

*Université de Neuchâtel  
Faculté des Sciences*

**Métabolites secondaires  
d'*Ophiostoma novo-ulmi* et  
de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*,  
pathogènes de l'orme et du platane**

*Thèse présentée à la faculté des sciences par  
Armelle MICHEL*

*Chimiste diplômée de l'Université de Pierre et Marie Curie VI  
Pour l'obtention du titre de  
Docteur ès Sciences*

## IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Métabolites secondaires d'*Ophiostoma novo-ulmi*  
et de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*,  
pathogènes de l'orme et du platane**

de Mme Armelle Michel

---

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

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

Mme N. Sellier (Paris),  
MM. R. Tabacchi (directeur de thèse),  
R. Deschenaux et A. Scala (Florence I)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 5 décembre 2001

Le doyen:



F. Zwahlen

à Olivier

à ma soeur, Gaëlle

à mes parents

à mes grands-parents

## *RESUME*

La maladie hollandaise de l'orme ou graphiose, sévit depuis 1919 sur tous les continents. Cette maladie est d'origine fongique. Le champignon responsable de la pandémie actuelle est *Ophiostoma* (= *Ceratocystis*) *novo-ulmi*. L'importante virulence de la souche provoque la mort rapide de l'arbre. Les symptômes principaux sont l'apparition d'une épinastie et d'une intense gommose à l'intérieur des vaisseaux du xylème.

L'étude des cultures de l'agent pathogène sur milieu liquide a permis d'isoler et d'identifier seize métabolites secondaires. Parmi ces métabolites, la 3-méthyl-3,5,8-trihydroxy-isochroman-1-one (**1**) est un nouveau produit naturel et la 3-méthyl-4,6,8-trihydroxy-isochroman-1-one (**2**), n'a jamais été isolé dans les familles *Ophiostoma* et *Ceratocystis*.

La recherche sur le matériel végétal a été effectuée sur des bois malades et sains ainsi que sur de la sève et des feuilles saines. La méthode utilisée est la chromatographie liquide sur phase inverse RP-C18 couplée à la spectrométrie de masse avec une source électrospray.

et Méthodes

Cette technique s'avère être idéale dans l'étude des mélanges complexes, avec des concentrations de produits de l'ordre du  $\text{mg.L}^{-1}$ . Dans les échantillons de bois malade extraits à l'éther et à l'hexane, treize métabolites ont été identifiés. Pour le matériel végétal sans symptômes apparents de graphiose, quatre composés ont été trouvés dans le bois, trois dans les feuilles et cinq dans la sève élaborée. Les différents métabolites sont caractérisés par leur temps de rétention et par leurs fragmentations en masse, avec les modes Full MS, SIM et SRM.

L'agent pathogène, *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*, est responsable du chancre coloré du platane. Des recherches sur le matériel végétal malade, d'un arbre infecté artificiellement par des spores de champignon, ont été également réalisées afin de trouver une relation entre les mêmes espèces de champignons et les maladies produites.

De ces nombreuses expériences, nous pouvons conclure à la présence de plusieurs toxines, de phytoalexines et de métabolites secondaires, dont leur rôle respectif dans les maladies n'ont pas encore été clairement établis.

La juglone (**6**) et l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque (**12**) sont des phytotoxines qui seraient à l'origine de la gommose et des symptômes foliaires. Des tests biologiques effectués sur des feuilles et des calcs d'orme, ont permis de quantifier leur pouvoir toxique. La 2-hydroxyjuglone (**22**) et la 3-hydroxyjuglone (**23**) sont aussi des toxines.

Le 4-hydroxybenzaldéhyde (**26**) est capable de diminuer faiblement la conductivité de l'eau, ce qui a pour conséquence est une réduction de la croissance de la plante.

La scytalone (**16**), métabolite faiblement toxique, est un des deux intermédiaires principaux de la DHN-mélanine fongique, pigment noir qui protège les champignons contre la lumière UV et l'irradiation solaire.

Le métabolite **1** a été identifié uniquement dans le bois malade, nous pouvons le classer dans la famille des composés toxiques. Il en est de même pour le protocatéchualdéhyde (**30**), le tryptophole (**13**) et la 6,8-dihydroxy-3-méthyl-isochromen-1-one (**19**).

Deux phytoalexines ont pu être mises en évidence : l'umbélliférone (**28**) et la scopolétine (**29**). Elles ont un rôle de défense de la plante contre les agents pathogènes.

Une similitude des structures des métabolites secondaires et de leurs toxicités respectives, dans les deux espèces voisines de champignons, ont été mise en évidence. La présence de protéines hydrophobes, telles que la cerato-ulmine et la fimbriatane, produites par les agents pathogènes, serviraient de transporteur de toxines de type quinone à l'intérieur des cellules. Par contre, la cerato-platanine de *C. fimbriata* sp. *platani* permettrait l'accumulation de phytoalexines.

## SUMMARY

Since 1919, the Dutch elm disease is rife in the world. The disease is of fungal origin. The fungus, *Ophiostoma* (= *Ceratocystis*) *novo-ulmi*, is related to the actual pandemy. The great virulence of the stump produces the quick death of the tree. The main symptoms are the appearance of an epinasty and a severe gummosis inside the vessels of the xylem.

The research in the liquid culture medium of the pathogenic agent allowed us to isolate and to identify sixteen secondary metabolites. Among these metabolites, the 3-methyl-3,5,8-trihydroxy-isochroman-1-on (**1**) is a new natural product and the 3-methyl-4,6,8-

trihydroxy-isochroman-1-on (**2**), has never been isolated from the *Ophiostoma* and *Ceratocystis* families.

Investigation of the plant material were carried out with infected and healthy woods, healthy leafs and healthy sap. The method used is liquid chromatography in reverse phase RP-C18 coupled to a mass spectrometer with an electrospray source. This technique turns out to be ideal for the search of complex mixtures, with products concentration in the mg.L<sup>-1</sup> range. In the infected wood ether and hexane sample extract, thirteen metabolites have been identified. In the plant material without the obvious symptoms of the Dutch elm disease, four compounds have been found in the wood, three in leaves and five in phloem sap. The different metabolites were characterizes by their retention time and their mass spectrometry fragmentations, in the Full MS, SIM and SRM modes.

The pathogenic agent, *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*, is related to the canker of the plane tree. Investigations of the infected plant material, the tree being infected artificially by the fungus's spores, have been realized too with the aim to find a relation between the same fungus species and the disease that they produced.

From these experiments, we can conclude that there is present of toxins and phytoalexins. The role of the secondary metabolites with the disease have not been clearly established.

Juglone (**6**) and 2,3-dihydroxybenzoic acid (**12**) are phytotoxins who are at the origin of gummosis and the foliar symptoms. The biological tests carried out on leafs and callus of elm, allowed to quantify to their toxic power. 2-hydroxyjuglone (**22**) and 3-hydroxyjuglone (**23**) were also toxins.

4-hydroxybenzaldehyde (**26**) is able to weakly decrease water conductivity, the consequence being the reduction in the plant's growth.

Scytalone (**16**), a weakly toxic metabolite, is one of the two principal intermediates of the fungous DHN-melanin, a black pigment which protects the fungi against UV light and solar irradiation.

The metabolite **1** has been identified in the infected wood only; we can file him in the family of toxic compounds. It is the same for protocatechualdehyde (**30**), tryptophol (**13**) and 6,8-dihydroxy-3-methyl-isochromen-1-on (**19**).

Two phytoalexins have been determined: umbelliferone (**28**) and scopoletin (**29**). They play a part of plant defence against the pathogen.

One similitude in the structure of the secondary metabolites and their respective toxicity, in the two species of neighbouring fungi, has been revealed. Presence of hydrophobic proteins, cerato-ulmin and fimbriatan, produced by the pathogen, serve as carriers of toxins of quinone type inside the cells. The cerato-platanin of *C. fimbriata* sp. *platani* will allow to the accumulation of phytoalexins.

## TABLE DES MATIERES

GLOSSAIRE.....

1

CHAPITRE I : INTRODUCTION.....

6

et Méthodes

## I. Généralités

	7
I-1. Introduction	7
I-2. La graphiose	7
I-3. Historique du champignon	8
I-4. Biologie et Pathogénie d' <i>O. novo-ulmi</i>	9
I-5. Vecteurs de la maladie	11
I-5.1. Les scolytes	11
I-5.2. La fusion des racines	13
I-5.3. Les hommes	13
I-6. Symptomatologie	13
I-7. Moyens de lutte	14
I-7.1. Sylviculture	14
I-7.2. Lutte chimique	15
I-7.3. Cemagref	16

II. Métabolites produit par *O. novo-ulmi*

	16
II-1. Composés phénoliques	16
II-2. Polysaccharides	17
II-3. Glycopeptide	17
II-4. Protéine	17

## III. But du travail

	18
--	----

## CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

	19
--	----

## I. Cultures fongiques

	20
--	----

et Méthodes

I-1.	Le milieu de culture	20
I-2.	Procédure d'extraction	20
I-3.	Procédure d'isolement	22
II. Matériel végétal		
II-1.	Extraction du bois	23
II-2.	Extraction des feuilles	23
II-3.	Extraction de la sève	23
III. Techniques chromatographiques		
III-1.	Chromatographie sur couche mince, CCM	23
III-2.	Chromatographie liquide à basse pression, LPLC	23
III-3.	Chromatographie liquide à haute pression, HPLC	23
IV. Méthodes spectroscopiques et spectrométriques		
IV-1.	Résonance magnétique nucléaire, RMN	24
IV-2.	Spectrométrie de masse	24
IV-2.1.	Modes EI et DCI	24
IV-2.2.	LC/MS	24
V. Spectrométrie de masse		
V-1.	L'impact électronique	25
V-2.	La source à impact électronique	25
V-3.	L'ionisation chimique par désorption	26

et Méthodes

V-4.	L'ionisation par électrospray	27
V-5.	L'ionisation chimique à pression atmosphérique	29
V-6.	Analyseur quadripolaire	30
V-7.	La trappe ionique	32

