

Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE METABOLITES
SECONDAIRES ET PHYTOTOXIQUES
D'EUTYPA ARMENIACAE

Thèse présentée à la Faculté des Sciences
par
JEAN-MARC RENAUD

Ingénieur chimiste diplômé
pour L'obtention du titre de
Docteur ès Sciences

Institut de chimie
de l'Université
Neuchâtel
Juin 1985

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

*Isolement et identification de métabolites
secondaires et phytotoxiques de Eutypa
armeniaca*

de Monsieur *Jean-Marc Renaud*

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. Pezet (Changins),

U. Seguin (Bâle) et A. Jacot-Guillarmod

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le *26 mai 1986*

Le doyen:

François Sigrist
François Sigrist

A mes parents

A Christiane

Que soient remerciés ici, tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à l'achèvement de ce travail.

En particulier, je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur Tabacchi pour la confiance qu'il m'a accordée en me confiant un poste d'assistant, ainsi que pour ses encouragements souvent bienvenus.

Je suis très reconnaissant à l'égard de Monsieur R. Pezet, pour le grand travail supplémentaire consenti pour la préparation des milieux de culture et l'exécution des tests biologiques.

Je veux témoigner également toute ma reconnaissance à Messieurs les Professeurs A. Jacot-Guiliarmod et U. Séquin pour leur participation au jury d'évaluation de ce travail.

Mes remerciements vont également à tous mes camarades assistants du groupe "Chimie organique analytique" dont les remarques ont toujours constitué des éléments constructifs.

Il ne faut pas oublier non plus l'appui dévoué des apprentis qui ont contribué de façon non négligeable à ce travail.

Neuchâtel, juin 1985

S O M M A I R E

	page
1. <u>INTRODUCTION:</u>	
1. <u>EUTYPA ARMENIACAE, SA RELATION AVEC LE DEPERIS-</u> <u>SEMENT DE LA VIGNE</u>	2
1.1 Aperçu historique	2
1.2 Répartition géographique	3
1.3 Symptômes sur la vigne	3
1.4 Description du champignon	5
1.5 Production d'une toxine	6
2. <u>GENERALITES</u>	7
2.1 Les toxines	7
2.2 Métabolismes primaire et secondaire	11
2.3 Le métabolisme du champignon	12
3. <u>BUT DU TRAVAIL</u>	14
4. <u>RESULTATS</u>	15

	page
II. <u>RECHERCHE ENTREPRISE:</u>	16
1. <u>TEST DE TOXICITE</u>	17
1.1 Déroulement du test	17
1.2 Evaluation de la toxicité	20
2. <u>MATERIEL DE DEPART</u>	20
2.1 Culture du champignon	20
2.2 Traitement préliminaire du milieu de culture	21
3. <u>SEPARATION DU MILIEU DE CULTURE</u>	21
3.1 Tests préliminaires	21
3.1.1 Extraction liquide-solide	22
3.1.2 Extraction liquide-liquide	22
3.1.3 Chromatographie sur gel de silice	23
3.1.4 Adsorption de la toxine sur charbon actif	24
3.1.5 Discussion des résultats	25
3.2 Protocole de séparation du milieu de culture d' <u>Eutypa armeniacae</u>	26
3.3 Résultats	27
3.4 Fractionnement de A.1 et A.2	29
3.5 Purification de l'extrait éthéré	31

	page
<u>III. IDENTIFICATION DES COMPOSES ISDLES</u>	40
1. <u>IDENTIFICATION DE (1)</u>	41
2. <u>IDENTIFICATION DE (2)</u>	48
3. <u>IDENTIFICATION DE (3)</u>	51
4. <u>IDENTIFICATION DE (4)</u>	56
4.1 Etude de (4) par RMN- ¹ H	58
4.2 Etude du spectre infrarouge	60
4.3 Acétylation de (4)	60
4.4 Etude du spectre de masse	62
4.5 Etablissement de la structure de (4)	63
5. <u>IDENTIFICATION DE (5)</u>	66
6. <u>IDENTIFICATION DE (6)</u>	74
7. <u>IDENTIFICATION DE (7)</u>	78
8. <u>IDENTIFICATION DE (8)</u>	84
9. <u>IDENTIFICATION DE (9)</u>	87
9.1 Formule brute	89
9.2 Analyse du spectre ¹ H-RMN	89

	page
9.3 Acétylation de (9)	90
9.4 Etude de (9) par double résonance	92
9.5 Analyse du spectre infrarouge	96
9.6 Clivage de la double liaison	96
9.7 Analyse du spectre ^{13}C -RMN	97
9.8 Etablissement de la structure de (9)	98
9.9 Détermination de la structure de (9) par diffraction des rayons X	99
10. <u>IDENTIFICATION DE (10)</u>	102
11. <u>ANALYSE DE LA FRACTION E.1</u>	106
11.1 Analyse de E.1 par CG-5M	106
11.2 Identification de(11)	108
11.3 Identification de(12)	110
11.4 Identification de(13)	113
11.5 Identification de(14)	114
11.6 Identification de(15)	116
11.7 Remarque	118

	page
IV. <u>ETUDE BIOLOGIQUE:</u>	119
1. <u>ETUDE DE LA PHYTOTOXICITE DES PRODUITS ISOLES</u>	120
2. <u>DISCUSSION DES RESULTATS</u>	122
3. <u>ORIGINE BIOGENETIQUE DES PRODUITS ISOLES</u>	126
3.1 Isocoumarines (1), (2), (3)	126
3.2 Stéroïdes (10) à (15)	127
3.3 Chromone (4)	130
3.4 Composés aromatiques (5) à (8)	130
V. <u>CONCLUSION GENERALE:</u>	132
VI. <u>PARTIE EXPERIMENTALE:</u>	136
1. <u>TESTS PRELIMINAIRES</u>	137
1.1 Extraction liquide-solide	137
1.2 Extraction liquide-liquide à contre-courant	137
1.3 Chromatographie liquide sur gel de silice	137
1.4 Adsorption de la toxine sur charbon actif	138

	page
2. <u>FRACTIONNEMENT DE A.1 ET A.2</u>	139
2.1 Chromatographie sur échangeurs d'ions	139
2.2 Chromatographie préparative sur plaque	140
2.3 Chromatographie liquide à haute pression	140
2.4 Chromatographie d'exclusion	141
3. <u>TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES</u>	141
3.1 CCM	141
3.2 Chromatographie liquide basse pression	141
3.3 HPLC	142
3.4 Révélateurs CCM	143
4. <u>ACETYLATION</u>	143
5. <u>PREPARATION DE DERIVES TRIMETHYLSILYLES</u>	143
6. <u>CLIVAGE OXYDATIF DES DOUBLES LIAISONS</u>	143
7. <u>ANALYSE INSTRUMENTALE</u>	144
7.1 RMN	144
7.2 IR	144
7.3 SM	145
7.4 CG-SM	145
7.5 $[\alpha]_D$	145
7.6 UV	145
8. <u>DIFFRACTION DES RAYONS X</u>	145
VII. <u>BIBLIOGRAPHIE :</u>	147

I

INTRODUCTION

1. EUTYPA ARMENIACAE, SA RELATION AVEC LE DÉPÉRISSEMENT DE LA VIGNE:

1.1. Aperçu historique: [1]

Depuis environ quinze ans, on observe dans les vignobles de Suisse romande un dépérissement et une mort plus ou moins rapide de ceps en production. Une étude des bois nécrosés a mis en évidence la présence dominante des quatre champignons lignicoles suivants:

- Eutypa armeniacae Hansford & Carter
- Phomopsis viticola Sacc.
- Stereum spp.
- Phellinus Spp.

Eutypa armeniacae est l'espèce la plus fréquemment isolée des ceps malades. Ce champignon n'est pas spécifique à la vigne, mais a été détecté tout d'abord sur l'abricotier où il provoque la maladie de l'apoplexie ("Gummosis" ou "die-back" en anglais). Cette mycose se traduit durant l'été par un dessèchement brusque, apoplectique de rameaux et de branches plus ou moins grands.

En Suisse romande, Eutypa armeniacae a été isolé sur des branches mortes d'abricotiers à Martigny en 1971 par CARTER [2]. Durant les années suivantes, des périthèces du champignon sont découverts dans toutes les parties du vignoble romand et des isolements obtenus à partir du bois de ceps malades ou d'ascospores donnent des cultures d'aspect identique à celles isolées d'abricotiers. Inoculées à des branches d'abricotiers, les cultures du champignon isolées de ceps malades provoquent l'apoplexie typique.

Dans la littérature anglosaxonne, cette maladie est connue sous le nom de "Eutypa dieback", alors que dans la littérature francophone, le terme d'Eutypiose a été retenu.

1.2. Répartition géographique:

L'eutyplose est largement répandue dans le monde. Elle a été identifiée sur la vigne en Australie [3], en Grèce [4], aux USA [5], au Canada [5] et au Mexique [6]. On peut penser qu'elle existe aussi dans les pays viticoles où les périthèces d'Eutypa armeniaca ont été observés et où le champignon a pu être isolé de chancres d'abricotiers soit en Nouvelle-Zélande [7], en France [8], en Espagne [9], en Italie [10], en Bulgarie [11] en Afrique du Sud [12] et en Suisse [1].

1.3. Symptômes sur la vigne: [1]

Au printemps, les jeunes sarments développés à partir d'une corne infectée ont une croissance chétive, rabougrie; les entre noeuds sont très courts. Les feuilles sont nettement plus petites que la normale, chlorotiques, tantôt enroulées, tantôt déformées et déchiquetées. Dans les cas les plus graves, elles portent des nécroses marginales, puis séchent complètement et tombent.

Les grappes ont un aspect quasi-normal jusqu'à la floraison, mais sont ensuite victimes d'une forte coulure ou séchent complètement .

En coupant longitudinalement une corne malade, on constate une ou plusieurs nécroses provenant chacune d'une blessure causée par une plaie de taille ou par un accident mécanique et s'enfonçant profondément dans le bois; on remarque donc que Eutypa armeniaca est un parasite de blessure.

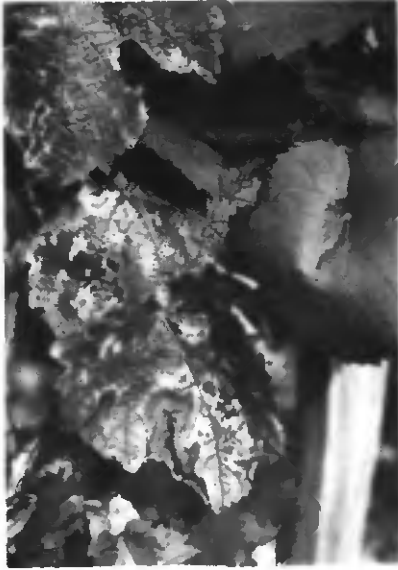


Fig. 1. Eutypiose sur Chasselas. Déformation du limbe des feuilles.



Fig. 2. Dessèchement en cours d'été d'un cep de Gamay atteint d'eutypiose.

1.4. Description du champignon: [1]

Au laboratoire, en boîte de Petri, sur gélose maltée à 20-25 °C, le champignon développe des colonies vigoureuses, blanches, d'apparence échevelée par suite de l'abondante production de filaments mycéliens aériens réunis en petits cordons. Le mycélium devient plus dense en vieillissant et se mélanise partiellement. Il forme des fructifications asexuées après six à huit semaines de culture.

Les pycnides apparaissent généralement à la surface des parties mélanisées du mycélium. Elles émettent un cirrhe jaunâtre contenant une multitude de spores du genre Cytosporina sacc. Le stade Cytosporina se forme naturellement à la surface du bois nécrosé de la vigne lorsque l'humidité est élevée. Il précède ou accompagne le développement des fructifications sexuées. On trouve la forme sexuée du champignon sur des ceps morts depuis deux à cinq ans. A la surface du bois excorié se développe un stroma noirâtre plus ou moins mélangé avec les éléments cellulaires de l'hôte et contenant de nombreuses fructifications globuleuses.



Fig. 3. Culture d'Eutypia armeniaca âgée d'une semaine sur gélose maltée.



Fig. 4. Culture d'Eutypia armeniaca âgée d'un mois sur gélose maltée. Mélanisation du mycélium.



Fig. 5. Fructifications sexuées
d'Eutypa armeniaca sur un cep mort.

1.5. Production d'une toxine:

La relation entre le champignon Eutypa armeniaca, plus précisément son stade imparfait Cytosporina et le dépérissement de la vigne étant établie, une question se pose:

Une ou des toxines fongiques jouent-elles un rôle dans cette maladie ?

PEZET [13] a mis en évidence expérimentalement la production de substances toxiques par Cytosporina s.p.: Un milieu de culture synthétique est inoculé avec une pièce de PDA supportant Cytosporina sous forme mycélienne. Après incubation des cultures pendant trois semaines à température ambiante et sous agitation, le mycélium est écarté et le filtrat stérilisé par filtration sur membrane millipore. L'extrait du milieu de croissance est alors prêt pour un test de toxicité. Deux jeunes plants de vigne de la variété Grenache

sont prévus par test. Les contrôles sont constitués par:

- 1) de l'eau distillée.
- 2) le milieu synthétique non-inoculé.

Les racines sont plongées dans l'extrait à tester. Après cinq jours, l'examen des plantes fournit les renseignements suivants:

- Les plantes plongées dans l'extrait de Cytosporina ont péri.
- Les témoins ne présentent aucun signe de maladie.

Une expérience semblable menée à partir d'une culture de Cytosporina en milieu solide de laquelle on a prélevé un exsudat mycélien noir conduit à des observations identiques.

Ces expériences suggèrent avec évidence qu'Eutypa armeniaca produit une toxine qui peut être responsable des symptômes observés sur la vigne infectée par ce champignon.

2. GENERALITES:

2.1. Les toxines:

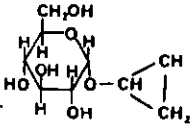
En phytopathologie, une toxine est généralement définie comme une substance non-enzymatique qui endommage les cellules de la plante ou interrompt leur métabolisme. Une vaste terminologie a été établie pour désigner les différentes substances toxiques; les définitions des termes les plus importants figurent en fin de chapitre.

En tant que groupe, les phytotoxines n'ont aucune parenté structurale. Elles appartiennent à des classes aussi différentes que des peptides (ou d'autres dérivés d'acides aminés), des terpénoïdes, des glycosides, des phénols, des pyrones, des polysaccharides ou encore, des combinaisons de ces différentes classes.

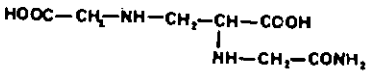
Afin d'illustrer la variété des structures chimiques découvertes parmi les phytotoxines, citons quelques exemples:

Organisme	Nom de la toxine	Damage causé	Réf.
<u>Helminthosporium Sacchari</u>	Helminthosporoside (I)	Nécrose de la canne à sucre	[14]
<u>Fusicoccum amygdali</u>	Fusicoccin (II)	Flétrissement et dessiccation de bourgeons sur les amandiers et les pêchers	[15]
<u>Fusarium oxysporum f. sp lycopersici</u>	Lycomarasmine (III) et acide fusarique (IV)	Flétrissement de la tomate	[16], [7]
<u>Alternaria zinniae</u>	Zinniol (V)	Nécrose et rouille du zinnia et d'autres plantes	[18]
<u>Helminthosporium oryzae</u>	Ophiobolines (VI, VII)	Nécrose de plantes de riz	[19], [20]

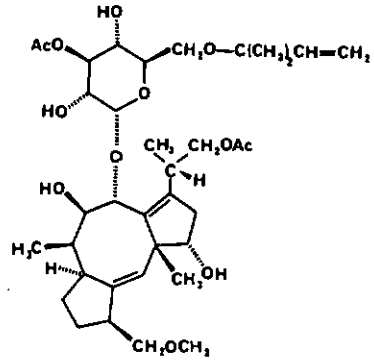
Tableau 1. Exemples de phytotoxines produites par les champignons



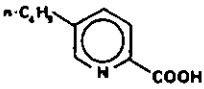
(I)



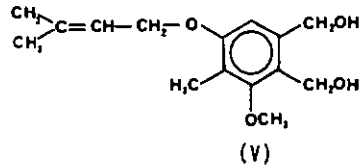
(III)



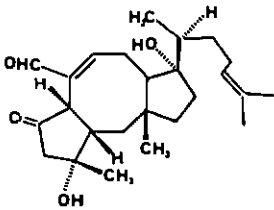
(II)



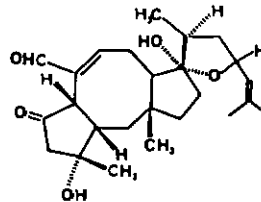
(IV)



(V)



(VI)



(VII)

Fig. 6. Structures de quelques phytotoxines connues

Définitions:[21]

- Toxine : Produit microbien de nature non enzymatique causant un dommage évident aux tissus de la plante et dont on sait avec certitude qu'il joue un rôle dans le développement de la maladie
- Phytotoxine : Substance toxique envers les plantes.
- Mycotoxine : Substance toxique envers les animaux
- Vivotoxine : Substance produite in vivo par le pathogène, qui intervient dans le développement de dommage mais qui n'en est pas l'agent initial.
- Pathotoxine : Toxine agissant comme déterminant majeur du dommage.

2.2. Métabolismes primaire et secondaire:

Dans le règne végétal, il est possible de distinguer deux types de métabolisme: Le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Le métabolisme primaire est constitué par un ensemble de chaînes de réactions chimiques catalysées par des enzymes, qui approvisionnent l'organisme en énergie et produisent ses intermédiaires synthétiques ainsi que ses macromolécules-clé tels ADN et protéines [22].

Le métabolisme secondaire est caractéristique d'un organisme vieillissant et il est observable par exemple dans une culture de laboratoire lorsque la période de croissance exponentielle est terminée et qu'il n'y a plus d'augmentation de la biomasse. A ce stade, certains intermédiaires métaboliques de base, tels les ions acétate, malonate, mévalonate, pyruvate et les acides aminés peuvent être utilisés dans la synthèse de molécules complexes n'ayant aucune fonction physiologique précise au sein de l'organisme qui les produit. Ces métabolites secondaires constituent un groupe de composés très divers, parmi lesquels on trouve principalement des coumarines, des flavonoïdes, des pyrroles, des composés polycétoniques, des macrolides et des terpénoïdes. De nombreux composés sont des pigments, tandis que d'autres possèdent des propriétés antibiotiques ou toxiques [23].

Tandis que le métabolisme primaire est fondamentalement le même pour tous les systèmes vivants, le métabolisme secondaire est limité aux formes les plus simples de vie; il est spécifique aux espèces et dépend des circonstances, de l'histoire et des contraintes de l'organisme. Remarquons que la plupart des métabolites secondaires ont été isolés à partir de milieux artificiels, ce qui a souvent pour conséquence leur accumulation en quantité relativement importante ou du moins aisément détectable. De ce point de vue, l'accumulation de tels composés est la conséquence d'un métabolisme non équilibré, de sorte que ces produits peuvent être qualifiés de métabolites de stress [22].

2.3. Le métabolisme du champignon:[24]

Le glucose est la principale source de carbone et d'énergie pour la plupart des organismes hétérotrophes. Quoique quelques métabolites fongiques soient dérivés directement du glucose, ce dernier est dans la plupart des cas disponible pour les procédés biosynthétiques sous la forme des intermédiaires des différentes étapes de son oxydation

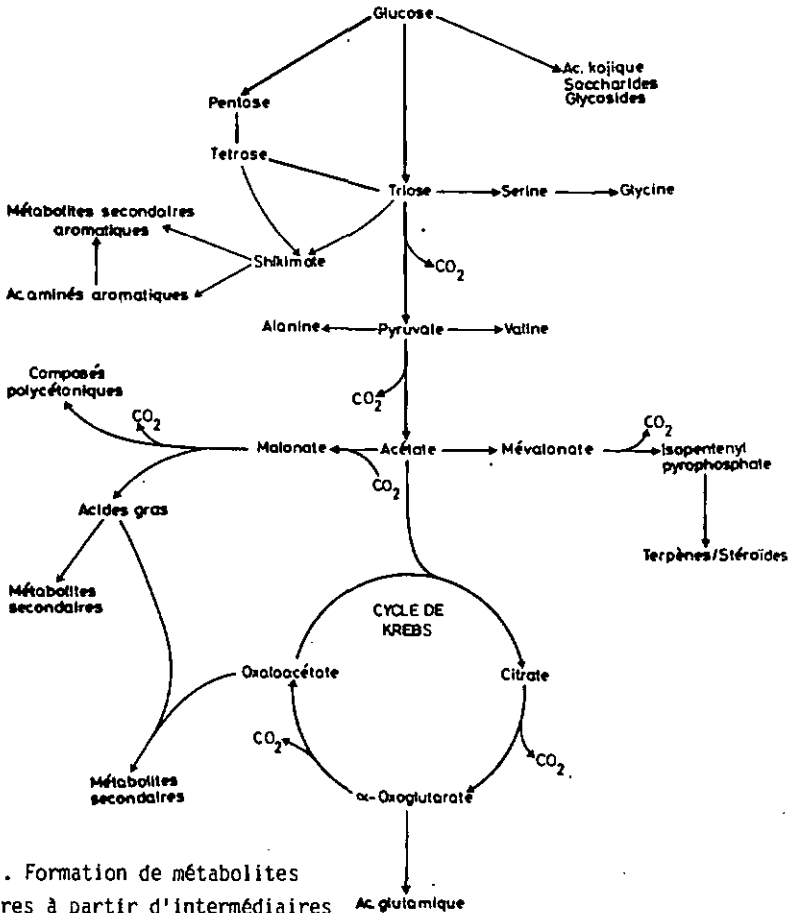


Schéma 1. Formation de métabolites secondaires à partir d'intermédiaires du métabolisme primaire

Chez les champignons, la voie acétate-polymalonate prédomine dans la formation des métabolites secondaires avec la production des composés polycétoniques ou des acides gras qui peuvent à leur tour former des métabolites secondaires.

Toutefois, des métabolites secondaires ou des composés phytotoxiques peuvent encore provenir d'autres sources comme le montre le schéma 1:

- a) Intermédiaires du métabolisme de l'acide shikimique.
- b) Composés dérivés d'acides gras.
- c) Composés dérivés du cycle de Krebs.
- d) Dérivés d'acides aminés.
- e) Dérivés de la chaîne acétate-mévalonate produisant terpènes et stéroïdes.
- f) Métabolites primaires du cycle de Krebs, accumulés en quantités phytotoxiques (acide oxalique, acide citrique, acide fumarique).

A ces composés, on peut encore ajouter un groupe de substances difficilement classifiables, soit en raison de leur structure incertaine, soit en raison de leur biogénèse mal connue.

3. BUT DU TRAVAIL:

La recherche que nous avons menée a pour but l'étude des métabolites secondaires les plus abondants produits par Eutypa armeniaca en culture in vitro. Ainsi, nous avons tenté d'isoler du milieu de culture, un maximum de composés dont nous avons établi la structure chimique par des techniques spectroscopiques. Ensuite, au moyen d'un test biologique, nous avons cherché à mettre en évidence les éventuelles propriétés phytotoxiques des métabolites identifiés dans le but de déterminer si l'eutypiose peut être mise en relation avec un ou des produits biosynthétisés par le champignon.

4. RESULTATS:

Le travail effectué nous a permis d'identifier 15 métabolites secondaires produits par Eutypa armeniacae: Leurs structures chimiques sont reproduites ci-dessous.

Parmi les composés identifiés, sept (produits (3-9)) sont nouveaux.

Les composés (1) à (10) ont été purifiés et isolés. Au contraire, les stéroïdes (11) à (15) sont présents en traces dans le milieu et ont été caractérisés par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse.

Les tests d'activité biologique effectués sur les composés purs (1) à (10) ainsi que sur le mélange des stéroïdes (11) à (15) ont permis de regrouper les métabolites isolés en trois classes:

(I) Produits phytotoxiques

- Composés (5), (7), (10).
- Fraction contenant les stéroïdes (11) à (15).

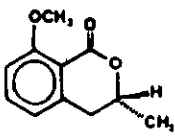
(II) Produits peu phytotoxiques

- Composés (6) et (8).

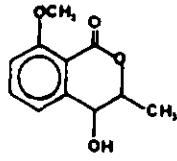
(III) Produits non phytotoxiques

- Composés (1), (2), (3), (4), (9).

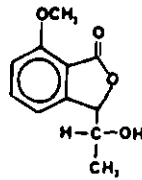
Parallèlement à l'étude systématique des métabolites secondaires, des essais effectués dans le but d'établir un protocole de purification des composants phytotoxiques du milieu de croissance ont montré que l'activité ne résulte vraisemblablement pas de l'action d'une substance unique mais que les toxines sont multiples et que des phénomènes de synergie sont probables.



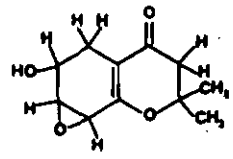
(1)



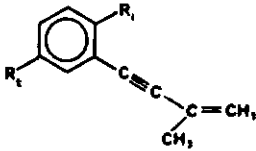
(2)



(3)



(4)



(5) $R_1 = -O-CH_3$

$R_2 = -CH_2-OH$

(6) $R_1 = -OH$

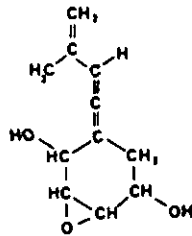
$R_2 = -CH_2-OH$

(7) $R_1 = -OH$

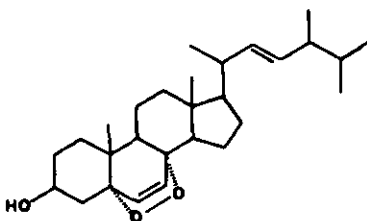
$R_2 = -CHO$

(8) $R_1 = -O-CH_3$

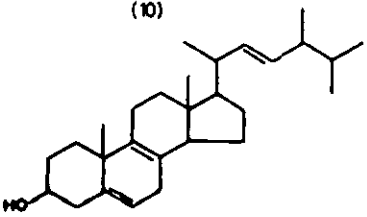
$R_2 = -CHO$



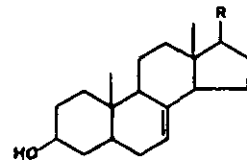
(9)



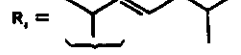
(10)



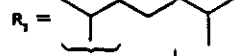
(11)



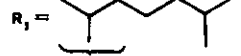
(12)



(13)



(14)



(15)



Fig.7. Structure des produits isolés

II

RECHERCHE ENTREPRISE

1. TEST DE TOXICITE:

Afin d'évaluer la toxicité des fractions isolées, nous avons eu recours à un test biologique: Celui-ci a été mis au point et effectué par Monsieur R. PEZET à la station fédérale de recherches agronomiques de Changins. L'organisme-test, choisi en raison de sa sensibilité très élevée est une plantule de tomate à une feuille développée de l'espèce Bony-Best.

Cette plantule mise en contact avec une solution de toxine à pH neutre flétrit dans un délai d'une à trois heures; une pesée montre en outre qu'en milieu toxique, la plantule peut perdre jusqu'à 20 % de son poids. Au contraire, une plante identique, le témoin, plongée dans de l'eau distillée ne présente après quatre heures aucun flétrissement et son poids marque une augmentation de 4 à 7 %.

1.1. Déroulement du test:

L'échantillon à tester est séché sous courant d'azote, pesé puis dissous dans de l'eau distillée de manière à disposer d'au moins un millilitre d'une solution à 0,1 %.

Remarques:

- Dans les cas où la quantité de substance était inférieure à 1mg, les tests ont été effectués à des concentrations inférieures à 1 mg/ml et pouvant s'abaisser jusqu'à 0,01 mg/ml.
- Les substances organiques peu solubles dans l'eau ont été dissoutes dans une solution d'acétone à 5 %, parfaitement tolérée par le témoin.

La solution obtenue est répartie en quantités égales dans cinq tubes dans chacun desquels est plongée la tige d'une tomate. Ces plantes ont été au préalable sélectionnées en fonction de leur taille (5-8 cm, une feuille) et de leur poids frais (100-250 mg); elles ont ensuite été coupées soigneusement à leur base à l'aide d'une lame de rasoir.

Après cinq heures de culture à 20 °C, 80 % d'humidité relative et sous éclairage artificiel, les tomates sont pesées et leur flétrissement évalué.

1.2. Evaluation de la toxicité:

Deux critères d'appréciation sont retenus:

1^o la perte de poids de la tomate qui, exprimée en % de poids frais, sera appelée "activité".

$$\text{Activité : } A = - \frac{P_2 - P_1}{P_1} \cdot 100$$

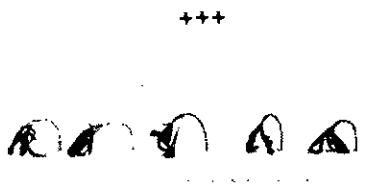
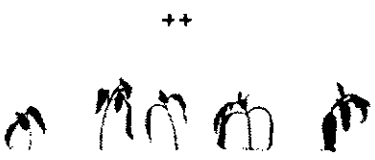
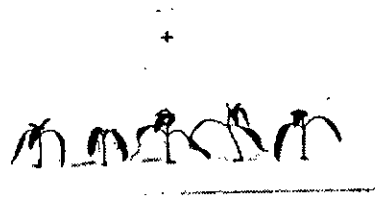
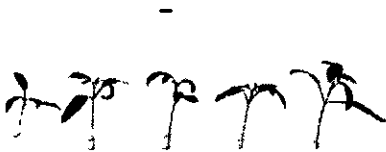
P_1 : Poids de la tomate avant la mise en contact avec la solution à tester.

P_2 : Poids de la tomate après un séjour de 4 h. dans la solution à tester.

2^o Estimation visuelle du flétrissement avec le système de quantification suivant:

Symbole	Flétrissement observé
(-)	Aucun flétrissement
(+)	Léger flétrissement
(++)	Flétrissement marqué des feuilles
(+++)	Flétrissement très marqué de toute la plante

Différents états de flétrissement des tomates:



2. MATERIEL DE DEPART:

Le milieu de culture d'Euptya armeniaca Hansford & Carter constitue le matériel de base de notre travail. Ci-dessous, nous décrivons brièvement le processus par lequel ce milieu a été préparé. Ce travail a été effectué par Monsieur R. PEZET à la station fédérale de recherches agronomiques de Changins.

