéger le microorganisme des contraintes extérieures^[68,69,70,71] : principalement rayonnement UV et dessiccation (ce polymère est très hydrosoluble). La biosynthèse de ce dihydroxynaphthalène emprunte la voie des acétonides et engage de nombreux métabolites intermédiaires, parmi lesquels la scytalone ou la vermélone^[30,33]. Des déviations à la voie directe (dihydroxynaphthalène et mélanine) mènent aux "melanin shunt pathway metabolites", composés issus d'une modification enzymatique de l'un ou l'autre des intermédiaires biosynthétiques. Ces nouveaux métabolites ne sont pas nécessaires à la mélanisation, ils s'accumulent dans le milieu ou sont convertis enzymatiquement en d'autres composés utilisables ou non. Parmi ceux-ci, on mentionnera la 4-hydroxyscytalone, la juglone, les 2- ou 3-hydroxyjuglone et la 1(2H)-3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphthalénone. Le schéma 15, tel qu'il est proposé par plusieurs auteurs^[30,33,72], rend compte des liens qui unissent tous ces métabolites à la mélanine.

Au vu de ce schéma, deux remarques doivent être faites :

- 1) La 2-hydroxyjuglone (14) se présente comme l'un des précurseurs biogénétiques de la naphthalénone 3 et *non l'inverse*; or nous ne l'avons jamais décelée dans nos milieux de culture fongique; elle pourrait donc être rapidement réduite par le microorganisme avant d'être libérée dans le milieu sous sa forme de naphthalénone. Cet exemple montre comment un intermédiaire de synthèse, aussi abondant soit-il, peut ne jamais être rejeté dans son environnement immédiat.
- 2) Dans son travail de thèse relatif à *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea*, agent pathogène du caféier, *Gremaud*^[73] rapporte l'isolation de la scytalone, 4-hydroxyscytalone, vermélone et 1(2H)-3,4 dihydro-3,4,8 trihydroxynaphthalénone; en revanche il ne rapporte pas la naphthalénone 3, pourtant l'un des principaux métabolites produit par notre souche; ce fait traduit quelques divergences notoires d'une variété à l'autre. Les séquences enzymatiques utilisées sont nécessairement différentes, puisque les voies biosynthétiques n'aboutissent pas au même point. Cette inéquivalence apparente du matériel enzymatique n'est pas sans rappeler les travaux de *Ten* et *Stepaninchenko*^[30] relatifs aux mutants mélanine-déficients. Leurs recherches avaient mis en évidence des déficiences génétiques entravant la biosynthèse de la mélanine.

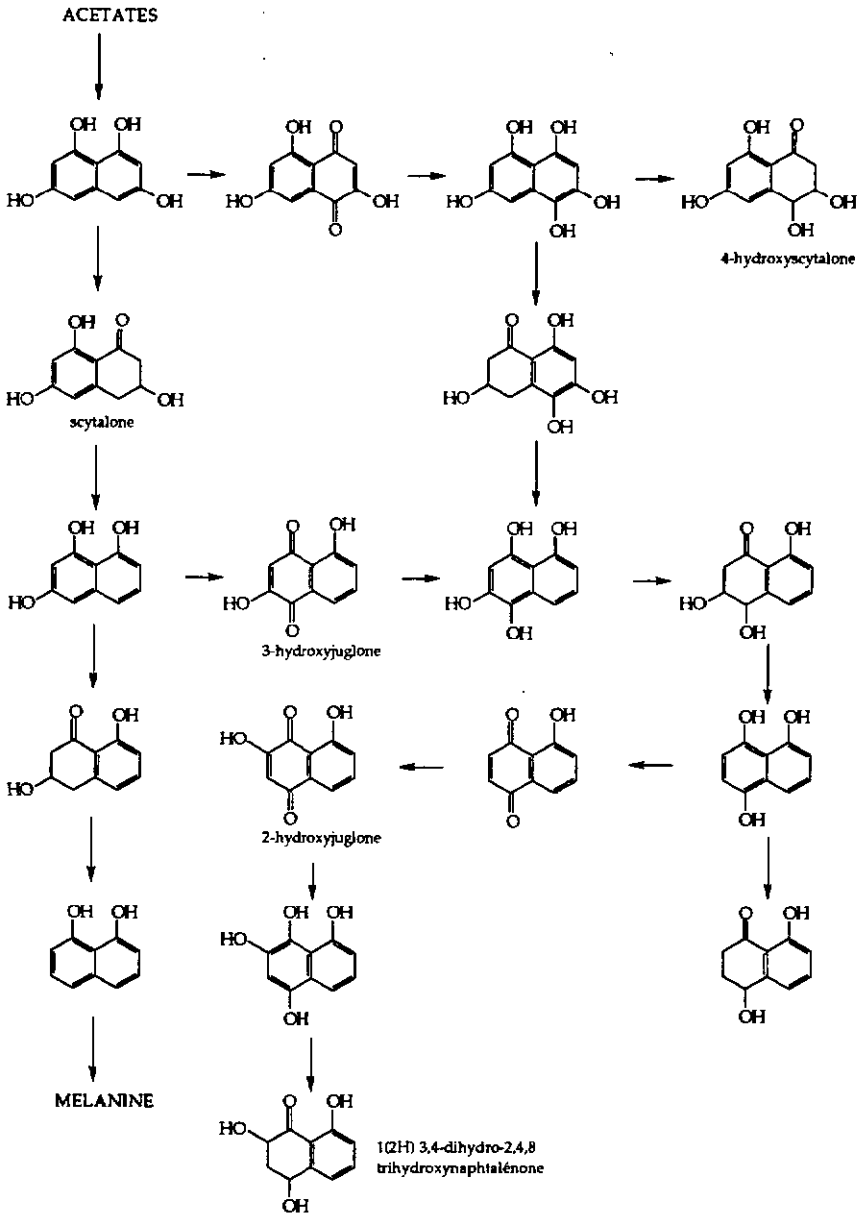


Schéma 15 Relation biogénétique liant les naphthaléones à la mélanine

6.4 Mécanisme d'action des substances actives isolées

6.4.1 Isocoumarines

Les isocoumarines ont déjà souvent été reportées comme des substances biologiques actives; à titre d'exemple, nous citerons *Hallock et al.*[74]. Certains auteurs ont mis en relation leur toxicité avec celle de leur produit de métabolisation dans les plantes : les melléines ou 3,4 dihydro-isocoumarines[18,75]. On relèvera cependant que, structurellement parlant, les isocoumarines se présentent comme de puissants inhibiteurs enzymatiques; l'ouverture de la fonction ester déboucherait en effet sur un composé très stable :

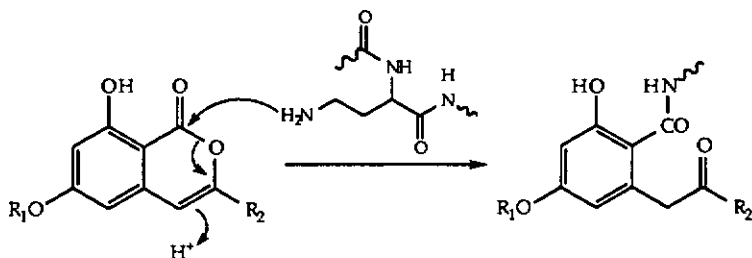


Schéma 16

Un mécanisme postulé du pouvoir inhibiteur des isocoumarines

Aucune de ces hypothèses n'a été vérifiée jusqu'alors; nous nous abstenons donc de tout commentaire à leur sujet.

6.4.2 Naphtalénones

Rarement reconnues actives, si ce n'est ponctuellement certaines comme l'isoclérone[76], les scytalone et 4-hydroxyscytalone[34,77] et bien entendu la 1(2H)-3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphtalénone[29]. Aucun mécanisme d'action n'a à ce jour été proposé. Nous nous garderons donc de toute hypothèse.

Nous proposons cependant un mode d'action spécifique à la trihydroxynaphtalénone (3) :

1) Dans un premier temps, celle-ci est convertie en 2-hydroxyjuglone, processus favorisé par un milieu oxydant et faiblement alcalin. Dans nos tests effectués *in vitro*, cette réaction survient au sein même de la solution aqueuse, mais on peut soupçonner a priori qu'elle ait également lieu dans les tissus exposés; absorbée par les fragments végétaux, la naphtalénone serait dès lors convertie *in situ* en quinone grâce à un environnement très oxydant ou à un système enzymatique adéquat.

Du reste, de nombreux auteurs ont décrit l'autooxydation spontanée des naphthalénones (et hydroxynaphthalènes) en naphtoquinones^[30,33,36,78,79,80,81]; dans certains cas, ces processus se sont avérés enzymatiques, soit dans le sens d'une réduction (hydrogénases), soit d'une oxydation (déshydrogénases); *Tsuruda, Lamé et Jones*^[78] mentionnent l'oxydation rapide *in vivo* du naphthalène (ou de son dérivé 1 sulfate-4 hydroxy) en époxide (oxide de naphthalène) ainsi qu'en 1,4-naphtoquinone; *Dahiya et Rimmer*^[79] décrivent quant à eux l'oxydation biologique de la scytalone en 2-flavioline, et la réduction de cette dernière en 4-hydroxyscytalone dans *Verticillium dahliae* :

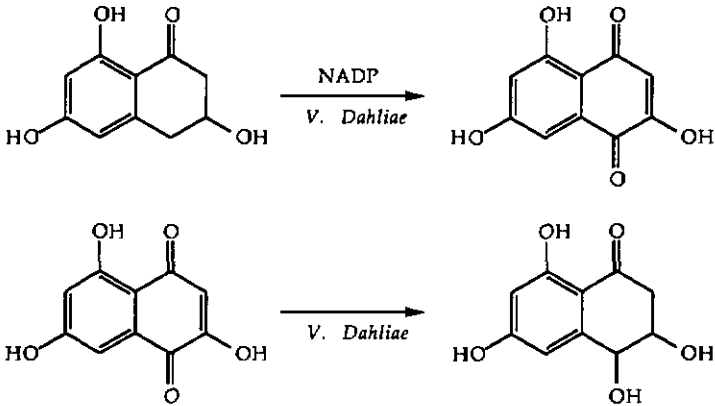


Schéma 17

Processus d'oxydo-réductions dans *Verticillium dahliae*

Fait intéressant, le processus oxydatif (aboutissant aux naphtoquinones) s'avère très largement dominant dans les milieux de culture fongiques dotés d'un pH légèrement alcalin (T-medium, *Thielavopsis basicola*^[33]).

On relèvera également l'oxydation rapide des tri- et tétrahydroxynaphthalènes, considérés comme les précurseurs enzymatiques des naphthalénones (vermélone, scytalone et 4-hydroxyscytalone)^[80,81].