### CHAPITRE III : METABOLITES ISOLEES ET IDENTIFIES DU MILIEU DE CULTURE

36

#### I. Analyses et structures des métabolites isolés du milieu de culture

37

I-1.	3-Méthyl-3,5,8-trihydroxy-isochroman-1-one (1)	38
I-2.	3-Méthyl-4,6,8-trihydroxy-isochroman-1-one (2)	39
I-3.	6,8-Dihydroxy-3-hydroxyméthyl-isochromen-1-one (3)	42
I-4.	8-Hydroxy-3-hydroxyméthyl-6-méthoxy-isochromen-1-one (4)	44
I-5.	6,8-Dihydroxy-3-(2-hydroxy-propyl)-isochromen-1-one (5)	47
I-6.	5-Hydroxy-{1,4}-naphthoquinone (6)	50
I-7.	Acide 2,4-dihydroxy-6-(2-oxo-propionyl)-benzoïque (7)	52
I-8.	p-Tolyl-éthanone (8)	54
I-9.	Acide octadeca-9,12-dienoïque (9)	55
I-10.	Adénosine (10)	57

#### II. Métabolites identifiés par LC-MS<sup>n</sup>

60

II-1.	Généralités	60
II-2.	Acide para-aminobenzoïque (11)	60
II-3.	Acide 2,3-dihydroxybenzoïque (12)	62
II-4.	Tryptophole (13)	64
II-5.	Acide D(+)-3-phenyllactique (14)	67

et Méthodes

II-6. Cis 1(2H) 3, 4-Dihydro-3, 4, 6, 8-tétrahydroxynaphtalénone (15)	70
II-7. 1(2H) 3, 4-Dihydro-3, 6, 8-trihydroxynaphtalénone (16)	73

## CHAPITRE IV : TESTS BIOLOGIQUES

I. Tests sur plantules de tomate	78
II. Tests sur carrée de feuilles d'orme	78
III. Tests sur des cals d'orme	80

## CHAPITRE V : ETUDE DU MATERIEL VEGETAL DE L'ORME

I. Généralités	85
II. Recherche dans le bois malade	88
II-1. Extrait étheré	89
II-2. Extrait hexanique	93
III. Recherche dans le bois sain	98
IV. Recherche dans les feuilles saines	100
V. Recherche dans la sève saine	103
VI. Récapitulatif des résultats	106

## CHAPITRE VI : ETUDE DU MATERIEL VEGETAL DU PLATANE

I. Introduction	108
-----------------	-----

et Méthodes

I-1.	Le chancre du platane	108
I-2.	Métabolites fongiques	108
I-3.	Tests de toxicité	110
II. Recherche en LC-MS <sup>n</sup> dans le matériel végétal		111
II-1.	Préparation des échantillons	111
II-2.	Méthode	111
II-3.	Matériel végétal	111
II-4.	Recherche en LC/MS <sup>n</sup>	113
	II-4.1. Bois malade : Malato	114
	II-4.2. Bois malade : Pianta malata	122
	II-4.3. Bois sain : Sano	123
III. Récapitulatif		125
CHAPITRE VII : DISCUSSIONS		126
I. Biosynthèse		127
I-1.	Les métabolismes	127
I-2.	Les transformations biochimiques	128
I-3.	Les métabolites secondaires	129
I-4.	Biosynthèse des métabolites d' <i>Ophiostoma ulmi</i>	130
	I-4.1. Composés 1 et 2	130
	I-4.2. Isocoumarines : composés 3 et 4	130
	I-4.3. Isocoumarine : composé 5	131

et Méthodes

I-4.4. Composé 6 : Juglone	131
I-4.5. Composé 7	134
I-4.6. Composé 9 : Acide linoléique	135
I-4.7. Composé 10 : Adénosine	136
I-4.8. Composé 11 : Acide p-aminobenzoïque	137
I-4.9. Composé 12 : Acide 2,3-dihydroxybenzoïque	142
I-4.10. Composé 13 : Tryptophole	144
I-4.11. Composé 14 : Acide D(+)-3-Phenyl-lactique	145
I-4.12. Composé 15 : Cis 1(2H) 3,4-dihydro-3, 4, 6, 8-tétrahydroxynaphtalénone	147
I-4.13. Composé 16 : 1(2H) 3,4-Dihydro-3,6,8-trihydroxynaphtalénone	148
I-4.14. Coumarines	150
I-4.15. 4-Hydroxybenzaldéhyde	153
I-4.16. 3,4-Dihydroxybenzaldéhyde (Protocatéchualdéhyde)	156
I-4.17. Composé 8: p-tolyl-éthanone	157
I-4.18. 3-Hydroxyjuglone	158
I-4.19. 2-Hydroxyjuglone	158
I-4.20. Acide 3,5-dihydroxybenzoïque	158

## II. Activité biologique des métabolites

	159
II-1. Tests biologiques	159
II-1.1. Tests sur les plants de tomates	159
II-1.2. Tests sur les feuilles d'orme	159
II-1.3. Tests sur les cals d'orme	160
II-2. Phytotoxicité	160
II-2.1. Nouveau produit naturel	160

et Méthodes

II-2.2. Composés toxiques	161
II-2.3. Composés moyennement toxiques	161
II-2.4. Composés non toxiques	161
II-2.5. Composés non détectés	162
II-2.6. Isocoumarines	162
II-3. Activité biologique	162
II-3.1. L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque	162
II-3.2. Le 4-hydroxybenzaldéhyde	163
II-3.3. Les toxines	163
II-3.4. Les phytoalexines	163
II-3.5. Mélanines fongiques	164
II-3.6. Métabolites de <i>C. fimbriata</i> sp. <i>platani</i>	164
III. Discussion commune : 2-hydroxyjuglone et 3-hydroxyjuglone	164
CHAPITRE VIII : CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	166
I. L'orme	167
II. Le platane	170
III. Comparaison des deux espèces	170
CHAPITRE IX : BIBLIOGRAPHIE	172

## *GLOSSAIRE*

## A

**Adventif** : Se dit des racines et des bourgeons qui croissent hors de leur place normale de développement.

**Agressif, agressivité** : Composante quantitative du pouvoir pathogène qui permet à un agent pathogène d'attaquer un hôte avec plus ou moins grande intensité et qui n'a de sens que si l'agent pathogène est virulent.

**Allélopathie** : L'influence ou l'effet (interactions biochimiques) d'une plante vivant avec une autre. Ces effets dépendent d'un composé chimique qui peut être rajouté à l'environnement.

**Apex** : (Anatomie) Extrémité d'un organe. L'apex du cœur, sa pointe.

**Apical** : (Anatomie) Relatif à l'apex d'un organe.

**Ascomycètes** : Classe des champignons dont les hyphes sont cloisonnés et dont les périthèces sont tapissés d'asques.

**Ascospore** : Spore issue de la reproduction sexuée des champignons ascomycètes.

**Asque** : Organe contenant huit ascospores formées au niveau de l'hyménium des périthèces des ascomycètes.

## B

**Biocatalyseur** : Composé chimique synthétisé par un être vivant, qui l'utilise pour catalyser une réaction de son métabolisme.

**Biosynthèse** : Formation d'une substance organique dans un être vivant.

## C

**Cal** : Amas de cellulose qui obstrue les tubes criblés de certaines plantes.

**Cambium** : Couche de cellules entre le bois et le liber, qui donne naissance à ces deux formations par multiplication cellulaire.

**Catabolisme** : Phase du métabolisme qui comprend les processus de dégradation des composés organiques, avec dégagement d'énergie sous forme de chaleur ou de réactions chimiques et élimination des déchets.

**Chitine** : Substance organique (polysaccharide azoté) qui est présente dans la membrane cellulaire des champignons.

**Conductance** : Mesure de la conductivité d'une solution servant à déterminer sa teneur en matières solubles.

**Conductance fluide** : Rapport algébrique du débit masse permanent compté positivement dans le sens amont-aval à la chute des pressions statiques aval et amont.

Conidie : Terme général désignant une spore issue de la multiplication végétative d'un champignon et produite au niveau d'une tache sporulante.

Cotylédon : Feuille ou lobe séminal qui naît sur l'axe de l'embryon (réserve nutritif de la plantule).

Cycle de reproduction : Cycle qui permet à l'agent pathogène de se reproduire.

## **E**

Eliciteur : Molécule induisant des réactions de défense chez la plante, associé ainsi à la synthèse de phytoalexines. L'éliciteur est de nature chimique variable (protéine, oligosaccharide).

Enzyme : Biocatalyseur protéique qui active une réaction biochimique spécifique. Il y a six classes d'enzymes : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases.

Epinastie : Ramollissement et recourbement vers le bas, des feuilles en cours de flétrissement.

## **F**

Fibrille : petit filament

Forme parfaite, téléomorphe, forme imparfaite, anamorphe : Un champignon est souvent désigné par sa forme parfaite ou sexuée (téléomorphe), d'une part, et par sa forme imparfaite ou non sexuée (anamorphe), d'autre part. Il arrive que l'une ou l'autre des deux formes ne soit pas (ou plus) rencontrée dans la nature.

Fructification : Production par un agent pathogène, libre ou déjà à l'intérieur de son hôte, d'éléments issus de sa reproduction sexuelle ou d'une multiplication asexuée.

## **G**

Germination : Faculté pour un agent pathogène d'émettre un tube germinatif ou une hyphes. Ceux-ci sont alors capables de pénétrer dans une plante-hôte.

Gomme, gommose : Ecoulement résineux manifesté ici par une plante en réaction à une attaque par un agent pathogène. La gommose est la manifestation pathologique.

## **H**

Haploïde : Qui ne possède que la moitié du nombre de chromosomes propre à l'espèce. Les gamètes sont haploïdes (elles possèdent n chromosomes) et leur union donne naissance à un zygote diploïde (ayant 2 n chromosomes).

Hôte, gamme d'hôtes : Individu (plante-hôte) ou population (population-hôte) susceptibles d'être contaminés par un agent pathogène.

La gamme d'hôte représente l'ensemble des espèces sensibles à un agent pathogène.

Hyménium : Pseudo-tissu tapissant l'intérieur des fructifications sexuées des ascomycètes et des basidiomycètes et comprenant des éléments fertiles (asques ou basides) et parfois des paraphyses (éléments stériles).

Hyphe : Filament élémentaire du mycélium.

## I

Inhibition : Suspension de l'activité d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule.

Inoculum : Matériel infectieux (spores ou autre) provenant d'un agent pathogène et qui sert à induire une maladie sur un végétal.