2.1. Culture du champignon:

Euptya armeniaca est cultivé en milieu liquide: 4 l de ce dernier sont répartis dans des Erlenmeyer de 250 ml à raison de 100 ml de solution par récipient. Chaque milieu est ensuite inoculé au moyen d'un morceau de PDA ($\varnothing = 5$ cm) supportant Cytosporina sous forme mycélienne. L'ensemble des cultures est ensuite incubé pendant six semaines à température ambiante, lumière artificielle et sous agitation.

Composition du milieu synthétique: (selon Fries, modifié par Pezet)

KH_2PO_4	: 1,0 g	Saccharose	: 5,0 g
NaCl	: 0,5 g	Maltose anh.	: 10,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,1 g	FeCl_3 [5 mg/ml]	: 1 ml
KNO_3	: 5,0 g	H_2O	: 1 l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1,0 g	Oligoéléments	: 1 ml
Glucose anh.	: 10,0 g	(selon Fries)	

Oligoéléments selon Fries:

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 78,6 mg	CaCl_2	: 20 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 17,7 mg	H_3BO_3	: 50 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 15,6 mg	H_2O	: 100 ml
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 21,2 mg		

On ajoute ensuite 1000 ml d'eau distillée et le pH est ajusté à une valeur située entre 5,5 et 6,0, avant stérilisation avec NaOH 1 N ou HCl 1 N.

2.2. Traitement préliminaire du milieu de culture:

Après six semaines d'incubation, les différents milieux de culture sont réunis et on écarte le mycélium par centrifugation. le filtrat est ensuite stérilisé par filtration sur une membrane millipore (0,45 μ m). Les 2,5 l de solution brune que nous obtenons alors constituent le matériel de départ de notre travail.

Au cours de nos recherches, nous avons mené à terme 14 cultures selon le protocole décrit ci-dessus. Cela nous a permis d'une part de tester différentes méthodes de purification et d'autre part d'accumuler les produits isolés afin de disposer de quantités suffisantes pour les analyses spectrales.

3. SEPARATION DU MILIEU DE CULTURE D'EUTYPA ARMENIACA

3.1. Tests préliminaires:

Dans une première phase, nous avons testé différentes techniques de séparation en engageant de faibles quantités de substance. Au cours de ces essais, le but recherché était non pas d'obtenir des produits purs, mais plutôt d'observer une augmentation significative de l'activité dans une ou plusieurs fractions.

Dans un premier temps, nous avons testé les méthodes de séparation suivantes:

- Extraction liquide-solide
- Extraction liquide-liquide à contre courant.
- Chromatographie liquide sur gel de silice.
- Adsorption sur charbon actif.

Remarque: Les modes opératoires des différents essais sont décrits dans la partie expérimentale au paragraphe 1.

3.1.1. Extraction liquide-solide:

Des extractions successives d'un lyophilisat du milieu de culture au moyen d'un appareil de Soxhlet nous ont permis d'obtenir les quatre fractions suivantes:

- Extrait à l'hexane (A1)
- Extrait à l'éther (A2)
- Extrait à l'acétate d'éthyle (A3)
- Extrait au méthanol (A4)

En plus des extraits A1-4, nous avons soumis le lyophilisat brut (I) au test.

Fraction	Concentration [mg/ml]	Activité %	flétrissement
A1	0,1	0,2	(-)
A2	0,7	2,0	(+)
A3	0,3	3,1	(+)
A4	1,0	5,9	(+)
I	1,0	4,7	(+)

Tableau 2. Activité des fractions obtenues.

3.1.2. Extraction liquide-liquide:

L'extraction du milieu de culture à l'éther nous a permis d'isoler trois fractions que nous avons testées en présence de l'extrait initial (I).

- B1 : Phase d'extraction à pH 3
- B2 : Phase d'extraction à pH 10
- B3 : Phase aqueuse résiduelle

Fraction	Concentration [mg/ml]	Activité %	Flétrissement
B1	1,0	4,7	(+)
B2	1,0	2,1	(+)
B3	1,1	7,9	(+)
I	1,0	5,5	(+)

Tableau 3. Activité des fractions obtenues.

1.3. Chromatographie sur gel de silice:

Six fractions ont été isolées par chromatographie sur couche épaisse de silicagel à partir d'un lyophilisat du milieu de culture.

Eluant: isoProOH - NH₃ - H₂O (6:2:1)

Toutes les fractions isolées (C1 -C6), ainsi qu'un échantillon de l'extrait de départ (I) ont été soumis au test de toxicité.

Fraction	Rf	Concentration [mg/ml]	Activité %	Flétrissement
C1	0	1,0	7,8	(+)
C2	0,14	1,0	6,5	(+)
C3	0,23	1	4,2	(+)
C4	0,30	0,9	5,4	(+)
C5	0,46	1,0	1,5	(-)
C6	0,80	1,0	-1,1	(-)
I	-	1,0	5,8	(+)

Tableau 4. Activité des fractions séparées sur gel de silice.

3.1.4. Adsorption de la toxine sur charbon actif:

Certains composés du milieu de culture peuvent être adsorbés par le charbon actif. Au moyen de lavages successifs, avec un gradient d'éthanol puis par l'introduction d'ammoniaque et finalement de pyridine, il nous a été possible de désorber séparément différents groupes de substances.

La composition des systèmes de solvants utilisés est la suivante:

- D2 : Ethanol 10 %
- D3 : Ethanol 25 %
- D4 : Ethanol 50 % contenant 1 % d'ammoniaque.
- D5 : Pyridine-eau (1:1)

La fraction D1 figurant dans le tableau ci-dessous a été prélevée dans le milieu de culture après traitement au charbon actif.

Toutes les fractions isolées (D1 - D5), ainsi qu'un échantillon du mélange de départ (I) ont été soumis au test de toxicité.

Fraction	Concentration [mg/ml]	Activité %	Fiérissement
D1	1,0	-2,4	(-)
D2	1,0	-2,9	(-)
D3	1,0	-2,7	(-)
D4	1,0	8,1	(++)
D5	1,0	9,7	(++)
I	1,0	5,0	(+)

Tableau 5. Activité des fractions de lavage du charbon actif.

1.5. Discussion des résultats:

A l'examen des activités des différentes fractions isolées, nous constatons immédiatement que les méthodes de séparation directes, extraction et chromatographie d'adsorption sur gel de silice ne permettent aucun enrichissement significatif de la toxine. Par contre, la ou les substances actives du mélange sont adsorbées sur le charbon actif; il est alors ensuite facile de les récupérer par lavage du charbon à l'aide d'une solution ammoniacale ou pyridinique. Nous retiendrons donc ce principe de séparation comme étape de prépurification du milieu de culture.

L'adsorption sur charbon actif a déjà été utilisée avec succès pour la purification de toxines: Nous avons relevé l'emploi des deux techniques suivantes:

- Chromatographie sur colonne de charbon actif [25],[26]
- Extraction directe telle que nous l'avons pratiquée [27]

3.2. Protocole de séparation du milieu de culture d'Eutypa armeniacae:

Sur la base des résultats des tests préliminaires et après de nombreux essais de poursuite de la purification des extraits à l'ammoniaque et à la pyridine, nous avons établi le protocole de séparation décrit ci-dessous (schéma 2).

Les objectifs du processus choisi sont les suivants:

- 1° Permettre une augmentation notable de l'activité des fractions.
- 2° Conduire à une simplification de ces fractions.
- 3° Permettre l'isolement de métabolites secondaires en quantités suffisantes pour déterminer leur structure et étudier leur activité phytotoxique éventuelle.

Mode opératoire:

2,5 l de milieu de culture stérilisé sont concentrés jusqu'à 500 ml à l'évaporateur rotatif à une température inférieure à 40 °C. Le concentrat est ensuite extrait avec quatre portions de 200 ml d'éther. Les phases étherées sont réunies, séchées sur $MgSO_4$ anh. et conservées à l'obscurité à température ambiante.

On ajoute à la phase aqueuse 25 g de charbon actif, Norit A (Sigma Co), et maintient le tout à 5 °C sous agitation pendant 14 h. La suspension est ensuite centrifugée, le surnageant écarté, tandis que le charbon actif est repris dans 250 ml d'eau, additionné de 25 g de Celite 545 (Fluka) et, après une vigoureuse agitation, introduit dans une colonne à chromatographie (60 x 5 cm). On laisse s'écouler la solution jaune limpide et lave à l'eau jusqu'à décoloration totale de l'éluat.

On procède ensuite à quatre lavages successifs jusqu'à décoloration au moyen des systèmes de solvants suivants:

1. Ethanol 10 %
2. Ethanol 25 %
3. Ethanol 50 % contenant 1 % d'ammoniaque
4. Pyridine - eau (1:1)

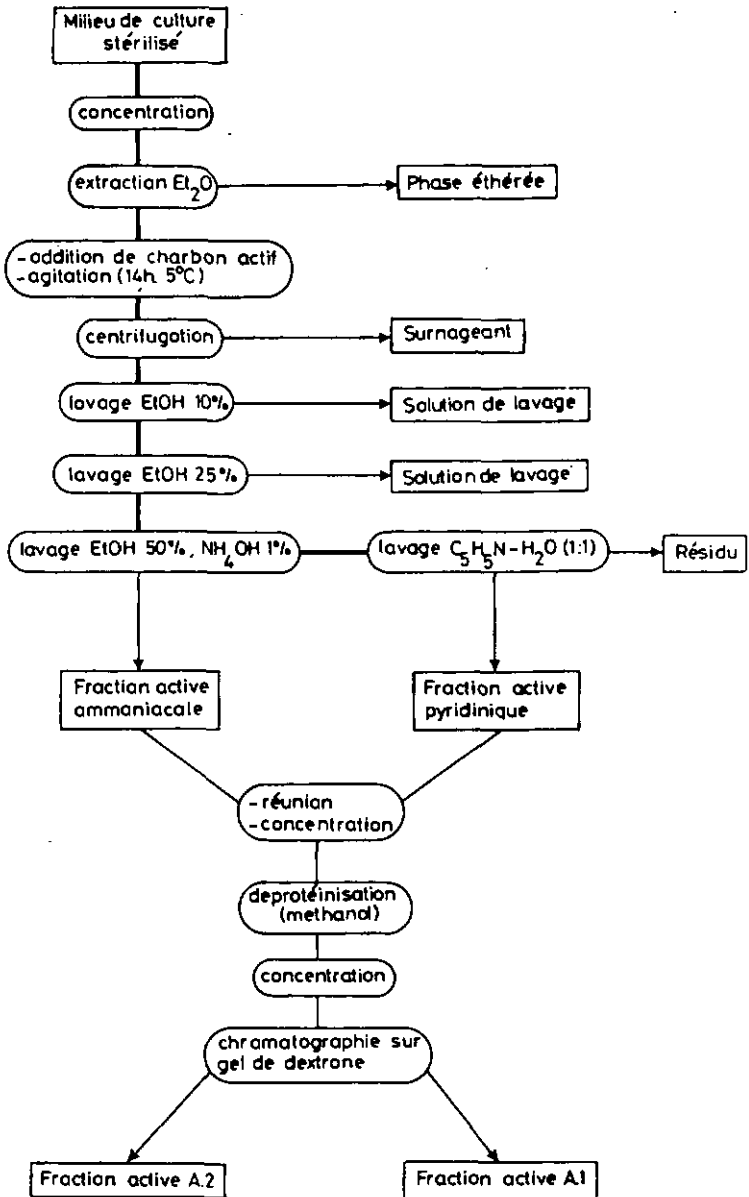


Schéma 2: Séparation du milieu de culture d'*Eutypa armeniacae*

Les différents éluats sont ensuite concentrés à l'évaporateur rotatif sous pression réduite et à une température n'excédant pas 40 °C. Au cours de la concentration de la fraction pyridinique, de l'eau (100 ml) est ajoutée à plusieurs reprises afin de faciliter l'élimination de la pyridine.

On procède au test de toxicité sur chaque fraction; seuls les deux derniers extraits présentent une activité; ils sont alors réunis et soumis à une lyophilisation partielle de manière à réduire leur volume à 50 ml. Après addition de 500 ml de méthanol, on laisse précipiter la matière protéique à 5 °C pendant 15 h. Le précipité obtenu est centrifugé et la solution alcoolique, concentrée à l'évaporateur rotatif est appliquée au sommet d'une colonne de gel de dextrane, Séphadex LH 20 (Pharmacia Chemicals Co). Comme éluant, nous utilisons un mélange méthanol-eau (1:1) avec un débit de 0,1 ml/min. Des fractions sont prélevées pendant des intervalles de 30 mn au moyen d'un collecteur automatique, tandis qu'un chromatogramme est enregistré à titre indicatif au moyen d'un moniteur UV à 254 nm. Des fractions composées du contenu d'une ou au maximum deux éprouvettes selon le chromatogramme sont soumises au test de toxicité.

3.3. Résultats:

Le mode opératoire décrit ci-dessus et appliqué à quatre extraits de milieux de culture (J,K,L,M), nous a permis d'isoler les fractions suivantes:

- Quatre fractions étherées chromatographiquement identiques et présentant une activité faible: J-1, K-1, L-1, M-1 respectivement.
- Quatre extraits pyridiniques et ammoniacaux, fortement actifs que nous avons regroupés en une seule fraction active : A
- Les autres solutions de lavage non actives ont été écartées.

La séparation de A sur gel de dextrane montre en cours d'éluion la nette séparation de quatre bandes colorées. Le test d'activité appliqué à

l'éluat, nous a permis de localiser deux bandes d'activité, A.1 et A.2.

Fraction	Activité %	Flétrissement
J	8,1	(++)
K	8,3	(++)
L	2,0	(+)
M	4,7	(+)
J-1	2,4	(+)
K-1	12,1	(++)
L-1	0,5	(+)
M-1	2,1	(+)
A	14,0	(+++)
A.1	18,0	(+++)
A.2	14,9	(+++)

Tableau 6. Activité des fractions isolées.

3.4. Fractionnement de A.1 et A.2:

La chromatographie sur couche mince de silicagel (isoProOH, NH₄OH 25%, H₂O (6:2:1)) met en évidence des fractions encore très complexes. Nous avons poursuivi la purification des fractions actives en appliquant à A.1 et A.2 les techniques de séparation suivantes:

- Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions.
- Chromatographie préparative sur plaque de silicagel.
- Chromatographie liquide à haute pression en phase Inversée.
- Chromatographie d'exclusion sur gel de dextrane (Sephadex G 15).
- Chromatographie sur papier et plaques de cellulose.

Résultats:

Les séparations de A.1 et A.2 sont rendues délicates par la nature polaire des solutions initiales, raison pour laquelle, lors de la chromatographie sur gel de silice, nous avons désactivé la surface de l'adsorbant au moyen d'éluants aqueux.

Aucune des techniques mentionnées ci-dessus ne nous a permis d'augmenter l'activité toxique de A.1 et A.2:

- La composition des fractions n'est pas modifiée et aucune activité n'est retenue sur la colonne lors du traitement de A.1 et A.2 sur une résine échangeuse d'ions.
- Pour tous les autres essais de fractionnement, la séparation des mélanges initiaux conduit à de nouvelles fractions chromatographiquement distinctes. En revanche, l'activité phytotoxique est dispersée sur pratiquement toutes les fractions récoltées et la perte de poids des tomates inférieure à celle occasionnée par le mélange initial.

L'impossibilité d'accroître l'activité toxique par le fractionnement des extraits A.1 et A.2 suggère donc que celle-ci résulte de l'action d'un complexe actif. La toxicité élevée de ce mélange semble due à l'ensemble des contributions de chaque constituant. Des phénomènes de synergie y jouent peut-être un rôle important.

3.5. Purification de l'extrait éthéré:

Les fractions étherées obtenues à partir des milieux de culture J,K,L,M ont été traitées séparément selon le protocole résumé dans le schéma 3.

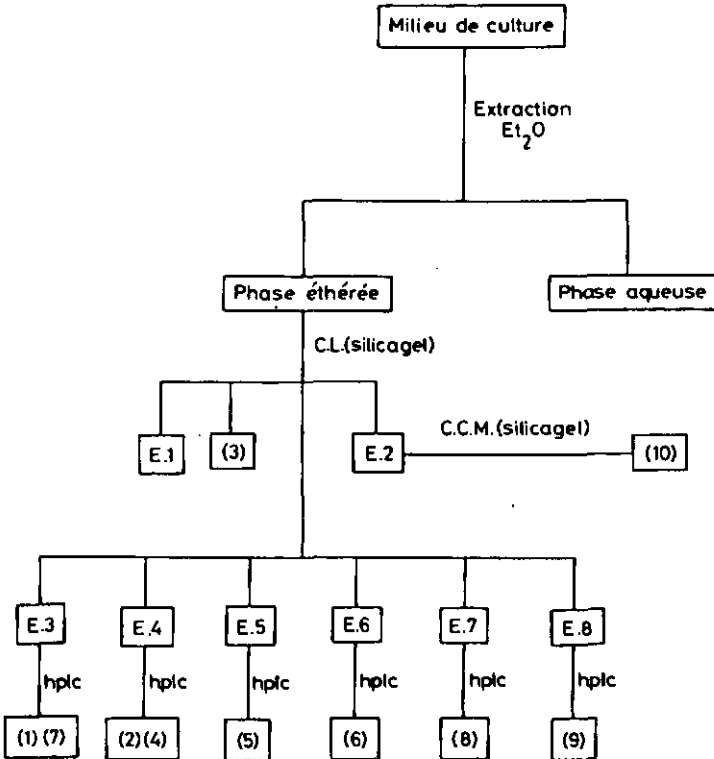


Schéma 3. Processus de séparation de la phase étherée.

Mode opératoire:

La phase éthérée contenant environ 15 mg de mélange est concentrée et chromatographiée sur une colonne de gel de silice (silicagel-60, Merck, 230-400 Mesh). L'élution est effectuée à un débit de 0,5 ml/min avec les systèmes successifs suivants:

1. CHCl_3 - AcOEt (5:1)
2. CHCl_3 - MeOH (9:1)
3. Acétone

Les fractions sont collectées durant des intervalles de 10 min, analysées sur couche mince de silicagel et au besoin regroupées: Un produit chromatographiquement pur (3), ainsi que huit mélanges (E.1 - E.8) ont été recueillis. Nous avons ensuite procédé à l'isolement et l'identification des constituants des diverses fractions en engageant les techniques suivantes:

- Chromatographie liquide à haute pression (HPLC) en phase inversée.
- Chromatographie liquide sur gel de silice.
- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

FRACTION E.1:

En raison de la faible abondance des constituants de E.1, nous avons procédé à leur identification par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse: cinq composés (11 à 15) ont été identifiés par cette technique.

FRACTION E.2:

La fraction E.2, isolée immédiatement à partir de l'extrait éthéré montre par chromatographie sur couche mince, la présence d'un produit majoritaire révélé comme une tache verte par H_2SO_4 20 %.

En raison de sa faible absorption dans l'ultraviolet, le produit principal a été purifié par chromatographie préparative sur plaque de gel de silice (Merck, F_{254} , 1 mm) en utilisant l'éther comme éluant.

0,8 mg de produit pur, (10), ont été isolés et soumis à l'analyse spectrale.

FRACTION E.3:

Colonne : 25 cm x 8 mm, Knauer, RP 18
Débit : 3 ml/min
Eluant : 30 % A à 50 % en 20 min
50 % A à 100 % en 20 min
A : MeOH
B : H₂O
Détection : UV 254 nm

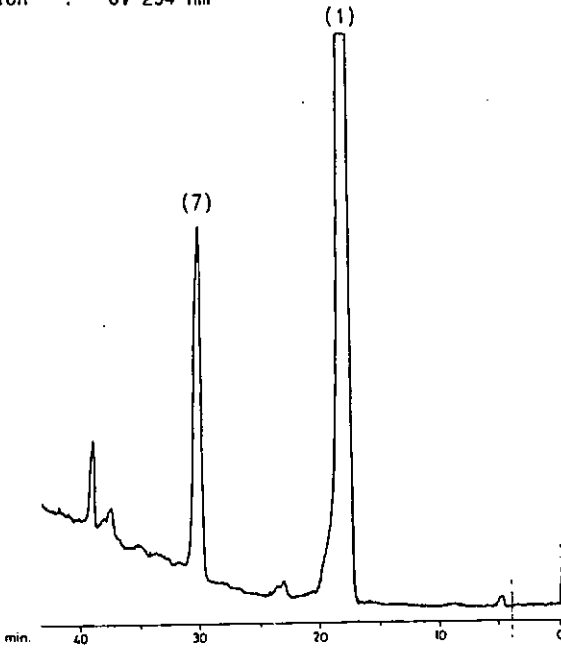


Fig.8. Séparation de E.3

FRACTION E.4:

Colonne : 25 cm x 8 mm, Knauer RP 18
Débit : 3 ml/min
Eluant : 30 % A à 100 % en 30 min
100 % A pendant 10 min
A : MeOH
B : H₂O
Détection : UV 254 nm

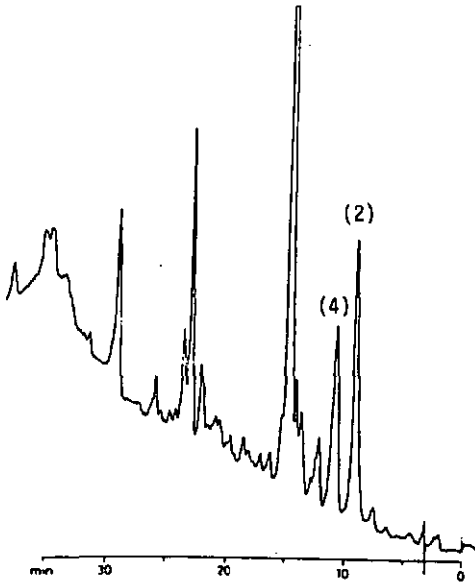


Fig.9. Séparation de E.4

FRACTION E.5:

Colonne : 25 cm x 8 mm, Knauer, RP 18
Débit : 3 ml/min
Eluant : 55 % A pendant 20 min
55 à 100 % A en 10 min
A : MeOH
B : H₂O
Détection : UV 254 nm

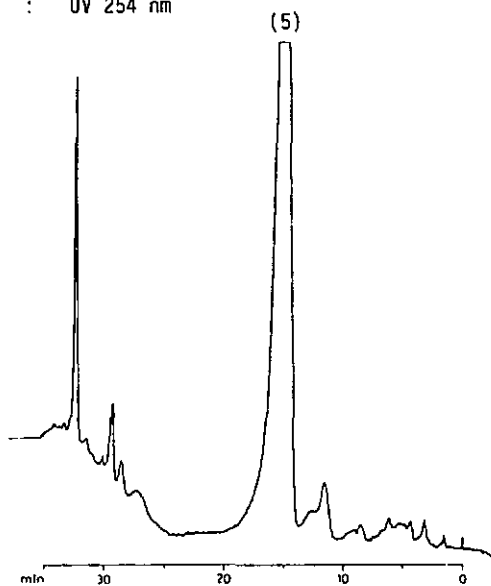


Fig.10. Séparation de E.5

FRACTION E.6:

Colonne : 25 cm x 8 mm, Knauer RP 18
Debit : 3 ml/min
Eluant : 48 % A pendant 10 min
48 % A à 100 % A en 20 min
A : MeOH
B : H₂O
Détection : UV 254 nm

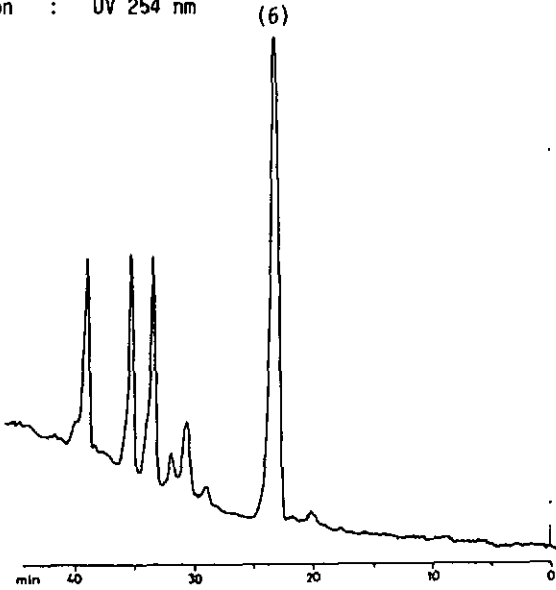


Fig.11. Séparation de E.6

FRACTION E.7:

Colonne : 25 cm x 8 mm, Knauer, RP 18
Débit : 3 ml/min
Eluant : 70 % A
 A : MeOH
 B : H₂O
Oétection : UV 254 nm

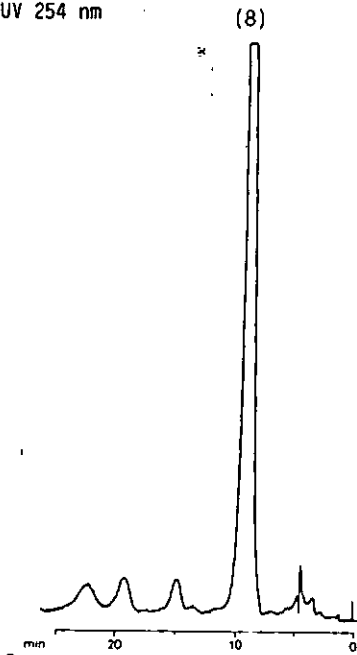


Fig.12. Séparation de E.7

FRACTION E.8:

Colonne : 25 cm x 8 mm, Knauer, RP 18
Débit : 3 ml/min
Eluant : 25 % A à 55 % en 12 min
55 % A pendant 15 min
A : MeOH
B : H₂O
Détection : UV 254 nm

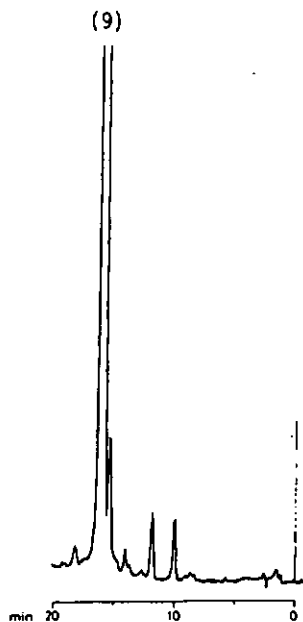


Fig.13. Séparation de E.8

Les produits chromatographiquement purs, isolée à partir des extraits J, K, L, M, ont été comparés (CCM, HPLC, $^1\text{H-RMN}$) puis regroupés. En raison des faibles quantités de substances isolées, nous avons été contraints de restreindre l'étude structurale aux composés les plus abondants, regroupés dans le tableau ci-dessous.

Fraction	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Poids [mg]	7	0,8	0,6	1,0	1,0	1,0

(7)	(8)	(9)	(10)	E.1
1,2	0,8	10	0,5	0,9

Tableau 7. Produits et fractions isolés les plus abondants.

III

IDENTIFICATION DES COMPOSES

ISOLES

1. IDENTIFICATION DE (1):

Nous avons isolé 7 mg de (1): Le produit cristallise sous forme d'aiguilles incolores et montre les propriétés suivantes:

- UV (MeOH) : λ_{\max} = 245,305 nm
- F [°C] : 82
- Rf (silicagel, CHCl_3 -AcOEt (5:1)) : 0,8
- Aucune réaction lors de la révélation de la plaque chromatographique avec FeCl_3 (réactif des phénols [28]).

La quantité de substance isolée nous a permis d'effectuer une analyse spectrale complète de (1).

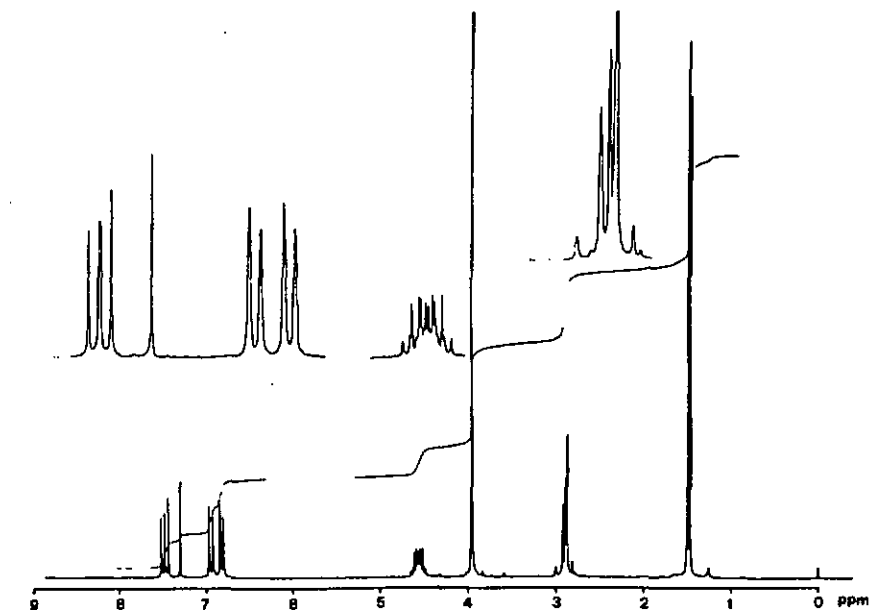


Fig.14. Spectre ^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) de (1)

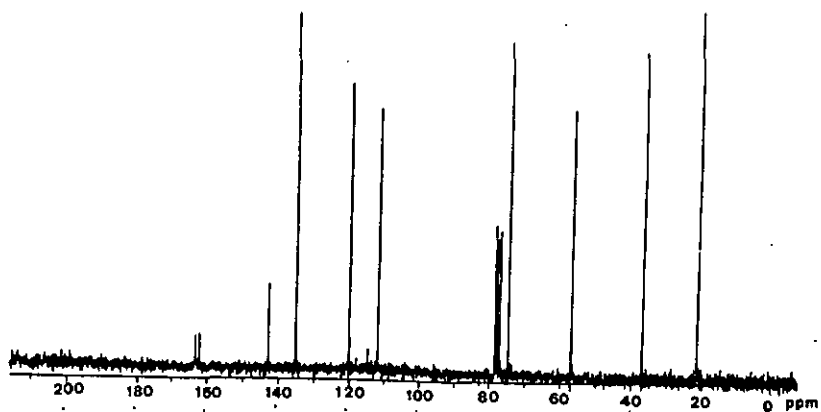


Fig.15. Spectre ^{13}C -RMN (COCl_2 , 50,29 MHz) de (1)

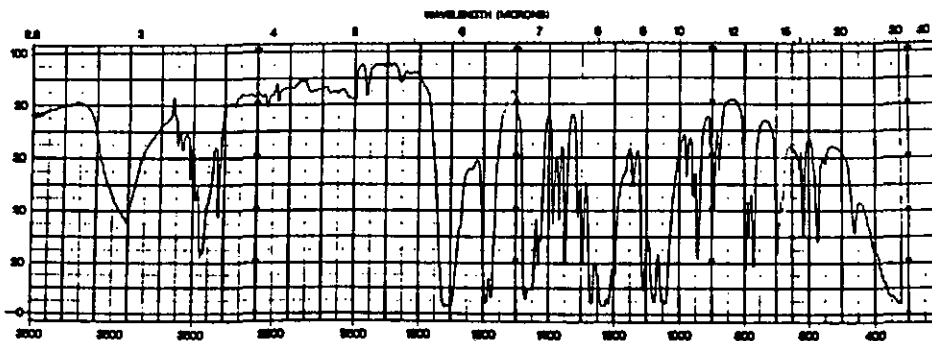


Fig.16. Spectre infrarouge (KBr) de (1)

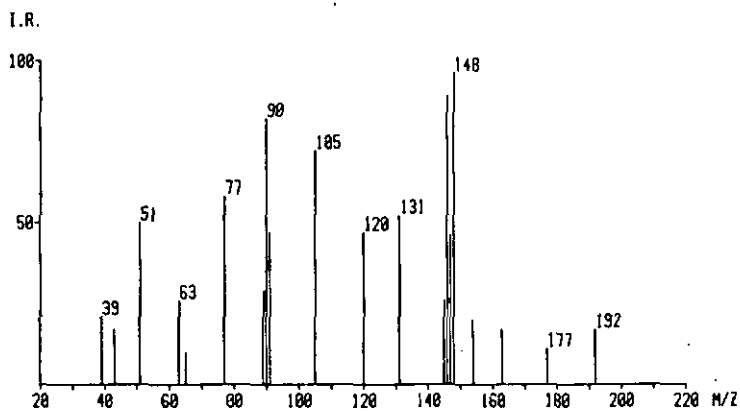


Fig.17. Spectre de masse de (1)

Le spectre ^1H -RMN montre la présence d'un système aromatique composé de trois protons et au sein duquel, nous distinguons des constantes de couplage ortho et méta.