2) La naphtoquinone nouvellement formée est pourvue quant à elle d'une forte réactivité chimique; du reste, la cytotoxicité de molécules affiliées a maintes fois été reportée^[82,83]. L'activité des naphtoquinones serait liée à leur aptitude à former des adduits avec les fonctions amines ou thiols des protéines^[78,84,85,86]; les hydroquinones formées subissent ensuite aisément une oxydation, leur permettant de réagir avec un autre groupe nucléophile (peptide ou protéine); c'est le phénomène postulé du "cross-linking" des protéines (schéma 18)^[82,87]. Si l'on considère la 2-hydroxyjuglone (1,4 naphtoquinone), on constate que ces propriétés sont encore accentuées par la présence de l'énol en position 2; cette

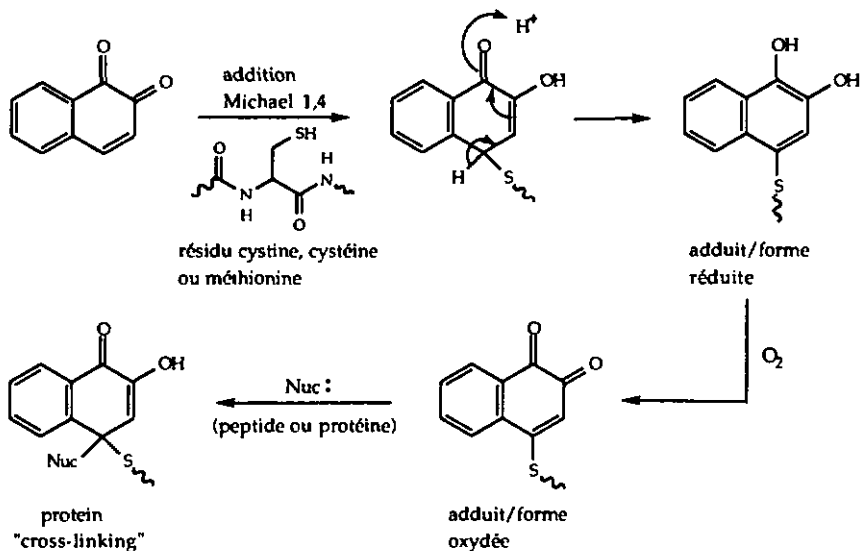


Schéma 18

Mécanisme du cross-linking des protéines provoqué par les 1,2-naphtoquinones

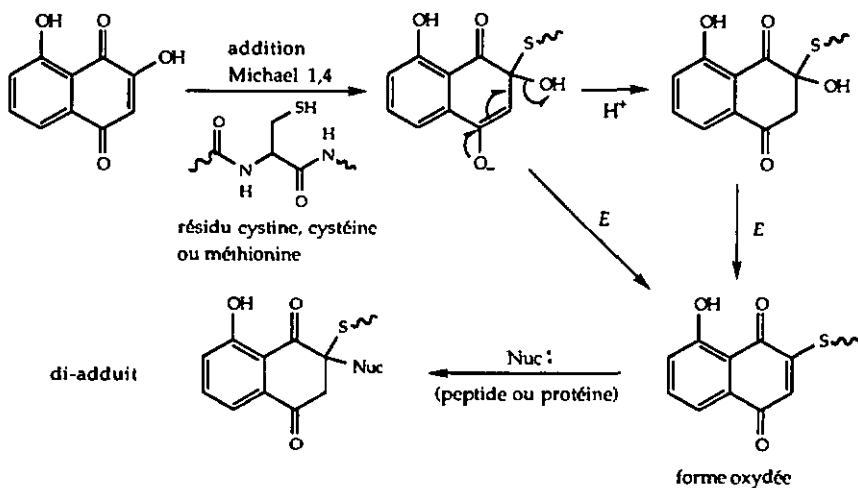


Schéma 19

Mécanisme proposé du cross-linking des protéines induit par la 2-hydroxyjuglone (ou plus généralement par les 1,4-naphtoquinones).

même position devient dès lors un site très favorable aux additions nucléophiles (schéma 19)^[87].

La 2-hydroxyjuglone se présente donc elle aussi comme un puissant inhibiteur enzymatique; sa structure relativement simple et sa très forte réactivité chimique n'en font pas une toxine spécifique; les naphthoquinones affiliées sont d'ailleurs réputées toxiques sur un très large éventail de végétaux^[82,83].

6.4.3 Acide p-aminobenzoïque (10)

Son mécanisme d'action sur les plantes n'est pas connu. Dans certains cas, cet amino-acide est même administré dans les milieux gélosés pour assurer la bonne croissance de végétaux en culture.

Souvent considéré comme un émulateur de croissance dans les microorganismes, il est intégralement converti en acide N-acétyl-p-aminobenzoïque dans les organismes supérieurs (chien, homme)^[32]; cette acétylation peut être interprétée comme un processus de détoxification. Elle traduit une activité biologique rattachée au groupe amino, ou une forte activation du cycle aromatique en sa présence.

Au niveau biosynthétique, l'acide p-aminobenzoïque est une pièce constitutive de l'acide tétrahydrofolique, une coenzyme jouant un rôle prépondérant dans les processus de méthylation, hydroxyméthylation ou formylation :

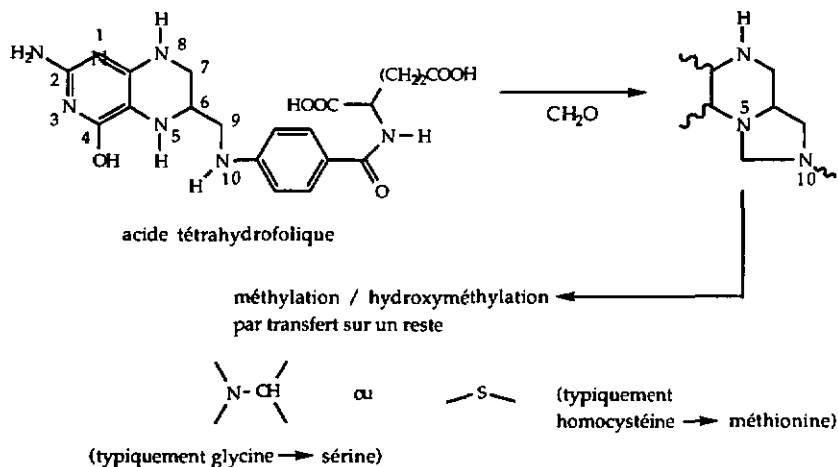


Schéma 20

Rôle de l'acide tétrahydrofolique et de son constituant l'acide p-aminobenzoïque (10) dans les processus de méthylation, hydroxyméthylation et formylation.

Dans cet acide, l'entité L-glutamique est responsable de la fixation de la molécule à l'enzyme; le site actif se situe au niveau des deux azotes (positions 5 et 10, schéma 20) sur lesquels se fixe un formaldéhyde ou un acide formique.

6.5 Réalité biologique des métabolites 3, 10 et 14

Tous trois ont une activité biologique indéniable sur le platane; les tests de toxicité l'ont assez clairement montré. Toutefois, nous n'avons pu détecter aucun d'entre eux dans le bois infecté, ce qui ne nous permet pas de leur attribuer un rôle effectif dans le processus de toxification du platane.

Mais ce sont aussi les trois substances chimiques les plus réactives que nous ayons répertoriées. Cela signifie que ces molécules seront rapidement incorporées ou converties *in vivo* en des substances fort différentes. La conversion 3→14 n'est qu'un exemple et pourrait bien ne constituer qu'une petite étape dans le processus qui mène à la nécrose du bois infecté.

De fait, la détection de l'isocoumarine 9 dans le matériel végétal n'est pas si surprenante non plus, car de toutes les isocoumarines fongiques, c'est aussi la plus stable chimiquement : substituant non hydroxylé en position 3 et fonction phénol méthylée en position 6. Bien qu'ignorant son activité biologique pour les raisons citées précédemment (§ 6.1), nous serions dès lors tentés de ne lui prêter qu'un faible caractère pathologique. Cependant, sa présence en fortes quantités pourrait avoir des conséquences non sans importance dans le processus de toxification du platane.

6.6 Relations hôte-parasite

Au vu des chromatogrammes présentés au § 5 (Figure 44), on constate quelques divergences notoires d'un extrait à l'autre; d'abord, toute une série de pics mineurs apparaissent exclusivement dans les extraits "pianta malata" et "malato"; à l'exception de l'umbelliférone (temps de rétention 26.16') et de la 3-méthyl-6 méthoxy-8 hydroxyisocoumarine 9 (temps de rétention 40.50'), aucune de ces substances n'a pu être identifiée jusqu'ici; il serait dès lors intéressant de déterminer l'origine de ces métabolites (fongique ou végétale) pour définir plus précisément le rôle joué par chacun des deux organismes dans cette interaction. Mais surtout il y a la très nette amplification de deux substances initialement présentes dans l'arbre sain à l'état de traces (27.18' et 44.10', Figure 44). Ces deux substances sont quant à elles nécessairement le résultat d'une interaction hôte-parasite au sein du platane. Survenant dans une variété réputée très vulnérable (*P. orientalis*), on peut douter qu'il s'agisse là de molécules fortement agressives à l'encontre du parasite, mais bien plutôt d'éléciteurs de résistance émis par l'arbre attaqué; des cas analogues ont été décrits dans la littérature, un exemple particulièrement frappant étant le rôle joué par l'acide salicylique dans diverses plantes^[88]; ces études ont montré qu'en soi, cette petite molécule ne joue pas un

rôle immunitaire à l'encontre des agents pathogènes, mais qu'elle induit l'expression d'un gène résistant au sein de la plante (systemic acquired resistance gene, SAR)^[89]. Son rôle se résume donc à celui d'un signal capable d'initier une réaction défensive de l'hôte. Il serait dès lors du plus grand intérêt d'établir la structure de ces agents et leur contribution à un quelconque processus d'autodéfense chez *P. orientalis*.

Des études préliminaires (§ 5) ont montré qu'il ne s'agissait ni d'acide salicylique, ni de l'un de ses précurseurs biosynthétiques (acides trans-cinnamique et benzoïque, phénylalanine). Une méthode analytique encore plus sensible et sélective s'avère donc nécessaire pour identifier ces probables éliciteurs de résistance et pour déceler d'éventuelles traces des toxines fongiques dans le bois malade. On mentionnera à ce sujet l'utilisation d'un détecteur MS/MS il y a quelques années^[90] pour la détection de l'eutypine dans la vigne infectée par *Eutypa lata*. Cette méthode s'était avérée très fiable.

6.7 Validité et sensibilité des tests de toxicité

Les deux tests quantitatifs que nous avons effectués nous ont permis d'illustrer le comportement de chaque toxine; ils permettent également - nous l'avons vu - d'appréhender des phénomènes biologiques intermédiaires, périodes d'induction ou vraisemblable(s) conversion(s) chimique(s). Mais ces tests nécessitent de grandes quantités de matériaux biologiques; ils s'appuient sur des critères purement macroscopiques (nécroses, pertes pondérales) et restent en définitive peu sensibles. La sensibilité pourrait être considérablement accrue en s'appuyant sur des effets plus spécifiques et moins visuels.

Plattner, Gessler et Wolfe^[23] ont développé plusieurs tests de toxicité sur le platane; l'un d'eux s'appuie sur des inhibitions de croissance de cals : on cultive ces derniers sur des milieux nutritifs comportant un % défini du milieu stérilisé de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*; les variations de masse en fonction du temps sont rapportées comparativement à des standards maintenus sur milieu neutre.

Le test est très sensible; il est en revanche très difficile à mettre en oeuvre, s'étend sur plus de quarante jours (!) et repose sur une inhibition de croissance; son utilisation nous aurait sans doute mené aux mêmes conclusions que celles rapportées par *Ake, Darbon, Grillet et Lambert*^[24] : obtention d'un composé de nature protéinique ("fimbriatan"), inhibant fortement la reproduction cellulaire (voir § 1.3).