## K

Kinase : Enzyme de la famille des transférases, catalysant le transfert d'un groupe phosphoryle d'un substrat à un autre.

## L

Liber : Tissu conducteur de la sève élaborée, qui constitue la face interne de l'écorce.

Lyase : Enzyme catalysant la rupture d'une liaison chimique par un autre moyen que l'hydrolyse ou l'oxydation.

## M

Métabolisme : Ensemble de réactions couplées se produisant dans les cellules de l'organisme.

Mitochondrie : Organite délimité par deux membranes. Elles sont localisées dans le cytoplasme des cellules. Elles jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique cellulaire, puisqu'elles sont le site de synthèse de la majorité de l'ATP et aussi de la respiration cellulaire.

Multiplication végétative : Reproduction d'un organisme (hôte, agent pathogène) sans intervention de phénomène sexuel.

Mycélium, mycélien : L'appareil végétatif des champignons (ou thalle) est constitué d'hyphe mycéliens microscopiques.

## O

Oxydase : Enzyme qui active la fixation de l'oxygène sur d'autres corps.

## P

Parasite : Agent pathogène qui est capable de vivre aux dépens de tissus vivants ou morts de la plante-hôte.

Pathogénèse : Processus d'installation et d'évolution de la maladie.

Pathogénie (= pouvoir pathogène) : Caractéristique d'un agent pathogène qui lui permet de contaminer un hôte. Le pouvoir pathogène se compose d'un aspect qualitatif : la virulence et d'un aspect quantitatif : l'agressivité.

Périthèce : Terme général désignant l'organe issu de la reproduction sexuée des ascomycètes et contenant des asques.

Phanérogame : Se dit des plantes qui ont les organes de fructification apparents.

Phytoalexine : Molécule synthétisée par la plante en réponse à différents facteurs d'irritation.

Phytotoxine : Molécule produite par les micro-organismes et toxique pour les plantes.

Plantule : Jeune plante phanérogame, du début de la germination jusqu'au moment où elle peut vivre par ses propres moyens.

Protoplaste : Cellule végétale dépourvue de sa paroi cellulaire.

Pycnide : Fructification asexuée de certains champignons produisant des conidies (pyniospores).

## **R**

Rhizome : Tige souterraine de certaines plantes (ex. fougères), dont la face inférieure donne naissance à des racines adventives, et dont la face supérieure émet des bourgeons qui se transforment en tiges aériennes.

## **S**

Saprophyte : Organisme capable de coloniser des tissus sains après avoir utilisé une base nutritive constituée par des éléments morts ou des substances nutritives libres.

*Scolytidae* : Coléoptères (ordre d'insectes holométaboles, chez qui le passage de l'état larvaire à l'état adulte se fait par l'intermédiaire d'un état nymphal.)

Sève : Liquide nutritif tiré du sol par poils absorbants des racines, élaboré dans les feuilles, et qui circule dans les plantes vasculaires.

Sève brute : est une solution aqueuse diluée, de sels minéraux absorbés par les racines.

Sève élaborée : est une solution concentrée et visqueuse, riche en sucres, en acides aminés et en diverses substances plus ou moins complexes, synthétisés par les feuilles à partir de la sève brute.

*Sphaeropsidales* : Ordre des champignons appartenant aux champignons imparfaits dont les conidies sont formées dans une pycnide.

Spore : La spore (sexuée ou asexuée) est le plus petit élément pouvant assurer la perpétuation (conservation ou propagation) d'un champignon.

**T**

Trachéomyose : Maladie due à un champignon parasite se développant dans le système vasculaire, entravant la circulation de la sève, et causant la mort de la totalité ou d'un secteur de la plante

**V**

Vaisseaux (conducteurs) : Constitués des tissus (xylème et phloème) qui transportent les différentes sortes de sève.

**X**

Xylophage : Le régime alimentaire est composé de bois.

***CHAPITRE I :***  
***INTRODUCTION***



Détail de Ramifications d'orme Champêtre

## Généralités

### Introduction

L'orme [1] appartient à la famille des Ulmées et est représenté par trois genres. Le *Celtis* qui regroupe soixante-dix espèces dans le monde dont le micocoulier de Provence (France). Le *Zelkova* qui comporte cinq espèces originaires d'Asie, par exemple l'orme de Sibérie ou *Zelkova crenata*. Le dernier étant l'*Ulmus*, "les ormes", qui comprend quarante-cinq espèces originaires de la zone tempérée nord. Trois espèces principales sont réparties selon le climat, l'altitude et les sols : l'orme lisse, l'orme de montagne et l'orme champêtre. Ces deux dernières sont les espèces d'orme les plus répandues en Suisse.

➤ Orme champêtre (*Ulmus minor* Mill., *Ulmus campestris* L., *Ulmus vulgaris* Pall.), appelé aussi orme franc, orme rouge ou orme à petites feuilles : Il pousse dans les plaines et moyenne montagne, en pleine lumière. Il peut atteindre vingt-cinq mètres de haut en cent ans, et culminer vers cinquante mètres pour un âge honorable de trois à cinq cents ans.

Il est réparti dans le sud et l'est de l'Europe, l'Afrique du nord, l'Asie mineure et une partie de l'Asie centrale.

➤ Orme de montagne (*Ulmus glabra* Hubs., *Ulmus montana* With., *Ulmus scabra* Mill.), appelé orme à grandes feuilles ou orme blanc : Il préfère les altitudes d'environ mille six cents mètres (les Alpes, les Pyrénées, le Massif central) mais également le bord des rivières. Il dépasse rarement trente mètres de haut. Son aire de répartition s'étend du nord et du centre de l'Europe à l'Asie occidentale.

➤ Orme lisse (*Ulmus effusa* Willd., *Ulmus laevis* Pall., *Ulmus pedunculata* Foug.), désigné aussi sous le nom d'orme pédonculé ou orme diffus : C'était déjà une espèce menacée de disparition avant les ravages de la graphiose. Son habitat est la forêt et les rives des fleuves. Son territoire s'étend de l'Europe orientale aux berges de la Volga et au caucase.

Le genre *Ulmus* comprend cinq autres espèces importantes : l'orme de Hollande, l'orme d'Amérique, l'orme ailé, l'orme de Chine et l'orme nain.

Les recherches sur la maladie hollandaise de l'orme, qui est l'une des plus graves catastrophes écologiques survenues au XX<sup>e</sup> siècle, sont nombreuses et très importantes. L'orme est probablement la seule essence indigène capable d'offrir autant de qualités et d'usages : bois d'œuvre et de chauffage, haies, protection contre les embruns, fourrage, plante médicinale.

## La graphiose

Vraisemblablement d'origine asiatique, la maladie hollandaise de l'orme ou la graphiose [2], est apparue en 1919 pour la première fois en Hollande [3] (d'où son nom) et dans le nord de la France, puis dans toute l'Europe. Son apparition en Amérique du nord (USA, Canada) a provoqué de très graves dégâts sur l'orme américain, qu'elle a détruit sur des surfaces considérables. Vers 1970, une nouvelle souche plus agressive apparaît en Europe suite à des importations de grume. Pour ne citer qu'un exemple, entre 1971 et 1978, 70 %, soit approximativement 22 millions d'ormes sont morts en Grande-Bretagne [4].

Deux champignons provoquent la maladie : *Ophiostoma ulmi* dite souche non-agressive responsable de la première pandémie durant les années 20-40 a le plus faible pouvoir pathogène. Depuis le début des années 80, *O. ulmi* a pratiquement disparu. *Ophiostoma novo-ulmi*, dite souche agressive [5,6,7], présente au contraire un pouvoir pathogène très élevé, responsable de la pandémie actuelle. La souche agressive se divise en deux races bien distinctes : la race européenne, EAN, et la race nord américaine, NAN. Ces deux souches ont une morphologie et une physiologie différentes [8].

Des hybridations entre EAN et NAN [9,10] ont lieu dans la nature ou sont effectuées en laboratoire (figure I-2) afin de trouver une solution contre la graphiose [11]. C'est aussi pour cette raison que des clonages sont réalisés avec différentes espèces d'orme [12,13] plus ou moins résistants aux champignons et aux insectes vecteurs. *Ulmus americana* est très sensible alors que *Ulmus pumila* (Russie) et *U. Japonica* (Japon) sont résistants, de même que certains ormes de Chine et de Sibérie [14]. En 1973, une 3<sup>ème</sup> génération de clones [15], les

et Méthodes

clones “Lobel”, “Dodoens” et “Plantyn” sont issus d’un croisement de *U. Wallichiana* (Indes) et de *U. glabra* ‘Exoniensis’ (Angleterre). Actuellement ces clones servent de parents aux nouvelles générations, essayant ainsi de créer des espèces très résistantes dans le temps.

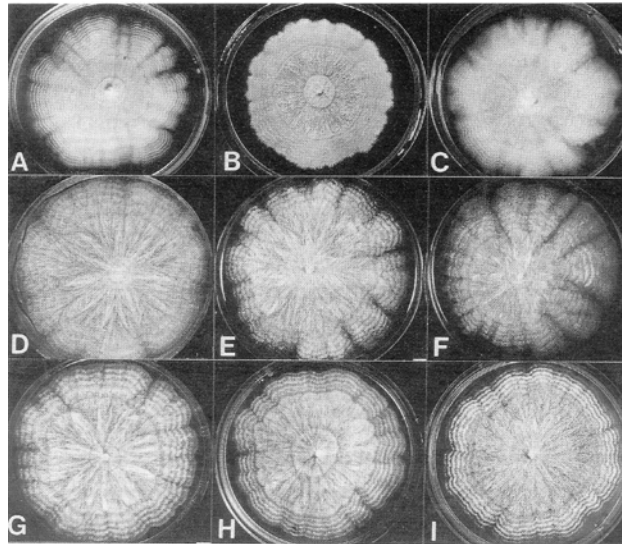


Figure I-2 : Photographie représentant les différents mycéliums [16]

A à C ⇒ souche dite non-agressive

D à F ⇒ souche EAN agressive

G à I ⇒ souche NAN agressive

## Historique du champignon

Les deux formes (parfaite et imparfaite) du champignon responsables de la maladie de l’orme ont vu modifier, au cours du temps, leurs noms.

Le stade imparfait, forme asexuée, est *Graphium ulmi* [16], renommé en 1973 *Pesotum ulmi* par Crane et Schoknecht [15] (figure I-3).