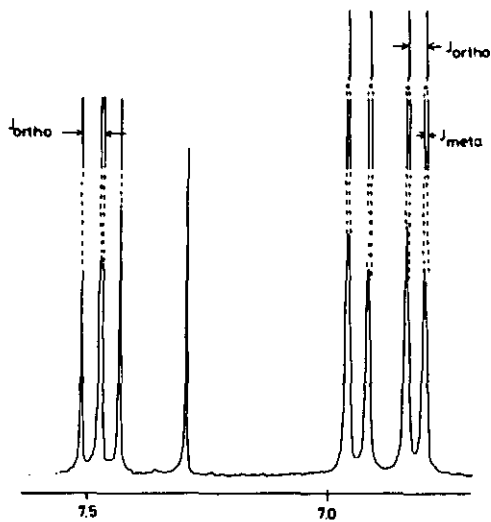


Fig.18. Protons aromatiques de (1)

De tels couplages sont caractéristiques d'un système aromatique à trois atomes d'hydrogène adjacents (AMX).

Le singulet (3H) à 3,95 ppm correspond à un groupe méthoxy fixé sur un cycle aromatique.

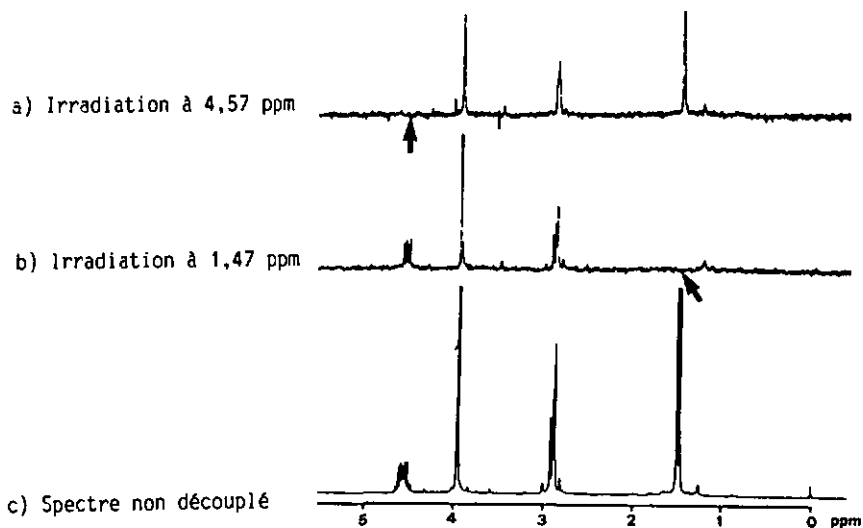


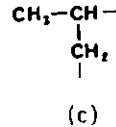
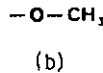
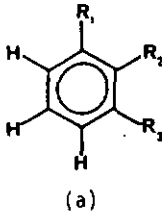
Fig.19. Etude de (1) par double résonance

Le groupe méthyle à 1,47 ppm est couplé avec le multiplet apparaissant à 4,57 ppm ($J = 4$ Hz). Ce couplage est démontré par irradiation sélective du doublet à 1,47 ppm et confirmé lors de l'irradiation du multiplet à 4,57 ppm.

Le multiplet à 4,57 ppm résultant de l'irradiation du groupe méthyle met en évidence le couplage de ces deux systèmes; d'autre part, il permet

d'identifier ce signal comme la partie X d'un système ABX dont la partie AB apparaît à 2,87 ppm.

Nous pouvons donc déduire du spectre $^1\text{H-RMN}$ la présence des fragments suivants:

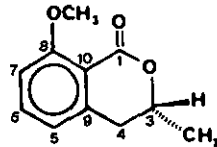


La non équivalence des deux protons méthyléniques du fragment (c) est caractéristique de deux atomes d'hydrogène diastéréotopes et implique la présence d'un carbone asymétrique en α du groupe CH_2 ; de plus, pour justifier son déplacement chimique élevé, le groupement CH doit être lié à un système fortement électro-négatif.

Dans le spectre IR, la bande large (1720 cm^{-1}) est attribuée à une fonction lactone α,β insaturée, formant un cycle à six membres.

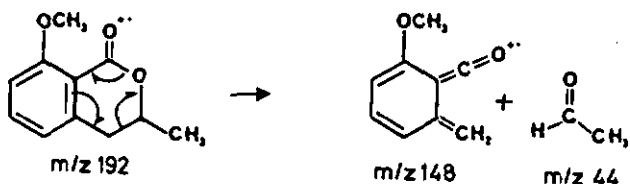
Les bandes caractéristiques des groupements aromatiques apparaissent à $3020, 1590, 1575, 1430\text{ cm}^{-1}$. Les bandes de déformation du cycle à 795 et 770 cm^{-1} confirment la présence de trois atomes d'hydrogène adjacents, mis en évidence par RMN.

Le pic moléculaire intense à m/z 192 correspond bien à la somme des fragments moléculaires décrits ci-dessus, de sorte que nous proposons la structure suivante:



La perte d'acétaldéhyde (m^+-44) à partir du pic moléculaire est caractéristique de la fragmentation des méthyl-3 isochromanones-1 [29] et confirme la

structure proposée:



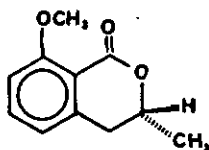
Le spectre ^{13}C -RMN est en accord avec la structure proposée. De plus, le calcul des déplacements chimiques des carbones aromatiques au moyen des règles d'additivité [30], confirme par son bon accord avec les valeurs mesurées la position du groupe méthoxy sur le carbone C-6, plutôt que C-3.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 50,29 MHz) : 162,91 (s, C-1), 161,80 (s, C-8), 142,43 (s, C-10), 134,82 (d, C-6), 119,71 (d, C-5), 115,7 (s, C-9), 111,58 (d, C-7), 74,46 (d, C-3), 56,62 (q, $\text{CH}_3\text{-O-}$), 36,56 (t, C-4), 21,03 (q, $\text{CH}_3\text{-(C-3)}$).

δ [ppm]	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
Mesuré	119,71	134,82	111,58	161,80	115,7	142,3
Calculé	119,8	133,7	111,0	159,8	115,3	146,3

Tableau 8. Déplacement chimiques calculés et mesurés des carbones aromatiques.

Structure de (1):



- (-) 3R-dihydro-3,4-méthoxy-8-méthyl-3-isocoumarine
- ((-)) 3R-O-méthylmelléine

La (-) 3R 0-méthylmelléine a déjà été identifiée par DEVYS [31] dans le milieu de culture de Septoria nodorum Berck, champignon responsable de la Septoriose du blé.

(1) est optiquement actif; nous avons mesuré sa rotation spécifique et comparé cette valeur avec celle mentionnée par DEVYS [31].

$[\alpha]_D^{20} \text{CHCl}_3$ (mesuré) : -221°

$[\alpha]_D^{20} \text{CHCl}_3$ réf. [31] : $-218 \pm 3^\circ$

L'accord entre les deux valeurs permet de conclure à des configurations absolues identiques, R, au niveau du carbone C-3.

2. IDENTIFICATION DE (2):

Nous avons isolé 0,8 mg de (2). Il s'agit d'un produit incolore, absorbant dans l'UV à 254 nm. Nous avons relevé les propriétés chromatographiques suivantes:

- Rf (silicagel, CHCl_3 -AcOEt (5:1)) : 0,1
- Aucune réaction lors de la révélation de la plaque chromatographique avec FeCl_3 .

En raison de la faible quantité de substance isolée, nous avons restreint les manipulations à l'enregistrement de spectre ^1H -RMN, suffisant pour déterminer sans ambiguïté la structure de (2).

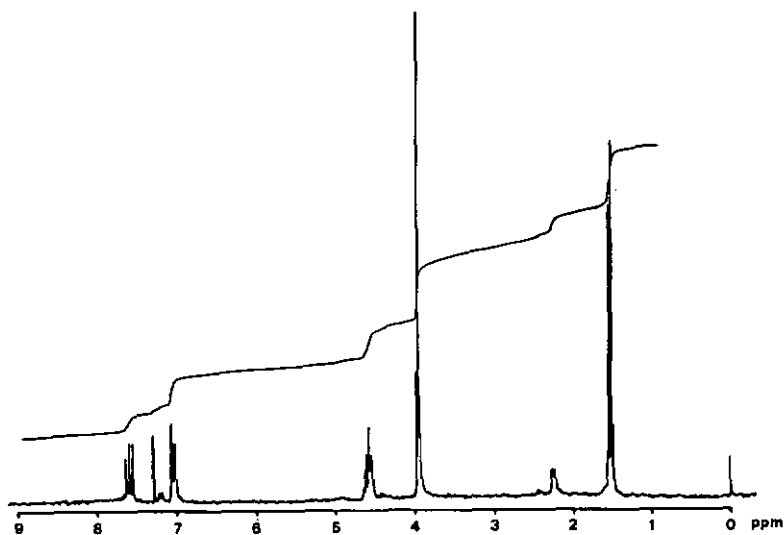


Fig.20. Spectre ^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) de (2).

^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz): 1,54 (d, 3H); 2,24 (d, 1H); 3,94 (s, 3H); 4,52 (dd, 1H); 4,56 (m, 1H); 7,02 (m, 1H); 7,03 (d, 1H); 7,57 (dd, 1H).

Remarque: Les signaux de faible intensité à 1,53 et 3,92 ppm sont dus à des impuretés non identifiées.

La grande similitude du spectre ^1H -RMN de (2) avec celui de (1) nous laisse penser qu'il s'agit d'un produit appartenant à la même famille. Le système aromatique est comme précédemment typique d'un cycle contenant trois atomes d'hydrogène adjacents. Toutefois, par rapport au spectre de (1), nous constatons que les protons possédant les couplages ortho et méta ont un déplacement chimique identique. Celui-ci est supérieur (0,22 ppm) à celui des protons correspondants de la méthoxymelléine: Ce fait traduit la présence sur le cycle aromatique en position 9 d'un groupement légèrement plus électro-négatif. La présence d'un seul proton benzylique ainsi que l'augmentation de son déplacement chimique de 2,87 à 4,52 ppm nous incite à placer un groupement fortement électro-négatif (OH) sur le carbone en α du cycle aromatique. La présence du signal échangeable à 2,24 ppm (1H) est en accord avec cette hypothèse.

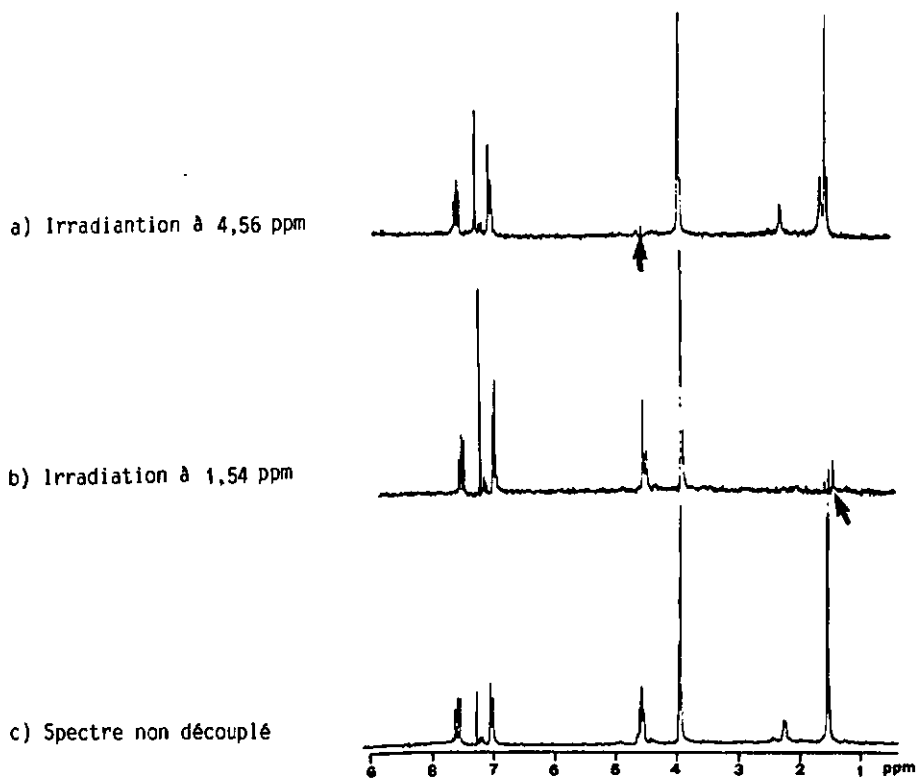
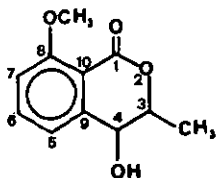


Fig.21. Etude de (2) par double résonance.

Les irradiations sélectives du multiplet à 4,56 ppm et du doublet à 1,54 ppm mettent en évidence le couplage des deux signaux.

Les données du spectre ^1H RMN nous autorisent donc à émettre l'hypothèse de structure suivante:

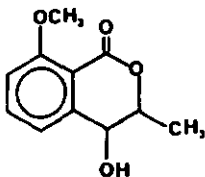


La comparaison des déplacements chimiques des protons du cycle lactonique de (2) avec ceux de l'hydroxy-4 melléine [31] confirme parfaitement la structure proposée.

δ [ppm]	Me-(C-3)	H-(C-3)	H-(C-4)
(2)	1,54	4,56	4,52
Hydroxy-4 melléine	1,55	4,56	4,50

Tableau 8. Comparaison des déplacements chimiques des protons non aromatiques de (2) avec ceux de l'hydroxy-4 melléine.

Structure de (2):



dihydro-3,4-dihydroxy-4-méthoxy-8-méthyl-3-isocoumarine
(hydroxy-4-melléine)

3. IDENTIFICATION DE (3):

(3) a été isolé en faible quantité (0,6 mg) par chromatographie sur gel de silice de l'extrait étheré. Le produit est un solide incolore absorbant dans l'UV à 254 nm. Ses propriétés chromatographiques sont les suivantes:

- Rf (silicagel, CHCl_3 - MeOH (95:5)) : 0,63
- Ne réagit pas lors de la vaporisation de la plaque chromatographique avec une solution de FeCl_3 .

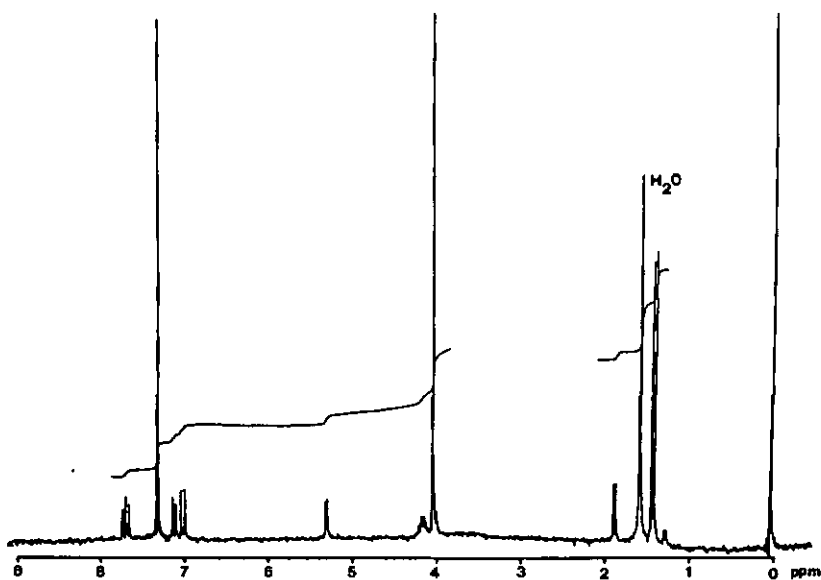


Fig.22. Spectre ^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) de (3).

^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) : 1,33 (d, 3H), 1,82 (d, 1H), 3,97 (s, 3H), 4,13 (m, 1H), 5,27 (d, 1H), 6,95 (d, 1H), 7,06 (d, 1H), 7,63 (t, 1H).

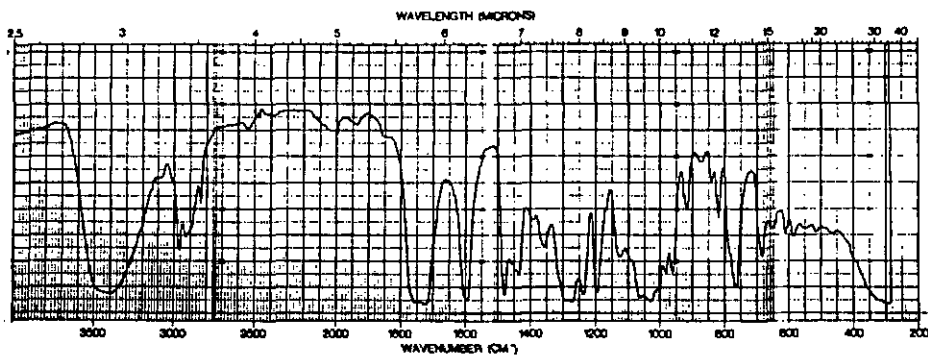


Fig.23. Spectre infrarouge (KBr) de (3).

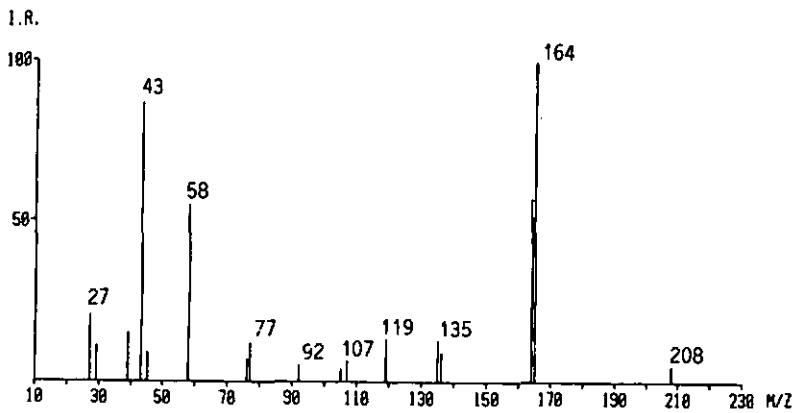


Fig.24. Spectre de masse de (3).

A l'évidence, (3) fait partie de la famille des composés du type melléine. La partie aromatique montre comme précédemment trois atomes d'hydrogène adjacents. On remarque également la présence d'un groupement méthoxybenzénique (3,97 ppm) ainsi qu'un groupement méthyle (1,33 ppm). Le proton échangeable d'une fonction hydroxy donne le signal à 1,82 ppm. Des expériences de double irradiation mettent en évidence le couplage entre le multiplet à 4,13 ppm et les trois signaux suivants: Le doublet à 5,27 ppm, le doublet (OH) à 1,82 ppm, le doublet du groupement méthyle (1,33 ppm). Ces expériences de découplages nous permettent de conclure à la présence de la structure partielle suivante:

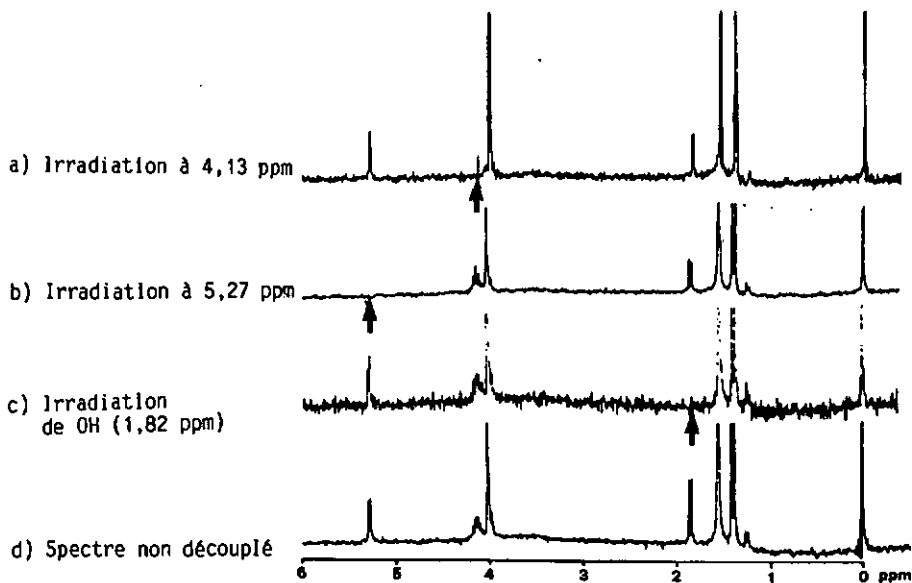
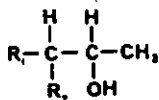
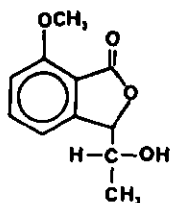


Fig.25. Etude de (3) par double résonance.

Le spectre Infrarouge met en évidence la présence d'une fonction hydroxyle (3400 cm^{-1}). Nous attribuons la bande large à 1740 cm^{-1} à la vibration de valence de la fonction carbonyle d'une γ -lactone α,β -Insaturée. Les bandes du système aromatique apparaissent à 1600 , 1480 , 1430 et 765 cm^{-1} ; cette dernière bande est caractéristique des systèmes aromatiques à trois atomes d'hydrogène adjacents et confirme l'information déduite du spectre $^1\text{H-RMN}$.

Le ion moléculaire à m/z 208 subit une perte de CO_2 (m^+-44), suivie de l'élimination d'un radical méthyle, conduisant au fragment m/z 149. Ces deux éliminations consécutives sont confirmées par des ions métastables à m/z 129,3 et 135,4 respectivement. La perte de 45 à partir du pic moléculaire confirme la présence d'un groupe hydroxy-1-éthyle.

Les données spectrales recueillies nous permettent d'attribuer à (3) la structure suivante:



(hydroxy-1-éthyl)-3-méthoxy-7-phthalide

La présence de plusieurs ions métastables dans le spectre de masse nous a permis d'établir un schéma de fragmentation confirmant la structure proposée.

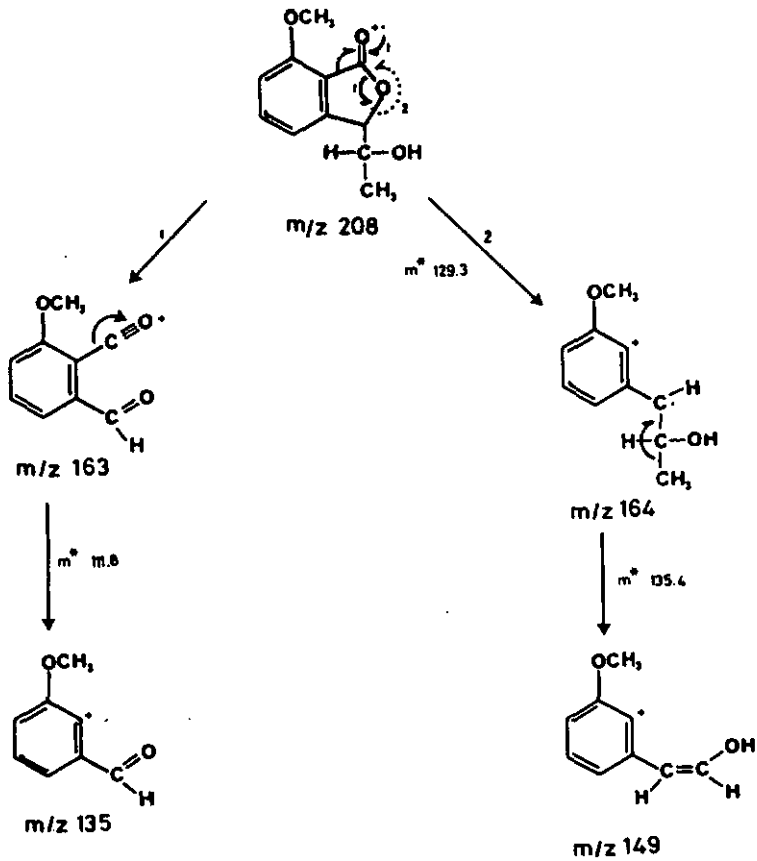


Schéma 4. Schéma de fragmentation de (3)

4. IDENTIFICATION DE (4):

Nous avons isolé 1 mg d'un solide blanc, (4). Ce composé présente les propriétés suivantes:

- Rf (silicagel, CHCl_3 -MeOH (95:5)) : 0,6
- Uv (MeOH) : λ_{max} : 285 nm

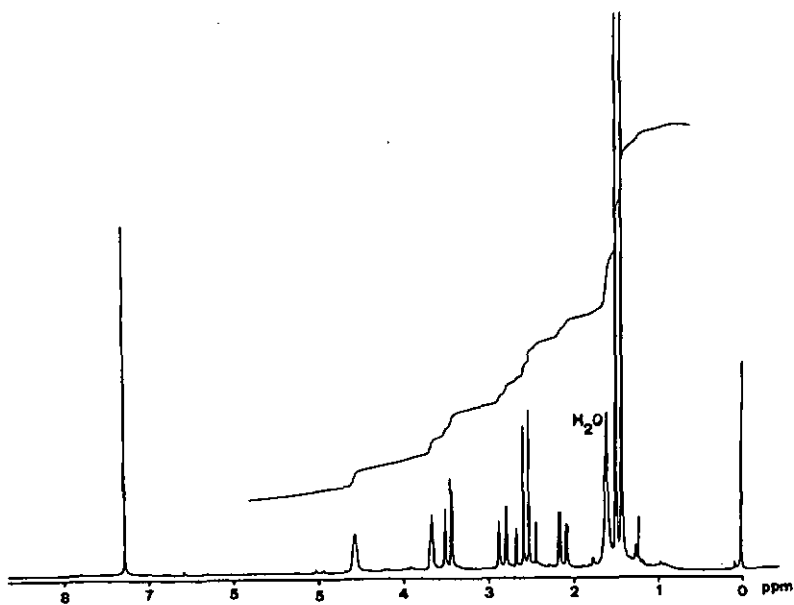


Fig.26. Spectre ^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) de (4)

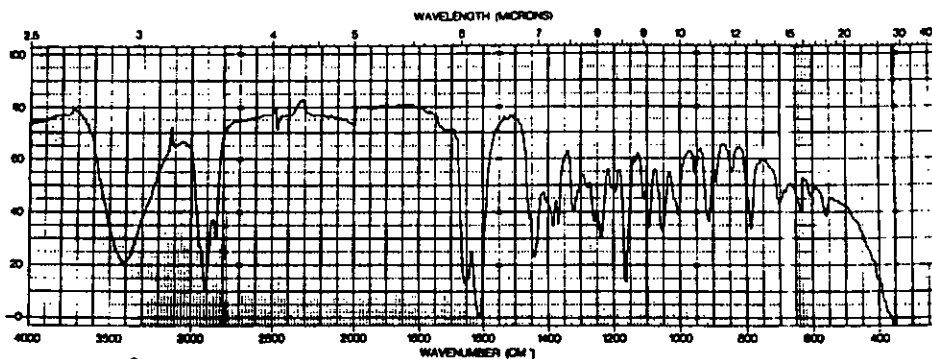


Fig.27. Spectre infrarouge (KBr) de (4):

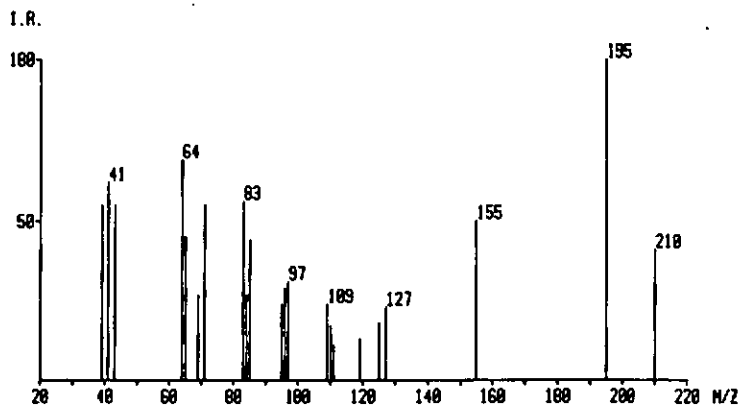


Fig.28. Spectre de masse de (4)

4.1. Etude de (4) par RMN-¹H :

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz) : 1,42 (s, 3H), 1,49 (s, 3H), 2,10 (dd, 1H), 2,54 (AB, 2H), 2,82 (m, 1H), 3,35 (d, 1H), 3,65 (m, 1H), 4,56 (m, 1H).