Un second test fut proposé; il repose sur la létalité observée des protoplastes. Des suspensions sont additionnées d'un % défini du milieu fongique stérile; on décompte alors les protoplastes vivants en fonction du temps, comparativement à des standards maintenus en milieu neutre. Le test est extrêmement sensible; il distingue très nettement les effets d'un milieu jugé inoffensif et d'une solution

fongique diluée à 1%. Il ne s'étend que sur une trentaine d'heures tout au plus ce qui en fait un test particulièrement rapide. Ses effets miment enfin très fidèlement la réalité (mort cellulaire). Il est en revanche délicat et très difficile à mettre en oeuvre; les résultats sont relativisés par une très forte mortalité, également dans les solutions de contrôle.

7. Perspectives et Conclusions

Parmi les métabolites fongiques isolés, six manifestent une faible activité biologique à l'égard du platane, et seuls deux s'avèrent suffisamment actifs pour engendrer de profondes nécroses brunes ou noires sur les tissus exposés. Ces divers métabolites appartiennent à plusieurs classes de composés différents, principalement naphthalénones et isocoumarines; l'acide p-aminobenzoïque constitue une classe à part, tant sur le plan structural que biosynthétique. Tous causent un fort brunissement des chloroplastes jouxtant les membranes cellulaires, et dans certains cas (naphthalénone (3), acide p-aminobenzoïque (10)), un flétrissement des tissus accompagné d'une perte sensible de masse (§ 4).

De tels symptômes sont reportés dans la littérature comme faisant suite à l'infection du platane par *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*[7,24,62]. Il y a donc correspondance entre certains symptômes de la maladie observés *in vivo* et les dommages biologiques causés par ces phytotoxines *in vitro*.

Des diverses substances fongiques, seule l'isocoumarine 9 a été détectée en fortes quantités dans le platane contaminé. Nous servant de la LC/MS en "selected ion monitoring" (SIM), nous avons également pu constater des similitudes structurales entre l'isocoumarine 7 et l'un des métabolites présent dans une fraction polaire de l'extrait malato (fraction EF3, voir § 5.3.2). Ce fait, s'il est vérifié, signifie que certaines des molécules actives pourraient ne pas être présentes sous leur forme native dans la plante, mais sous une forme déjà dérivée. En d'autres termes, le fait de ne pas les avoir détectées *in vivo* ne signifie pas pour autant qu'elles ne s'y trouvent pas; cela peut aussi vouloir dire qu'une fois produites, elles sont rapidement converties en d'autres substances telles que décrites au chapitre 6. Ainsi, dans le cas particulier de la naphthalénone 3 et de son homologue oxydé (2-hydroxyjuglone (14)), il serait plus judicieux de rechercher des dérivés de cette 1,4-naphtoquinone (adduits peptidiques, cf § 6) plutôt que la quinone elle-même : en effet, on peut supposer que sa durée de vie dans les tissus végétaux sera d'autant plus petite que sa réactivité chimique est forte; l'analyse, décrite par Jones et al.[82,87] pour des substrats analogues, peut être effectuée via l'utilisation d'un double détecteur de masse (MS/MS) opérant en "selected ion monitoring" (schéma 21). Dans notre cas, la détection des ions de m/z 191 et 224, tous deux issus d'une fragmentation de Michael inverse, permettrait de vérifier très rapidement l'hypothèse d'une dégradation oxydative *in vivo*.

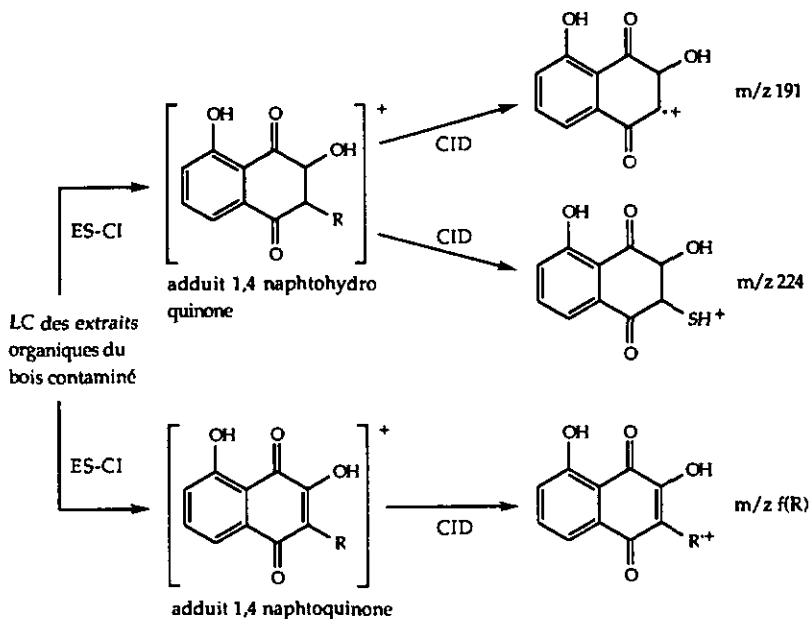


Schéma 21

Fragmentation observée des adduits peptidiques des 1,4-naphtoquinones^[82,87]; les ions de m/z 191 et 224 détectés à la sortie de la chambre de collision (CID) seraient vraisemblablement le diagnostic de la présence de tels adduits dans les effluents chromatographiques. Dans ce schéma, le symbole ES-CI se rapporte à une séquence d'ionisation chimique par électrospray, CID représente une "collisionally induced dissociation cell" et le substituant R une chaîne peptidique liée à la quinone via un résidu cystéine (ions de m/z 191 et 224), lysine ou histidine (ion de m/z 191 et fragmentation de la chaîne aminée).

Il serait également judicieux d'observer au niveau cellulaire les effets engendrés par ces substances actives. Des études comparatives au microscope électronique permettraient éventuellement de dresser un parallèle entre les symptômes observés *in vitro* (par exemple suite à l'immersion de fragments cellulaires du platane dans des solutions de toxine fongique) et ceux relevés *in vivo*. De tels travaux ont été menés avec *Ceratocystis ulmi*, agent parasite de l'orme^[91,92]. Des similitudes flagrantes ont été relevées entre les effets du pathogène et de sa toxine présumée (cerato-ulmine), en particulier des changements conformationnels assez conséquents au niveau des organelles cellulaires (mitochondries, membranes cytoplasmiques et nucléaires, vacuoles).

On constate également que toutes les naphthalénones isolées manifestent une certaine activité biologique à l'égard du platane; ces substances apparaissent comme des intermédiaires dans la biosynthèse de la mélanine. Au vu des naphthalénones isolées d'un champignon très voisin (*Ceratocystis fimbriata* var. *coffea*^[73]), on constate plusieurs similitudes (l'isolation des métabolites 2 et 4, aux côtés des isocoumarines 6, 7, 8 et 9), mais également quelques profondes divergences (la naphthalénone 3 est un des métabolites majeurs de la souche *platani*, elle ne l'est manifestement pas dans l'espèce *coffea* où de surcroît apparaissent d'autres intermédiaires biosynthétiques de la mélanine : I(2H) 3,4 dihydro-3,4,8 trihydroxynaphthalénone I et vermélone II).



Ces inéquivalences dans le contenu organique des deux souches *coffea* et *platani* suggèrent certaines divergences au niveau enzymatique. La voie directe 1,3,6,8-tétrahydroxynaphthalène - scytalone - vermélone - 1,8 dihydroxynaphthalène et mélanine est nécessairement identique dans les deux souches, car toutes deux synthétisent de la mélanine (voir schéma 15). Mais ce sont les séquences indirectes, menant aux intermédiaires modifiés, qui semblent inégales. Dans cette optique, il serait intéressant d'approfondir l'étude comparative de ces deux souches, mais aussi de plusieurs autres *Ceratocystis* pour permettre une distinction plus précise des différents membres de cette famille. Au sein même de l'espèce *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*, on trouve par ailleurs quelques individus différents sur le plan morphologique. Si les souches AF (auto-fertiles) constituent près du 80% des effectifs, on n'en trouve pas moins 17 % d'espèces dites AS (auto-stériles) et quelques % d'ASP (auto-stériles protopérithéciales) ou PS (périthèces-stériles). Toutes sont capables de s'implanter et de croître dans un milieu approprié, mais différent au niveau de la reproduction sexuée. Les AS ne contiennent pas de périthèces et ne peuvent donc pas engendrer d'ascospores. Les ASP en possèdent, mais sous forme atrophiée : seule subsiste effectivement la masse sphérique résultant de l'aggrégation des hyphes; en revanche, on n'observe pas le cou fibrillé caractéristique des espèces AF. Les espèces ASP, tout comme AF, engendrent des ascospores. Enfin les espèces PS sont morphologiquement identiques aux auto-fertiles, mais leurs périthèces sont stériles et ne peuvent pas produire de spores. L'étude de ces différents espèces présente un intérêt dans le sens où elles présentent une pathogénicité inégale^[98]. Il serait donc là aussi intéressant d'analyser leur contenu phytotoxique

(métabolites secondaires ou protéines) et de le mettre en rapport avec la pathogénicité de la souche observée *in vivo*.

Un autre sujet des plus captivants concerne les interactions pouvant survenir entre le parasite et son hôte. Nous avons vu (figure 44) l'apparition de l'umbelliférone dans le bois en réponse à son infection par *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*; nous avons aussi pu vérifier l'hypothèse avancée par Macheix et al.^[2], selon laquelle cette émission surviendrait trop tardivement pour représenter une défense efficace. Et effectivement, nous n'avons pas même décelé une trace de cette phytoalexine dans le bois situé juste en amont du front de progression du parasite. Nous avons enfin constaté l'absence totale de la scopolétine, une autre phytoalexine détectée dans *P. acerifolia* suite à son infection par le parasite^[2].

A l'inverse, nous avons mis en évidence deux autres substances majoritairement présentes dans le bois malade; il est très intéressant de constater leur rapide déclin en passant du bois directement contaminé ("malato") au bois situé plus en amont ("pianta malata"), puis sain ("sano"). Ces substances n'ont pas été identifiées, mais le spectre UV de l'une d'entre elles (27.18', figure 45) témoigne d'un simple composé aromatique substitué, alors que le second (44.10', figure 46), avec un épaulement à 350 nm, suggère une structure plus complexe. Il serait dès lors des plus intéressant d'identifier ces composés d'origine végétale, et de déterminer leur éventuelle contribution à un processus d'auto-défense chez *P. orientalis*; il faudrait également mener en parallèle une étude comparative de *P. occidentalis* (espèce reconnue plus résistante^[1]), afin d'apprécier les mécanismes défensifs dans cette autre variété.