Le stade parfait est *Ceratostomella ulmi*, décrit en 1932 par Buisman [17]. Il est par la suite renommé *Ophiostoma* par Nannfeldt en 1934 [18] et *Ceratocystis* par Moreau en 1952 [19]. En 1956, après une étude plus approfondie sur le genre *Ceratocystis*, Hunt [20] donne le nom de *C. ulmi*. Cependant en 1974, De Hoog nomme le champignon *Ophiostoma ulmi* [21] après avoir relevé des différences importantes sur les études préalables de Hunt.

Actuellement c’est *O. ulmi* qui est le nom couramment utilisé, surtout en Europe.

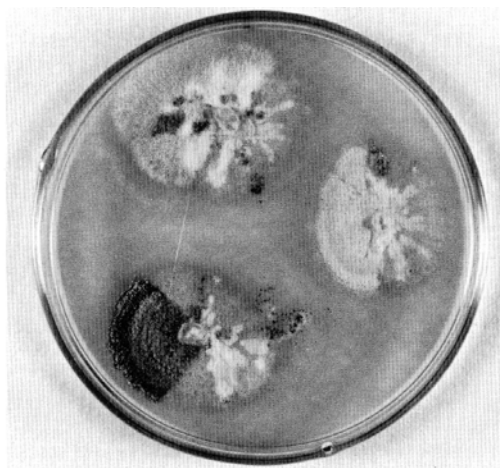


Figure I-3 : Zones sombres représentant le stade imparfait correspond à *Graphium ulmi*

### **Biologie et Pathogénie d'*O. novo-ulmi***

Le champignon est un ascomycète, sous-classe des pyrénomycètes, sous-groupe des *Sphaeriales*.

Le cycle de reproduction du champignon est composé de deux parties : une phase sexuée et une phase asexuée, qui est étroitement lié au cycle général de la graphiose (figure I-4A).

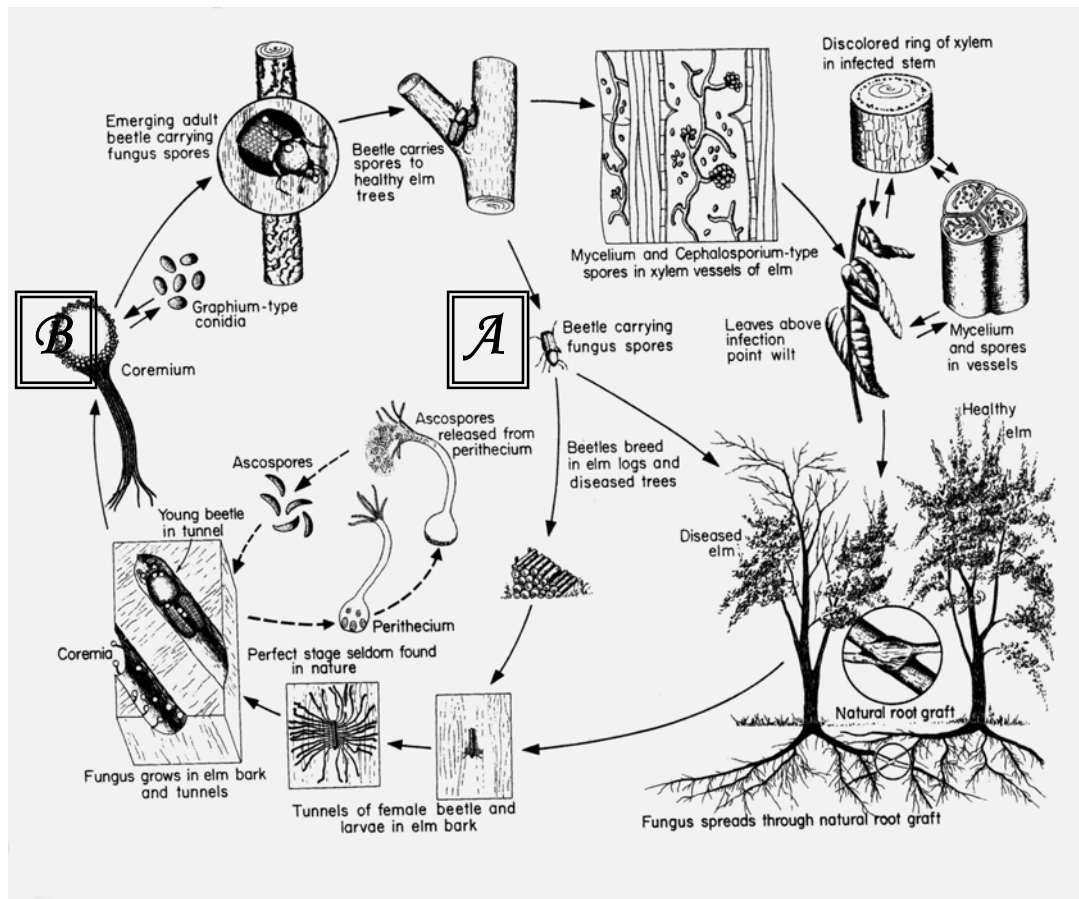


Figure I-4A : Cycle de la graphiose [22]



Partie téléomorphe : phase sexuée

Les ascospores haploïdes (spores sexuelles) au nombre de huit se situent dans un sac appelé asque et sont éjectées par explosion induisant la déchirure de l'extrémité supérieure des sacs. Les asques se développent à l'intérieur des fructifications globuleuses : les périthèces (figure I-4B). Suite à des déchirures prématurées des asques, des spores peuvent demeurer librement dans le canal périthécial. Les périthèces ne s'ouvrent que par un étroit orifice apical nommé ostiole. Ils sont sphériques, noirs, de diamètre égal à  $120\ \mu\text{m}$  et de longueur de tige de  $300\ \text{à}\ 400\ \mu\text{m}$ .

Cette phase correspond à l'inoculum primaire, qui est responsable de la contamination de l'hôte et permet à la maladie d'exister.



Partie anamorphe : phase asexuée

Les spores asexuées sont appelées conidies ou conidiospores et sont portées par des filaments : les conidiophores. L'association en faisceaux compacts des conidiophores forme les corémies ou les synnemas.

Cette phase correspond à l'inoculum secondaire. Elle apparaît sur la population-hôte déjà contaminée et contribue à la dissémination de la maladie.

et Méthodes

Par germination une ascospore engendre des filaments, constituant le mycélium de couleur blanc crème, de structure cloisonnée avec des parois cellulaires chitineuses. Pendant la phase végétative, les ascomycètes se multiplient fréquemment par l'intermédiaire de spores asexuelles.

Les corémies se développent dans les galeries. C'est pendant la phase conidienne que les spores seront ensuite transportées vers d'autres ormes par les jeunes scolytes.

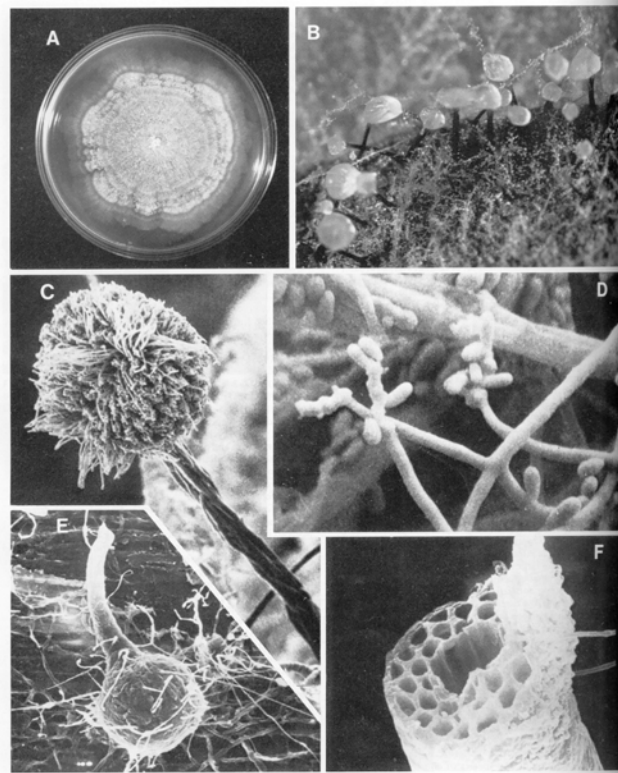


Figure I-4B : *Ceratocystis ulmi* [23]

A : Culture sur boîte de pétri, B : Corémies de la forme *Graphium*, C : Tête et tige d'un conidiophore,  
D : Mycélium et spores E : Périthèce et mycélium, F : Détails du canal périthécial

## Vecteurs de la maladie

La graphiose se répand de trois manières différentes :

- Insectes vecteurs : Scolytes de l'arbre [24]
- Fusion des racines
- Hommes

### *Les scolytes*

Les scolytes de l'arbre, coléoptères de la famille des Scolytidae [25], sont le vecteur essentiel de la maladie. Les deux espèces principales [26] sont le *Scolytus multistriatus* originaire d'Europe et l'*Hylurgopinus rufipes* vivant dans les régions froides des Etats-Unis et du Canada (figure I-5.1A).

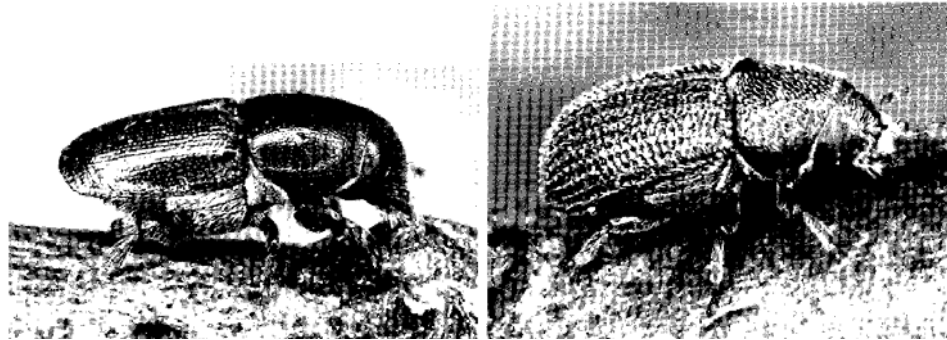


Figure I-5.1A : Gauche : *Scolytus multistriatus*, Droite : *Hylurgopinus rufipes*

D'autres scolytes sont vecteurs du *O. ulmi* [27,28], leurs tailles variant de 2 à 5 mm :

- ✧ *Scolytus scolytus* (= *S. destructor*), Grande-Bretagne, Europe centrale, Bulgarie
- ✧ *S. triarmatus*, Allemagne, Scandinavie
- ✧ *S. japonicus*, Russie
- ✧ *S. orientalis*, Bulgarie, Russie

Les symptômes de la graphiose, le cycle de reproduction du champignon et le cycle des scolytes établissent un seul cycle qui est relativement complexe.