1. Généralités :

Le spectre ¹H-RMN de (4) met en évidence l'absence de protons aromatiques et la présence de deux groupements méthyles non couplés à 1,42 et 1,49 ppm respectivement. Les signaux situés entre deux et trois ppm font partie de deux systèmes AB imbriqués:

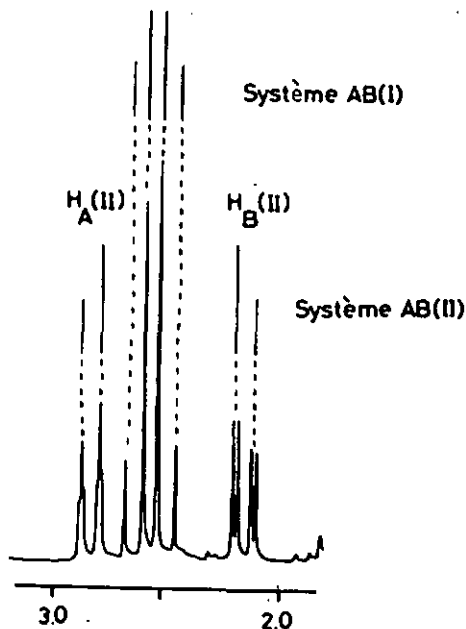


Fig.29. Systèmes AB du spectre ¹H-RMN de (4)

Le système AB(I), centré à 2,54 ppm a une constante de couplage J_{AB} de 16,5 Hz; Les quatre singulets constituant le signal traduisent un système de deux protons isolés. Au contraire, le système AB(II) est compliqué par des

couplages secondaires: Le signal $H_B(II)$ est un doublet de doublet avec en plus de la constante J_{AB} (17 Hz), un couplage fin (4,5 Hz). Le signal du second proton $H_A(II)$ est constitué de deux doublets de doublets avec des constantes de couplage de 1,8 et 1,9 Hz. Les valeurs élevées des constantes de couplage J_{AB} (16,5 et 17 Hz) sont indicatrices dans chaque système AB de deux protons en position géminale.

Afin d'élucider les couplages entre les différents protons du spectre, nous avons procédé à des découplages sélectifs.

11. Etude de (4) par double résonance:

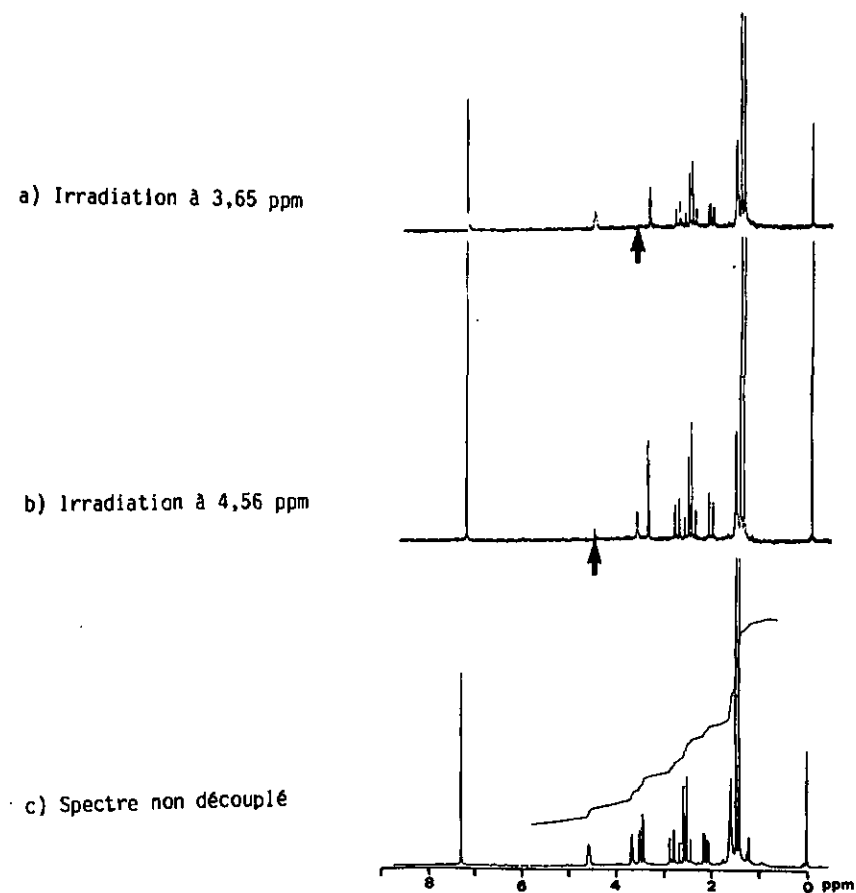


Fig.30. Etude de (4) par double résonance.

L'irradiation du multiplet à 4,56 ppm met en évidence le couplage entre le multiplet à 4,56 ppm et les signaux suivants:

- Le multiplet à 3,65 ppm qui se simplifie.
- Les deux parties du système AB(II): Les doublets de doublets de $H_A(II)$ deviennent doublets ($J=1,8$ Hz) tandis que les deux doublets du proton $H_B(II)$ deviennent singulets.

Par irradiation à 3,65 ppm, les signaux suivants sont modifiés:

- Le multiplet à 4,56 ppm est modifié.
- Le doublet à 3,35 ppm devient singulet.
- Le proton $H_A(II)$ se simplifie en deux doublets ayant une constante de couplage de 1,9 Hz.

4.2. Etude du spectre infrarouge:

Nous avons relevé les absorptions caractéristiques des fonctions suivantes:

- Fonction hydroxy : 3400 cm^{-1}
- Fonction cétone α, β insaturée: 1655 cm^{-1} (ν_{CO}), 1610 cm^{-1} ($\nu_{C=C}$).

Notons que la très forte intensité de la bande de vibration oléfinique est caractéristique de cétones α, β insaturées.

- Fonction époxy : $1250, 910, 790\text{ cm}^{-1}$

4.3. Acétylation de (4):

Afin de confirmer la présence d'une fonction hydroxy et dans le but de mettre en évidence les protons voisins de cette dernière, nous avons acétylé 0,5 mg de (4) par l'anhydride acétique en présence de pyridine. La réaction conduit à un produit majoritaire dont nous avons enregistré les spectres $^1\text{H-RMN}$ et IR après purification par HPLC.

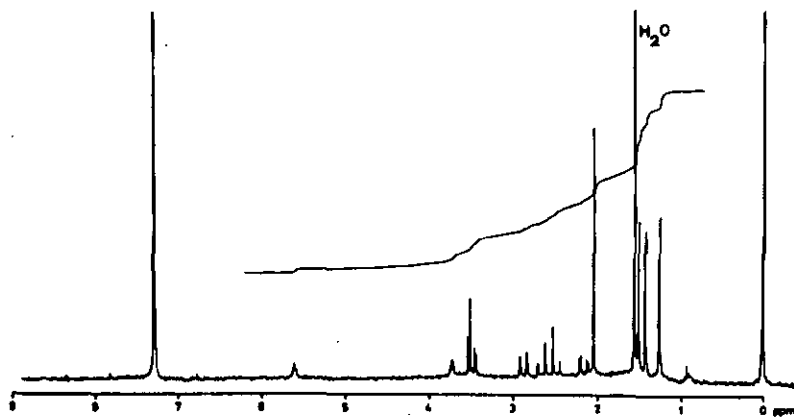


Fig.31. Spectre ^1H -RMN (COCl_2 , 200 MHz) du produit acétylé

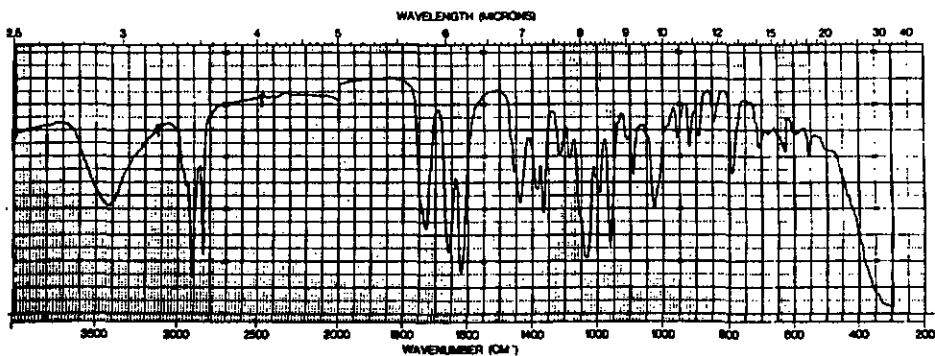
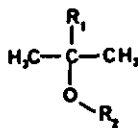


Fig.32. Spectre Infrarouge (KBr) du produit acétylé

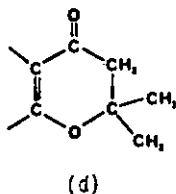
L'acétylation engendre les modifications suivantes du spectre ^1H -RMN de (4) : L'apparition d'un singulet à 2,0 ppm ($3\text{H}, \text{CH}_3\text{-CO-O-}$). Le déplacement à 5,60 ppm du multiplet situé à 4,56 ppm dans le spectre du produit non-acétylé. La molécule contient donc une seule fonction hydroxy et cette dernière est fixée sur le carbone porteur de l'atome d'hydrogène dont le signal apparaît à 4,56 ppm.

4.4. Etude du spectre de masse:

Le pic moléculaire, m/e 210 perd un radical méthyle pour donner le pic de base du spectre, m/z 195. L'intensité de cette fragmentation implique la présence de groupes méthyles labiles. La structure partielle ci-dessous remplit cette condition et est en accord avec les déplacements chimiques observés dans le spectre $^1\text{H-RMN}$.



Le déplacement chimique des protons du système AB(I) correspondant à un atome de carbone méthylénique en α d'une fonction carbonyle, nous permet de proposer la structure partielle suivante:



Cette hypothèse est confirmée par le schéma de fragmentation ci-dessous (schéma 5).

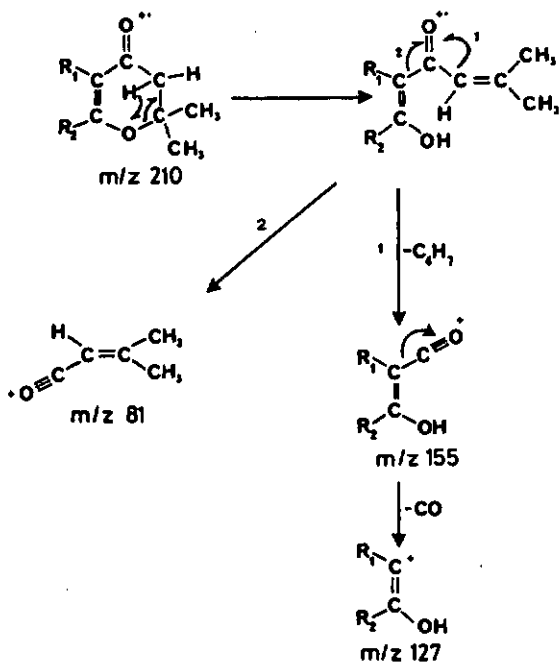
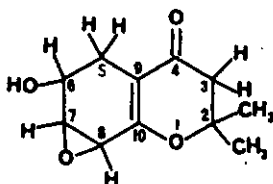


Schéma 5. Schéma de fragmentation de la structure partielle (d).

4.5. Etablissement de la structure de (4):

Considérant la structure partielle (d), ainsi que les différents groupes fonctionnels ou fragments moléculaires mis en évidence précédemment, nous établissons la structure totale de la molécule:



En fonction de la structure ci-dessus, nous attribuons les signaux du spectre $^1\text{H-RMN}$ comme suit:

Me(C-2),s,3H,1,42 ppm; Me(C-2),s,3H,1,49 ppm; H(C-3),AB,2H,2,54 ppm ($J_{AB}=16,5$ Hz); H(C-5),AB,2H,2,10 et 2,82 ppm, ($J_{AB}=17$ Hz); H(C-6),m,1H, 4,56 ppm; H(C-7),m,1H,3,65 ppm; H(C-B),d,1H,3,35 ppm.

La multiplicité des signaux observés résulte des couplages suivants:

- H(C-6) est couplé avec les deux protons de C-5. Les valeurs constantes de couplage mentionnées ci-dessous correspondent respectivement aux interactions équatoriale-équatoriale et équatoriale-axiale.

$$J_{\text{H(C-6)}-\text{H}_A(\text{C-5})} : 1,9 \text{ Hz}$$

$$J_{\text{H(C-6)}-\text{H}_B(\text{C-5})} : 4,5 \text{ Hz}$$

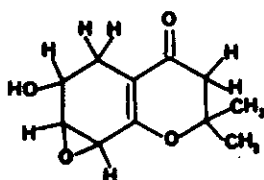
H(C-6) est également couplé avec H(C-7), $J=2$ Hz

- H(C-7) est couplé avec H(C-8), $J=4$ Hz.

De plus, H(C-7) montre un couplage à longue distance d'ordre 4J ($^4J=1,8$ Hz)

avec le proton H_A du système AB(II). Un tel couplage est fréquemment observé dans les systèmes alicycliques si les liaisons situées entre les deux protons ont la forme d'un W, ce qui est le cas pour H(C-8) et H(C-6).

Structure de (4):



(4): époxy-7,8-hydroxy-6-diméthyl-2,2
pentahydro-3,5,6,7,8-benzopyranone-4

5. IDENTIFICATION DE (5):

1 mg de (5) a été isolé. Il s'agit d'un produit incolore dont nous avons relevé les propriétés chromatographiques suivantes:

- Rf (silicagel, CHCl_3 -AcOEt (5:1) : 0,44
- Ne réagit pas lors de la révélation de la plaque avec FeCl_3 .

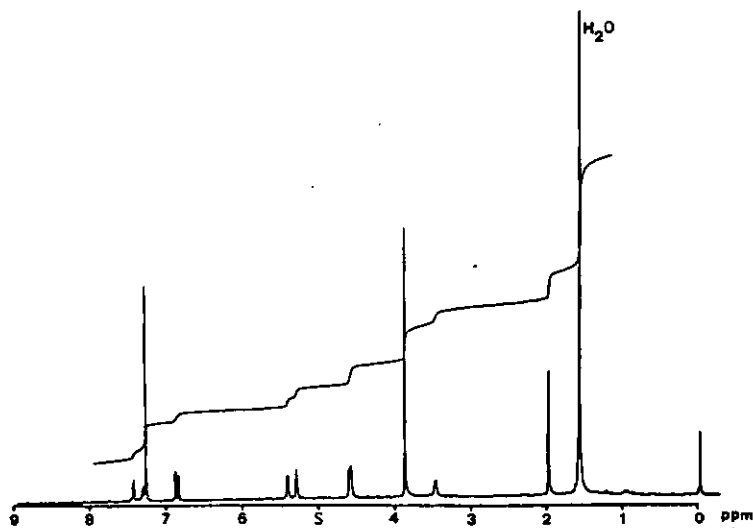


Fig.33. Spectre ^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) de (5).

^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) : 2,0 (m,3H); 3,90 (s,3H); 4,61 (d,2H); 5,31 (dd,1H); 5,43 (dd,1H); 6,88 (d,1H); 7,29 (dd,1H); 7,44 (d,1H).

Remarque: Le signal à 3,55 ppm provient d'une impureté non identifiée.

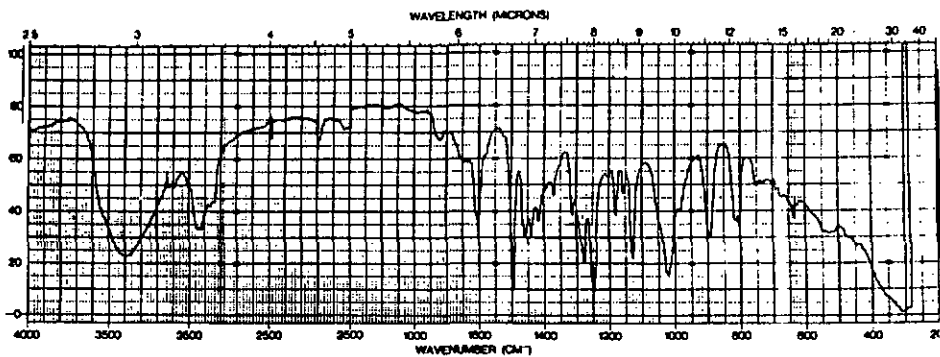


Fig.34. Spectre infrarouge (KBr) de (5)

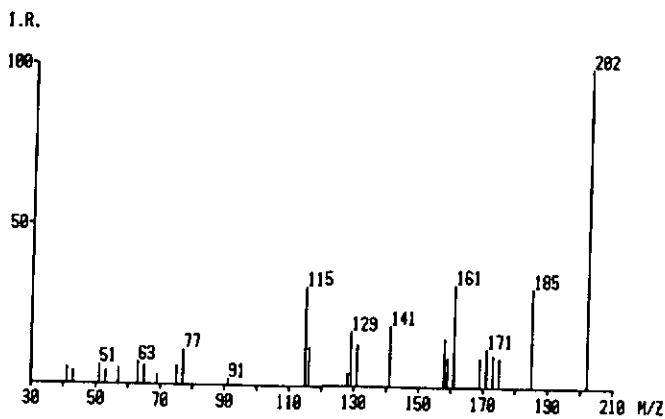


Fig.35. Spectre de masse de (5)

Le spectre ^1H -RMN montre trois protons aromatiques avec un couplage ortho ($J=8,5$ Hz) et un couplage méta ($J=2,4$ Hz), correspondant à un cycle aromatique 1,2,4-trisubstitué.

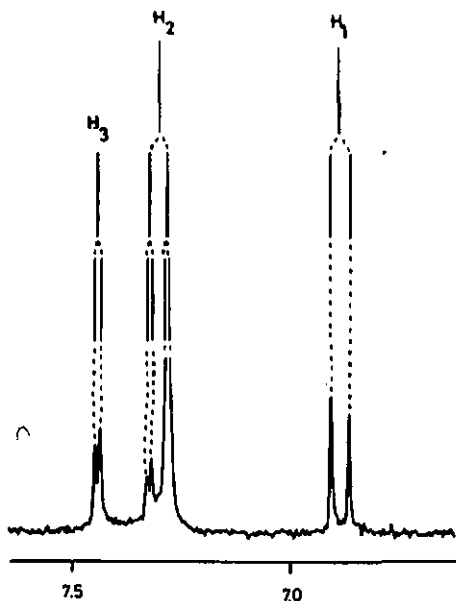
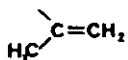


Fig.36. Couplages des protons aromatiques

Le signal d'un groupe méthoxyaromatique apparaît à 3,90 ppm.

Une irradiation du multiplet à 2,0 ppm ($\text{CH}_3\text{-C}=\text{C}$) fait apparaître les deux protons oléfiniques à 5,43 et 5,31 ppm sous forme de doublets ($J=2\text{Hz}$); Sur une double liaison, une telle constante est caractéristique d'un couplage géminial. De cette expérience, nous pouvons déduire la présence du fragment suivant:



L'irradiation du pic de l'eau (1,57 ppm) entraîne la coalescence des signaux du doublet à 4,61 ppm. Compte tenu du déplacement chimique élevé de ce dernier, seul le proton d'une fonction hydroxybenzylrique peut correspondre au signal à 1,57 ppm.

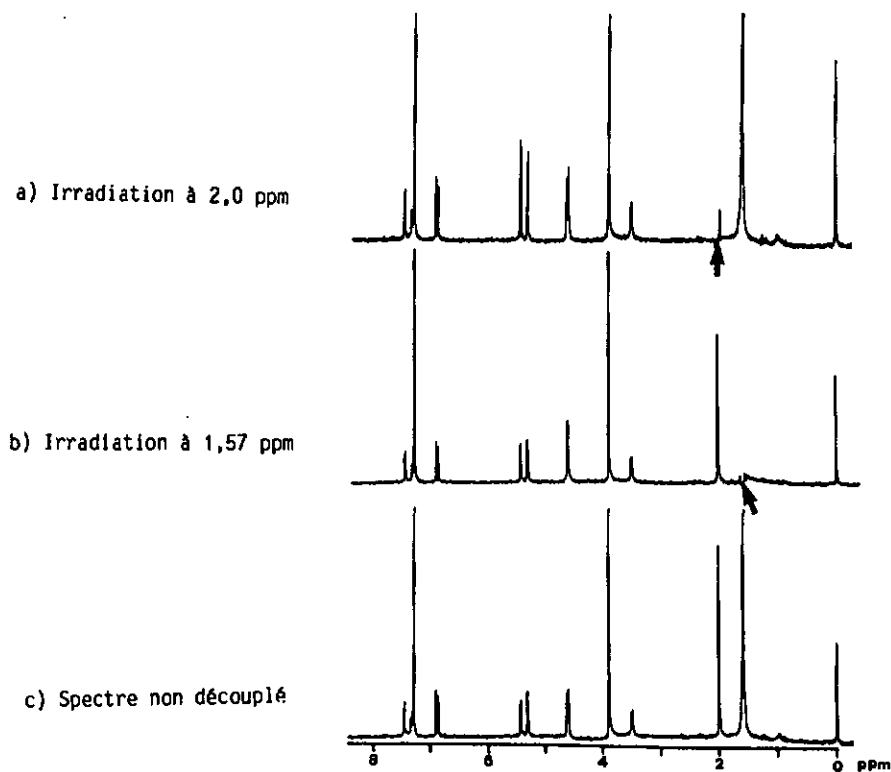


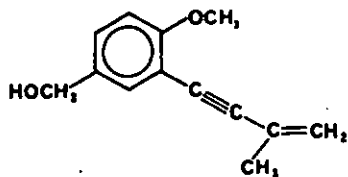
Fig.37. Etude de (5) par double résonance

Le spectre infrarouge met en évidence une fonction hydroxybenzylrique. $3400,1020\text{ cm}^{-1}$. A 2195 cm^{-1} , apparaît la bande caractéristique des alcynes ($\nu\text{C}\equiv\text{C}$). L'absence de signaux à 3350 cm^{-1} (νCH) et 660 cm^{-1} (δCH) implique

la présence d'une triple liaison non terminale. Les bandes de déformation du cycle confirment la substitution déduite du spectre $^1\text{H-RMN}$: 890 cm^{-1} , bande indicatrice d'un atome d'hydrogène isolé; 810 cm^{-1} , bande indicatrice de deux atomes d'hydrogène adjacents.

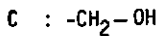
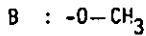
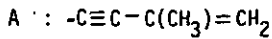
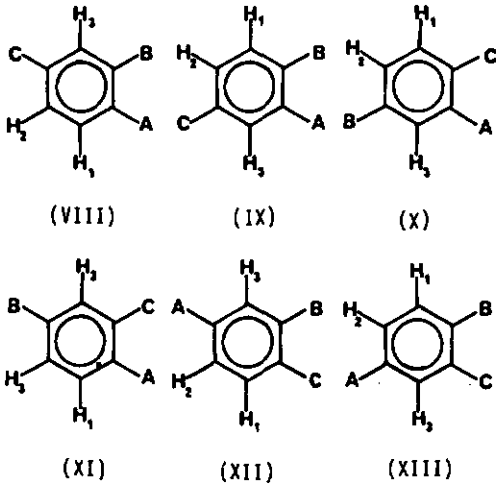
Le spectre de masse montre un pic moléculaire très intense (100 %) à m/z 202 traduisant la présence d'une structure stable, probablement conjuguée. La fragmentation classique des alcools benzyliques est bien visible dans ce spectre: Perte d'un proton, suivie de l'élimination d'une molécule de CO ($m^*=148,9$); élimination d'un radical OH à partir du ion moléculaire. La perte du fragment 41 correspondant au groupement méthyl-vinyle précédemment décrit engendre un pic intense (32 %) à m/z 161.

Les remarques énoncées ci-dessus, nous conduisent à attribuer la structure suivante à (5) :

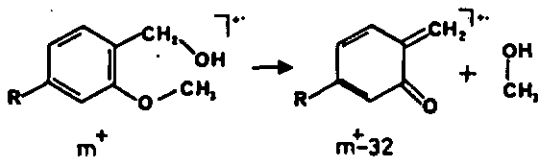


Positions relatives des substituants:

Les couplages du système aromatique indiquent un système 1,2,4-trisubstitué. Sur la base de cette unique information, six structures sont possibles:



Le spectre de masse de (5) permet d'exclure les structures (XII) et (XIII) possédant les groupes méthoxy et hydroxy-méthyle en position ortho. En effet, une telle substitution devrait conduire à la perte d'une molécule de méthanol (m^+-32) selon le mécanisme suivant:



Cette fragmentation est totalement absente du spectre de masse de (5).

Le choix de la structure de (5) parmi les quatre possibilités restantes est effectué par comparaison des déplacements chimiques des protons H_1 , H_2 , H_3 , calculés [32] et mesurés.

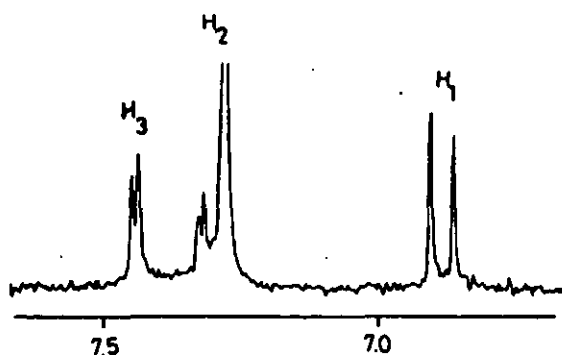


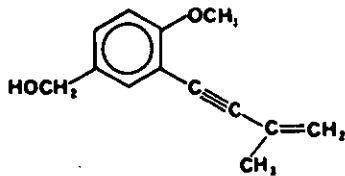
Fig.38. Protons aromatiques de (5)

δ [ppm]	H_1	H_2	H_3
Mesurés	6,87	7,29	7,44
(VIII)	7,25	6,77	6,73
(IX)	6,73	7,10	7,30
(X)	7,12	6,71	6,90
(XI)	6,70	7,25	6,73

Tableau 9. Déplacements chimiques calculés et mesurés des protons aromatiques.

Le tableau 9 montre clairement que seuls les déplacements chimiques de la proposition de structure (IX) sont en bon accord avec les valeurs expérimentales.

Structure de (5) :



Alcool méthyloxy-4- (méthyl-3-butène-3-ynyl-1)-3-benzylique

6. IDENTIFICATION DE (6) :

1 mg de (6) a été isolé: ce composé est un solide incolore, bien visible en lumière UV à 254 nm. En chromatographie sur couche mince (silicagel, CHCl_3 -AcDEt (5:1)), il possède un R_f de 0,30. Le traitement de la plaque avec FeCl_3 fait apparaître le spot à 0,3 comme une tache bleue: (6) possède donc probablement une fonction hydroxy phénolique.