8. Partie expérimentale

8.1 Appareillage

Deux types d'HPLC furent utilisés : tantôt un Perkin-Elmer 3B, tantôt un HP 1050, tous deux couplés à un détecteur UV/VIS HP 1040A et un détecteur à fluorescence HP 1046A. Les GC furent elles aussi effectuées sur trois types d'appareils suivant la nature des composés à séparer. Le premier était un chromatographe DANI 3900 équipé d'un détecteur FID et d'une colonne capillaire en verre revêtue d'un film de polymère de type OV-1 (diméthyle-polysiloxane, support apolaire). La colonne mesurait 30 m, son diamètre intérieur 0.32 mm et l'épaisseur du film 0.3 μ m, split fixé à 1/30. Le second était un Perkin-Elmer SIGMA 3B, détecteur FID, muni d'une colonne SES4-DF 0.25 (support semi-apolaire). Son diamètre intérieur était de 0.32 mm et sa longueur de 25 m. Une précolonne SES4-MN la précédait, diamètre intérieur 0.32 mm et longueur 1m. Quant au troisième, destiné aux résolutions énantiomériques, il s'agissait d'un HR DANI 6800 équipé d'un détecteur FID et d'une colonne revêtue d'un polymère de β -CD modifiée, comme décrit sous chapitre 2. Les spectres RMN furent enregistrés sur un VARIAN GEMINI 200 ou sur un BRUKER AMX 400. Le spectromètre IR était un Perkin-Elmer 1720 X à transformée de Fourier et les spectres systématiquement relevés en appliquant les substances pures sur fenêtre de NaCl ou KBr. Les spectres de masse furent acquis sur un NERMAG R30-10 en mode d'ionisation par impact électronique (EI) ou chimique (DCI, NH₃) suivant les exigences. Les spectres UV furent mesurés sur un spectrophotomètre HP 8452A muni d'un détecteur à barrette de diodes (DAD). Le polarimètre utilisé était un Jasco DIP 370, et les α_D relevés à 589 nm dans une cellule thermostatée à 25°C. Enfin on mentionnera l'utilisation d'un Jasco J-500C pour les spectres de dichroïsme circulaire. Toutes les manipulations biologiques ont été menées sous un flux laminaire pour raisons de sécurité évidentes.

8.2 Synthèses

Les modes opératoires suivants se rapportent aux schémas de synthèse présentés au chapitre 3. Les chiffres entre parenthèse se réfèrent aux structures conformément à leur numérotation dans cet ouvrage.

8.2.1 Synthèse de la 1(2H) 3,4-dihydro 2,4,8 trihydroxynaphtalénone (3)

Toute la procédure de la synthèse de la 1(2H) 3,4-dihydro 2,4,8-trihydroxynaphtalénone est inspirée des travaux de *Fujimoto et Satoh* (§ 3.2.4)^[53].

1(2H) 3,4-dihydro 4,8-dihydroxynaphtalénone (23)

A une suspension de 3.4 g de LiAlH_4 (90 mmol) dans 300 ml d'éther sec, on ajoute goutte-à-goutte une solution de 2 g de juglone (11.5 mmol) dans 80 ml de THF sec. L'agitation à température ambiante est maintenue 10 heures. Au mélange préalablement refroidi à -15°C , on ajoute 500 ml de HCl 5% glacé, observant une intense coloration rouge de la solution. Après trois extractions consécutives à l'éther et concentration, on solubilise l'huile sombre obtenue dans 100 ml de diméthoxypropane, y ajoute une quantité catalytique d'acide camphresulfonique et maintient l'agitation 1 heure durant. La solution est alors versée sur 200 ml de NaCl sat., 3 fois extraite à l'éther puis soumise à une flash chromatographie sur silice (acétate d'éthyle/hexane) permettant de séparer la 4,8 dihydroxynaphtalénone (750 mg) du 1,8-acétonide (260 mg, 11%) et de la juglone non convertie (140 mg, 7%). On obtient la naphthalénone pure par précipitation des impuretés sombres avec le système de solvants acétate d'éthyle/hexane (620 mg, 30%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) : 12.40 (s, OH), 7.47 (t, 8.0 Hz), 7.00 (dt, 8.0, 0.8 Hz), 6.89 (dd, 8.0, 0.8 Hz), 4.88 (large dd, 4.4, 8.0 Hz), 3.56 (s, OH), 2.97 (ddd, 18.0, 8.0, 4.4 Hz), 2.41 (ddd, 18.0, 8.0, 4.4 Hz), 2.30 (1H, m), 2.16 (1H, m); IR (fenêtre NaCl) : 3338, 2974, 1636, 1455, 1050 cm^{-1} .

1(2H) 3,4-dihydro 4-tétrahydropyranyle 8-hydroxynaphtalénone (28)

A 620 mg de 1(2H) 3,4 dihydro 4,8 dihydroxynaphtalénone (3.5 mmol) solubilisés dans 120 ml de dichlorométhane sec, on ajoute 950 μl (880 mg, 10 mmol) de 3,4 dihydro-2H-pyrane et une quantité catalytique d'acide camphresulfonique. On maintient l'agitation 1 heure durant, puis y ajoute un volume équivalent de NaHCO_3 sat. Les deux phases sont séparées, la phase aqueuse 2 fois extraite à l'éther et les phases organiques réunies lavées au moyen de NaCl sat. On obtient après évaporation 900 mg d'éther monotétrahydropyranyle (~100%) souillé d'une infime quantité de diéther. MS : m/z (EI, 70 eV) : 263 (MH^+), 178 ($\text{MH}^+\text{-THP}$), 162 ($\text{MH}^+\text{-OTHP}$).

Oxodiperoxymolybdène(hexaméthylphosphoric triamide) ($\text{MoO}_5\text{-HMPA}$)¹⁹³⁾

Dans un ballon thermostaté à 40°C , on mélange 20 g de MoO_3 (0.14 mol) et 100 ml d'eau oxygénée 35%. Un contrôle rigoureux de la température est maintenu, la réaction étant faiblement exothermique. Après 2 heures 30 d'agitation à 40°C , la solution jaune est filtrée sur Büchner, refroidie à 10°C et mêlée à 25 g de HMPA (0.14 mol). Le précipité qui se forme instantanément est récupéré par filtration, rincé à l'eau puis recristallisé du méthanol après dissolution à 40°C . Le peroxyde est obtenu anhydre après 24 heures sous vide et sur P_2O_5 . Masse obtenue : 35g (70%).

1(2H) 3,4-dihydro 4-tétrahydropyranyle 2,8-dihydroxynaphtalénone (29)

Dans un appareillage à l'abri de l'humidité, on réfrigère à -75°C une solution de 900 mg du monoéther précédemment obtenu (3.5 mmol) dans 90 ml de THF sec.

On y ajoute via un septum 4.5 ml d'une solution de LD \dot{A} dans le THF titrée à 1.8 mol/l (8 mmol), observant une coloration pourpre immédiate. Après 45 minutes d'agitation, la solution est tempérée à -15°C et on lui ajoute 3.05 g de MoO₅-HMPA (8.6 mmol). La solution rouge vire au brun. Après 90 minutes d'agitation, la réaction est interrompue par adjonction de 50 ml de Na₂SO₃ sat., puis 75 ml d'eau. Les deux phases sont séparées, la phase aqueuse 2 fois extraite à l'éther, les phases organiques réunies sont lavées au NaCl sat. puis concentrées pour donner une huile noire. Par flash chromatographie sur silice (acétate d'éthyle 5%, puis 20% dans l'hexane), on récupère 570 mg du produit de départ (30%) et 240 mg de l' α -hydroxycétone recherchée (25%).

1(2H) 3,4-dihydro 2,4,8-trihydroxynaphtalénone (3)

Un mélange de 120 mg de 1(2H) 3,4-dihydro 4-tétrahydropyranyle 2,8-dihydroxynaphtalénone (0.43 mmol), 20 ml de THF et 20 ml de HCl 5% aqueux sont mis sous agitation. Après 1 heure la solution est diluée dans un double volume d'eau, 3 fois extraite à l'éther et les phases organiques lavées avec NaHCO₃ sat. puis NaCl sat. On obtient après concentration 80 mg du produit final (100%). Ses données spectroscopiques sont en parfaite concordance avec celles du produit naturel.

8.2.2 Synthèse des analogues bromés de la 1(2H) 3,4-dihydro 4,8-dihydroxynaphtalénone et de son diacétate

1) 1(2H) 3,4 dihydro-4 bromo-8 hydroxy-naphtalénone (24)

Selon procédure décrite par King et Ostrum^[54] pour des composés analogues (§ 3.2.3):

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, on met sous reflux une suspension de 0.14 g de CuBr₂ finement broyé (0.6 mmol) dans un mélange de 0.25 ml CHCl₃ et 0.25 ml EtOAc. On y ajoute d'un coup une solution de 56.3 mg de 1(2H) 3,4 dihydro-4,8 dihydroxynaphtalénone (0.3 mmol) dans 0.6 ml du solvant mixte CHCl₃/EtOAc. On maintient le chauffage et une forte agitation 2 heures durant; un précipité hétérogène gris est alors retiré par filtration et le produit majoritaire purifié par chromatographie sur silice (EtOAc-hexane 10 : 90) pour donner 14 mg du bromure (19%). ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): 12.42 (s, OH), 7.44 (dd, 7.8, 7.5 Hz), 6.94 (dd, 7.8, 0.6 Hz), 6.92 (d, 7.5 Hz), 5.54 (large t, 3.5 Hz), 3.24 (dt, 17.7, 8.9 Hz), 2.73 (ddt, 17.7, 1.2, 3.5 Hz), 2.54 (ddt, 8.9, 1.2, 3.5 Hz), 2.50 (dt, 8.9, 3.5 Hz); IR (fenêtre KBr): 2960, 1642, 1614, 1455, 1358, 1240 cm⁻¹; MS : m/z (EI, 70 eV) : 242/240, 161 (M⁺-Br), 133 (M⁺-Br-CO), 115 (133 -H₂O), 105 (M⁺-Br-C₃H₄O), DCI (NH₃) : m/z 243/241, 161, 133.

2) 1(2H) 3,4 dihydro-5 bromo-4,8 dihydroxynaphtalénone (25)

Dans un ballon à 2 cols, on refroidit à 0°C un mélange de 0.75 ml de méthanol et 0.25 ml d'acide acétique glacial. A l'abri de la lumière et sous agitation, on ajoute 12 μ l (37.4 mg, 2.34 \cdot 10⁻⁴ mol) de brome, puis une solution de 37.5 mg de 1(2H) 3,4

dihydro-4,8 dihydroxy-naphtalénone ($2.1 \cdot 10^{-4}$ mol) dans 1 ml de méthanol. L'agitation à 0°C est maintenue 30 minutes, et la solution incolore ensuite réchauffée à température ambiante. La solution organique est neutralisée par petits ajouts de NaHCO_3 puis concentrée avant purification chromatographique (silice, Et_2O -hexane 20 : 80); on obtient 25 mg du bromure pur (46%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) : 12.48 (s, OH), 7.63 (d, 8.4 Hz), 6.88 (d, 8.4 Hz), 5.24 (t, 3.2 Hz), 3.21 (ddd, 16.4, 14.0, 5.6 Hz), 2.60 (ddd, 16.4, 3.2, 0.4 Hz), 2.30 (2H, m).

3) 1(2H) 3,4 dihydro-4,8 diacétyl-naphtalénone (26)

25 mg de 1(2H) 3,4 dihydro-4,8 dihydroxynaphtalénone (0.14 mmol) sont maintenus sous agitation et à température ambiante dans 1 ml de pyridine et 1 ml d'anhydride acétique. Après une heure, la solution est mélangée à 40 ml d'eau glacée puis extraite 3 fois consécutives avec 30 ml d'éther. Les phases organiques réunies sont lavées avec HCl 5%, NaHCO_3 saturé puis de l'eau jusqu'à neutralité. On obtient après séchage et concentration 35 mg de diacétate pur (100%). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) : 7.59 (t, 8 Hz), 7.40 (dt, 8.0, 0.4 Hz), 7.10 (dd, 8.0, 0.4 Hz), 6.12 (dd, 4.0, 5.6 Hz), 2.90 (ddd, 5.8, 9.4, 17.1 Hz), 2.60 (ddd, 17.1, 5.6, 6.9 Hz), 2.39 (s, CH_3), 2.35 (m, 2H), 2.13 (s, CH_3).