Le cycle hôte-vecteur est représenté (figure I-5.1B) par l'alternance de deux phases principales : une phase parasitaire et une phase saprophyte.

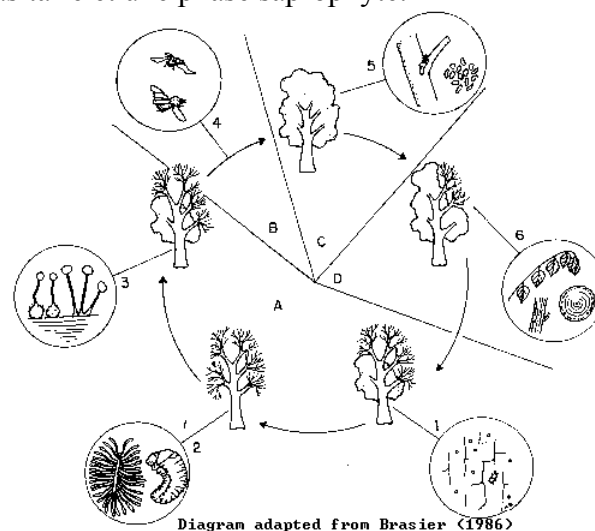


Figure I-5.1B : Cycle hôte-vecteur [29]  
 A = phase saprophyte, B = "flight" phase  
 C = phase d'extension, D = phase parasitaire

∞ Phase A :

et Méthodes

Lorsque la période de la reproduction arrive, les femelles scolyte se mettent à la recherche d'ormes affaiblis, malades ou éprouvés par la sécheresse, qu'elles repèrent à de grandes distances à leur odeur particulière. Dans une petite loge à l'intérieur de l'écorce, elles sécrètent des phéromones [30,31,32] renforçant ainsi l'odeur attractive de l'arbre pour les autres femelles. Ensuite, elles creusent des galeries [33] où elles pondent leurs œufs. Les larves apparaissent huit jours plus tard et se nourrissent de l'écorce interne.

☞ Phase B :

Les jeunes scolytes quittent l'arbre malade en emportant avec eux les spores du champignon fixées sur leurs corps.

☞ Phase C :

Les insectes se nourrissent sur un arbre sain, inoculant ainsi la maladie dans les blessures qu'ils créent par leurs morsures.

☞ Phase D :

Les insectes ont introduit le pathogène à l'intérieur du xylème conduisant à l'infection de l'arbre qui donne lieu aux différents symptômes (paragraphe I-6).

*S. multistriatus* pond deux fois par an, au début du printemps et plus tard dans l'été. Leurs galeries sont parallèles aux fibres du bois (figure I-5.1C). Par contre, *Hylurgopinus rufipes* pond une fois par an et les galeries sont creusées avec un angle de 45° par rapport aux fibres.

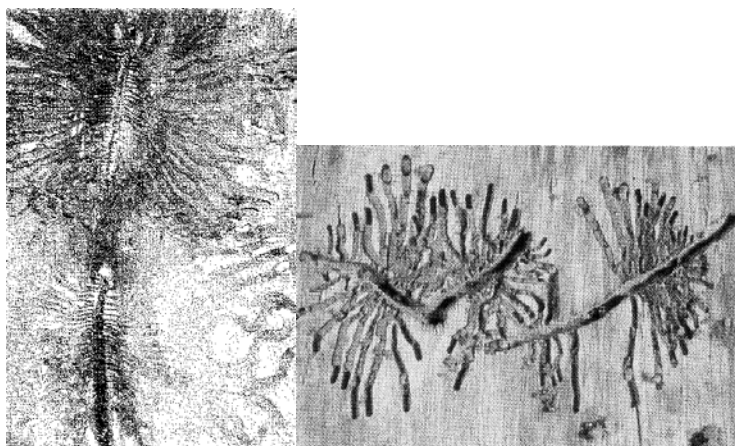


Figure I-5.1C : Gauche : galeries de *S. multistriatus*, Droite : galeries de *Hylurgopinus rufipes*

### ***La fusion des racines***

Lorsqu'il y a une forte concentration d'arbres (forêts, allées), la graphiose peut se transmettre par fusion des racines. L'agent pathogène se propageant à l'intérieur des vaisseaux du bois.

### **Les hommes**

Les risques de contamination découlent en partie de la multiplication des échanges internationaux de marchandises, à la faveur duquel circulent aussi les champignons. Le Canada a pris des résolutions draconiennes sur la circulation des ormes à l'intérieur même du pays et sur la manière d'entreposer les arbres.

Les gardes forestiers ou randonneurs peuvent inconsciemment contaminer un arbre sain par blessures avec divers outils infectés par le champignon.

### **Symptomatologie**

La graphiose est une maladie d'origine vasculaire, caractérisée parallèlement par une épinastie, une décoloration foliaire et une intense gommose qui envahit le xylème de la tige. L'obstruction des vaisseaux est un facteur essentiel de la pathogenèse des trachéomycoses. Les substances gommeuses sont un mélange complexe variant en fonction du couple hôte-parasite. Elles contiennent notamment des polysaccharides et des composés polyphénoliques.

Les premiers symptômes de l'infection deviennent apparents vers le milieu de l'été, le champignon causant le flétrissement et l'enroulement des feuilles (figure I-6A) qui se dessèchent et brunissent par la suite.

Lorsque l'infection a lieu plus tard dans l'été, les feuilles jaunissent et se flétrissent ensuite. La perte prématurée des feuilles infectées est courante. Les arbres infectés plus tard dans la saison produisent, au printemps suivant, des feuilles plus petites dans toute la cime ou une partie de celle-ci. Des petites branches mortes peuvent être observées.

La mort de l'arbre survient un à deux ans après l'infection.



Figure I-6A : Flétrissement des feuilles d'orme

Une coupe transversale d'un tronc infecté révèle souvent une coloration vasculaire brune (figure I-6B) en forme de cerne plein ou de série de points. L'écorce enlevée, les galeries des scolytes peuvent être examinées.



Figure I-6B : Taches vasculaires brunes d'un tronc infecté

## Moyens de lutte

### *Sylviculture*

La sylviculture est une méthode d'élagage préventive qui s'intéresse à la sauvegarde des massifs forestiers. Rendre la forêt biologiquement résistante est le meilleur moyen de la protéger des agressions.

L'abattage et la destruction de tous les arbres morts et moribonds de même que les grosses branches mortes des arbres sains sont obligatoires. Les outils d'émondage et de coupe utilisés sur des arbres infectés doivent être stérilisés à l'alcool dénaturé entre chaque coupe.

### *Lutte chimique*

Les insecticides, les fongicides et les herbicides injectés dans le système racinaire d'arbres individuels constituent un moyen de répression de cette maladie.

#### ➤ Insecticides :

Un moyen préventif contre la transmission de la maladie est d'agir contre les insectes vecteurs.

Une des méthodes les plus courantes est l'emploi systématique, par injection dans les troncs, du dicrotophose (figure I-7.2A) [34]. Les inconvénients sont la régulation de la quantité à injecter suivant l'état plus ou moins avancé de l'infection de l'arbre et la dégradation dans le temps du composé.

Une deuxième méthode est l'emploi du méthoxychlore (figure I-7.2A) [35]. Déposé par sprayage, il agit sur l'espèce *Scolytus multistriatus*. Mais cette méthode manque de sélectivité et d'autres coléoptères inoffensifs sont aussi éliminés.

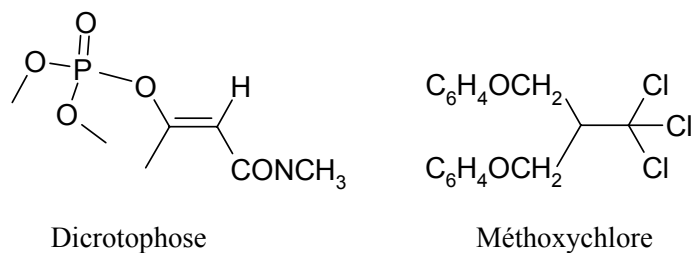


Figure I-7.2A : Formules développées des composés

➤ Fongicides :

Les benzimidazoles [36] sont utilisés par injection dans les troncs ou les grosses branches, combiné avec un élagage. Ce traitement [37] est efficace à 100 % pour les infections de l'année en cours et à 71 % pour les infections résiduelles, mais doit être renouvelé tous les ans.

➤ Herbicides :

Ils sont toujours employés comme complément d'un insecticide. Dans cette combinaison, c'est la faculté des herbicides à circuler dans les vaisseaux du bois qui est exploitée.

Les traitements avec de l'acide cacodylique (figure I-7.2B) (combiné à 1 ppm d'arsenic ou du méthylearsonate monosodique [38]), ou avec le chlorpyrifos [39], suppriment le renouvellement du cycle de reproduction des insectes. Une diminution de l'éclosion des larves de 50 % à 90 % peut-être atteinte. L'utilisation de phéromones [40] permet une augmentation de l'efficacité du traitement. Dans ces conditions, 100 % de mortalité sur les scolytes sont atteints en 10 semaines.

Dans certains cas, il faut tenir compte du type des ormes, pour adapter et choisir le traitement le plus adéquat. Par exemple, l'herbicide 2,4,5-T (figure I-7.2B) [41,42] agit sur *U. americana*, alors que sur *U. parvifolia* (Chine) il n'a aucun effet.