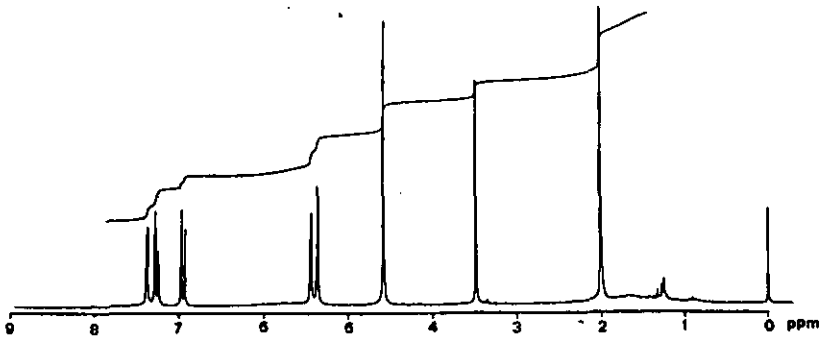


Fig.39. Spectre ^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) de (6)

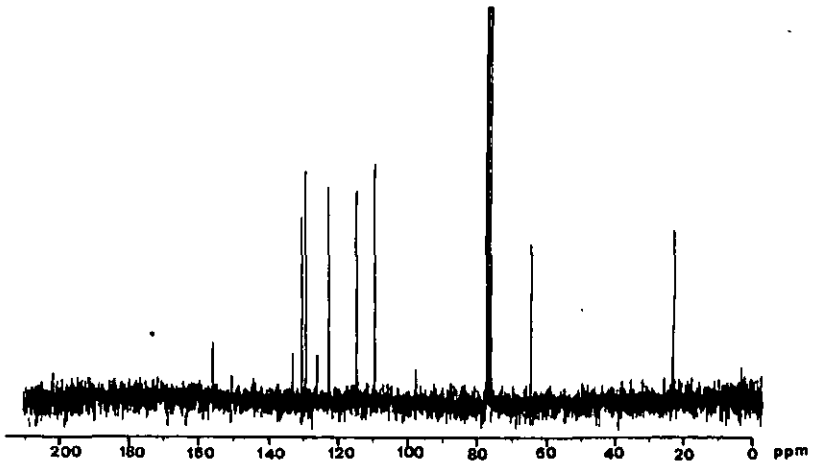


Fig.40. Spectre ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 50,29 MHz) de (6)

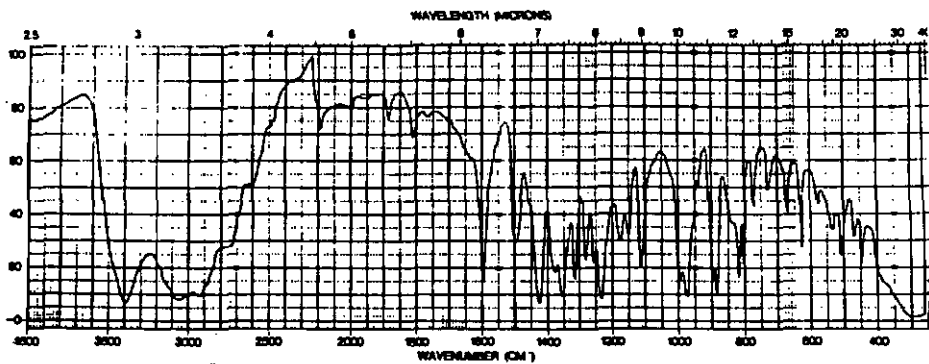


Fig.41. Spectre infrarouge (KBr) de (6)

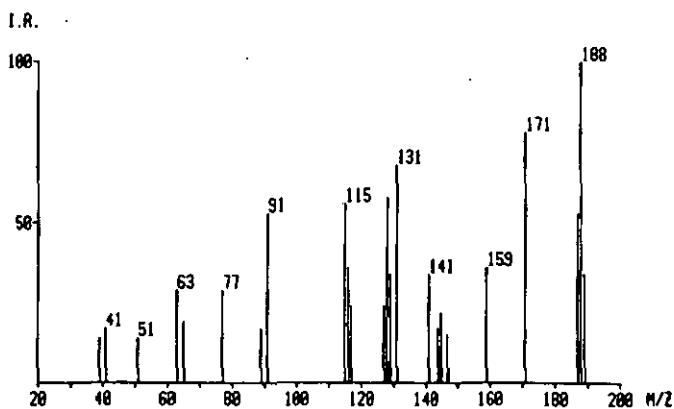


Fig.42. Spectre de masse de (6)

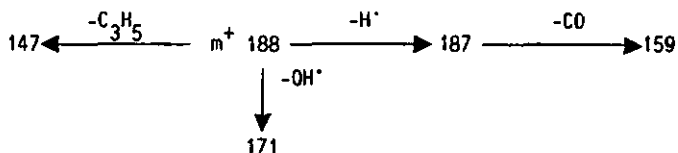
$^1\text{H-RMN}$ (COCl_2 , 200 MHz): 2,01 (dd,3H); 3,47 (s,1H); 4,60 (s,2H); 5,37 (m,1H); 5,45 (m,1H); 6,95 (d,1H); 7,27 (dd,1H); 7,36 (d,1H)

La comparaison des spectres $^1\text{H-RMN}$ montre que (6) et (5) ont des structures très voisines: Dans les deux cas, les systèmes aromatiques sont semblables; caractéristiques d'un cycle 1,2,4-trisubstitué. Dans le spectre de (6), nous relevons également la présence du groupe méthyl-vinyle avec ses signaux caractéristiques à 2,01, 5,37 et 5,45 ppm. Les deux protons du groupe $\text{Ar-CH}_2\text{-O}$ apparaissent dans le spectre de (6) comme un singulet à 4,60 ppm, déplacement identique à celui observé pour le groupe méthylène de (5). Par contre, dans le spectre de (6), le signal du groupe méthoxy n'apparaît pas, mais on observe à 3,47 ppm un singulet échangeable correspondant à une fonction hydroxy.

Les spectres infrarouges des deux substances montrent des absorptions caractéristiques identiques qui mettent en évidence:

- Un système aromatique 1,2,4-trisubstitué: 1600, 1495, 1425, 885, 810 cm^{-1}
- Une triple liaison: 2190 cm^{-1}
- Une fonction hydroxy: 3400 cm^{-1}

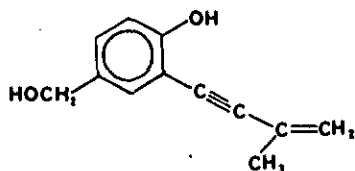
Le pic moléculaire de (6) apparaît à m/z 188, soit 14 unités de moins que le pic moléculaire de (5). La fragmentation caractéristique du ion moléculaire de (6) est identique à celle observée dans le cas de (5):



La structure de (6) diffère donc de celle de (5) uniquement par le remplacement de la fonction méthoxy de ce dernier par un groupe hydroxy.

Compte tenu de la grande similitude des deux spectres $^1\text{H-RMN}$ au niveau des protons aromatiques, et considérant l'influence similaire des fonctions hydroxy et méthoxy sur le déplacement chimique de ces derniers, nous concluons

à une position relative des substituants de (6) identique à celle mise en évidence pour (5) :



Afin de confirmer la position relative des substituants proposée, nous avons enregistré le spectre ^{13}C -RMN de (6) dans le but de comparer les déplacements chimiques observés avec les valeurs calculées [30].

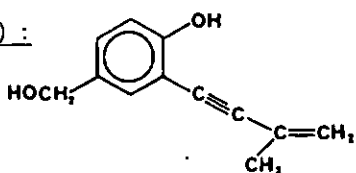
^{13}C -RMN (COCl_2 , 50,29 MHz): 23,78 ($\text{CH}_3\text{-C=C-}$); 65,15 ($\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$); 77,66 ($\text{Ar-C}\equiv\text{C-}$); 98,25 ($\text{Ar-C}\equiv\text{C-C=}$); 110,21 (C-3); 115,33 (C-5); 123,32 ($\text{C}=\text{CH}_2$); 126,67 ($\text{C}=\text{CH}_2$); 129,94 (C-6); 130,96 (C-2); 133,59 (C-1); 156,58 (C-4)

Le tableau ci-dessous met en évidence le bon accord entre les valeurs calculées et mesurées des déplacements chimiques des carbones aromatiques.

δ [ppm]	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Mesuré	133,59	130,96	110,21	156,58	115,33	129,94
Calculé	133,6	132,7	109,7	158,2	116,2	128,7

Tableau 10. Comparaison des déplacements chimiques de (6) calculés et mesurés.

Structure de (6) :



Alcool hydroxy-4-(méthyl-3-butène-3-ynyl)-1-3-benzylrique

7. IDENTIFICATION DE (7):

(7) est un produit incolore, bien visible en lumière UV (254 nm) que nous avons isolé en faible quantité (1,2 mg). En chromatographie sur couche mince, (silicagel, CHCl_3 -AcOEt (5:1)), son R_f vaut 0,58; de plus, la nature phénolique du produit est mise en évidence par la réaction positive de ce dernier avec FeCl_3 .



Fig.43. Spectre ^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) de (7)

Remarque: Les signaux apparaissant à 1,21, 2,12 ppm ainsi que les pics de faible intensité entre 5 et 10,5 ppm sont dus à des impuretés non identifiées.

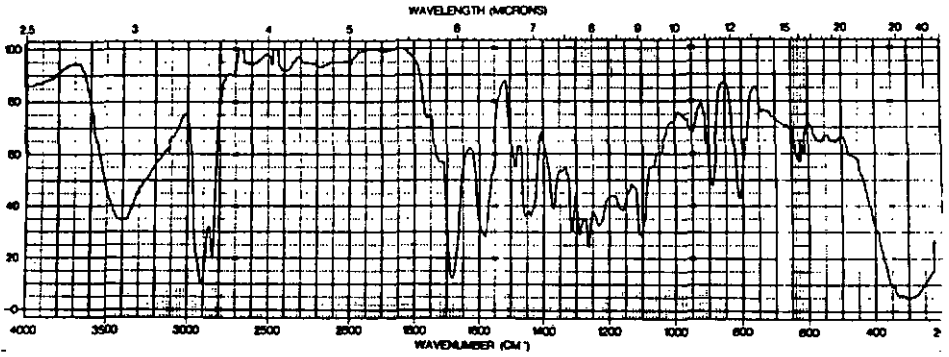


Fig.44. Spectre infrarouge (KBr) de (7)

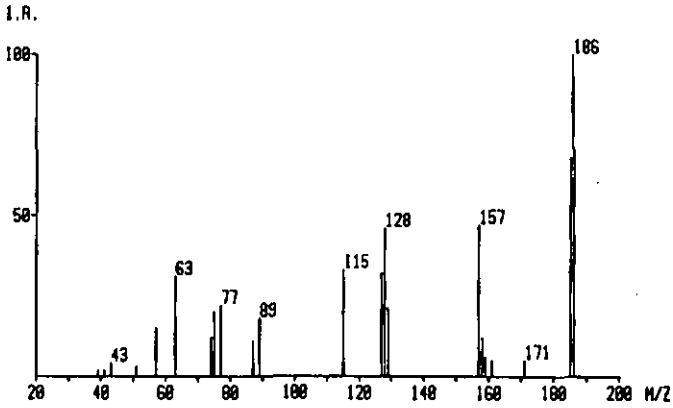


Fig.45. Spectre de masse de (7)

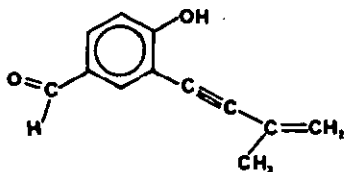
$^1\text{H-RMN}$ (COCl_2 , 200 MHz): 2,02 (dd, 3H); 5,44 (m, 1H); 5,51 (m, 1H); 7,08 (d, 1H); 7,81 (dd, 1H); 7,90 (d, 1H); 9,86 (s, 1H)

De même que les spectres de (5) de (6), le spectre $^1\text{H-RMN}$ de (7) met en évidence la présence d'un noyau aromatique 1,2,4-trisubstitué et d'un reste méthyl-vinyle. Toutefois, nous remarquons que par rapport au spectre de (5), les protons du système aromatique, H_1 , H_2 , H_3 , sont déplacés respectivement de 0,20, 0,42 et 0,46 ppm vers les champs faibles. Cela traduit la présence sur le cycle d'un groupement fortement attracteur d'électrons. Cette constatation est confirmée par l'absence de protons méthyléniques (signal à 4,6 ppm) et l'apparition d'un singulet non échangeable à 9,86 ppm, correspondant au proton d'une fonction aldéhyde.

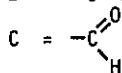
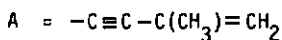
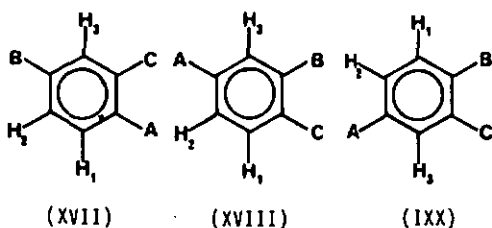
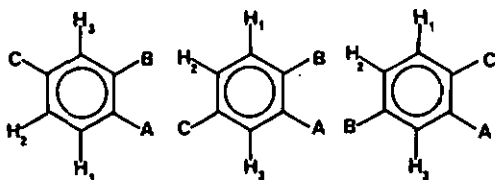
Dans le spectre infrarouge, les bandes caractéristiques des aldéhydes sont présentes à 1685, 2820 (épaulement) et 2720 cm^{-1} . De plus, par rapport aux spectres IR de (5) et (6), on remarque la disparition de la bande de vibration $\nu_{\text{C-O}}$ entre 980 et 1020 cm^{-1} , caractéristique de la fonction hydroxybenzylrique.

Le spectre de masse de (7) montre un pic moléculaire à m/z 186 très intense (100%). Le ion moléculaire se fragmente selon le mécanisme classique des aldéhydes aromatiques, à savoir perte d'un radical hydrogène, m/z 185 (68%), suivie de l'élimination d'une molécule de CO, m/z 157 (47%) accompagnée d'un ion métastable à m/z 133,2.

Les informations mentionnées ci-dessus nous permettent d'attribuer à (7) la structure suivante:



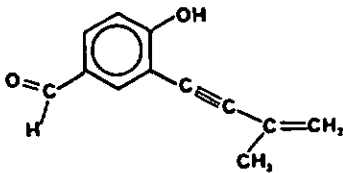
Afin de vérifier la position relative des substituants que nous avons placés par analogie aux structures de (5) et (6), nous avons procédé au calcul des déplacements chimiques des protons aromatiques, sur les structures suivantes:



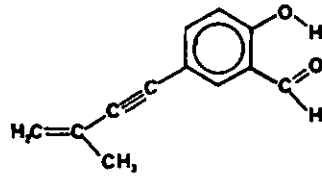
δ [ppm]	H ₁	H ₂	H ₃
Mesurés	7,08	7,81	7,90
(XIV)	7,51	7,35	7,24
(XV)	6,90	7,35	7,85
(XVI)	7,68	6,90	7,07
(XVII)	7,51	6,97	7,24
(XVIII)	7,68	7,18	7,07
(IXX)	6,90	7,58	7,85

Tableau 11. Déplacements chimiques calculés et mesurés des protons aromatiques de (7).

De la comparaison des valeurs calculées et mesurées, il ressort que seules les structures (XV) et (IXX) peuvent correspondre à (7).



(XV)



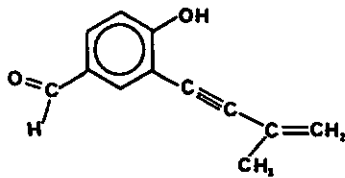
(IXX)

Les cycles aromatiques possédant en position ortho les fonctions hydroxy et aldéhyde perdent successivement une molécule d'eau et une molécule de CO. Dans le spectre de (7), si la structure (IXX) est exacte, nous devrions observer la fragmentation suivante:



Comme aucun ion fragment n'est enregistré ni à m/z 168, ni à m/z 140, nous pouvons affirmer que la structure de (7) ne correspond pas à la proposition (IXX). (7) possède donc la structure (XV), ce qui est en bon accord avec les résultats développés ci-dessus pour (5) et (6).

Structure de (7):



hydroxy-4-(methyl-3-butène-3-ynyl-1)-3-benzaldehyde

8. IDENTIFICATION DE (8) :

(8), isolé en faible quantité, 0,5 mg. se présente sous la forme d'un produit incolore, bien visible en lumière UV (254 nm). Son Rf (silicagel, CHCl_3 -AcOEt (5:1)) vaut 0,82 et la tache ne réagit pas avec FeCl_3 .

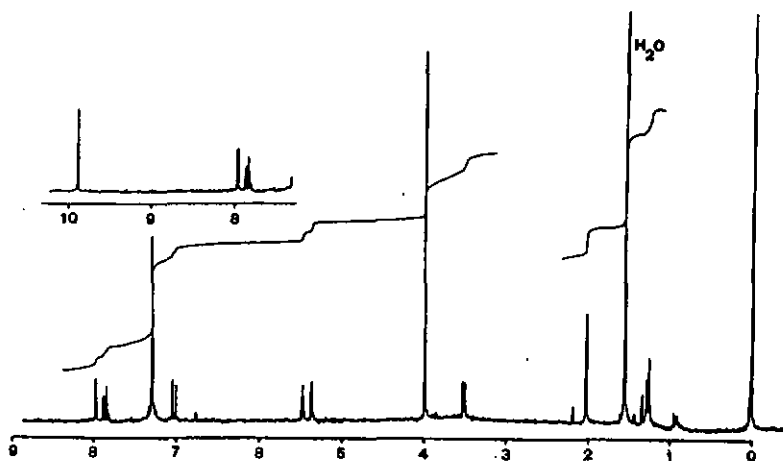


Fig.46. Spectre ^1H -RMN (COCl_2 , 200 MHz) de (8)

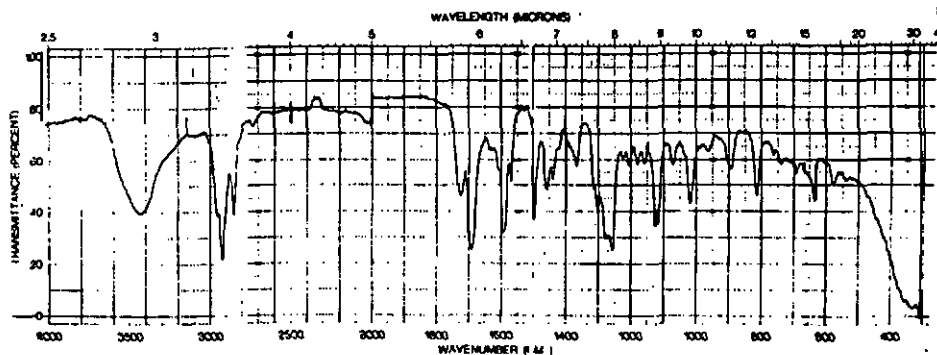


Fig.47. Spectre infrarouge (KBr) de (8)

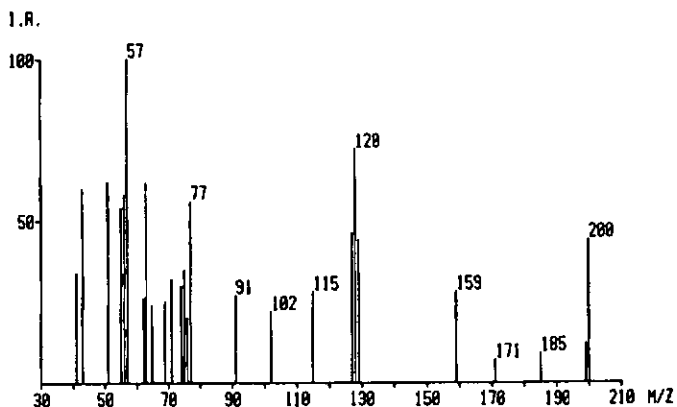


Fig.48. Spectre de masse de (8)

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 200 MHz): 2,01 (dd,3H); 3,98 (s,3H); 5,35 (m,1H); 5,46 (m,1H); 7,01 (d,1H); 7,84 (dd,1H); 7,95 (d,1H); 9,89 (s,1H)

Remarque: Les signaux à 1,27 et 3,5 ppm ne font pas partie du spectre de (8), mais sont dus à des impuretés.

Le spectre $^1\text{H-RMN}$ de (8) montre une grande similitude avec celui de (7) : Les mêmes groupes fonctionnels, aldéhyde, noyau aromatique, groupe méthylvinyle sont présents; en plus, dans le spectre de (8), apparaît à 3,98 ppm un groupe méthoxy.

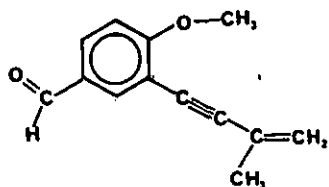
Dans les spectres infrarouges des deux composés, on discerne les mêmes bandes d'absorption caractéristiques:

2820, 2720, 1690 cm^{-1} : aldéhyde.

1595, 1500, 1460, 890, 815 cm^{-1} : noyau aromatique.

Le pic moléculaire de (8) apparaît à m/z 200. Le ion moléculaire montre la fragmentation classique des aldéhydes aromatiques (perte d'un radical H^{\bullet} et d'une molécule de CO). L'élimination du radical méthyl-vinyle ($m^+ - 41$) est également bien visible.

Les données spectrales résumées ci-dessus, ainsi que leur comparaison avec celles de (7), nous permettent d'attribuer à (8), la structure suivante:



Méthoxy-4-(méthyl-3-butène-3-ynyl)-3-benzaldéhyde

La position relative des substituants peut être déduite des calculs effectués pour (7) : En effet, le remplacement de la fonction hydroxy par le groupe méthoxy n'engendre que des modifications mineures (0,01-0,08 ppm) des déplacements chimiques des protons aromatiques.

9. IDENTIFICATION DE (9):

(9) est avec (1) le métabolite secondaire le plus abondant de l'extrait éthéré du milieu de culture; nous avons isolé 10 mg de produit que nous avons cristallisé dans le chloroforme. En chromatographie sur couche mince de gel de silice (CHCl_3 -MeOH (9:1)), (9) a un R_f de 0,50.

UV (MeOH) λ_{max} : 225 nm

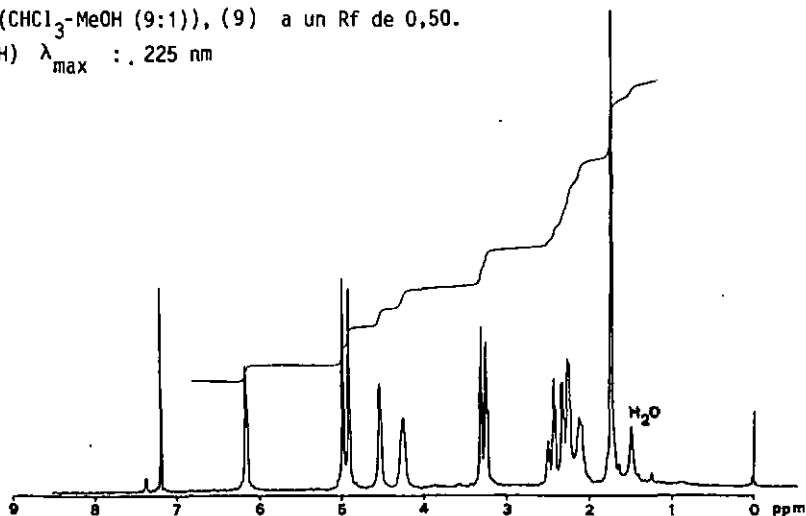


Fig.49. Spectre ^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) de (9)

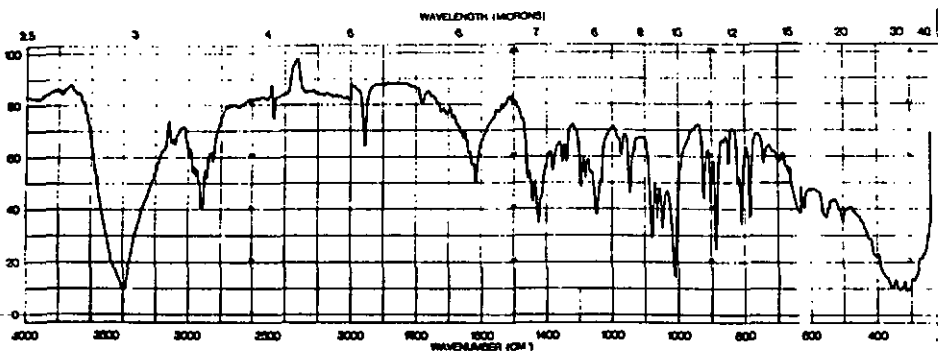


Fig.50. Spectre infrarouge (KBr) de (9)

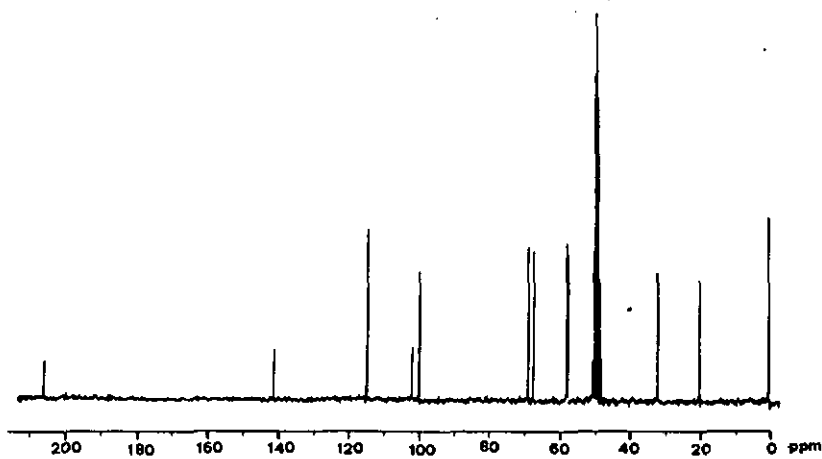


Fig.51. Spectre ^{13}C -RMN (MeOH, 50,29 MHz) de (9)

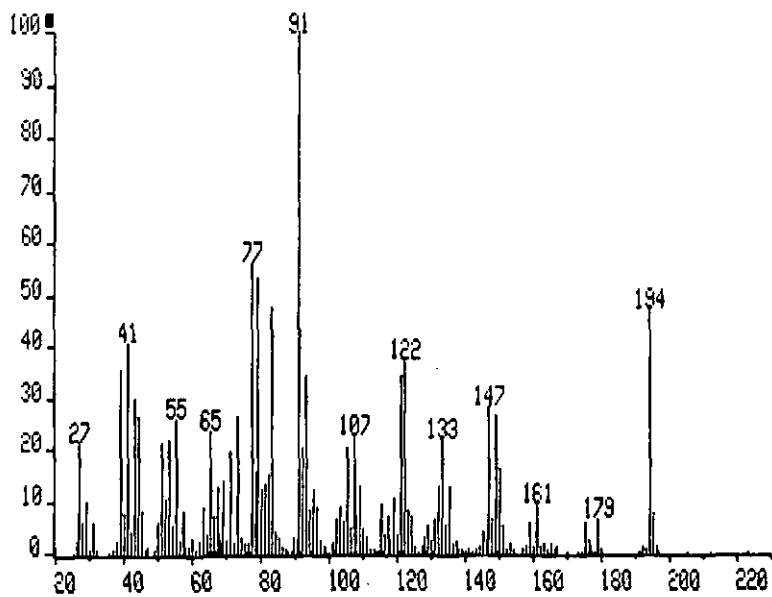


Fig.52. Spectre de masse de (9)

9.1. Formule brute:

Les nombreuses informations spectrales à disposition nous ont permis d'établir la formule brute de (9).

Le spectre ^1H -RMN met en évidence 14 protons; parmi eux, les deux protons du signal large à 2,25 ppm sont échangeables.

Du spectre ^{13}C -RMN, nous déduisons la présence de 11 atomes de carbone tandis que la multiplicité des signaux traduit la présence de 12 protons fixés sur des atomes de carbone.

Le spectre de masse de (9) indiquant un poids moléculaire de 194, nous pouvons compléter les informations précédentes et proposer la formule brute $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$. Cette formule a été confirmée par spectrométrie de masse à haute résolution qui nous a indiqué pour (9) un poids moléculaire de 194,0944 correspondant à la formule brute proposée avec une déviation de 0.0.

9.2. Analyse du spectre ^1H -RMN:

^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) 1,75 (m,3H); 2,25 (large,2H); 2,42 (m,2H); 3,32 (m,2H); 4,32 (m,1H); 4,56 (m,1H); 4,92 (m,1H); 4,97 (m,1H); 6,18 (m,1H).

De façon sûre, trois signaux peuvent d'emblée être attribués à des atomes d'hydrogène oléfiniques en raison de leurs déplacements chimiques élevés: 6,18, 4,97 et 4,92 ppm.

Le déplacement chimique à 1,75 ppm du groupe méthyle, ainsi que son couplage fin (0,5 Hz) laissent penser que ce dernier est fixé sur une double liaison: Cette hypothèse est vérifiée par l'irradiation du signal à 1,75 ppm faisant apparaître doublets ($J = 1,9$ Hz) les signaux à 4,92 et 4,97 ppm. Un tel système est caractéristique d'un fragment méthyl-vinyle.

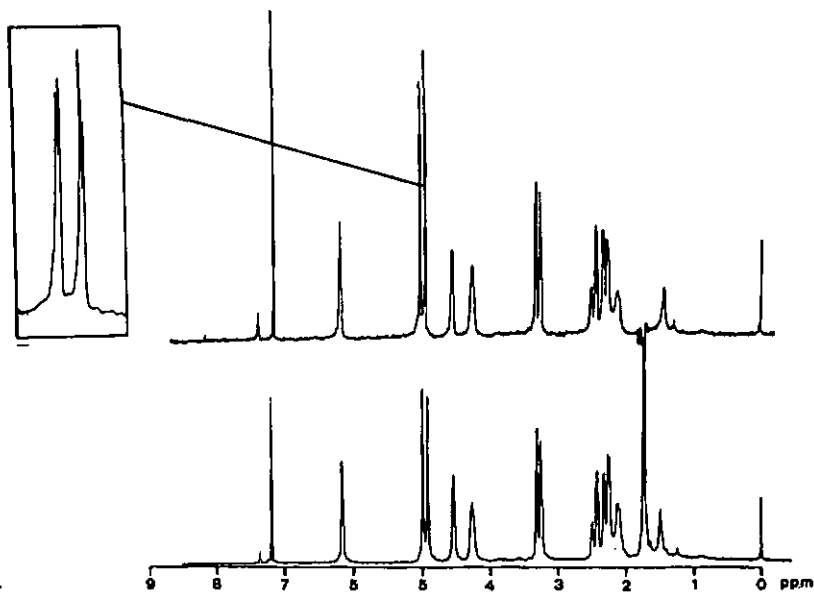


Fig.53. Mise en évidence des couplages du signal à 1,75 ppm

Le déplacement chimique du signal large à 2,25 ppm est modifié lors de variations de la concentration: par exemple, dans le spectre non découplé ci-dessus, on le trouve à 2,75 ppm. Lors de l'addition de D₂O à la solution, ce signal disparaît, mettant en évidence la présence de deux fonctions hydroxy.

9.3. Acétylation de (9):

Nous avons acétylé 1 mg de (9) par l'anhydride acétique en présence de pyridine. Après 14 heures à température ambiante, la réaction est quantitative de sorte que nous pouvons enregistrer directement le spectre ¹H-RMN.

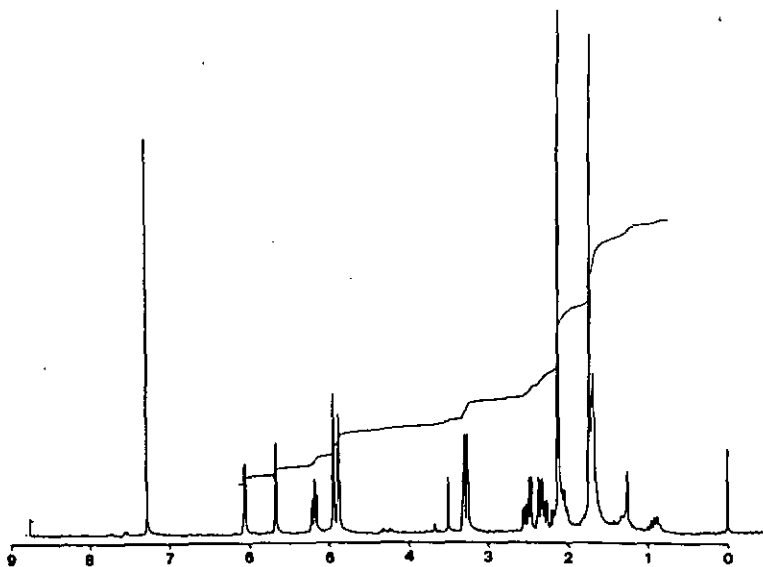


Fig.54. Spectre ^1H -RMN (CDCl_3 , 200 MHz) du produit acétylé

Remarque: Trois signaux de faible intensité dus à des impuretés apparaissent à 0,9, 1,2 et 3,6 ppm.