1(2H) 3,4 dihydro-2,2 dibromo-4,8 diacétyl-naphtalénone (27)

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, on met sous reflux une suspension de 20.7 mg de CuBr_2 finement broyé (0.09 mmol) dans 0.5 ml de CHCl_3 et 0.5 ml d' EtOAc . On y ajoute une solution de 11.75 mg du diacétate (0.045 mmol) dans 1 ml de solution mixte CHCl_3 - EtOAc et quelques μl d'acide acétique glacial. La solution est laissée sous reflux 12 heures durant. Le CuBr gris est retiré par filtration, la solution additionnée de 3 ml d'eau puis 3 fois extraite à l'éther. Après lavage des phases organiques à l'eau et concentration, le solide orange résiduel est purifié par chromatographie (silice, Et_2O -hexane 25 : 75) pour donner 8 mg de dibromure (42%). Le solide obtenu vire très rapidement au noir. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) : 7.68 (t, 8.5 Hz), 7.30 (d, 8.5 Hz), 7.18 (d, 8.5 Hz), 6.30 (dd, 5.4, 9.9 Hz), 3.57 (dd, 5.4, 14.0 Hz), 3.12 (dd, 9.9, 14.0 Hz), 2.46 (s, CH_3), 2.26 (s, CH_3); MS : DCI (NH_3) m/z 440/438/436 ($\text{M}^+ + \text{NH}_3$), 360/358 ($\text{M}^+ + \text{NH}_3$ -Br), 300/298 (m/z 360/358 -OAc), 280 (m/z 300/298 -Br).

8.2.3 Synthèse de la 2-hydroxyjuglone (14)

1) via la 1(2H) 3,4-dihydro 2,4,8-trihydroxynaphtalénone

20 mg de 1(2H) 3,4-dihydro 2,4,8-trihydroxynaphtalénone (0.1 mmol) sont dissouts dans 20 ml de NaOH 0.01 M méthanolique. On observe un rougissement progressif de la solution. Après deux heures d'agitation à température ambiante, la solution est diluée dans un large volume d'eau (80 ml) puis 2 fois extraite à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse résiduelle est acidifiée à l'acide acétique glacial ($\text{pH} < 6$) puis à nouveau 3 fois extraite à l'acétate d'éthyle. Après lavage à NaCl sat., ces dernières sont concentrées puis soumises à une chromatographie

sur silice (acétate d'éthyle 5 : acide acétique 2 : hexane 93) pour obtenir un solide orange très pur (15 mg, 80%). La 2-hydroxyjuglone recrystallise aisément de l'acide acétique. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) : 11.1 ppm (s, OH), 7.64 (t), 7.63 (s, OH), 7.23 (d), 7.22 (d), 6.35 (s); $^1\text{H-NMR}$ (acétone- d_6 , 200 MHz) : 7.78 (t, 8 Hz), 7.56 (d, 8 Hz), 7.25 (d, 8 Hz), 6.20 (s); MS (EI, 70 eV) m/z 190, 162 (M^+-CO), 134 (M^+-2CO), 120 ($\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_2$), 92 ($\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_2-\text{CO}$); IR 1729, 1628, 1570 et 1455 cm^{-1} ; UV (λ_{max} , EtOH-eau 2 : 98) : 248, 282, 402 nm (forme protonée); 248, 448 nm (forme déprotonée).

Acétylation du produit de dégradation (2,8-diacétyljuglone) (34)

Une petite quantité du composé obtenu est solubilisée dans un mélange 1:1 d'anhydride acétique et de pyridine et laissée sous agitation trois heures durant. On observe à ce niveau une rapide décoloration de la solution. Les réactifs en excès sont alors éliminés par évaporation et le résidu brun-orangé chromatographié sur silice (acétate d'éthyle 5 : AcOH 2 : hexane 93) pour donner le diacétate pur. MS (EI, 70 eV) m/z 274, 246 (M^+-CO), 232 (M^+-Ac), 204 ($\text{M}^+-\text{Ac-CO}$), 190 (M^+-2Ac), 162 ($\text{M}^+-2\text{Ac-CO}$), 134 ($\text{M}^+-2\text{Ac-2CO}$), 120 ($\text{M}^+-2\text{Ac-CO-C}_2\text{H}_2\text{O}$). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) : 8.08 (dd, 8.0, 1.0 Hz), 7.79 (t, 8.0 Hz), 7.40 (dd, 8.0, 1.0 Hz), 6.75 (s), 2.44 (s, CH_3), 2.39 (s, CH_3).

2) via la juglone

La procédure de la 2-hydroxy, tout comme celle de la 3-hydroxyjuglone sont directement tirées des travaux de Thomson et Macleod (§ 3.2.5)^{56,57}.

2-p-tolylthiojuglone (30)

A une suspension de 0.5 g de juglone (2.9 mmol) dans l'éthanol (25 ml), on ajoute sous agitation une solution de 0.17 g de p-thiocrésol (1.4 mmol) dans 6 ml d'éthanol. Après 20 minutes, le précipité brun qui se forme est récupéré par filtration, puis recrystallisé dans le système mixte de solvants acétone-eau. On obtient après séchage 0.38 g d'un solide brun-jaune (92%).

2-hydroxyjuglone (14)

A une solution dans l'éthanol (30 ml) de 0.38 g de l'adduit précédemment synthétisé (1.3 mmol), on ajoute 15 ml de NaOH 2M. La solution violette est mise sous reflux 1 heure durant, diluée avec 40 ml d'eau puis réacidifiée (à 0°C) au moyen de H_2SO_4 4M. On observe un virage instantané du violet au brun. Après évaporation de l'éthanol, un solide brun se dépose. On le récupère par filtration. Après recrystallisation de l'acide acétique, on obtient 150 mg d'une poudre brune (61%).

8.2.4 Synthèse de la 3-hydroxyjuglone (15) (§ 3.2.6)^{56,57}

acétate de juglone (31)

A une suspension de 0.5 g de juglone (2.9 mmol) dans 4 ml d'anhydride acétique, on ajoute 2 gouttes d'acide sulfurique concentré. Après agitation, on observe

rapidement la précipitation d'un solide jaune que l'on récupère par filtration, rince à l'eau et finalement sèche pour obtenir 0.31 g d'acétate (50%).

acétate de 3-p-tolylthiojuglone (32)

A une suspension de 0.31 g d'acétate de juglone (1.4 mmol) dans 10 ml d'éthanol, on ajoute une solution de 90 mg de p-thiocrésol (0.7 mmol) dans 3 ml d'éthanol. La solution est mise sous reflux 15 minutes, le volume d'éthanol réduit de moitié puis refroidi à -10°C. Un composé jaune-orangé cristallise que l'on récupère par filtration (0.15 g, 63%).

3-p-tolylthiojuglone (33)

0.15 g d'acétate de 3-p-tolylthiojuglone (0.44 mmol) sont mis sous reflux 10 minutes durant dans 20 ml d'éthanol et 7.5 ml d'HCl concentré. Par évaporation de l'éthanol et adjonction d'un grand volume d'eau, on provoque la cristallisation d'un composé orange. Après filtration et lavage à l'eau, on obtient 120 mg de 3-p-tolylthiojuglone (90%).

3-hydroxyjuglone (15)

120 mg de 3-p-tolylthiojuglone (0.4 mmol) sont mis sous reflux 45 minutes durant avec 5 ml d'éthanol, 3 ml d'eau et 0.4 ml de NaOH 2M. La solution est refroidie dans la glace, réacidifiée au moyen de H₂SO₄ 4M puis évaporée jusqu'à obtention d'un précipité noir collant; ce dernier est repris dans l'acétate d'éthyle, les phases organiques lavées à NaCl sat. puis 4 fois extraites à NaOAc 2%. Après évaporation de ces dernières jusqu'à un faible volume, refroidissement à 0°C et réacidification avec H₂SO₄ 4M, on obtient à nouveau un précipité noir collant. Une chromatographie sur silice (acétate d'éthyle 5 : AcOH 2 : hexane 93) permet de séparer la 3-hydroxyjuglone (solide orange) de ses impuretés.

8.2.5 Synthèses des D-galactol, D-mannitol et D-allositol hexaacétates (16,17,18)
(voir § 3.2.8)^[42,94]

A une solution de 2 g de galactose (11.1 mmol) dans 40 ml d'eau, on ajoute une solution de 0.3 g de NaBH₄ (7.9 mmol) dans 20 ml d'eau. Après deux heures d'agitation, la solution est évaporée à sec puis 3 fois reprise dans le méthanol. Le résidu blanc est séché 12 heures durant à l'étuve à vide puis resolubilisé dans 20 g d'anhydride acétique (0.196 mol). On le maintient de la sorte trois heures sous agitation à 80°C. Après refroidissement, l'excès d'anhydride acétique est hydrolysé par adjonction d'eau (100 ml) et l'hexaacétate 3 fois extrait à l'éther. Les phases organiques sont lavées au NaHCO₃ sat. puis concentrées pour donner un solide blanc non hygroscopique. On obtient le galactol hexaacétate pur par recristallisation dans le couple de solvants méthanol-eau (1.52 g, 32%).

Les D-mannitol et D-allositol hexaacétates sont obtenus de la même façon via le D-mannose et le D-allose. L'alditol naturel fut acétylé de manière identique et obtenu pur après chromatographie sur silice (EtOAc 20 : THF 2 : Hexane 78).

8.2.6 Synthèse du monoamide de l'acide fumarique (13) (§ 3.2.7)

A 0.5 g de chlorure de fumaryle (3.3 mmol) on ajoute 500 µl d'une solution glacée d'ammoniaque 12% (3.3 mmol, 1 équivalent). Le précipité rose qui se forme est récupéré par filtration, abondamment lavé à l'eau puis soumis à une chromatographie sur silice (acétate d'éthyle 95 : AcOH 5) pour séparer le monoamide recherché du diamide et de l'acide fumarique. Le solide blanc qui en résulte est débarrassé de la silice qui l'accompagne par solubilisation dans l'isopropanol et filtration consécutive. On obtient 11 mg du monoamide fumarique (3%) sous forme d'une poudre blanche amorphe.