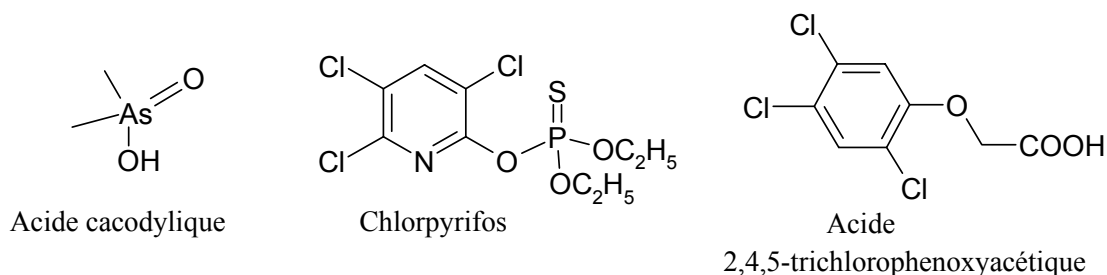


Figure I-7.2B : Formules développées des composés

**Cemagref**

Cemagref est un organisme français, dirigeant le programme européen pour la conservation génétique des ormes (projet : GENRES 78). Ce projet permet notamment de

caractériser la diversité génétique des ormes d'Europe à l'aide de marqueurs moléculaires. La collection de 2000 clones, prélevés par bouturage d'arbres rescapés, est répertoriée dans une base de données. Des mesures conservatoires efficaces à long terme, telle que la cryoconservation des bourgeons dans l'azote liquide, sont mises en œuvre en attente d'une solution efficace contre la graphiose.

### Métabolites produit par *O. novo-ulmi*

Les métabolites produits par *Ophiostoma novo-ulmi* se divisent en quatre groupes :

- composés phénoliques
- polysaccharides
- glycopeptide
- protéine

### Composés phénoliques

Claydon et al. [43,44] ont isolé des métabolites phénoliques (figure II-1) présents dans le champignon. Des tests *in vivo*, portant sur les injections de ces composés dans des encoches effectuées sur des troncs, n'ont pas permis d'établir leur toxicité.

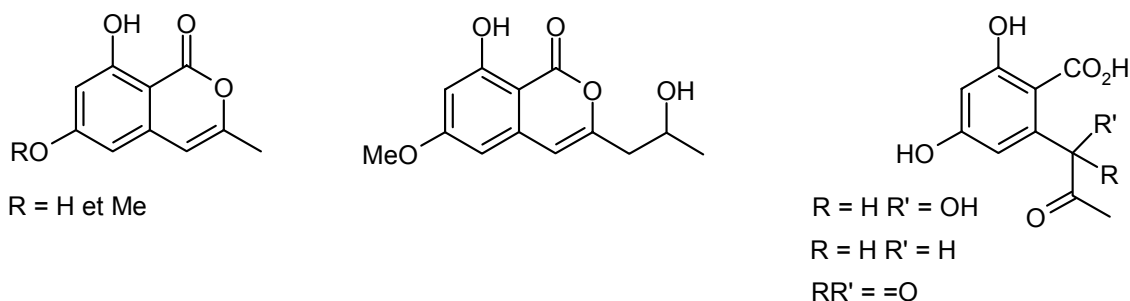


Figure II-1 : Métabolites phénoliques précédemment isolés.

### Polysaccharides

Dimond [45] a isolé une fraction contenant des polysaccharides, après précipitation avec 70 % d'éthanol du milieu de culture. L'importance de ces composés *in vivo* est discutable. En effet après inoculation du champignon, la fluidité du xylème n'est pas affectée. Feldman et Rebel conclurent que les polysaccharides ont un rôle très minime dans la maladie.

### Glycopeptide

La phytotoxicité de la fraction glycopeptidique sur des pousses d'orme a été décrite par Saleminck et al. [46], Rebel [47], Strobel et al. [48] et plus en détails par Van Alfen et Turner [49]. L'analyse structurale révèle un peptidorhamnmannane, de masse allant de 105

et Méthodes

000 à 120 000 [50]. Les bio-essais sont basés sur la conductance et la fluidité de l'eau dans les troncs. La toxicité du glycopeptide n'est pas spécifique à l'orme et les effets biochimiques sur les tissus n'ont pas été mis en évidence.

Parmi ces trois groupes, aucun n'a démontré un pouvoir pathogène et leur importance dans la pathogénèse n'est donc pas établie [51].

## Protéine

La cérato-ulmine [52,53], CU, est l'unique petite protéine produite par *Ophiostoma novo-ulmi*. Elle possède un caractère pathotoxique [54,55] et joue un rôle dans le déclenchement de la maladie hollandaise de l'orme [56]. Elle reproduit, *in vivo*, les mêmes symptômes (nécrose, foliaire) que la graphiose à partir d'une concentration minimale de 2 ng/mL [57]. La CU est produite par l'agent pathogène dans les vaisseaux du xylème du tronc et des branches puis transportée jusqu'aux feuilles où elle s'accumule [58,59] entraînant la mort de l'arbre.

Le rapport entre la production de CU et la pathogénie est une méthode rapide permettant d'évaluer la pathogénie des isolats sans avoir recours à l'injection d'hôtes dans le matériel végétal [60,61,62].

La cérato-ulmine a l'aspect d'une poudre floconneuse blanche. De masse égale à 8 000 avec 100 résidus [63], la séquence protéinique contient principalement de la cystine, de la proline, de la leucine, de la serine, de l'acide aspartique, de l'asparagine et dans une plus faible quantité de l'histidine, de la lysine, de l'arginine, de l'isoleucine, de la phénylalanine et de la tyrosine.

L'étude des paramètres agissant sur la variation de la production de CU [64] a été effectuée dans le but d'obtenir des renseignements sur les différentes propriétés de cette protéine.

Ces propriétés sont les suivantes :

- ✧ Hydrophobe [65,66]
- ✧ 3 formes de microstructure différente : unité, baguette, fibrille [67,68]
- ✧ pH = 5.8, dans une solution aqueuse à 80 % d'éthanol
- ✧ Spectre UV  $\lambda_{\max}$ . (nm) : 269, 278 et 285.

Elle est présente principalement dans le fluide de tête des conidiophores [69] et à la surface des hyphes [70].

### *But du travail*

L'objectif de ce travail consistera dans un premier temps, à l'isolement et l'identification de métabolites secondaires d'*Ophiostoma* (= *Ceratocystis*) *ulmi*, agent

et Méthodes

pathogène de la graphiose, cultivé en milieu liquide. Par la suite, différents tests d'activité biologique seront effectués sur les composés isolés pour évaluer leur phytotoxicité.

Dans un second temps, l'étude du matériel végétal, bois (infecté et sain), feuilles, sève par LC-MS<sup>n</sup> permettra de déterminer *in vivo* la présence ou non des métabolites phytotoxiques et d'établir leurs rôles dans le cycle de la maladie.

L'agent pathogène, *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*, est responsable du chancre coloré du platane. Des recherches sur le matériel végétal malade seront également réalisées afin de trouver une relation entre mêmes espèces de champignons et les maladies qu'ils causent.

**CHAPITRE II :**  
**MATÉRIELS ET MÉTHODES**



*Rameau d'orme ailé*

## *Cultures fongiques*

### **I-1. Le milieu de culture**

Le champignon pathogène sujet de nos recherches est *Graphium ulmi*, forme asexuée de l'*Ophiostoma ulmi*. La souche du champignon provient de France, isolée d'*Ulmus* (clone Lobel, 84.3386). Repiqué régulièrement dans un milieu malt-agar (1%) sur boîte de pétri, il pousse radialement et présente un aspect blanc filamenteux.

La culture est effectuée en milieu liquide [46], dont la composition est :

Sucrose	10 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
L-asparagine	2 g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
Extrait de levure	2 g	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.44 mg
Eau désionisée	1 L	FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0.48 mg
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0.36 mg		

10 L de milieux de culture sont préparés dans 2 erlemeyers de 5 L. La solution est répartie, par quantité d'environ 250 mL, dans des erlemeyers de 500 mL à chicane préparés (VQT, S<sup>t</sup> Blaise, CH). La chicane permet une homogénéité de la solution et une meilleure oxygénation pendant l'agitation. Les erlemeyers sont bouchés par un bouchon d'ouate recouvert d'une feuille d'aluminium afin d'éviter l'humidité. Ils sont mis à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

Le champignon est inoculé dans le milieu liquide sous flux laminaire. Le col des erlemeyers et les ustensiles entre chaque inoculation sont stérilisés à la flamme, pour éviter toutes contaminations. Nous découpons des morceaux d'environ 1cm de coté de mycélium cultivé avec un milieu malt-agar 1 % sur boîte de pétri. Deux morceaux sont mis dans chacun des erlemeyers.

Les erlemeyers sont agités à 120 tours/min, sous une lumière alternée jour-nuit et à la température ambiante (18-25°C), pendant 3 à 4 semaines.

### **I-2. Procédure d'extraction**

Après la période optimale de quatre semaines, les cultures sur milieu liquide sont centrifugées à 3000 tours/min pendant 20 min. Le surnageant est filtré sur Büchner, à l'aide de célite et d'un papier filtre. Par la suite, le mycélium récupéré est détruit dans l'autoclave. Le filtrat possédant un pH légèrement acide (~ 5/6), est extrait deux fois à l'acétate d'éthyle (figure I-2A). La phase aqueuse récupérée est alors rendue basique à l'aide d'une solution de NaOH jusqu'à pH = 10. Elle est ensuite ré-extraite deux fois à l'acétate d'éthyle.

Pour 10 L de milieu liquide, nous obtenons environ 150 mg d'extrait brut.