Par rapport au spectre de (9), le spectre du produit acétylé fait apparaître les modifications suivantes:

- L'apparition de six protons à 2,13 ppm ($\text{CH}_3\text{-CO-O-}$)
- Le déplacement à 5,62 et 5,18 ppm des signaux apparaissant dans le spectre du produit non-acétylé à 4,56 et 4,32 ppm respectivement.

La présence de deux fonctions hydroxy est donc confirmée et nous savons de plus qu'elles se trouvent sur les carbones porteurs des protons des signaux apparaissent à 4,32 et 4,56 ppm.

Dans le spectre du produit acétylé, le signal à 5,18 ppm apparaît sous forme de triplet. Cette multiplicité résulte de l'interaction entre l'atome d'hydrogène à 5,18 ppm et les deux protons du système complexe centré à 2,42 ppm.

9.4. Etude de (9) par double résonance:

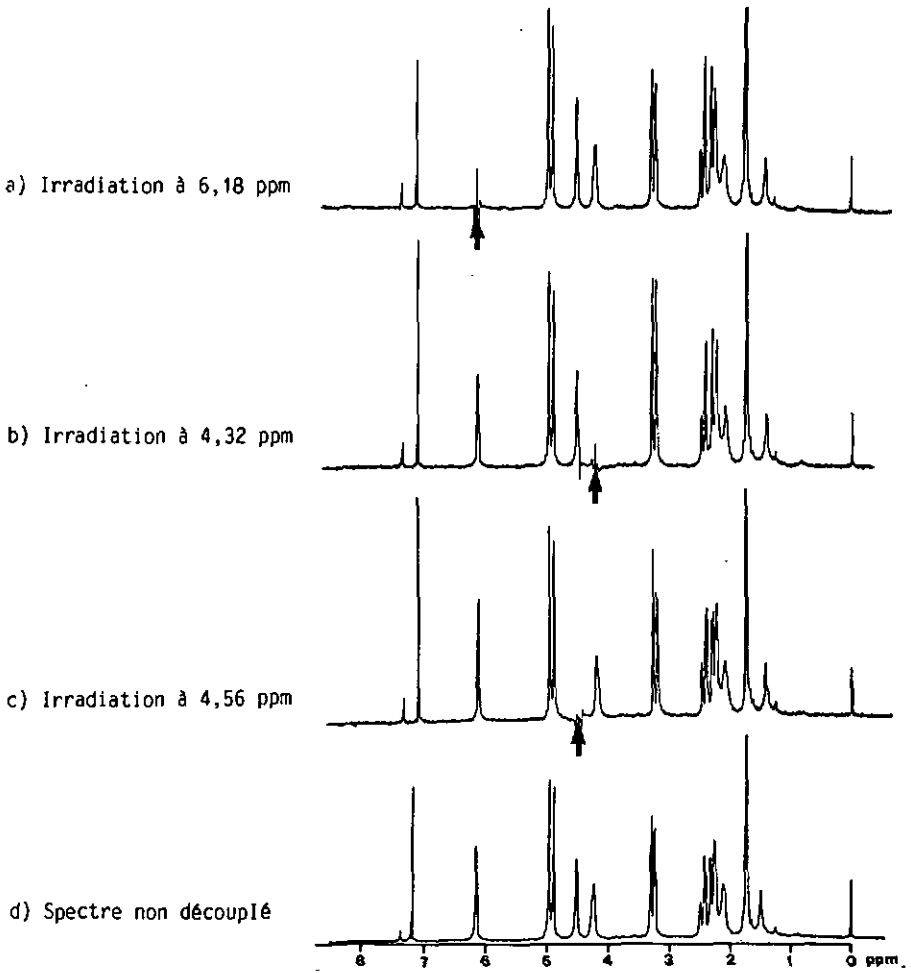


Fig.55. Etude de (9) par double résonance

L'irradiation du signal à 6,18 ppm engendre la disparition d'un couplage fin (allylique) dans le signal centré à 2,42 ppm et dont la structure AB apparaît alors clairement.

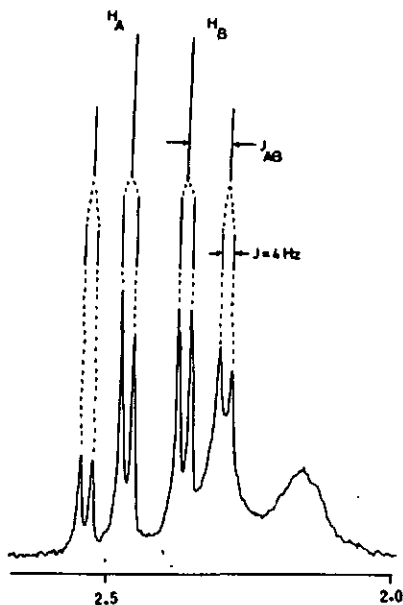
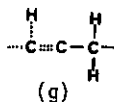


Fig.56. Signal à 2,42 ppm lors de l'irradiation à 6,18 ppm.

La constante de couplage J_{AB} (14,5 Hz) correspond à l'interaction de deux protons méthyléniques. Tout le système AB est de plus dédoublé par un couplage secondaire ($J=4\text{ Hz}$). Cette expérience de découplage met en évidence le fragment moléculaire (g).



L'irradiation du signal à 4,32 ppm modifie les signaux centrés à 2,42 et 3,32 ppm: Le signal à 2,42 ppm résultant de cette irradiation apparaît sous la forme d'un système AB dont la partie A est dédoublée par un couplage de 2,7 Hz, alors qu'un couplage de 1,5 Hz apparaît dans la partie B.

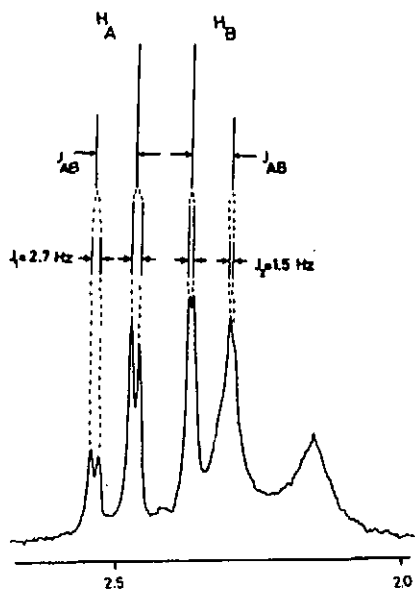


Fig.S7. Signal à 2,42 ppm lors de l'irradiation à 4,32 ppm.

Les constantes de couplage de 2,7 Hz et 1,5 Hz mises en évidence ci-dessus correspondent au couplage fin avec le proton oléfinique à 6,18 ppm.

Sous l'effet de l'irradiation à 4,32 ppm, le signal centré à 3,32 ppm apparaît sous forme d'un système AB ($J_{AB}=3,5$ Hz) dont les signaux de la partie A sont dédoublés sous l'effet d'un couplage secondaire ($J=1,5$ Hz). La faible constante de couplage J_{AB} traduit une interaction vicinale, tandis que les déplacements chimiques très voisins des protons H_A et H_B traduisent des substitutions semblables au niveau des atomes de carbone porteurs de H_A et H_B .

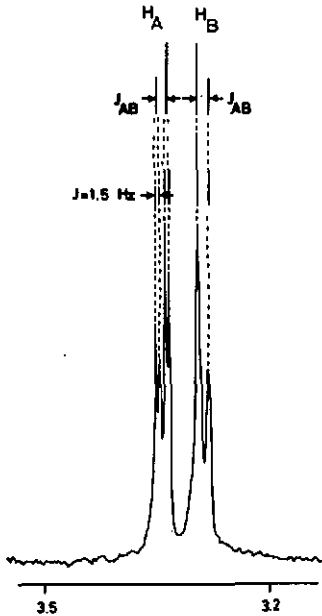
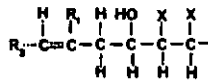


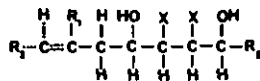
Fig.58. Signal à 3,32 ppm lors de l'irradiation à 4,32 ppm.

Les informations développées ci-dessus, permettent de compléter le fragment moléculaire (g):



(h)

L'irradiation du multiplet à 4,56 ppm a pour conséquence un affinement de la partie A du signal à 3,32 ppm. Le proton A montre la constante J_{AB} à laquelle vient s'ajouter un couplage à longue distance (J=0,9 Hz) qui résulte de l'interaction mise en évidence ci-dessus avec le proton à 4,32 ppm. Le fragment moléculaire (h) peut alors être complété de la manière suivante:



(i)

9.5. Analyse du spectre infrarouge:

Le spectre infrarouge de (9) met en évidence les groupements fonctionnels suivants:

- Liaison allénique : 1956 cm^{-1} ($\nu_{as}\text{C=C}$); 1080 cm^{-1} ($\nu_s\text{C=C}$)
- Fonction hydroxy : 3400 et 1010 cm^{-1}
- Double liaison terminale ($>\text{C}=\text{CH}_2$) : $3080, 2975, 1620$ et 890 cm^{-1}

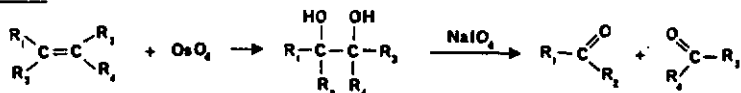
Remarque: La faible valeur de la vibration $\nu_{(\text{C}=\text{C})}$ (1620 cm^{-1}) Indique une double liaison conjuguée. Cette observation est corroborée par le spectre UV de (9) qui montre une absorption maximale à 225 nm .

- Fonction époxy : 3000 et 1250 cm^{-1}

9.6. Clivage de la double liaison:

Afin de confirmer la présence de la double liaison terminale, nous avons hydroxylé cette dernière avec le tétraoxyde d'osmium et clivé le diol formé par le periodate de sodium.

Réaction:



Afin de ne pas risquer le déclenchement de réactions secondaires sur les fonctions hydroxy, nous avons effectué la réaction sur le produit acétylé. le produit réactionnel a été analysé par spectrométrie de masse et $^1\text{H-RMN}$.

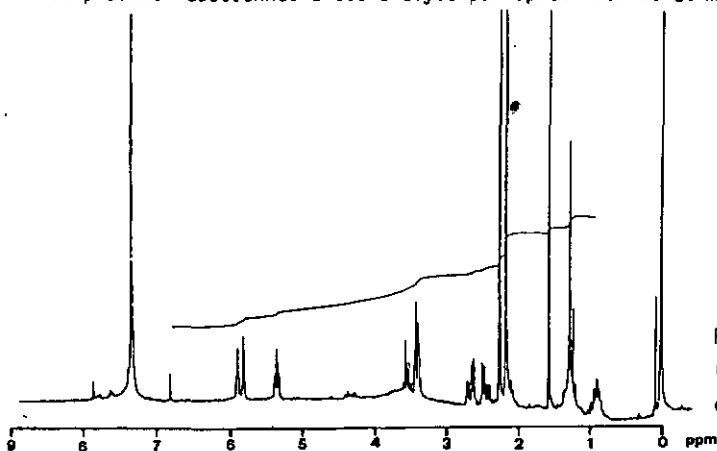


Fig.59. Spectre $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 200 MHz) du produit réactionnel

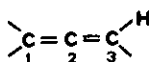
Par rapport au spectre $^1\text{H-RMN}$ du produit acétylé, nous constatons d'une part la disparition des deux signaux à 4,92 et 4,97 ppm et d'autre part, l'apparition d'un groupe méthyle cétonique à 2,23 ppm. Ce résultat confirme donc la présence d'un groupe méthyl-vinyle.

Le spectre de masse du produit final montre un pic moléculaire à m/z 280, en accord avec l'acétylation des deux fonctions hydroxy et le clivage oxydatif de la double liaison terminale de (9).

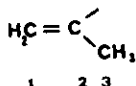
9.7. Analyse du spectre $^{13}\text{C-RMN}$:

$^{13}\text{C-RMN}$ (COCl_2 , 50,29 MHz) : 205,30 (s), 140,58 (s), 114,15 (t), 101,49 (s), 99,36 (d), 68,38 (d), 66,93 (d), 57,52 (d), 57,15 (d), 31,82 (t), 19,97 (q).

Le groupe allénique est évident dans le spectre $^{13}\text{C-RMN}$ de (9), en particulier le signal du carbone sp, dont le pic très caractéristique apparaît à 205,30 ppm (s,C-2); les autres carbones apparaissent à 101,49 ppm (s,C-1) et 99,36 (d,C-3).



Les carbones du groupe méthyl-vinyle apparaissent à 140,58 ppm (s,C-2), 114,15 ppm (t,C-1) et 19,97 ppm (q,C-3).



Les deux doublets visibles à 66,92 et 68,38 ppm sont les signaux des deux carbones porteurs de fonctions hydroxy, tandis que les deux doublets très voisins à 57,15 et 57,52 ppm traduisent les carbones de la fonction époxy. Le triplet dont le déplacement chimique vaut 31,82 ppm correspond au carbone porteur des deux protons du système AB centré à 2,42 ppm.

La mesure des constantes de couplage entre le proton oléfinique ($\delta = 6,18$ ppm) et le système AB ($\delta = 2,42$ ppm) indique des valeurs de 2,4 et 1,3 Hz. Ces constantes étant nettement plus en rapport avec un couplage al-lénique qu'avec un couplage vicinal, c'est la structure (XXI) qui semble corres-pondre le mieux avec les caractéristiques spectrales de (9).

9.9. Détermination de la structure de (9) par diffraction des rayons X:

La détermination de la structure de (9) par diffraction des rayons X a été entreprise dans le but de confirmer la structure proposée de la molé-cule et de préciser sa géométrie.

Des monocristaux ont été obtenus par évaporation lente d'une solution du produit dans un mélange chloroforme-n-heptane (5:1).

La structure déterminée par diffraction des rayons X figure ci-dessous. Elle confirme la proposition (XXI) déduite des données spectroscopiques. Dans les tableaux 12,13 et 14, nous avons rassemblé les données concernant la longueur des liaisons, les angles de liaison ainsi que les angles de torsion.

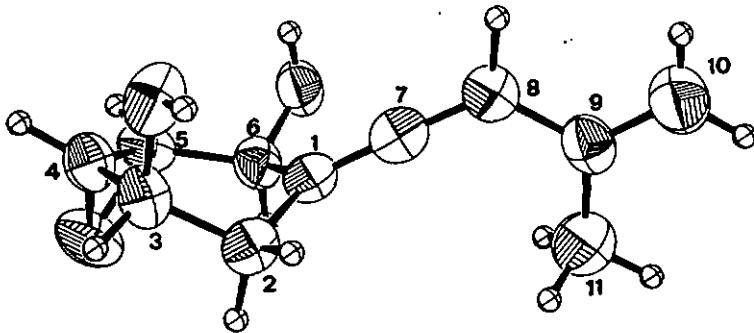


Fig.60 a. Représentation tridimensionnelle de (9)

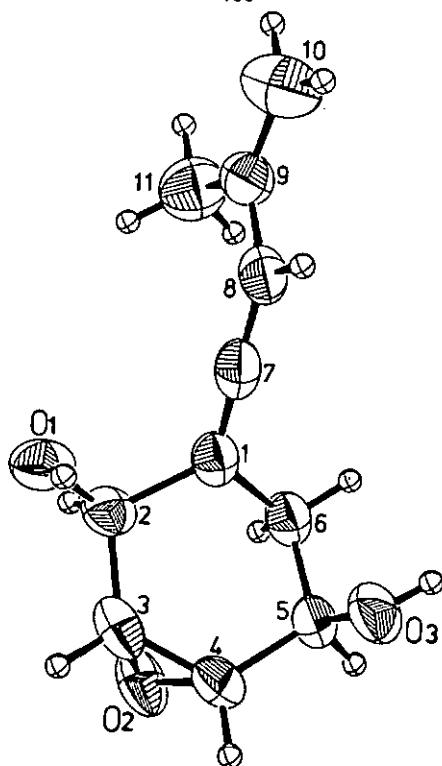


Fig.60 b. Représentation tridimensionnelle de (9).

Le cycle à six membres possède une conformation demi-chaise; un axe de symétrie d'ordre C₂ coupe en leur milieu les liaisons C(3)-C(4) et C(1)-C(6). Le plan moyen contenant les atomes C(2), C(1), C(6), C(7), C(8) (planaire avec une marge de 0,01 Å) fait un angle de 86,5° avec le plan moyen contenant les atomes C(7), C(8), C(9), C(10) et C(11) (planaire avec une marge de 0,03 Å).

C(1) - C(2)	: 1,509(4)	C(4) - C(5)	: 1,500(4)
C(1) - C(6)	: 1,493(4)	C(5) - C(6)	: 1,507(4)
C(1) - C(7)	: 1,305(4)	C(5) - O(3)	: 1,420(4)
C(2) - C(3)	: 1,507(4)	C(7) - C(8)	: 1,313(4)
C(2) - O(1)	: 1,407(4)	C(8) - C(9)	: 1,462(4)
C(3) - C(4)	: 1,461(5)	C(9) - C(10)	: 1,320(4)
C(3) - O(2)	: 1,449(4)	C(10) - C(11)	: 1,489(5)
C(4) - O(2)	: 1,443(3)		

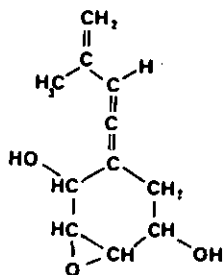
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	: -9,5	H(2)-C(2)-C(3)-H(3)	: -90,7
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	: 0,4	H(3)-C(3)-C(4)-H(4)	: -11,2
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	: -20,4	H(4)-C(4)-C(5)-H(5)	: 60,2
C(4)-C(5)-C(6)-C(1)	: 49,8	H(5)-C(5)-C(6)-H(6a)	: -58,2
C(5)-C(6)-C(1)-C(2)	: -62,2	H(5)-C(5)-C(6)-H(6b)	: 56,3
		H(6a)-C(6)-C(1)-C(7)	: -7,8
		H(6b)-C(6)-C(1)-C(7)	: -126,0
		H(8)-C(8)-C(7)-C(1)	: -131,2

Tableau 13. Angles de torsion [°]

C(2)-C(1)-C(6)	: 114,5(3)	C(3)-C(4)-C(5)	: 119,8(2)
C(2)-C(1)-C(7)	: 122,3(2)	O(2)-C(4)-C(5)	: 114,5(2)
C(6)-C(1)-C(7)	: 123,2(3)	C(4)-C(5)-C(6)	: 112,1(2)
C(1)-C(2)-C(3)	: 111,4(2)	C(4)-C(5)-O(3)	: 105,1(2)
C(1)-O(2)-O(1)	: 111,2(2)	O(3)-C(5)-C(6)	: 111,7(2)
C(3)-C(2)-O(1)	: 114,0(2)	C(5)-C(6)-C(1)	: 111,5(2)
C(2)-C(3)-C(4)	: 123,1(2)	C(1)-C(7)-C(8)	: 178,7(3)
C(2)-C(3)-O(2)	: 115,6(4)	C(7)-C(8)-C(9)	: 124,3(3)
O(2)-C(3)-C(4)	: 59,4(4)	C(8)-C(9)-C(10)	: 118,7(3)
C(3)-O(2)-C(4)	: 60,7(2)	C(8)-C(9)-C(11)	: 118,3(3)
C(3)-C(4)-O(2)	: 59,2(2)	C(10)-C(9)-C(11)	: 123,0(3)

Tableau 14. Angles de liaison [°]

Structure de (9):



époxy-3,4-(méthyl-3-butadienylidène)-1
cyclohexane-2,5-diol

10. IDENTIFICATION DE (10) :

0,8 mg de (10) ont été isolés à partir de E.2 par chromatographie préparative sur plaque de silicagel. Ce produit, non visible en lumière UV est révélé comme une tache verte avec H_2SO_4 20 % (Rf: silicagel ($CHCl_3$ -AcOEt (7:3)) : 0,40).

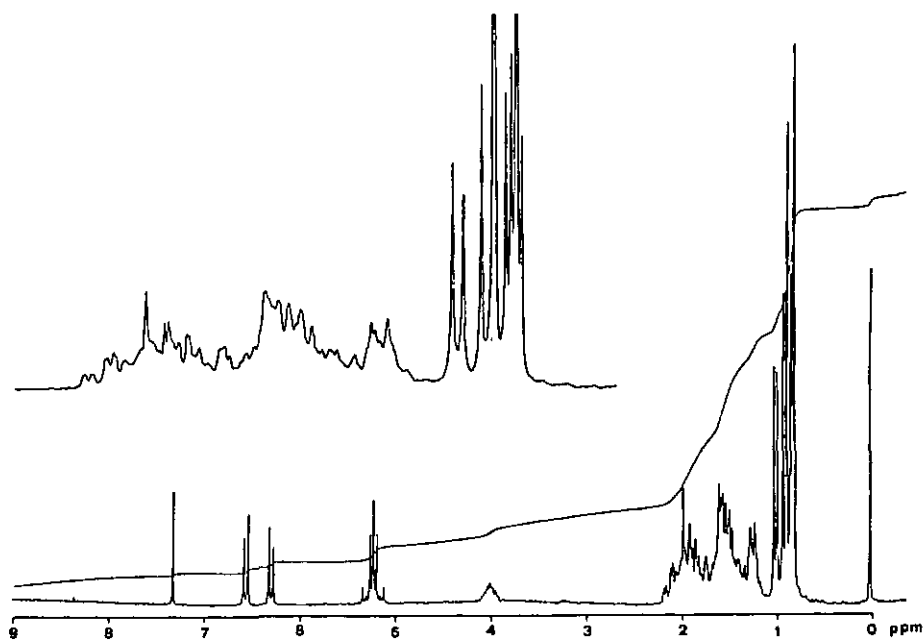


Fig.61. Spectre 1H -RMN ($CDCl_3$, 200 MHz) de (10).



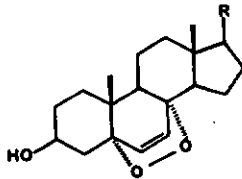
Fig.62. Spectre de masse de (10)

Le spectre $^1\text{H-RMN}$ met en évidence les entités suivantes:

- Les protons correspondant à six groupes méthyles entre 0,75 et 1,1 ppm.
- Deux protons vinyliques apparaissant à 5,18 ppm (partie AB d'un système ABX).
- Un système AB centré à 6,45 ppm ($J_{AB}=15$ Hz) correspondant à deux protons vinyliques fortement déblindés. Les valeurs des constantes observées traduisent des couplages vicinaux.

Ces informations suggèrent un composé de nature stéroïdique. La comparaison des R_f du cholestérol et de (10) sur plaque de silicagel ($\text{CHCl}_3, \text{AcOEt}$ (7:2)) indique des valeurs de 0,51 et 0,40 respectivement; (10) est donc un composé plus polaire que le cholestérol.

Dans le spectre de masse, le pic moléculaire de (10) apparaît à m/z 428; il perd une molécule d'oxygène pour créer le pic de base du spectre à m/z 396. Cette fragmentation, ainsi que le fragment à m/z 253 caractérisent selon GUNATILAKA et DJERASSI [33] un noyau épidoxy stérol du type:

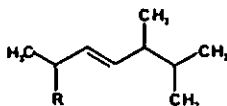


La perte du fragment m/z 59 à partir du fragment m/z 396 selon le mécanisme du schéma 6. confirme la substitution du cycle A, ainsi que l'absence de double liaison entre les carbones C-9 et C-11.

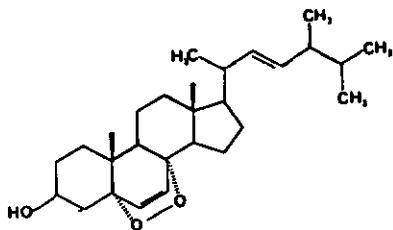
Dans le spectre $^1\text{H-RMN}$, le signal large à 3,95 ppm (H-(C-3)) est caractéristique d'une fonction hydroxy en position β .

En outre, la présence de la fonction peroxyde entre les carbones C-5 et C-8 justifie le déplacement chimique élevé du système AB vinylique à 6,45 ppm.

Les constatations développées ci-dessus et notamment l'analyse de (10) par spectrométrie de masse suggèrent d'identifier ce produit comme étant le peroxyde d'ergostérol. La comparaison des déplacements chimiques observés avec ceux d'un échantillon authentique montre un accord total: Parmi les signaux des protons méthyliques, nous pouvons déceler la présence de quatre doublets à 0,81, 0,85, 0,91 et 1,00 ppm satisfaisant à la structure ci-dessous pour la chaîne latérale:



Structure de (10):



(10)

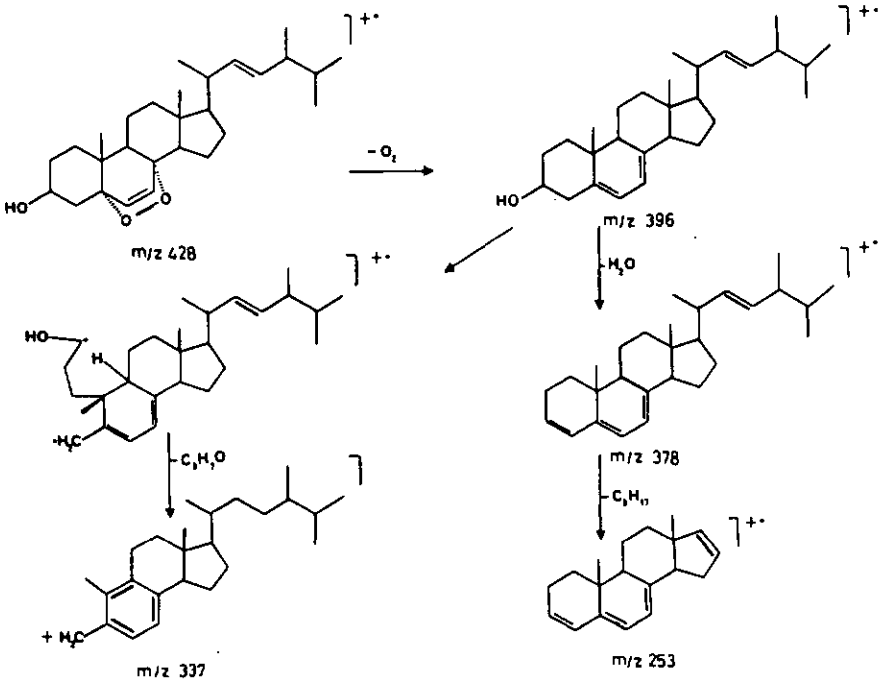


Schéma 6. Fragmentation du peroxyde d'ergostérol [33].

11. ANALYSE DE LA FRACTION E.1 :

Nous avons isolé 0,9 mg de E.1. En chromatographie sur couche mince de gel de silice, cette fraction montre un R_f (CHCl_3 -AcOEt (7:2)) de 0,56. Le spot n'est pas visible en lumière UV et est révélé comme une tache brune par H_2SO_4 20%.

Afin de situer la nature de la fraction E.1, nous avons procédé à l'enregistrement de son spectre ^1H -RMN: Ce dernier, d'aspect semblable au spectre de (10), traduit la nature stéroïdique de E.1 et laisse apparaître la présence vraisemblable de plusieurs produits: Une chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire OV-73, 18 m (220-330 °C, 5 °C/min) montre deux pics majoritaires; en plus de ces derniers, on distingue la présence de deux pics secondaires ainsi que quelques substances à l'état de traces. Compte tenu des faibles quantités d'échantillon disponibles, nous avons résolu de procéder à l'analyse de E.1 par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (CG-SM).

11.1. Analyse de E.1 par CG-SM:

Nous avons préparé les dérivés triméthylsilylés des stéroïdes de E.1 en faisant réagir 0,8 mg de E.1 avec 0,4 ml d'un mélange pyridine- BSTFA (1:1) à température ambiante pendant une nuit. Le mélange réactionnel a été séparé par chromatographie en phase gazeuse, chaque pic étant ensuite analysé par spectrométrie de masse. Nous avons relevé les spectres de masse des substances suivantes:

Substance	t_R [min]
(11)	12,8
(12)	13,1
(13)	13,8
(14)	13,9
(15)	14,1

Tableau 15. Temps de rétention des substances analysées par CG-SM.

Colonne : OV-1, capillaire, 10 m, $\phi_{int.}$: 0,3 mm
T.inj. : 220 °C
T.délect. : 300 °C
T. col. : 220-300 °C, 4 °C/min
Injection : 1 μ l, splitless

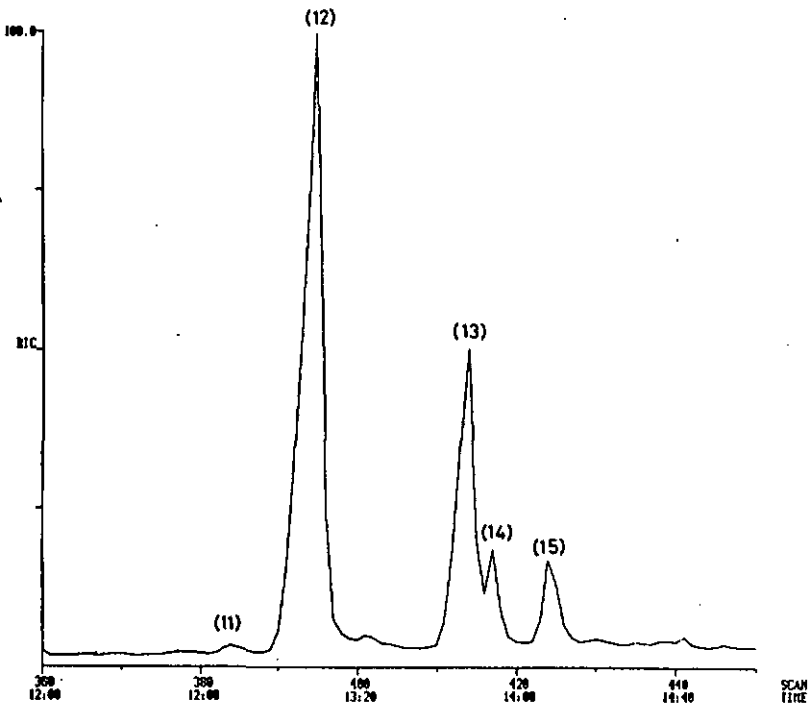


Fig.62. Séparation de E.1 par chromatographie en phase gazeuse.