8.2.7 Synthèse de l'acide 3,7-diméthyl-3-hydroxy-octène-6-oïque

1) Synthèse du racémate (§ 3.2.1)

3,7-diméthyl-3-hydroxy octène-6-oate d'éthyle (19)

Dans un ballon à 3 cols de 250 ml muni d'un réfrigérant et d'une ampoule à addition, on dispose 8.9 g de zinc en poudre (0.136 mol) préalablement lavé à l'éther et 10 ml de diméthoxyméthane sec. On y ajoute 2 ml de bromoacétate d'éthyle, initie la réaction par chauffage à 40°C et poursuit l'adjonction des 11.3 g de bromoacétate (0.68 mol) dissouts dans 40 ml de diméthoxyméthane de sorte à maintenir un reflux régulier. La solution est mise sous reflux 90 minutes durant, additionnée au goutte-à-goutte de 8.55 g de 6-méthyl-5-héptène-2-one (0.68 mol) dans 40 ml de diméthoxyméthane puis remise sous reflux 90 minutes durant. On la refroidit à 0°C et l'hydrolyse au moyen de 25 ml de HCl 15% froid. Après transfert dans une ampoule à extraction, les deux couches sont séparées et la phase aqueuse extraite à l'éther (100 ml). Les phases organiques réunies sont finalement lavées à Na₂CO₃ sat. puis H₂O. Après concentration, l'huile obtenue est tout d'abord distillée sous 13 mmHg pour éliminer l'excès de 6-méthyl-5-héptène-2-one, puis sous haut vide pour récupérer 9.59 g (66%) d'octénoate d'éthyle (ébullition à 78-79°C sous 0.38 mmHg). ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) : 5.09 (tseptet 6.9, 0.7 Hz), 4.18 (q, 6.6 Hz), 3.41 (large s, OH), 2.53 (d, 15.5 Hz), 2.41 (d, 15.5 Hz), 2.05 (2H, dd, 17.5, 6.9 Hz), 1.68 (d, 0.7 Hz, CH₃), 1.60 (s, CH₃), 1.52 (m, 2H), 1.27 (t, 6.6 Hz), 1.24 (s, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) : 173.7, 132.4, 124.8, 71.6, 61.3, 45.6, 42.5, 27.3, 26.3, 23.4, 18.3, 14.9 ppm; IR (fenêtre KBr) : 2975, 2930, 1718, 1376, 1203 cm⁻¹.

Acide 3,7-diméthyl-3-hydroxy-octène-6-oïque (1)

A 0.5 g d'ester éthylique (2.3 mmol), on ajoute 3.5 ml de NaOH 2M (7 mmol, 3 équivalents) et l'on maintient à froid une vive agitation pour favoriser l'émulsion des 2 phases. Après 3 heures, l'agitation est interrompue, la solution refroidie à 0°C et précautionneusement réacidifiée au moyen de HCl 5M jusqu'à pH 6. La solution est ensuite acidifiée à pH 4.5 au moyen de HCl 0.01 M, 4 fois extraite à l'éther, les phases organiques lavées au moyen d'eau puis concentrées pour donner 350 mg d'une huile jaune, l'acide 3,7-diméthyl-3-hydroxy-octène-6-

oïque pur (80%). Les données spectroscopiques sont en tous points identiques à celles du produit naturel (voir § 2).

Acide tétrahydro-2,6,6-triméthyl-2H-2-pyrane-acétique (20)

Ce produit minoritaire est obtenu lors de la réacidification brutale de l'ester éthylique saponifié. 0.4 g d'ester éthylique (1.9 mmol) sont saponifiés comme précédemment décrit. Après réacidification au moyen d'HCl concentré à température ambiante, la phase aqueuse est extraite à l'éther, les phases organiques lavées puis concentrées, enfin soumises à une chromatographie sur RP-C18 (MeOH-eau) pour séparer l'acide 3,7-diméthyl-3-hydroxy-octène-6-oïque (250 mg, 72%) du dérivé cyclique 20, une huile incolore (70 mg, 20%). 20 : m/z 187 (M⁺+H), 171 (M⁺-CH₃), 153, 128 (M⁺-CH₂COOH), 109, ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) : 3.2 (large s, OH), 2.6 (d, 16 Hz), 2.48 (d, 16 Hz), 1.5 (m, 3 CH₂), 1.3 (s, CH₃), 1.22 (s, 2 CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) : 175.8 (COOH), 72.3 (C_{quat}), 72.2 (C_{quat}), 45.5 (CH₂), 44.4 (CH₂), 42.8 (CH₂), 29.74 (CH₃), 29.71 (CH₃), 27.3 (CH₃), 19.2 (CH₂).

3,7-diméthyl 3-hydroxy octène-6-oate de méthyle

91 mg d'acide 3,7-diméthyl 3-hydroxy octène-6-oïque (0.49 mmol) sont méthylés au diazométhane selon la procédure décrite par Fales et al.^[95]. L'extrait organique qui en résulte est alors transféré dans une ampoule à extraction, l'acide libre résiduel extrait au moyen de NaOH 1 M et la phase organique finalement lavée à NaCl sat. jusqu'à neutralité. On obtient l'ester méthylique pur par concentration (64 mg, 65%). ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) : 5.08 (tseptet, 7, 1.6 Hz), 3.7 (s, CH₃), 2.54 (d, 15 Hz), 2.43 (d, 15 Hz), 2.04 (m), 1.66 (s, CH₃), 1.60 (s, CH₃), 1.52 (m), 1.24 ppm (s, CH₃).

La même procédure est suivie pour la méthylation du produit naturel en vue des injections GC comparatives (voir § 2).

2) Synthèse de l'énantiomère S (§ 3.2.2)

(2S, 3S)-Epoxygéraniol (21)^[96]

Dans un ballon de 500 ml coiffé d'un septum et maintenu sous atmosphère d'azote, on refroidit à -23°C et sous agitation 400 ml de dichlorométhane sec. On y ajoute alors successivement 8.12 g de tétraisopropanoate de titane (28.8 mmol) et 5.88 g de L-(+)-diéthyl tartrate (28.8 mmol), maintient l'agitation durant 5 minutes puis y ajoute 4.44 g de géraniol (28.8 mmol) et 250 ml d'une solution de 18.5 ml d'hydroperoxyde de *t*-butyle (57 mmol) dans le dichlorométhane. La solution résultante est agitée 2 heures durant; on y ajoute alors 65 ml d'une solution 10% aqueuse d'acide tartrique, observant sa solidification immédiate. Après 30 minutes, le ballon est retiré du système réfrigérant. Les phases organiques sont prélevées, lavées une seule fois avec de l'eau, séchées sur MgSO₄ puis concentrées pour donner une huile incolore encore contaminée par de l'hydroperoxyde. Cette huile est diluée dans 220 ml d'éther, refroidie dans un bain de glace puis agitée 30 autres minutes avec 90 ml d'une solution aqueuse de

NaOH 1M. La phase étherée est lavée au moyen de NaCl sat., séchée puis concentrée pour donner 6.64 g d'une huile claire. Après chromatographie sur silice (EtOAc/hexane 7 : 3), on obtient l'époxide (2S, 3S) pur (rendement 48%). ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) : 5.07 (1H, tsept, J = 7.1, 1.4 Hz, H-C₆), 3.79 (1H, dd, H-C₁), 3.68 (1H, dd, H-C₁), 2.96 (1H, dd, H-C₂), 2.07 (2H, td, J = 7.4, 7.9 Hz, H-C₅), 1.67 (4H, m, CH₃ et H-C₄), 1.60 (3H, s, CH₃), 1.45 (1H, m, H-C₄), 1.29 ppm (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) : 132.8 (C₇), 124.0 (C₆), 63.6 (C₂), 62.1 (C₁), 61.9 (C₃), 39.2 (C₄), 26.3 (C₉), 24.3 (C₅), 18.3 (C₈), 17.4 ppm (C₁₀); α_D, 25° (MeOH, c = 0.76) = -6.06° (litt.^[92] -6.36°, c = 1.5, CHCl₃).

L'isomère (2R, 3R) est préparé de la même manière (rendement 55%) à partir du D-(-)-diéthyltartrate et manifeste les mêmes propriétés.

(S)-3,7 diméthyl-1,3 diol-oct-6-ène (3-hydroxycitronellol) (22)^[97]

Une solution de 4.1 g (26 mmol) de l'époxide (2S, 3S) dans 30 ml de THF sec est ajoutée goutte-à-goutte et sous forte agitation à une solution glacée (0°C) de Red-Al (15.5 ml, 78 mmol) dans le THF (60 ml). Une fois l'addition terminée, on maintient l'agitation durant 16 heures à température ambiante. Après adjonction attentive de 120 ml d'eau à la solution (refroidie à 0°C), on élimine le précipité formé par filtration, extrait 3 fois le filtrat à l'éther puis lave les phases organiques au moyen de NaCl sat. Après traitement habituel et concentration, on chromatographie l'huile résultante sur gel de silice (EtOAc/hexane 2 : 3) pour obtenir 2.98 g de (S)-3,7 diméthyl-1,3 diol-oct-6-ène (67%). ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) : 5.07 (1H, tsept, J = 7.0, 1.02 Hz, H-C₆), 3.83 (2H, m, H-C₁), 3.35 (1H, large, OH), 3.23 (1H, large, OH), 1.99 (2H, m, H-C₅), 1.72 (1H, m, H-C₂), 1.64 (4H, m, CH₃ et H-C₄), 1.58 (3H, s, CH₃), 1.50 (2H, m, H-C₄), 1.20 ppm (3H, d, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) : 132.3 (C₇), 124.9 (C₆), 74.4 (C₃), 60.2 (C₁), 42.9 (C₄), 42.1 (C₂), 27.1 (C₁₀), 26.3 (C₈ ou C₉), 23.3 (C₅), 18.2 ppm (C₈ ou C₉); α_D, 25° (MeOH, c = 0.54) : +1.9°.

L'isomère 3R est préparé de façon analogue (rendement 89%) et manifeste les mêmes propriétés (α_D, 25° [MeOH, c = 0.51] = -2.3°).

(S)-3,7 diméthyl-3 hydroxy-octène-6-oate de méthyle

Une suspension de 50 mg de catalyseur oxyde de platine dans l'eau (5 ml) est réduite sous atmosphère d'hydrogène (30 bar) durant 1 heure. L'hydrogène est remplacé par de l'air et le diol 3S (50 mg, 0.29 mmol) est ajouté à la suspension. La solution est alors agitée 18 heures durant sous atmosphère d'oxygène (30 bar). Le solvant est évaporé sous pression réduite et de l'EtOAc est ajouté au résidu. Le platine est éliminé par filtration et le filtrat traité durant 15 minutes avec un excès d'une solution étherée de diazométhane. Après évaporation du solvant, le produit est purifié par chromatographie sur silice (EtOAc/hexane 1 : 4) pour donner 30 mg d'ester (rendement 51%). Les données spectroscopiques sont à nouveau identiques à celles du produit naturel méthylé et du racémate de synthèse (α_D, 25° [MeOH, c = 0.18] = +3.8°).

L'isomère 3R est préparé de façon identique (rendement 50%) et manifeste les mêmes propriétés ($\alpha_D, 25^\circ$ [MeOH, c = 0.074] = -1.48°).

Acide (S)-3,7 diméthyl-3 hydroxy-octène-6-oïque

La procédure est identique à celle de l'ester méthylique. Une fois l'oxydation terminée, le platine est à nouveau retiré par filtration, la solution alcalinisée au moyen de NaOH 1M et les impuretés (principalement 3-hydroxycitronellol initial) extraites au moyen d'EtOAc. La solution aqueuse est réacidifiée à pH 4 au moyen d'acide acétique, et l'acide extrait à son tour avec de l'EtOAc. Les phases organiques sont rincées à l'eau, séchées sur $MgSO_4$ puis concentrées pour donner l'acide pur (rendement 68%, $\alpha_D, 25^\circ$ [MeOH, c = 0.041] = $+1.03^\circ$).