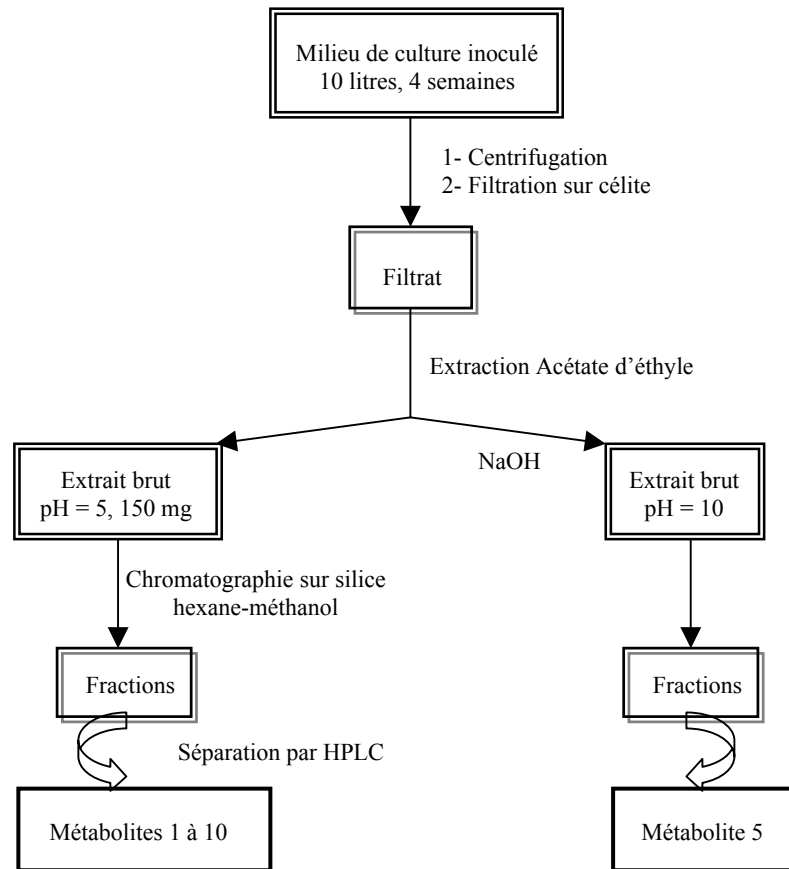


Figure I-2A : Procédure générale d'extraction des métabolites

Dans le but de vérifier la reproductibilité, les extraits bruts des différentes cultures sont analysés en HPLC à 254 nm et 366 nm, sur phase inverse (RP-C18) avec un gradient de solvant eau-méthanol (figure I-2B).

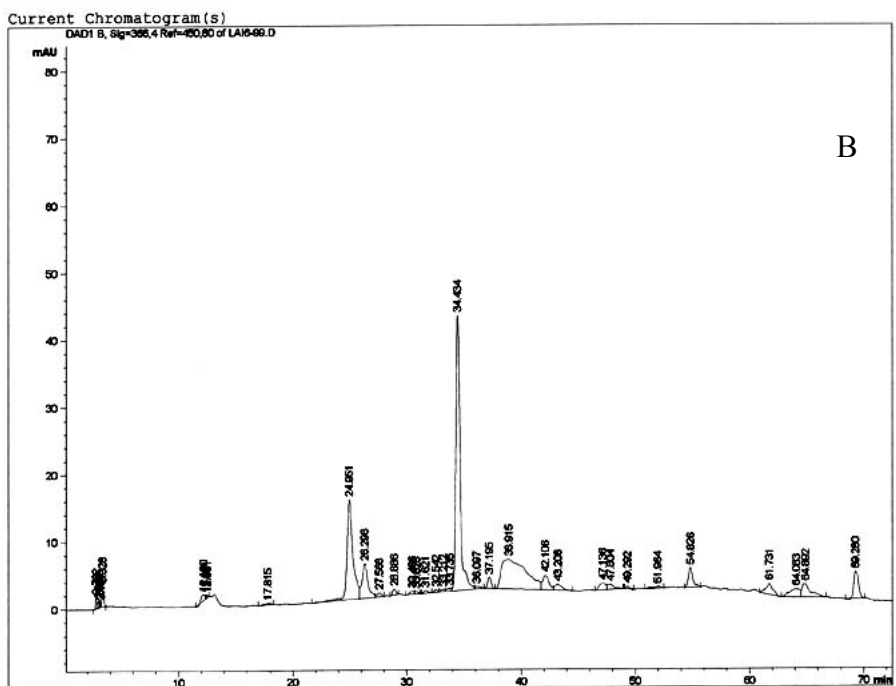
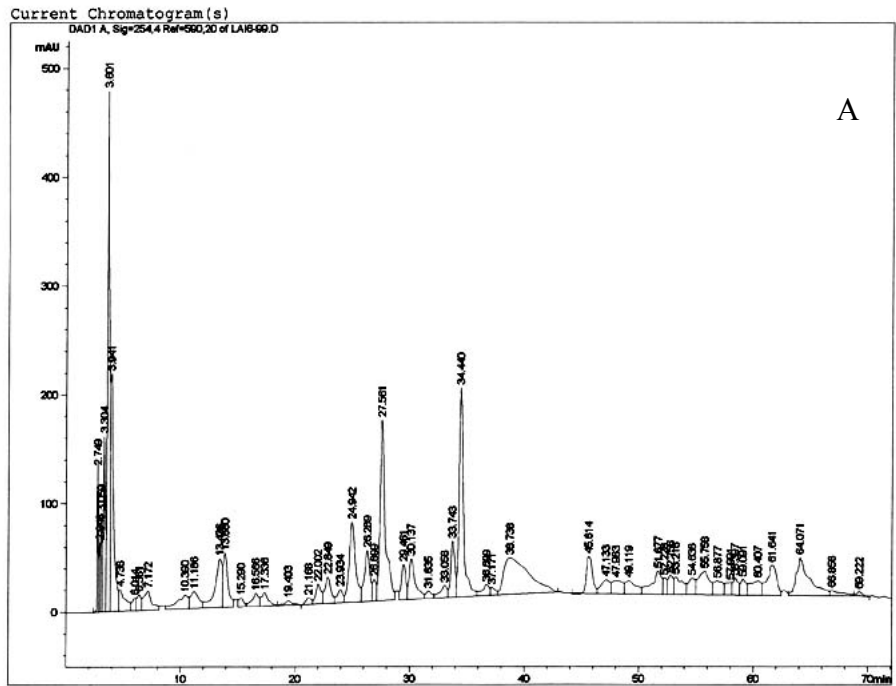


Figure I-2B : Chromatogrammes de l'extrait brut de culture fongique  
A : longueur d'onde de 254 nm  
B : longueur d'onde de 366 nm

Les extraits bruts ainsi que chaque fraction sont testés afin d'évaluer leur toxicité. Ces tests sont réalisés sur des plantules de tomate de la variété Bony Best, plongées dans une solution d'eau distillée à 2 % d'acétone contenant environ 1 mg de chaque fraction.

### **I-3. Procédure d'isolement**

Les fractions possédant une activité toxique sont chromatographiées en HPLC. Le programme (gradient de solvants, temps) est optimisé pour améliorer la séparation. Dans certains cas nous avons utilisé des plaques préparatives ou effectué des colonnes de silice pour la purification des composés.

## *II. Matériel végétal*

Le matériel végétal sain utilisé pour les recherches en LC-MS<sup>n</sup> provient d'un orme champêtre, âgé d'environ quatre ans, situé à Neuchâtel. La sève et les feuilles ont été récoltées au printemps. La sève est recueillie sur trois jours après entaille de la branche de l'arbre. Le bois infecté provient également de Neuchâtel (Collège Latins), âgé d'environ 40 ans.

### **II-1. Extraction du bois**

La méthode utilisée est analogue pour le bois malade que pour le bois sain. Le bois est préalablement réduit en sciure. Nous effectuons une extraction au Soxhlet pendant 24 h, 50 g de bois sont introduits dans une cartouche et les solvants sont soit l'éther soit l'hexane.

### **II-2. Extraction des feuilles**

Les feuilles fraîchement cueillies sont plongées dans de l'azote liquide, puis pilées dans un mortier. Ensuite, l'extraction est identique à celle du bois.

### **II-3. Extraction de la sève**

50 mL de sève élaborée, de pH = 6.5, est extraite 2 fois avec de l'acétate d'éthyle. Dans un second temps, l'extrait brut de la sève est rendu basique (pH = 10) avec une solution de NaOH. Elle est ensuite ré-extraite deux fois à l'acétate d'éthyle.

## *III. Techniques chromatographiques*

### III-1. Chromatographie sur couche mince, CCM

Les analyses par chromatographie sur couche mince sont effectuées sur des plaques Alugram Sil G/UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel, CH) de gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence, de 0.25 mm d'épaisseur.

### III-2. Chromatographie liquide à basse pression, LPLC

Les chromatographies liquides à basse pression sont réalisées avec du gel de silice (C-Gel, C-560, CU Chemie Uetikon AG, Uetikon, CH) de granulométrie 0.060-0.200 mm. Pour les extraits bruts de milieu de culture et les bruts de matériel végétal, nous utilisons une colonne en verre de dimension 20 × 300 mm avec un robinet en téflon. D'autre part, pour la purification subséquente des fractions, la colonne en verre employée est de dimension 10 × 150-300 mm. Les extraits sont déposés sous forme sèche en tête de colonne.

### III-3. Chromatographie liquide à haute pression, HPLC

Les échantillons sont préalablement filtrés sur des cartouches SPE de 3 mL, phase RP-C18 (Supelco, USA), en utilisant comme éluant le méthanol. Les solvants utilisés sont filtrés sur membrane Millipore, filtre nylon 66, 0.45 µm × 47 mm (Supelco, USA). Les phases mobiles sont du méthanol de qualité HPLC (Maechler AG, Reinach, CH) et de l'eau bidistillée. La colonne analytique utilisée est en phase inverse de type RP-C18 (Nucléosil 100-7-C18, 7 µm, 250 x 4.6 mm, Bischoff, Leonberg, D), munie d'une précolonne (Nucléosil 100-7-C18, 7 µm, 20 x 4 mm).

Les analyses HPLC sont effectuées, soit sur un appareil de type HP 1050 A (Hewlett-Packard) couplé à un détecteur à barrettes de diodes DAD de type HP 1040, soit sur un appareil de type HP 1100 (Hewlett-Packard) couplé à un détecteur ultra-violet de type HP 1100.

Le programme HPLC est le suivant :

Temps (min)	MeOH (%)	H <sub>2</sub> O (%)
0	10	90
5	10	90
35	60	40
40	60	40
60	100	0
70	100	0

Le débit est de 1 mL.min<sup>-1</sup>, et la quantité d'échantillon injectée est égale à 20 µL.