11.2. IDENTIFICATION DE (12):

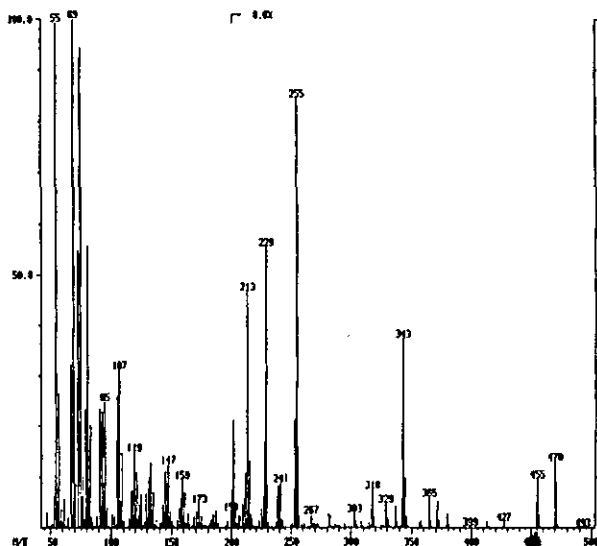
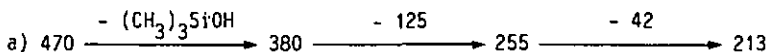
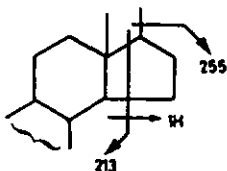


Fig.63. Spectre de masse de (12)

Le pic moléculaire à m/z 470 correspond à un stérol en C-28, porteur de deux insaturations. Nous pouvons relever les fragmentations typiques suivantes:



Les pertes des fragemnts m/z 125 et 42 caractérisent un stéroïde substitué en C-17 [35]: La perte de 125 unités correspond à l'élimination de la chaîne latérale qui est suivie de l'ouverture du cycle D par la perte du fragment m/z 42.



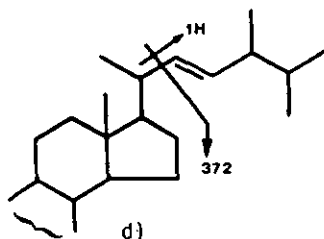
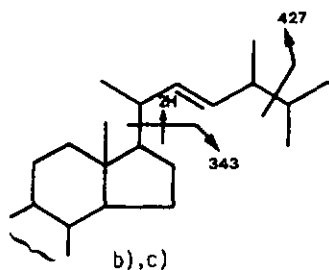
Cette fragmentation caractéristique permet d'attribuer à la chaîne latérale la formule brute C_9H_{17} et d'y déceler la présence d'une double liaison.

b) 470 \longrightarrow 343

c) 470 \longrightarrow 427

d) 470 \longrightarrow 372

Ces trois fragmentations typiques au niveau de la chaîne latérale permettent selon WYLLIE et OJERASSI [36] de localiser la double liaison en C-22(23):

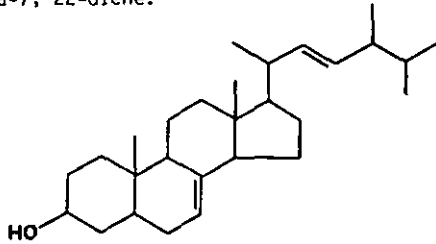


L'analyse du spectre 1H -RMN du mélange E.1 est en accord avec les conclusions tirées du spectre de masse et permet de localiser la seconde double liaison dans le noyau stéroïdique. En effet, le déplacement chimique des protons du groupe méthyle (C-18) vaut 0,54 ppm; une valeur aussi basse n'apparaît que dans les stéroïdes possédant une double liaison en C-7. La structure de la chaîne latérale est confirmée par la comparaison des déplacements chimiques des protons méthyliques C-21, C-26, C-27 et C-28 avec les valeurs publiées par Matsumoto [37] pour le 3-acétoxyergosta-7,22-diène.

δ [ppm]	C-21	C-26	C-27	C-28
Mesuré	1,01	0,82	0,83	0,91
Réf. [37]	1,01	0,82	0,84	0,91

Tableau 16. Déplacements chimiques des protons de la chaîne latérale

Les considérations ci-dessus permettent d'identifier (12) comme le 3-hydroxyergosta-7, 22-diène.



(12)

11.3. IDENTIFICATION DE (13):

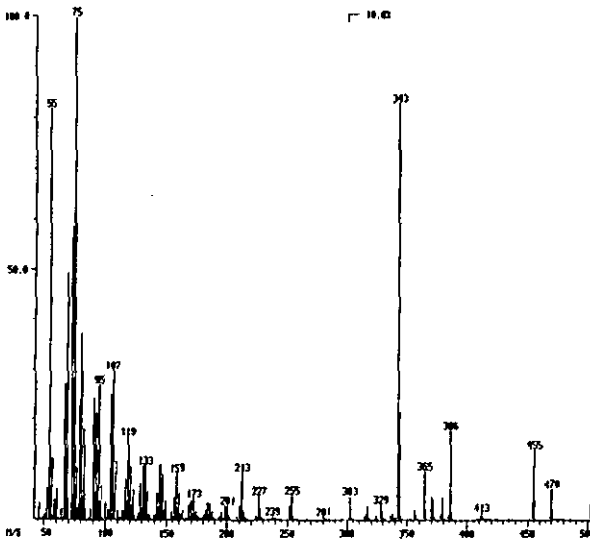
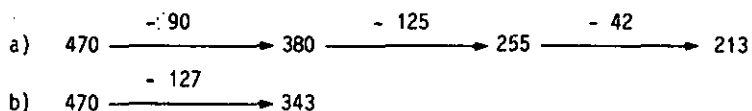


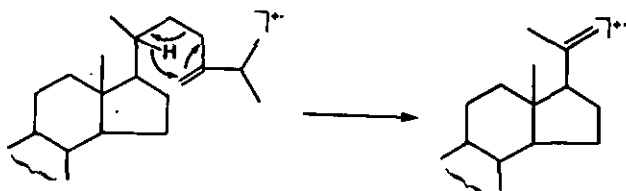
Fig.64. Spectre de masse de (13)

Le pic moléculaire de (13) apparaît comme dans le spectre de (12) à m/z 470: (13) est donc également un stérol en C-28 avec deux insaturations.

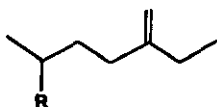
Deux fragmentations caractéristiques d'une chaîne latérale de formule brute C_9H_{17} avec une insaturation apparaissent de la même manière que dans le spectre de (12):



Toutefois, par rapport à (12), (13) ne subit pas la perte de 43 par rupture allylique de la liaison C-24 - C-25, mais perd le fragment m/z 84 pour donner le fragment m/z 386. Selon WYLLIE et DJERASSI [36], cette fragmentation est très typique des stérols possédant une double liaison en C-24(28) et s'explique par la "transposition de Mc Lafferty" suivante:



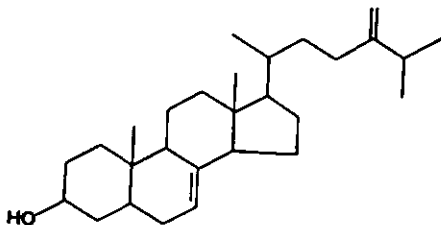
Le spectre 1H -RMN de E.1 confirme les informations ci-dessus: En effet, un système AB oléfinique ($J_{AB} = 1$ Hz) est centré à 4,69 ppm; ce signal est caractéristique de deux atomes d'hydrogène oléfiniques en position géminale. Nous admettons donc pour la chaîne latérale la structure ci-dessous qui est confirmée par la comparaison des déplacements chimiques des protons méthylliques en C-21, C-26 et C-27 avec les valeurs publiées par ITOH [38]



δ [ppm]	C-26	C-27	C-21
Mesuré	1,01	1,01	0,96
Réf. [38]	1,02	1,02	0,96

Tableau 17. Déplacements chimiques des protons de la chaîne latérale

En outre, les signaux correspondant aux carbones C-18 et C-19 à 0,54 et 0,80 ppm impliquent la localisation de la double liaison en C-7 comme précédemment. Nous pouvons alors identifier (13) comme le 3-hydroxyergosta-7 24(28)-diène.



(13)

11.4. IDENTIFICATION DE (14):

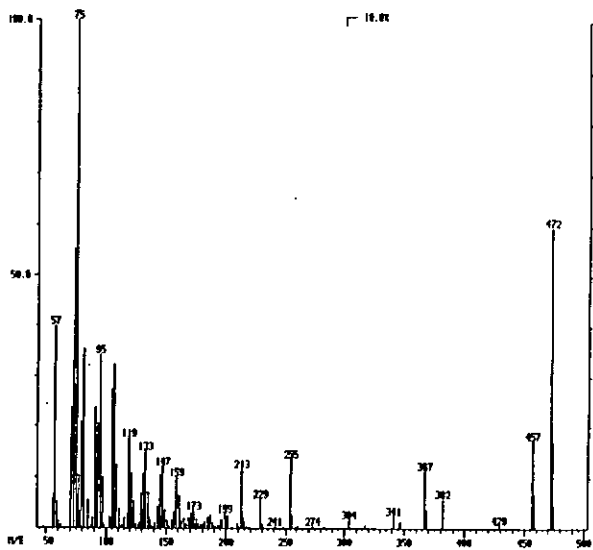
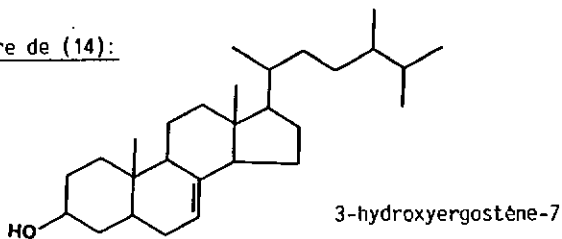


Fig.65. Spectre de masse de (14)

Le pic moléculaire apparaît à m/z 472. L'augmentation de deux unités de masse par rapport au spectre de (13), ainsi que l'accroissement faible (6 sec) du temps de rétention suggèrent que (14) est un homologue partiellement saturé de (13).

L'élimination de la chaîne latérale suivie de la perte du fragment 42 conduit comme dans les spectres précédents aux pics m/z 255 et m/z 213: Ceci implique un noyau stéroïdique identique à ceux de (12) et (13) et par conséquent une chaîne latérale saturée. Ce dernier point est confirmé par l'absence de signal à m/z 343 (perte de la chaîne latérale + 2H).

Structure de (14):



(14)

11.5. IDENTIFICATION DE (15):

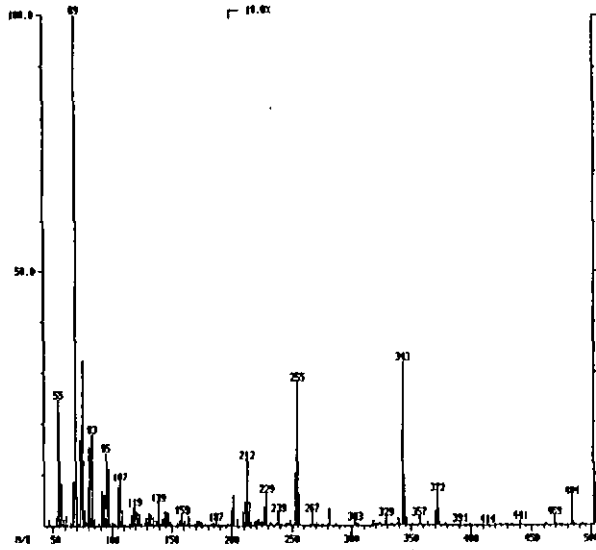


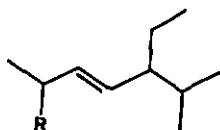
Fig.66. Spectre de masse de (15)

Le pic moléculaire est bien visible à m/z 484: L'observation des fragments laisse apparaître des filiations identiques à celles observées dans le spectre de (12), à savoir:

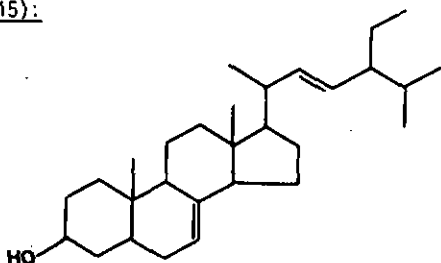
- a) $484 \xrightarrow{-(\text{CH}_3)_3\text{SiOH}, -139} 255 \xrightarrow{-42} 213$
- b) $484 \longrightarrow 343$
- c) $484 \longrightarrow 441$
- d) $484 \longrightarrow 372$

Les ions-fragments m/z 255,213 et 343 impliquent un noyau stéroïdique identique à ceux rencontrés précédemment. En effet, compte tenu de l'absence totale de signal dans le spectre $^1\text{H-RMN}$ entre 0,55 et 0,80 ppm, nous pouvons avec certitude localiser la double liaison en position 7.

Les fragmentations b),c) et d) permettent, comme dans le cas de (12) de localiser la double liaison en C-22(23); de plus, comme l'augmentation du poids moléculaire de 14 unités ne se retrouve que dans le ion m/z 441, issu de la rupture allylique de la liaison C-24 - C-25, nous pouvons conclure à la structure suivante de la chaîne latérale:



Structure de (15):



(15): 24-éthyl 3-hydroxycholesta-7,22-diène

11.6. IDENTIFICATION DE (11):

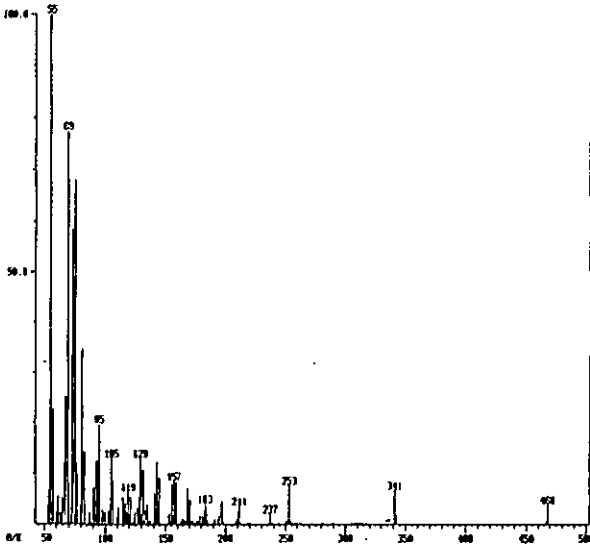
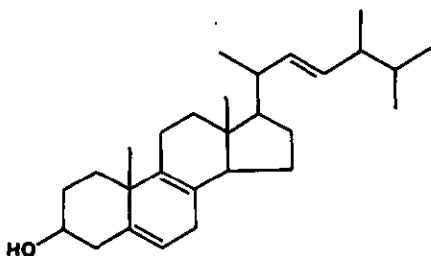


Fig.67. Spectre de masse de (11)

Ce composé, présent en traces, montre un pic moléculaire à m/z 468, inférieur de deux unités au pic moléculaire de (12). Nous relevons les fragments typiques suivants: m/z 341, 253, 211. A l'évidence, ces ions sont issus des mêmes fragmentations que celles conduisant aux ions à m/z 343, 355 et 213 dans les spectres de (12) à (15). Nous pouvons donc déduire la présence d'un noyau stéroïdique porteur de deux insaturations. Pour sa part, le pic m/z 341 indique une chaîne latérale avec une insaturation. En raison de la faible concentration de (11) dans le mélange, peu d'informations supplémentaires peuvent être déduites du spectre de masse. Toutefois les informations réunies ci-dessus ainsi que la comparaison du temps de rétention de (11) avec les valeurs citées par ITOH [39] pour différents stéroïls en C 28 nous autorise à identifier (11) comme le 3-hydroxyergosta-5,8 22-triéne .



(11): 3-hydroxyergosta-5,8 22-triène

La confirmation finale de la structure proposée est obtenue par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire OV-73 qui montre des temps de rétention identiques pour (11) et un échantillon de 3-hydroxyergosta-5,8 22-triène de référence.

11.7. REMARQUE:

Dans le tableau ci-dessous, nous avons comparé les temps de rétention des stéroïdes (11) à (15) avec des valeurs de référence proposées par ITOH [39]; à savoir les temps de rétention relatifs par rapport au cholestérol des dérivés acétylés de stéroïdes.

Les temps de rétention mesurés, ainsi que ceux cités en référence apparaissent dans le même ordre et attestent ainsi la cohérence des structures proposées.

Produit	t_R (relatif) [ITOH]	t_R (mesuré) [min]
3-hydroxyergosta-5,8 22-triéne	1,19	12,8
3-hydroxyergosta-7 22-diéne	1,26	13,1
3-hydroxyergosta-7 24(28)-diéne	1,43	13,8
3-hydroxyergosténe-7	1,46	13,9
24-éthyl 3-hydroxycholesta-7, 22-diéne	1,58	14,1

Tableau 18. Comparaison des temps de rétention sur colonne OV-1 des stérols identifiés dans E.1 avec des valeurs de référence [30].

IV

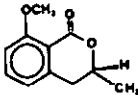
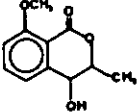
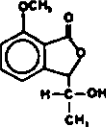
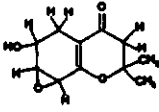
ETUDE BIOLOGIQUE

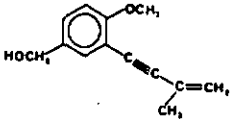
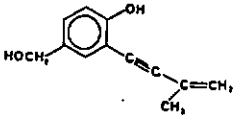
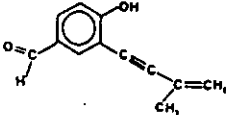
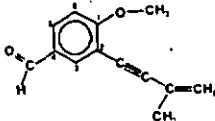
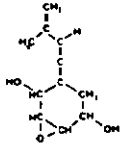
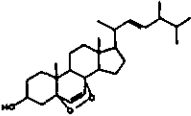
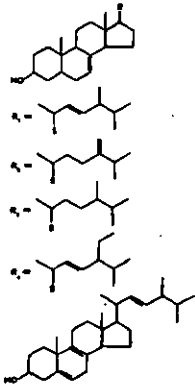
1. ETUDE DE LA PHYTOTOXICITE DES PRODUITS ISOLES :

Tous les composés isolés ont été soumis au test de toxicité. Ce dernier a été effectué dans les laboratoires de la Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, selon le mode opératoire décrit précédemment (cf test de toxicité).

En raison des faibles quantités de substances isolées, les tests ont été effectués sur des échantillons de poids compris entre 0,05 et 1,0 mg.

Tableau 19. Structure et activité des substances isolées.

Composé	Structure	Activité	Flétrissement
(1)		-	(-)
(2)		-	(-)
(3)		-	(-)
(4)		-	(-)

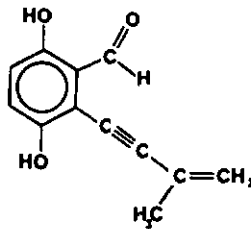
(5)		5,9	(++)
(6)		1,3	(+)
(7)		7,5	(++)
(8)		5,1	(+)
(9)		-	(-)
(10)		8,0	(++)
E.1		10,8	(++)

2. Discussion des résultats:

Les tests biologiques appliqués à tous les produits isolés révèlent de nettes différences dans les réponses des tomates aux diverses substances: D'après leur activité, les produits peuvent être classés en trois catégories:

- (1) Les produits phytotoxiques: Ce sont les composés (5) et (7), ainsi que (10) et les stéroïdes de la fraction E.1. Des solutions très diluées de ces composés (50 $\mu\text{g/ml}$) montrent une activité phytotoxique intense se traduisant par des pertes de poids comprises entre 5,9 et 11 %.
- (2) Les produits peu phytotoxiques: Il s'agit de (6) et de (8) qui, à des concentrations de l'ordre de 50 $\mu\text{g/ml}$ entraînent une perte de poids des tomates de 1,3 et 5,1 % respectivement. Dans ces cas également, un flétrissement léger mais parfaitement visible apparaît. L'effet toxique est plus évident encore si l'on tient compte du fait que le témoin testé simultanément montre une augmentation de poids de 6,1 %.
- (3) Les produits non phytotoxiques: Il s'agit de (1), (2), (3), (4) et (9). Plongées dans des solutions de ces substances, les tomates ne présentent aucun flétrissement et leur poids augmente de 0,5 à 3 %.

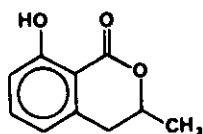
La frustulosine (1), un métabolite secondaire de *Stereum frustulosum* présentant des groupes fonctionnels identiques à ceux des composés aromatiques isolés, à savoir phénol, aldéhyde ainsi qu'une chaîne isopentène-3 ynyl-1, a été isolée par NAIR [34].



(XXII)
Frustulosine

Ce métabolite antibiotique montre une activité vis à vis de bactéries telles Staphylococcus aureus, Bacillus mycoIdes et Bacillus subtilis. NAIR signale également la toxicité de ce composé vis à vis de certaines espèces de champignons, mais sans autre précision. L'activité phytotoxique présentée par (5) et (7) n'est donc pas très surprenante, compte tenu de l'analogie structurale décrite ci-dessus.

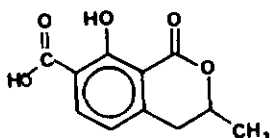
Plus étonnante en revanche est l'activité nulle montrée par les trois isocoumarines (1), (2) et (3). En effet, ces composés sont des dérivés de la melléine (XXIII), métabolite secondaire bien connu de Septoria nodorum et dont l'énantiomère R-(-) est responsable de la septoriose du blé [40]. En outre, sa toxicité a été mise en évidence par son pouvoir inhibiteur de la croissance du coléoptile et des racines de plantules de blé.



(XXIII)

Melléine (=ochracine)

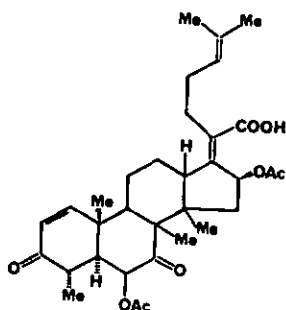
La melléine fait partie d'un groupe d'isocoumarines isolées de divers Aspergillus, elle est le précurseur biologique de l'acide carboxy-7 dihydro-3,4 hydroxy-8 méthyl-3 isocoumarique (XXIV), constituant des ochratoxines (métabolites hépato et néphrotoxiques produits par les Aspergillus).



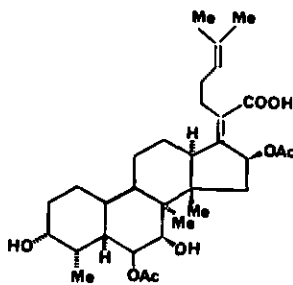
(XXIV)

A l'exception de (15), tous les composés stéroïdiques isolés possèdent 28 atomes de carbone et sont apparentés à l'ergostérol. Ce dernier a été mis en évidence dans une grande variété de champignons et on a relevé son abondance particulière dans les levures [41]. Le peroxyde d'ergostérol est également fréquemment obtenu à partir de champignons. Certaines réserves ont été émises quant à l'origine naturelle du peroxyde d'ergostérol qui, selon ADAM [42] serait un artéfact généré lors du processus d'isolement. Néanmoins, l'étude de la conversion de l'ergostérol en son épidioxyde par WHITE [43] chez Penicillium rubrum et Gibberella fujikuroi montre que les voies chimique (photooxydation) et enzymatique jouent un rôle. Remarquons encore, que l'oxygène à l'état singulet peut être obtenu par activation de l'oxygène moléculaire par les hème protéines, constituants centraux des oxygénases chez les animaux, les insectes et les microorganismes. Dans ce cas, la formation d'épidioxydes à partir de l'oxygène moléculaire doit également être considérée comme un processus biologique.

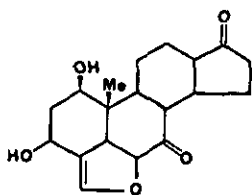
A l'exception du 3-hydroxycholesta-7 éthyl-24 22-diène, les constituants de la fraction E.1 sont mentionnés par TURNER [44] comme des métabolites connus des champignons. Cependant, à ce jour, aucune indication quant à une action phytotoxique des stéroïdes décelés n'a été publiée. Il est toutefois intéressant de remarquer que des composés de nature stéroïdique montrent une activité phytotoxique intense [45]: il s'agit de l'acide helvoïque (XXV), la cephalosporine P₁ (XXVI), le déméthoxyviridiol (XXVII) et les falsiculols (XXVIII).



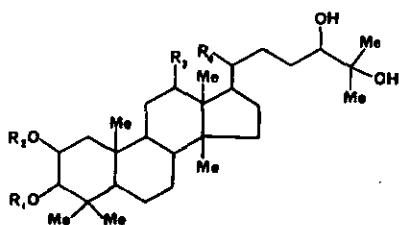
(XXV)



(XXVI)



(XXVII)



(XXVIII)

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
A	H	H	H	Me
B	H	H	OH	Me
C	H	H	OH	CH ₂ OH
D	H	X	OH	Me
E	X	H	OH	CH ₂ OH
F	H	X	OH	CH ₂ OH



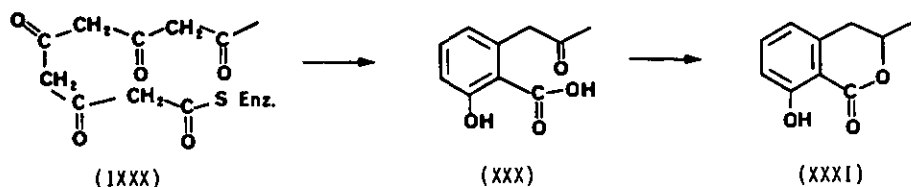
Fig.68. Structure de quelques stéroïdes phytotoxiques connus

3. ORIGINE BIOGENETIQUE DES PRODUITS ISOLES :

3.1. Isocoumarines (1), (2), (3):

Ces produits, tous apparentés à la melleïne, font partie du groupe des composés polycétoniques; plus précisément, il s'agit de composés pentacétoniques. La biosynthèse de telles substances résulte de la polycondensation d'un fragment acétyle avec plusieurs unités malonyles.

Dans le cas des composés pentacétoniques, une unité d'acétyl-S-CoA réagit avec quatre unités de malonyl-S-CoA sous action enzymatique. Le composé polycétonique résultant (IXXX) possède des groupes méthylènes actifs qui peuvent prendre part à des condensations aldoliques internes conduisant à des composés aromatiques (XXXI)..



La lactonisation des composés du type (XXX) conduit au groupe des isocoumarines (XXXI); il est important de remarquer que tous les composés de cette série conservent le groupe hydroxy en ortho du groupe carboxylique originel.

Diverses modifications structurales sont possibles à partir de l'intermédiaire polycétonique (IXXX):

- La perte d'un ou plusieurs atomes d'oxygène par réduction d'une fonction cétonique et déshydratation de l'alcool résultant.
- L'introduction électrophile de groupes alkyles, notamment un groupe méthyle à partir de la méthionine.
- Oxydation de groupes alkyles.
- Réduction de fonctions carboxyliques.
- Couplages oxydatifs inter ou intramoléculaires.

3.2. Stéroïdes (10) à (15):

La biogénèse des stéroïdes est bien connue: Nous en avons résumé les étapes principales dans le schéma ci-dessous [45]:

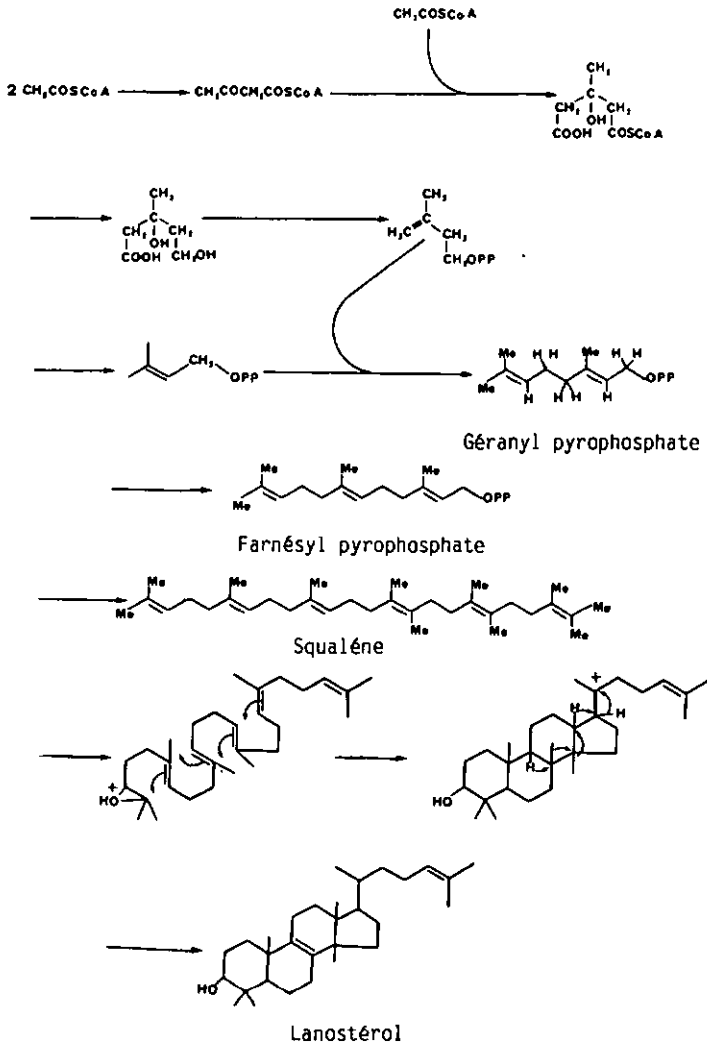


Schéma 7: Biogénèse des stéroïdes chez les champignons [45].

Le lanostérol peut évoluer vers la formation de stéroïds en C-28. Le squelette stéroïdique à 28 atomes de carbone est accessible grâce aux deux réactions suivantes:

- La déméthylation des positions C-4 et C-14.
- La méthylation en C-24.

a) Déméthylation en C-4:

Cette réaction s'effectue par hydroxylation du groupe méthyl-4 α , suivie d'une oxydation fournissant le méthyl-4 α carboxy-4 stérol-3. La décarboxylation de la carboxy-4 cétone-3 a lieu ensuite, avec inversion du groupe méthyle restant qui se trouve alors en configuration α .

L'élimination du second groupe méthyle en C-4 s'effectue de manière analogue.