L'isomère R est préparé de la même façon ($\alpha_D, 25^\circ$ [MeOH, c = 0.329] = -1.87° , produit naturel -2.02°).

8.3 Cultures fongiques

8.3.1 Obtention des extraits bruts

Deux types de cultures ont été régulièrement menées sur *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*. Le premier sur support solide (agar) destiné à assurer la reproduction de l'espèce, et le second en milieu liquide destiné, quant à lui, à l'isolation des métabolites fongiques. Les milieux solides sont obtenus en mêlant 8 g de malt extract (Oxoid, code L39, Baringstoke Hampshire, UK) à 8 g de Difco-agar et 400 ml d'eau distillée. La solution, stérilisée à l'autoclave, est coulée dans des boîtes à Pétri où l'on procède, après refroidissement, à l'inoculation.

Quant aux cultures liquides, nous utilisons le milieu ZMA décrit par Wittl^[22], milieu pour lequel l'activité biologique observée était systématiquement la plus forte. Sa constitution pour 5 litres d'eau distillée est la suivante : glucose 100 g, L-asparagine monohydrate 5 g, KH_2PO_4 7.5 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 2.5 g, solution d'oligo-éléments 1 ml. La solution d'oligo-éléments est obtenue par dissolution de 0.4 g de $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$, 0.45 g de $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.025 g de $MnSO_4 \cdot 5 H_2O$ et 0.025 g de $CuSO_4 \cdot H_2O$ dans 1 litre d'eau distillée additionnée d'une goutte d'acide sulfurique concentré. Les solutions ainsi préparées sont réparties par fractions de 250 ml dans des Erlenmeyers à chicane, stérilisées à l'autoclave puis additionnées à froid d'une solution aqueuse concentrée d'aneurine stérile (0.75 mg de vitamine B1 par flacon de 250 ml). On procède finalement à l'inoculation au moyen de 2 ml d'une culture fongique âgée de 6 jours. Les Erlenmeyers sont dès lors soumis à une rotation constante (120 rpm) à la lumière du jour, leur apparence virant progressivement du blanc trouble (4-6 jours) au gris (8-15 jours) puis au noir sombre (plus de 20 jours). Après 24 jours, le mycélium est séparé des phases aqueuses par filtration sur célite, ces dernières sont centrifugées à 10'000 rpm (30 minutes, 4°C), le liquide surnageant séparé du culot puis stérilisé par filtration au-travers d'une membrane de porosité 1 μm . L'ensemble des phases

sont chargées de NaCl (100 g/l) puis extraites deux fois consécutives à l'acétate d'éthyle, à deux pH différents (pH 5 et 8, le pH final des milieux de culture se montant à 5). Quant au mycélium récupéré par filtration, il est simplement extrait au méthanol puis détruit à l'autoclave.

A l'opposé de *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea* pour lequel de grandes variations des masses d'extraits avaient été observées^[73], une très grande reproductibilité a été constatée sur notre variété. C'est ainsi qu'à la faveur de 3 cultures de 15 litres menées durant 3 périodes différentes (janvier 1993, octobre 1993, janvier 1994), on a obtenu respectivement 525, 524 et 536 milligrammes d'extrait brut à pH 5. Ces valeurs sont probablement aussi le résultat d'une plus grande constance dans les procédures d'extraction utilisées.

8.3.2 Obtention de la mélanine

La solution aqueuse noire résultant de la filtration du milieu de culture de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani* sur Millipore 1 μ m est réduite au quart de son volume par évaporation, puis appliquée en tête d'une colonne d'Amberlite XAD-2 (Fluka, Buchs, Switzerland). Ce traitement permet la capture des composés organiques sur la résine, et donc leur élimination de la phase aqueuse. Les composés organosolubles sont désorbés au méthanol et traités comme les extraits organiques; les phases aqueuses quant à elles sont saturées de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ puis alcalinisées au moyen de NaOH 3M jusqu'à pH 12; l'hydroxyde de magnésium qui précipite entraîne avec lui toutes les entités noires de haut poids moléculaire (complexe d'inclusion). On obtient un abondant gel noir après filtration sur Büchner et lavage à l'eau. Le gel est resuspendu dans un minimum d'eau, puis dissout au moyen de quelques gouttes d'acide acétique concentré. Après concentration, on obtient une huile noire souillée par les sels de magnésium. Cette dernière est appliquée en tête d'une colonne de SEPHADEX G75 (longueur 22 cm, diamètre 2.5 cm, éluant H_2O) et le polymère noir recueilli dans les toutes premières fractions. Conformément au principe de la filtration sur gel, les acétates et petits termes ioniques n'éluent que beaucoup plus tardivement. Les premières fractions sont concentrées jusqu'à faible volume, et la mélanine récupérée après séchage sous haut vide sous la forme d'un solide noir amorphe.

8.4 Tests de toxicité

Trois types de tests différents furent menés sur les extraits bruts et métabolites isolés. Le premier d'entre eux est un test simple qui met en évidence les effets nécrotiques engendrés par les toxines sur le platane. Il est exclusivement qualitatif et n'a d'autres prétentions que de localiser les composés actifs et établir un ordre de phytotoxicité parmi eux. Une feuille de microbouture de platane âgée de 3 à 4 semaines et de longueur 1 à 2 cm est plongée dans une solution 2% éthanolique des divers extraits, fractions chromatographiques et composés purs

obtenus. Tout au long du test, les solutions sont maintenues en alternance de lumière et d'obscurité (12 heures d'illumination par jour). Les symptômes visuels aux différentes concentrations sont relevés comparativement à des blancs maintenus dans de l'éthanol à 2%. La nature même du test ne permet pas de quantifier cette évolution, les nécroses s'étendant le plus souvent le long du système vasculaire, rendant les surfaces lésées très difficiles à mesurer.

Dans un second temps, la synthèse ou la disponibilité des matériaux les plus phytotoxiques nous ont permis d'affiner ces tests et de quantifier l'activité de ces composés. Dans cette optique, deux autres types de tests furent menés. Le premier consiste à peser à intervalles réguliers de temps la masse de microboutures immergées dans des solutions de concentration définie. Ce test s'appuie sur le fait que des nécroses brunes sont le reflet d'un endommagement des membranes cellulaires, et par suite, d'une oxydation de leur contenu. Ces dommages irréversibles s'accompagnent d'une déshydratation du corps cellulaire et, partant, d'une perte de masse. On observe dès lors une courbe évolutive masse = f(temps) *croissante* pour les blancs éthanol 2% (croissance "normale" liée à une hydratation régulière des tissus) et *décroissante* pour les solutions biologiquement actives. Néanmoins, comme on le constate très rapidement, ce test n'accroît en rien la sensibilité du précédent, raison pour laquelle un troisième s'avérait nécessaire. Ce dernier repose quant à lui sur la mesure des surfaces nécrosées. Des fragments carrés de 1 cm² de feuilles de platane adulte sont plongés dans des solutions de concentration définie en 2,4,8 trihydroxynaphtalénone, acide para-aminobenzoïque et 2-hydroxyjuglone. Dans ces conditions, des bandes nécrosées brunes ou noires apparaissent sur tout le pourtour du fragment et convergent symétriquement vers son centre. On obtient une appréciation très précise des surfaces nécrosées en mesurant la largeur des bandes en fonction du temps. Si x correspond à cette largeur, alors la surface S est donnée par (schéma 21) :

$$\begin{aligned} S &= 2 * [1 * x] + 2 * [x * (1-2x)] \\ &= 2x + 2x - 4x^2 \\ &= 4x - 4x^2 \text{ [cm}^2\text{]} \end{aligned}$$

ou :

$$S = 40x - 4x^2 \text{ [mm}^2\text{]}$$

Dans ce dernier cas, on obtient directement le résultat en % de la surface totale. Nos schémas au chapitre 4 sont systématiquement présentés dans cette unité. Comme on a pu le constater, ce test améliore sensiblement les limites de toxicité observées jusqu'alors avec les deux autres tests. On le rationalise aisément par le fait qu'une vaste surface blessée du tissu cellulaire (coupe des fragments) est directement mise en contact avec l'agent pathogène. Ce test met également en lumière le retard des symptômes se manifestant avec les solutions de 2,4,8 trihy-

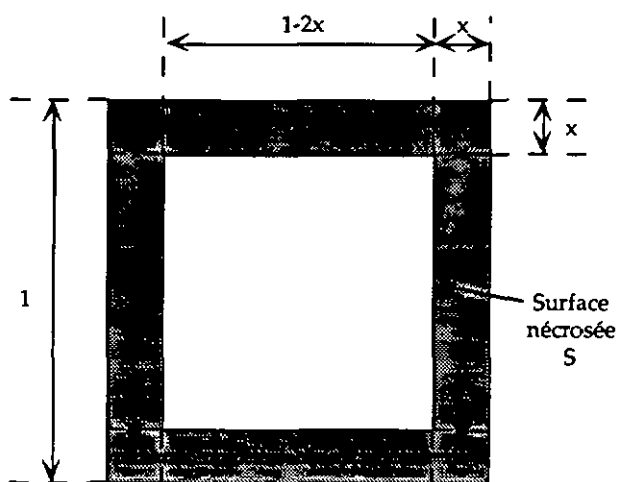


Schéma 21

Représentation schématique d'un "carré de feuille" pour le calcul de la surface S

-droxynaphtalénone comparé à la rapidité observée avec les solutions de 2-hydroxyjuglone. Il nécessite cependant des quantités non négligeables de composés fongiques, ce qui a impliqué la synthèse de certains d'entre eux. Il ne s'adapte enfin qu'à des substances fortement actives dont les effets sur la plante sont bien visibles.

9. Bibliographie

- [1] S. Ake, L. Grillet, C. Lambert, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 16, *Trees III*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1991)
- [2] C. El Modafar, A. Clerivet, A. Fleuriet, J. J. Macheix, *Phytochemistry* **34** (5), 1271-1276 (1993)
- [3] C. Gessler, G. Mauri, *Botanica Helvetica* **97**(2), 349-356 (1987)
- [4] A. Panconesi, M. Filindassi, Giornata di qualificazione dell'assistenza tecnica, "La difesa del platano", Marina di Massa (1987)
- [5] W. J. Moller, J. E. DeVay, *Phytopathology* **58**, 1499-1508 (1968)
- [6] H. Zalasky, *Can. J. Botany* **43** (10), 1157-1162 (1965)
- [7] W. A. Sinclair, H. H. Lyon, W. J. Johnson, "Diseases of trees and shrubs" p. 360, Cornell University Press, 1987
- [8] J. Hunt, *Lloydia* **19** (1), 1-58 (1956)
- [9] B. D. Halsted, *New Jersey Agr. Expt. Sta. Bull.* **76**, p 32 (1890)
- [10] J. Chevaugnon, Supplément colonial n° 2 à la revue de Mycologie, tome XXII, 45-60 (1957)
- [11] M. Kojima, "Ceratocystis and Ophiostoma, Taxonomy, Ecology and Pathogenicity", ch. 26, M. J. Wingfield ed., APS Press (1993)
- [12] R. K. Webster, E. E. Butler, *Can. J. Botany* **45** (9), 1457-1467 (1967)
- [13] W. A. Ayer, L. M. Browne, M-C. Feng, H. Orszanska, H. Saeedi-Ghomi, *Can. J. Chem.* **64**, 904-909 (1986)
- [14] W. A. Ayer, B. Kratochvil, E. Allen, L. M. Browne, C. Dufresne, D. Figueroa, A. Szenthe, *Can. J. Chem.* **64**, 910 (1986)
- [15] W. A. Ayer, L. M. Browne, S. K. Attah-Poku, H. Orszanska, *Can. J. Chem.* **65**, 765-769 (1987)
- [16] R. W. Hemingway, G. W. McGraw, S. J. Barras, *J. Agric. Food Chem.* **25**(4), 717-722 (1977)
- [17] N. Claydon, J. Frederick Grove, M. Hosken, *Phytochemistry* **13**, 2567-2571 (1974)
- [18] R. F. Curtis, *Experientia* **24**, 1187 (1968)
- [19] A. Stoessl, *Biochem. and Biophys. Res.* **35**, 186 (1969)
- [20] G. Gremaud, R. Tabacchi, *Natural Product Letters* **5**, 95-103 (1994)
- [21] G. W. McGraw, R. W. Hemingway, *Phytochemistry* **16**, 1315-1316 (1977)

- [22] S. Witt, Praktikumsarbeit, "Untersuchungen über das Wachstum von *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani* und Toxinproduktion in einem Bioreaktor", Chemap AG, Volketswil (1990)
- [23] T. Plattner, Diplomarbeit, ETH Zürich (1990)
- [24] S. Ake, H. Darbon, L. Grillet, C. Lambert, *Phytochemistry* 31 (4), 1199-1202 (1992)
- [25] S. Takai, *Nature* 252, 124-126 (1974)
- [26] M. B. Sticklen, J. L. Sherald, Dutch Elm Disease Research, cellular and molecular approaches, Springer-Verlag, New-York (1993)
- [27] M. Matasci-Stanga, thèse de doctorat SPfZ n° 10350, Zürich (1993)
- [28] Y. Fujimoto, E. Yokoyama, T. Takahashi, J. Uzawa, N. Morooka, H. Tsunoda, T. Tatsuno, *Chem. Pharm. Bull.* 34 (11), 1497 (1986)
- [29] A. A. Stierle, R. Upadhyay, J. Hershenhorn, G. A. Strobel, G. Molina *Experientia* 47, 853-859 (1991)
- [30] L. N. Ten, N. N. Stepanichenko, V. M. Shevtsova, S. Z. Mukhamedzhanov, A. G. Kas'yanenko, O. S. Otroshchenko, *Khim. Prir. Soedin.* 3, 393-397 (1980)
- [31] K. Dimroth, Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch- chemischen Analyse, Hoppe-Seyler/Thierfelder, 10. Auflage, 3. Band, 638-641 (1955)
- [32] J. B. Münzden, L. R. Cerecedo, C. P. Sherwin, *J. Biol. Chem.* 67, 469-476 (1925)
- [33] M. H. Wheeler, R. D. Stipanovic, *Experimental Mycology* 3, 340-350 (1979)
- [34] S. Iwasaki, H. Muro, K. Sasaki, S. Nozoe, S. Okuda, *Tetrahedron Letters* 37, 3537 (1973)
- [35] E. Bardshiri, T. J. Simpson, *Tetrahedron* 39 (21), 3539-3542 (1983)
- [36] A. A. Bell, R. D. Stipanovic, J. E. Puhalla, *Tetrahedron* 32, 1353-1356 (1976)
- [37] J. A. Findlay, D. Kwan, *Can. J. Chem.* 51, 1617 (1973)
- [38] H. Kumagai, T. Matsuda, M. Ohsono, S. Hattori, H. Naganawa, T. Sawa, M. Hamada, M. Ishisuka, T. Takeuchi, *J. Antibiotics* XLIII, 1505 (1990)
- [39] A. Ichihara, M. Hashimoto, T. Hirai, I. Takeda, Y. Sasamura, S. Sakamura, R. Sato, A. Tajimi, *Chemistry letters*, 1495-1498 (1989)
- [40] S. Vermeille, travail de diplôme, Neuchâtel (mars 1996)
- [41] K. Madhava Madyastha, V. Renganathan, *Indian J. Biochem. Biophys.* 20, 136-140 (1983)
- [42] J. Metz, W. Ebert, H. Weicker *Chromatographia* 4, 345-350 (1971)
- [43] H. Diekmann, *Archiv für Mikrobiologie* 62, 322-327 (1968)
- [44] K. Mosbach, *Z. Naturforsch.* 14b, 69 (1959)

- [45] C. A. Wachtmeister, *Acta Chem. Scand.* **12**, 147-164 (1958)
- [46] A. Panconesi, communication personnelle, Centro di studio per la Patologia delle specie legnose montane, Firenze (Italia)
- [47] J. B. Hendrickson, D. J. Cram, G. S. Hammond, *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, 3rd Edition, 820-1 (1970)
- [48] H. Beyer, *Lehrbuch der organischen Chemie*, 17. Auflage, S. Hirzel Verlag, 446-7, Stuttgart (1973)
- [49] M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Asymmetric synthesis* **5**, chapter 8 (1985)
- [50] B. H. Mckee, T. H. Kalantar, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **56**, 6966 (1991)
- [51] H. Weidmann, H. K. Zimmerman, *Ann.* **639**, 198 (1961)
- [52] M. Rottenberg, M. Thurkauf, *Helv. Chim. Acta* **42**, 226-231 (1959)
- [53] Y. Fujimoto, M. Satoh, *Chem. Pharm. Bull.* **34** (11), 4540-4544 (1986)
- [54] C. King, G. K. Ostrum, *J. Org. Chem.* **29**, 3459 (1964)
- [55] E. M. Kosower, G. -S. Wu, *J. Org. Chem.* **28**, 633 (1963)
- [56] R. H. Thomson, *J. Org. Chem.* **16**, 1082 (1951)
- [57] J. W. Macleod, R. H. Thomson, *J. Org. Chem.* **25**, 36 (1960)
- [58] S. Ho Park, A. Stierle et G. A. Strobel, *Phytochemistry* **35** (1), 101-106 (1994)
- [59] F. Sugawara, G. Strobel, L. E. Fisher, G. D. Vanduyne, J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8291-8294 (1985)
- [60] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Mass Spectrom. Rev.* **9**, 37 (1990)
- [61] D. Michelson, *Electrostatic Atomization*, Adam Hilger, Bristol (1990)
- [62] M. Mann, *Org. Mass Spectrom.* **25**, 575 (1990)
- [63] A. P. Bruins, T. R. Covey, J. D. Henion, *Anal. Chem.* **59**, 2642 (1987)
- [64] J. R. Chapman, *Practical Organic Mass spectrometry*, 2nd Ed., Wiley, 224-226 (1993)
- [65] S. Mutto, M. Ferrata, V. D'Ambra, *Phytopath. Z.* **91**, 39-51 (1978)
- [66] K. B. G. Torssel, *Natural Product Chemistry*, p. 61-67, Wiley (1983)
- [67] M. H. Wheeler, *Trans. Br. Mycol. Soc.* **81**(1), 29 (1983)
- [68] A. A. Bell, R. D. Stipanovic, J. E. Puhalla, *Can. J. Microbiol.* **22**, 787-799 (1976)
- [69] L. W. Durrell, *Mycopathol. Mycol. Appl.* **23**, 339-345 (1964)
- [70] A. S. Sussman, Longevity and surviability of fungi. *In The fungi*, vol. III, G.C. Ainsworth and A. S. Sussman Ed., pp. 447-486, New-York (1968)
- [71] N. N. Zhdanova, V. D. Pokhodenko, *Mikrobiologiya* **42**, 848-853 (1973)

- [72] G. A. Greenblatt, M. H. Wheeler, *J. Liq. Chromatog.* 9, 971 (1986)
- [73] G. Gremaud, travail de thèse, Neuchâtel (1994)
- [74] Y. F. Hallock, J. Clardy, D. S. Kenfield, G. Strobel, *Phytochemistry* 27, 4218 (1988)
- [75] K. Kameda, H. Aoki, H. Tanaka, M. Namiki, *Agr. Biol. Chem.* 37, 2137 (1973)
- [76] K. Borgschulte, S. Rebuffat, B. Bodo, J. Pinon, D. Schomburg, W. Trowitsch-Kienast, *Tetrahedron* 47, 8351-8360 (1991)
- [77] S. Iwasaki, H. Muro, S. Nozoe, *Tetrahedron Letters* 36, 13 (1972)
- [78] L. S. Tsuruda, M. W. Lamé, A. D. Jones, *Arch. Toxicol.* 69, 362-367 (1995)
- [79] J. S. Dahiya, S. Roger Rimmer, *Phytochemistry* 27 (11), 3481-3482 (1988)
- [80] C. P. Woloshuk, H. D. Sisler, M. C. Tokousbalides, S. R. Dutky, *Pestic. Biochem. Physiol.* 14, 256-264 (1980)
- [81] R. D. Stipanovic, A. A. Bell, *Mycologia* 69, 164 (1977)
- [82] C. H. Oberth, A. D. Jones, Proceedings 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry, Chicago, May 29-june 3, 66 (1994)
- [83] C. J. Soderquist, *J. Chem. Educ.* 50,(11), 782-783 (1973)
- [84] C. Oberth, A. D. Jones, M. Cho, A. Buckpitt, T. Shibamoto, Proceedings 39th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 745-746 (1991)
- [85] V. Murty, T. Penning, *Chemicobiol. Interact.* 84, 169-188 (1992)
- [86] Finley, in Patai, "The Chemistry of the Quinonoid compounds", pt. 2, 877-1144, Wiley, New-York (1974)
- [87] C. H. Oberth, A. D. Jones, T. Shibamoto, Proceedings 40th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Washington D. C., May 31-june 5, 1715 (1992)
- [88] T. Gaffney, L. Friedrich, B. Vernooij, D. Negrotto, G. Nye, S. Uknes, E. Ward, H. Kessmann, J. Ryals, *Science* 261, 754-756 (août 1993)
- [89] T. P. Delaney, S. Uknes, B. Vernooij, L. Friedrich, K. Weymann, D. Negrotto, T. Gaffney, M. Gut-Rella, H. Kessmann, E. Ward, J. Ryals, *Science* 266, 1247-1250 (novembre 1994)
- [90] P. de Angelis, travail de thèse, Neuchâtel (1990)
- [91] S. Takai, Y. Hiratsuka, *Can. J. Botany* 62, 1365-1371 (1984)
- [92] P. M. Pijut, R. D. Lineberger, S. C. Domir, J. M. Ichida, C. R. Krause, *Phytopathology* 80, 764-767 (1990)
- [93] E. Vedejs, D.A. Engler, J.E. Telschow, *J. Org. Chem.* 43 (2) 188-196 (1978)
- [94] M. Abdel Akher, J. K. Hamilton, F. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (3), 4691-4692 (1951)

Bibliographie

- [95] H. M. Fales, T. M. Jaouni, *Anal. Chem.* 45 (13), 2302-2303 (1973)
- [96] A. Pfenninger, *Synthesis*, p. 89 (1986)
- [97] S. M. Viti, *Tetrahedron Lett.* 23, 4541-4544 (1982)
- [98] A. Panconesi, communication personnelle, Centro di studio per la Patologia delle specie legnose montane, Firenze (Italia)