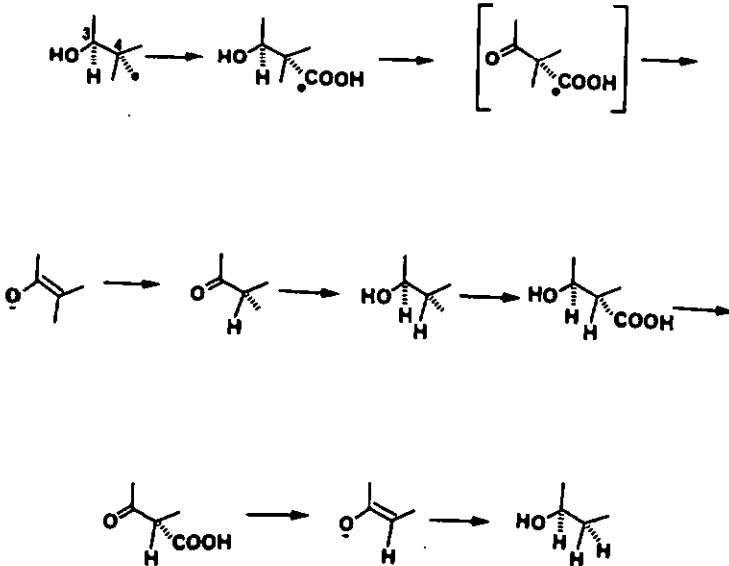


Schéma 8. Mécanisme réactionnel de la déméthylation des stéroïdes en C-4 [45]

b) Déméthylation en C-14:

L'élimination du groupe méthyle en C-14 se déroule selon le mécanisme ci-dessous avec notamment la formation d'une double liaison en C-14(15). L'atome de carbone en C-14 est éliminé dans ce cas sous la forme d'acide formique.

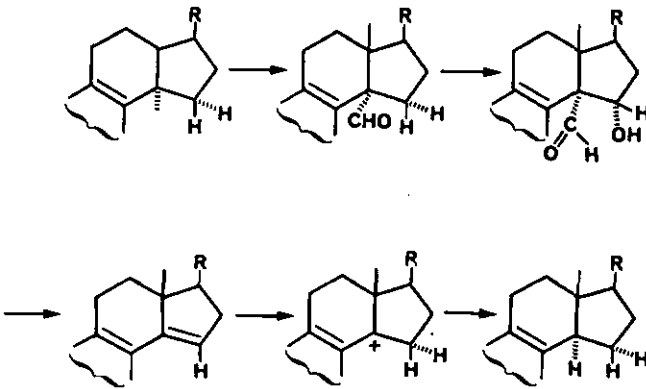


Schéma 9. Mécanisme réactionnel de la déméthylation des stéroïdes en C-14 [45]

c) Méthylation en C-24.

Un groupe méthyle peut être introduit en C-24 par transméthylation à partir de l'adényl-S méthionine selon le mécanisme suivant:

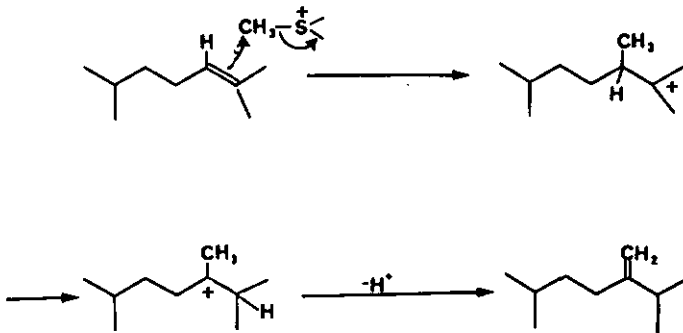
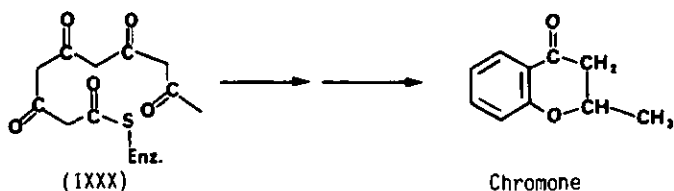


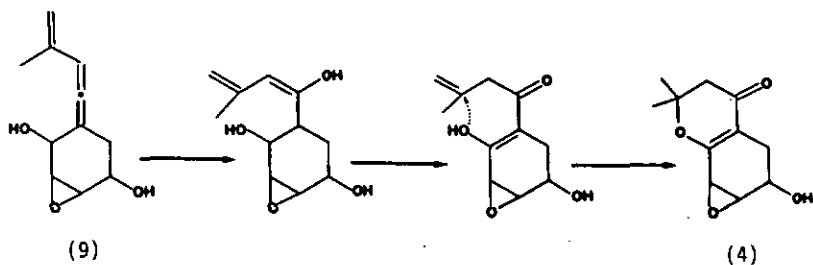
Schéma 9. Mécanisme réactionnel de la méthylation des stéroïdes en C-24 [45]

3.3. Chromone (4):

De même que les isocoumarines décrites au paragraphe 3.1., (4) peut également être considéré comme un produit du métabolisme acétate-polymalonate: en effet, TURNER [41] envisage la formation des chromones à partir de l'intermédiaire polycétonique (IXXX) ci-dessous par la cyclisation suivante:



Une approche différente, consistant à mettre en relation la structure de (9) avec celle de (4) nous a conduit à émettre l'hypothèse non vérifiée, que ce dernier est un produit de dégradation de (9); ce processus comprendrait en particulier une oxydation du carbone central de la fonction allénique et une cyclisation entre la fonction hydroxy en C-6 et l'atome de carbone oléfinique C-9.

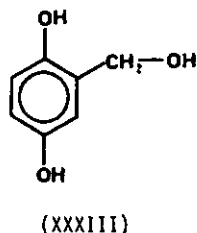
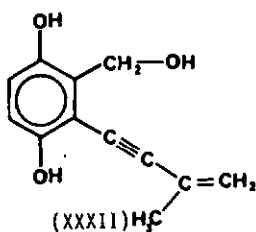


3.4. Composés aromatiques (5), (6), (7), (8):

Une étude de la biogénèse de ces composés nouveaux sort du cadre du présent travail. Remarquons cependant que NAIR [34] envisage la formation du frustulosinol (XXXII) à partir d'une double source:

- la chaîne latérale proviendrait de l'acide mévalonique.
- Le reste de la molécule serait dérivé à partir de l'acide shikimique.

NAIR base son hypothèse sur le fait que le frustulosinol ne diffère que par sa chaîne latérale de l'alcool gentisique (XXXIII) lequel peut être biosynthétisé par deux voies différentes : A partir de l'acétate ou à partir de l'acide shikimique.



La structure des composés isolés est en accord avec l'hypothèse de NAIR.

- La formation de la chaîne latérale à partir de l'acétyl-CoA via l'acide mévalonique est la voie la plus probable.
- L'origine du cycle aromatique à partir de l'acide shikimique semble confirmée par la substitution des composés isolés (hydroxy en para du groupe carbinol) qui semble irréalisable par condensation d'un composé polycétonique.

V

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE :

L'analyse du milieu de culture d'Eutypa armeniacae nous a permis d'identifier 15 métabolites secondaires, parmi lesquels 7 (composés (3) à (9)) n'ont à ce jour jamais été décrits.

De la structure chimique des composés identifiés, il ressort que leur biogénèse procède selon la voie acétate-polymalonate; font probablement exception les composés (5)-(8) dont l'origine d'une partie au moins de la molécule est l'acide shikimique. Remarquons que chez les champignons imparfaits, le métabolisme des composés polycétoniques produit la majorité des métabolites, tandis que les composés formés au départ de l'acide shikimique sont rares [46].

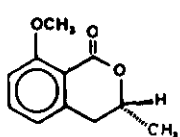
Parmi les composés isolés, cinq ont une activité phytotoxique évidente. Bien que n'écartant pas la participation d'une ou de plusieurs substances isolées à l'action toxique d'Eutypa armeniacae, nous estimons que ce ne sont certainement pas les déterminants majeurs de l'eutypiose: En effet, l'activité maximale des extraits se trouve non pas dans la phase éthérée, mais dans les eaux de lavage du charbon actif. L'échec des diverses tentatives de séparation de cet éluat nous suggère que l'activité toxique ne résulte certainement pas de l'action d'une seule substance, mais au contraire de la présence d'un complexe toxique: L'activité biologique de ce dernier est donc le fruit de l'action combinée de plusieurs substances.

Perspectives:

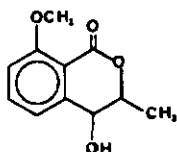
La compréhension de l'action toxique d'Eutypa armeniacae nécessite une connaissance de la nature chimique des constituants des fractions actives. Dans ce but, une analyse systématique des métabolites des autres fractions montrant une activité devrait être entreprise. La purification des constituants de ces fractions est apparue particulièrement délicate, en raison d'une part de leur polarité élevée et d'autre part de leur très faible abondance. Remarquons à ce sujet que l'optique de travail devrait être modifiée: En effet, nous avons choisi d'isoler des substances naturelles chimiquement intactes, dans le but de suivre tout au long de la purification la variation de l'activité. Dans ce but, nous avons limité nos investigations à des techniques de séparation garantissant la non-modification des substances du mélange. Dans le cadre d'une recherche ultérieure, nous estimons que dans un premier temps au moins,

cette démarche devrait être modifiée et qu'une dégradation chimique (hydrolyse par exemple) devrait être tentée sur les produits ou les mélanges actifs au stade de purification par chromatographie d'exclusion: Le but étant d'obtenir des composés plus facilement séparables et dont l'identification serait simplifiée et permettrait de situer la nature des composants de la fraction toxique.

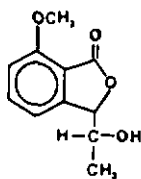
Parallèlement, un accroissement de la quantité de matériel de départ devrait être recherché, par exemple par l'utilisation de fermenteurs. Notons toutefois qu'une attention particulière devrait être donnée dans ce cas à la détection de modifications de la composition du milieu de culture engendrées par un nouveau mode de culture.



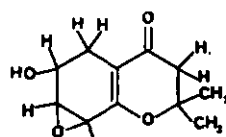
(1)



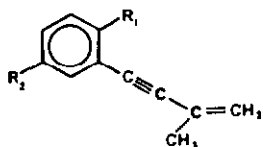
(2)



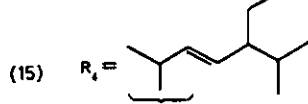
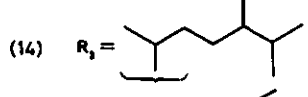
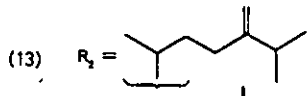
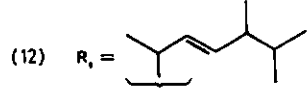
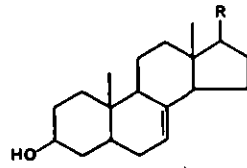
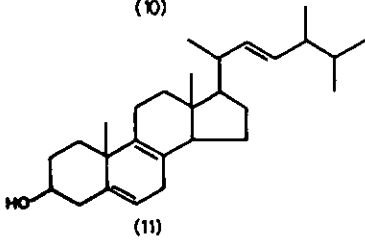
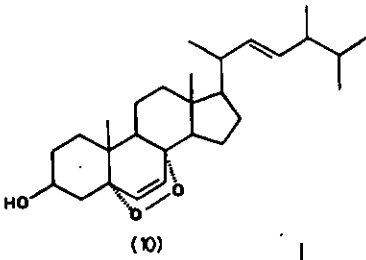
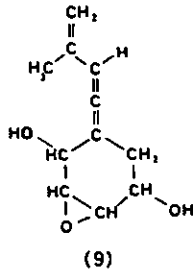
(3)



(4)



- | | | |
|-----|-----------------|------------------|
| (5) | $R_1 = -O-CH_3$ | $R_2 = -CH_2-OH$ |
| (6) | $R_1 = -OH$ | $R_2 = -CH_2-OH$ |
| (7) | $R_1 = -OH$ | $R_2 = -CHO$ |
| (8) | $R_1 = -O-CH_3$ | $R_2 = -CHO$ |



VI

PARTIE EXPERIMENTALE

1. TESTS PRELIMINAIRES:

1.1. Extraction liquide-solide:

1,2 g de filtrat du milieu de culture lyophilisés sont placés dans un extracteur de Soxhlet et soumis au protocole d'extraction suivant:

- | | | | |
|---------------------|--------------|---|--------------|
| 1. Hexane | 200 ml, 24 h | : | fraction A.1 |
| 2. Ether | 200 ml, 24 h | : | fraction A.2 |
| 3. Acétate d'éthyle | 200 ml, 24 h | : | fraction A.3 |
| 4. Méthanol | 200 ml, 24 h | : | fraction A.4 |

Un aliquot de chaque fraction est prélevé et soumis au test de toxicité.

1.2. Extraction liquide-liquide:

Le matériel de départ est constitué de 2 g de milieu de culture lyophilisés et dissous dans 30 ml d'eau désionisée. La solution est tout d'abord déprotéinée par addition de méthanol (200 ml) et maintenue pendant 14 heures à 5°C. Puis, après concentration, on ajuste le pH du surnageant à 3 (HCl 2N) et procède à son extraction avec quatre portions de 50 ml d'éther. La fraction étherée, B.1, est soumise au test de toxicité après séchage sur $MgSO_4$ anhydre.

Le pH de la solution est ensuite amené à 10 (NaOH 2N) et l'extraction effectuée à nouveau avec 4 fois 50 ml d'éther. Cette seconde phase étherée, B.2, est testée ainsi que la phase aqueuse résiduelle B.3 après neutralisation.

1.3. Chromatographie liquide sur gel de silice:

0,6 g du filtrat du milieu de culture dissous dans 15 ml d'eau désionisée constituent le matériel de départ. Comme précédemment, cette solution est déprotéinée au méthanol puis, après concentration, le surnageant est appliqué sur une plaque de gel de silice (Merck, 60 F₂₅₄, 1 mm).

Eluant : IsoproOH, NH₃ 25 %, H₂O (6:2:1)

Migration : 10 cm

Détection : UV 254 et 360 nm, H₂SO₄ 20 %

Six fractions sont récoltées par lavage du silicagel avec une solution MeOH-H₂O (8:2).

fraction	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6
Rf	0	0.14	0.23	0.30	0.46	0.80

Tableau 20. Rf (Silicagel, MeOH-H₂O (8:2)) des fractions isolées.

1.4. Adsorption de la toxine sur charbon actif:

500 ml du filtrat du milieu de culture sont concentrés à l'évaporateur rotatif sous pression réduite jusqu'à un volume de 100 ml. On ajoute alors au concentrat 5 g de charbon actif, Norit A (Sigma chemicals Co), et on maintient le tout à 5°C sous agitation pendant 15 heures. La suspension est ensuite centrifugée (5000 tours/min) pendant 10 min; le surnageant 0.1 est écarté.

Le traitement du charbon actif se poursuit par une série de lavages au moyen de différents systèmes de solvants; le protocole de lavage est le suivant:

1. Mise en suspension du charbon dans 100 ml du système de solvants.
2. Agitation de la suspension pendant 10 mn.
3. Centrifugation (5000 tours/min) pendant 10 min; le surnageant est écarté et soumis au test de toxicité.

Chaque lavage est effectué deux fois.

Liste des systèmes de solvants utilisés:

- | | | |
|--|---|----------------|
| 1. Ethanol 10% | : | Surnageant D.2 |
| 2. Ethanol 25% | : | Surnageant D.3 |
| 3. Ethanol 50% contenant 1% d'ammoniaque | : | Surnageant D.4 |
| 4. Pyridine-eau (1:1) | : | Surnageant D.5 |

La fraction pyridine-eau est concentrée par évaporation sous pression réduite et à une température inférieure à 40°C. De l'eau est ajoutée en cours d'évaporation afin de faciliter l'élimination de la pyridine.

2. FRACTIONNEMENT DE A.1 ET A.2:

2.1. Chromatographie sur échangeurs d'ions:

Colonne de verre, 20 x 1 cm

- | | | |
|-----------|---|-----------------------------|
| 1. Résine | : | Dowex 1 x 8, 200-400 mesh |
| Eluant | : | a) H ₂ O pH 7 |
| | | b) H ₂ O pH 9 |
| 2. Résine | : | Dowex 50w x 2, 200-400 mesh |
| Eluant | : | a) H ₂ O pH 7 |
| | | b) AcOH 0,1 N pH 4 |

2.2. Chromatographie préparative sur plaque:

1. Support : Silicagel 60 F₂₅₄, épaisseur 1 mm, sur plaque de verre. Merck.
Eluants : a) IsoproOH, NH₄OH 25%, H₂O (6:2:1,5)
b) Acétone-H₂O (92,5:7,5)
Détection : UV 254, 360 nm et H₂SO₄ 25%

2. Support : Cellulose, épaisseur 0,2 mm. sur plaque de verre. Merck.
Eluant : n-BuOH, acétone, NH₃, H₂O (10:10:2:5)
Détection : UV 254 et ninhydrine

2.3. Chromatographie liquide à haute pression:

- Colonne : 25 cm x 8 mm, Knauer RP18
Débit : 3 ml/min
Eluant : 100% B pendant 12 min
0% A à 100% pendant 40 min
- A: MeOH
O: H₂O
- Détection : UV 254 nm

2.4. Chromatographie d'exclusion:

Colonne de verre 20 x 1 cm

Support : a) Séphadex G15, (Pharmacia Chemicals)
b) Séphadex G10, (Pharmacia Chemicals)

Eluant : MeOH-H₂O (1:1)

Débit : 0,1 ml/min

3. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES:

3.1. CCM : Les chromatographies sur couche mince sont effectuées sur des plaques de gel de silice Merck, 60 F₂₅₄, de 0,2 mm d'épaisseur sur feuilles d'aluminium.

Des plaques de gel de silice Merck F₂₅₄ de 0,5, 1 et 2 mm d'épaisseur ont été utilisées à des fins préparatives suivant la quantité de produit à séparer.

3.2. Chromatographie liquide basse pression:

a) Phase stationnaire: gel de silice 60, Merck, 230-400 mesh.

Les dimensions des colonnes utilisées sont les suivantes:
0,6 x 12 cm, 1 x 20 cm.

Les colonnes sont préparées par voie humide; le gel de silice en suspension dans le premier éluant est introduit dans la colonne et tassé par le solvant choisi.

b) Phase stationnaire: Séphadex LH20, Pharmacia Chemicals, 25-100 μm .

Dimensions des colonnes utilisées: 40 x 2 cm, 60 x 5 cm. Notons que pour effectuer des séparations optimales par chromatographie sur gel de dextrane, le débit de la phase mobile doit être très faible, de l'ordre de 0,1 ml/min. Les colonnes sont préparées par voie humide: on laisse gonfler la phase pendant trois heures dans un mélange MeOH-H₂O (1:1), ensuite, la suspension est introduite dans la colonne et tassée avec l'éluant.

Remarque: Un mode opératoire identique a été suivi lors de l'utilisation des phases stationnaires suivantes:

- Séphadex G15, Pharmacia Chemicals, 40-120 μm .
- Séphadex G10, Pharmacia Chemicals, 40-120 μm .

3.3. HPLC:

La purification finale des différentes fractions a été effectuée par chromatographie liquide à haute pression au moyen d'une unité de pression Perkin-Elmer série 3B associée à un détecteur UV Perkin-Elmer LC 75.

Nous avons utilisé le principe de la chromatographie en phase inversée avec comme phase stationnaire du Lichrosorb RP 1B, 7 μm , Merck.

Pour les tests analytiques, nous avons employé une colonne de 250 x 4,6 mm, tandis que pour le travail à l'échelle semi-préparative, nous avons eu recours à une colonne de 8 x 250 mm. Comme solvants, nous avons utilisé exclusivement du méthanol, qualité HPLC, (Romyl Chemicals) et de l'eau désionisée distillée. Avant utilisation, ces solvants sont toujours filtrés sur membrane millipore 0,45 μm et dégazés par courant d'hélium.

3.4. Révélateurs CCM:

1. Chlorure de fer (III), réactif des phénols [18]
Solution de vaporisation: solution de FeCl_3 à 5% dans l'acide chlorhydrique 0,5 N.
Les zones correspondant aux phénols se colorent en bleu ou virent sur le vert.
2. Solution aqueuse d'acide sulfurique à 20%.

4. ACETYLATION:

A 1 mg d'échantillon à acétyler dissous dans 0,5 ml de pyridine distillée anhydre, on ajoute 1 ml d'anhydride acétique distillé. On laisse réagir pendant une nuit à température ambiante. Le réactif est neutralisé par 2 ml de méthanol. La pyridine est entraînée par évaporation sous vide avec 5 ml de toluène (3 fois). Au besoin, le produit de réaction est purifié par HPLC sur colonne RP 18, 7 μ m (Knauer).

5. PREPARATION DE DERIVES TRIMETHYLSILYLES:

Les dérivés triméthylsilylés des stérols sont obtenus en laissant réagir sous agitation à température ambiante pendant 14 heures 0,5 mg d'échantillon avec 0,4 ml d'un mélange pyridine-BSTFA (1:1).

- Pyridine puriss p.a. (Fluka) séchée sur KOH
- BSTFA (Pierce Eurochimie)

6. CLIVAGE OXYDATIF DES DOUBLES LIAISONS:

A 1 mg d'échantillon dissous dans 0,5 ml d'éther, on ajoute 0,5 ml d'une solution étherée de tétraoxyde d'osmium (1%). On laisse alors réagir à température ambiante jusqu'à observer un léger brunissement de la solution. On ajoute alors 2 mg de periodate de sodium et laisse réagir à température ambiante.

L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince: lorsque la totalité du produit de départ a disparu, on élimine l'excès de periodate de sodium par centrifugation.

On lave finalement deux fois la phase étherée avec 1 ml d'eau puis, après élimination du solvant, on sèche le produit de réaction sous vide.

7. ANALYSE INSTRUMENTALE:

- 7.1. RMN: Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur un appareil Bruker WP 200, à 200 MHz (^1H -RMN) et 50,29 MHz (^{13}C -RMN). Dans les deux cas, les déplacements chimiques ont été calculés avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence.
Nous avons eu recours aux abréviations suivantes:
s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet.
- 7.2. IR: Les spectres infrarouges ont été enregistrés en micro-pastilles de KBr ($\phi = 1,5$ mm) sur un appareil Perkin-Elmer, modèle 521. Les pastilles ont été préparées à partir de 70-100 μg d'échantillon broyé en présence de 25 mg de KBr.

- 7.3. SM: Les spectres de masse par impact électronique ont été enregistrés avec un appareil Hitachi-Perkin-Elmer RMU 6-L par introduction directe.
- 7.4. CG - SM: L'étude de E.3 par CG - SM a été effectuée au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse FINNIGAN 9610; colonne DV-1 capillaire (verre) ϕ_{int} : 0,3 mm, L = 10 m. Les spectres de masse des substances séparées ont été enregistrés sur un spectromètre FINNIGAN 4023 avec un potentiel d'ionisation de 70 eV.
- 7.5. $[\alpha]_D$: Les pouvoirs rotatoires sont mesurés en solution dans le chloroforme à température ambiante avec la raie D du sodium (589 nm) sur un polarimètre Perkin-Elmer 241.
- 7.6. UV: Les spectres UV ont été enregistrés en cours de séparation par chromatographie liquide à haute pression au moyen d'un détecteur à longueur d'onde variable, Perkin-Elmer LC 75.

8. DIFFRACTION DES RAYONS X:

Deux cristaux de dimensions similaires (0,15 x 0,25 x 0,4 mm) ont été utilisés pour la collection des données. Des photographies préliminaires de Weissenberg et de précession indiquent des cristaux orthorhombiques appartenant au groupe spatial $P2_12_12_1$. La mesure des intensités a été effectuée avec un diffractomètre Stoe STADI-2 à deux cercles, utilisant le rayonnement $Mo\ \alpha$. Domaine de mesure: $h = 0-4$, $k = 0-5$ avec $\theta < 25^\circ$. 1200 réflexions indépendantes ont été mesurées, 903 réflexions ont été considérées comme observées ($I < 1,5\sigma(I)$). La structure a été résolue par les méthodes directes à l'aide du programme SHELX-76 [47]. Dans les cycles finals d'affinement par la méthode des moindres

carrés, les atomes d'hydrogène ont été inclus dans les positions observées uniquement avec les facteurs de température isotropes. L'affinement par la méthode des moindres carrés à matrice entière pour 903 réflexions converge vers un indice résiduel $R = 0,041$. Dans le dernier cycle, la modification totale des paramètres était inférieure à 0,3 par rapport à la déviation standard estimée. Une synthèse de différence finale ne montre aucune densité résiduelle significative.

VII

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. BOLAY, W.J. MOLLER,
Revue suisse vitic., arboric., hortic., 9, 241-251 (1977).
- [2] M.V. CARTER, A. BOLAY, Phytopathologische Zeitschrift, 75, 187-9 (1972)
- [3] T. WICKS, Agric. Record, South Australia, 2, 14-20, (1975)
- [4] KOUYEAS H. & col., Phytopath. Z., 87(3), 260-3, (1976)
- [5] UYEMOTO & col., Plant. dis. repr., 60(18), 864-6, (1976)
- [6] D. TELIZ, P. VALLE, Plant. dis. rep., 63, 312-14, (1979)
- [7] J.M. DINGLEY, Orchard N.Z., 33, 78-9, (1960)
- [8] M.V. CARTER & col., Nature, 202, 1134, (1964)
- [9] M.V. CARTER, W.J. MOLLER, Plant dis. repr., 58(5), 442-3, (1974)
- [10] M.V. MOLLER, Phytopath. Medit., 15(2-3), 136-7, (1976)
- [11] W.J. MOLLER, J. LEHOCZKY, Phytopath. Z. 99, 116-25, (1980).
- [12] MATTHEE & col., Phytophylactica, 6, 131-2, (1974)
- [13] R. PEZET, Station féd. de recherches agronomiques de Changins,
rapport interne.
- [14] H.H. LUKE, V.E. GRACEN, Microbial toxins, Edit. KADIS & CIEGLER,
Acad. Press, London, New York (1972)
- [15] A. BALLIO, Experientia, 24, 631-5, (1968)
- [16] H. KERN, Phytotoxins in plant diseases, Edit. WOOD, BALLIO, GRANITI,
(Acad. Press, London, New York). 35, (1972)
- [17] M. BARBIER, Phytotoxins in Plant diseases, Edit. WOOD, BALLIO, GRANITI,
(Acad. Press, London, New York), 91, (1972)
- [18] TEMPLETON G.E., Microbial toxins, Edit. KADIS & CIEGLER (Acad. Press,
London, New York), 8, 169, (1972).
- [19] H.H. LUKE, V.E. GRACEN, Microbial toxins, Edit. KADIS & CIEGLER (Acad.
Press, London, New York), 8, 139, (1972)

- [20] G.G.CASINOVI, Phytotoxins in plant diseases, Edit. WOOD, BALLIO, GRANITI, (Acad. Press, London, New York), 112, (1972)
- [21] R.O. SCHEFFER, Toxins in plant diseases, Edit. R.O. DURBIN, (Acad. Press London, New York), 3, (1981).
- [22] A. STOESSL, Toxins in plant diseases, Edit. R.O. DURBIN, (Acad. Press, London, New York), 112, (1981)
- [23] D.S.P. PATTERSON, Environmental Chemistry, 2, 205-233, (1980)
- [24] W.H. TURNER, Fungal Metabolites, 2, Acad. Press. , London, (1971)
- [25] R.B. PRINGLE, R.P. SCHEFFER, Phytopathology, 53, 785-7, (1963)
- [26] F. SCHURING, C.A. SALEMINK, Microbial toxins, Edit. KADIS & CIEGLER, (Acad. Press, London, New York), 8, 193, (1972)
- [27] R.S. LIVINGSTON, R.P. SCHEFFER, Journal of biological chemistry, 256(4) 1705-1710, (1981)
- [28] Reactifs pour la chromatographie, Merck, Darmstadt. (1975)
- [29] M.J.RIX, B.R. WEBSTER, J. Chem. Soc. 8, 254-8, (1968)
- [30] F.W. WEHRLI, T. WIRTHLIN, Interpretation of carbon-13 NMR spectra, Heyden, London (1976)
- [31] M.DEVYS, J.F. BOUSQUET, Phytochemistry, 19, 2221-2, (1980)
- [32] PRETSCH, CLERC, SEIBL, SIMON, Spectral data for structure determination of organic compounds, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1983).
- [33] A.A. GUNATILAKA & Col, J. Drg. Chem., 46, 3860, (1981)
- [34] M.S.R. NAIR, M. ANCHEL, Phytochemistry, 16, 390, (1977).
- [35] BUDZIKIEWICZ, DJERASSI, WILLIAMS, Structure elucidation of natural products by mass spectrometry, 2, 94, Holden Day, (1964)
- [36] S.G. WYLLIE, C. DJERASSI, J. Drg. Chem., 33(1), 305, (1968)
- [37] T. MATSUMOTO, Phytochemistry, 22(5), 1300-1301, (1983)
- [38] T.ITOH, D.SICA, C.DJERASSI, J. Chem. Soc.Perkin Trans. I, 147, (1983)

- [39] T. ITOH & Col, J. of Chromatography, 234, 65-76, (1982).
- [40] M. DEVYS & col, Phytopathol. Z., 81, 92-94, (1974).
- [41] W.B. TURNER, Fungal metabolites, 128, Acad. Press, London, New York, (1971).
- [42] H.K. ADAM, Nature, 216, 397, (1967).
- [43] J.D. WHITE, J. Chem. Soc., Chem comm., 44, (1976).
- [44] W.B. TURNER, D.C. ALDRIDGE, Fungal matabolites II, 213, Acad. Press, London, New York, (1983).
- [45] J. McCORKINDALE, The filamentous fungi, Edit. SMITH & BERRY, (Edward Arnold, London), 2, 369, (1976).
- [46] W.B. TURNER, Fungal metabolites, 40, Acad. Press, London, New York, (1971).
- [47] G.M. SHELDRIK, Program for crystal structure determination, Univ. Cambridge, England, (1976).
- [48] A.STOESSL, Toxins in plant diseases, Edit. DURBIN, (Acad. Press, London, New York), 181, (1981).