## *IV. Méthodes spectroscopiques et spectrométriques*

### **IV-1. Résonance magnétique nucléaire, RMN**

Les spectres RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , COSY 45, DEPT 135 et HETCOR SR sont réalisés sur un spectromètre Bruker AMX-400. Les solvants deutérés utilisés sont  $\text{CDCl}_3$ , méthanol- $\text{d}_4$  et l'acétone- $\text{d}_6$  provenant de Cambridge Isotope Laboratories Inc. (CIL, Andover, USA). Le pic du solvant a servi de référence. Les valeurs des déplacements chimiques de chaque solvant sont les suivants : 7.26 ppm pour le  $\text{CDCl}_3$ , 2.04 ppm pour l'acétone- $\text{d}_6$ , et 3.4 ppm pour le méthanol- $\text{d}_4$ . Les échantillons sont solubilisés dans un minimum de solvant et filtré.

### **IV-2. Spectrométrie de masse**

#### *IV-2.1. Modes EI et DCI*

Les spectres de masse sont effectués sur un triple quadripôles Delsi-Nermag R30-10. L'énergie cinétique des électrons est de 70eV. En impact électronique, EI, l'échantillon est déposé dans un petit creuset en verre, chauffé progressivement jusqu'à 380°C. En ionisation chimique par désorption, DCI, l'échantillon est déposé sur un filament de tungstène, et chauffé à 600°C en quelques secondes. Le gaz réactant utilisé est l'ammoniac (Carbagaz, CH).

#### *IV-2.2. LC/MS*

L'appareil utilisé est un LCQ (Finnigan) à trappe ionique, couplé avec un appareil HPLC HP1100 (Hewlett-Packard). Le LCQ est équipé d'une source ESI et d'une source APCI.

Le flux de solvant en HPLC est de 1 mL.min<sup>-1</sup>, 20  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont injectés. La colonne utilisée est une phase inverse RP-C18. Afin d'obtenir un flux de 100  $\mu\text{L}$ .min<sup>-1</sup> à l'entrée de la source électrospray, nous effectuons un split post-colonne de 90 %. D'autre part, 3  $\mu\text{L}$ .min<sup>-1</sup> d'une solution aqueuse à 5 % de  $\text{NH}_3$  sont injectés pour favoriser l'ionisation des composés, et ainsi augmenter la sensibilité.

Les paramètres de la source d'électrospray sont les suivants :

- Température du capillaire chauffant : 190°C
- Voltage de la source : 4.5 kV
- Flux d'azote : 600 mL.min<sup>-1</sup>

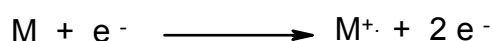
## *V. Spectrométrie de masse*

La spectrométrie de masse est le détecteur idéal dans l'analyse des mélanges complexes, et de la confirmation de structure des composés. C'est une technique extrêmement sensible, sélective, reproductible, qualitative et quantitative.

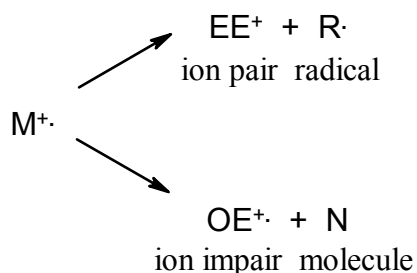
Nous décrivons les quatre méthodes de spectrométrie de masse utilisées, l'impact électronique (EI), l'ionisation chimique par désorption (DCI), l'électrospray (ES ou ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

### V-1. L'impact électronique

L'ionisation par impact électronique est la méthode la plus ancienne et la plus utilisée. Le produit à analyser est volatilisé dans la chambre d'ionisation, les molécules sont soumises au bombardement électronique et transformées en ions positifs. La courbe du nombre d'ions produits en fonction de l'énergie des électrons donne un rendement maximum pour les molécules organiques aux alentours de 70eV. A cette valeur, on produit un ion par mille molécules entrant dans la source.



L'ion moléculaire est un radical-cation à nombre impair d'électrons. Il donne comme fragments soit un radical et un ion à nombre pair d'électrons, soit une molécule neutre et un nouveau radical-cation.



Les ions sont ensuite séparés d'après leur rapport masse sur charge et détectés en proportion de leur nombre. Nous obtenons ainsi un spectre de masse.

### V-2. La source à impact électronique

Elle est constituée d'un filament (W ou Rh) chauffé qui émet des électrons qui sont accélérés vers une anode et entrent en collision avec les molécules gazeuses de la source (figure V-2). Les ions sont focalisés vers l'analyseur quadripolaire grâce à un système de lentilles.

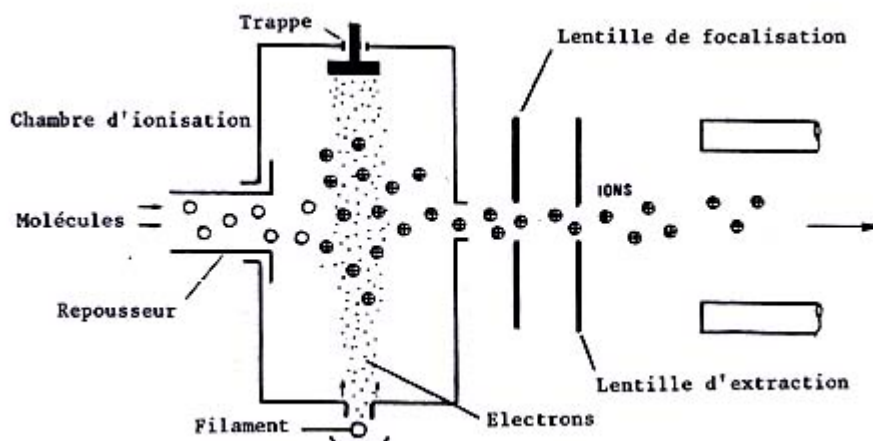
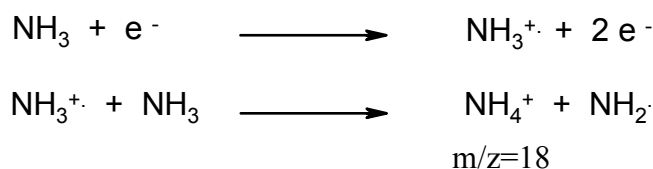


Figure V-2 : Schéma d'une source en EI (Documentation Nermag)

### V-3. L'ionisation chimique par désorption

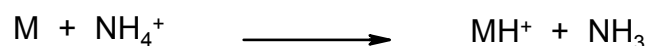
Dans le cas de molécules "fragiles", les vitesses de décomposition sont telles que l'ion moléculaire ne peut pas être observé. L'ionisation chimique est une méthode plus douce, qui donnera peu de fragments, mais permettra de déterminer la masse moléculaire.

Cette méthode consiste à produire des ions par collision de la molécule à ioniser avec des ions primaires présents dans la source. Les principaux gaz ionisants utilisés sont : l'ammoniac et l'ammoniac deutéré, le méthane, l'iso-butane, le diméthyléther et le monoxyde d'azote. Nos expériences ont été réalisées avec l'ammoniac. La production de l'ion réactant  $\text{NH}_4^+$  est fonction de la température et de la pression du gaz dans la source.



Les ions  $\text{NH}_4^+$  réagissent avec les molécules pour donner les deux ions pseudo-moléculaires  $(M+1)^+$  et  $(M+18)^+$ , selon les réactions suivantes :

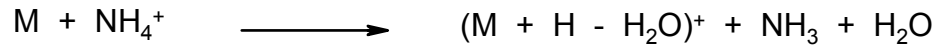
➤ Réaction de transfert de protons



➤ Réaction d'addition électrophile et formation d'adduit



➤ Réactions d'élimination



Le spectre observé résulte probablement de la superposition de plusieurs phénomènes : évaporation de l'échantillon avec ionisation rapide, ionisation directe sur la surface du filament (tungstène ou rhénium), désorption directe d'ions, et à plus haute température pyrolyse suivie d'ionisation.

#### V-4. L'ionisation par électrospray

C'est une méthode pour laquelle les ions présents en solution sont transférés en phase gazeuse.

L'électrospray (figure V-4A) [71] est produit par application, à pression atmosphérique, d'un haut champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un débit de  $1-10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel, de 3 à 6 kV, entre le capillaire et la contre-électrode.

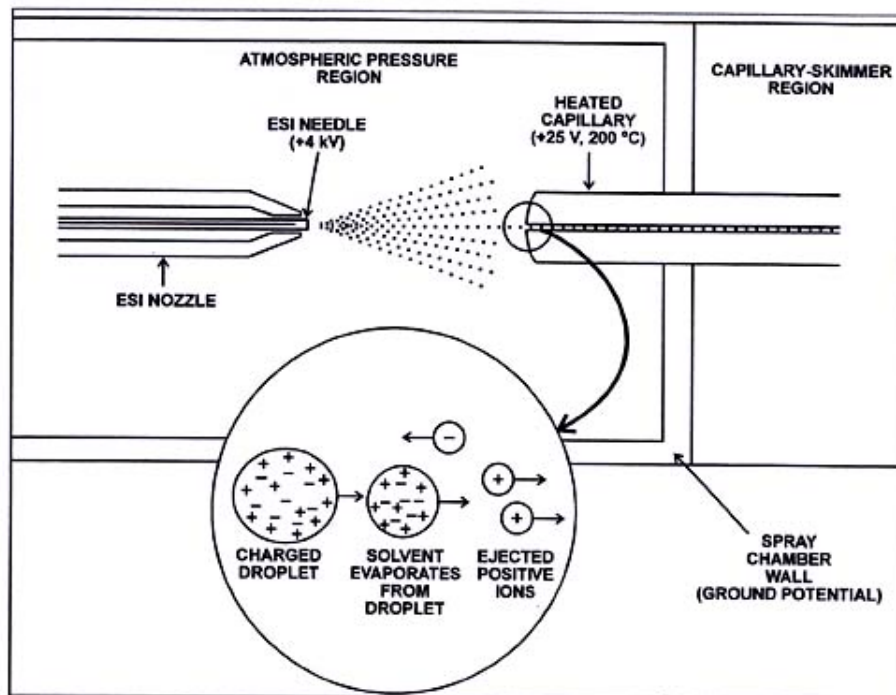


Figure V-4A : Nébullisation en électrospray (Documentation Finnigan)

Ce champ provoque un enrichissement d'ions positifs à la surface du liquide, située à l'extrémité du capillaire. Lorsque la force de répulsion entre les charges positives est plus grande que la tension de surface du liquide, cela entraîne une dilatation de la surface du liquide et il se forme le cône de Taylor (figure V-4B). Les gouttelettes chargées produites par le jet du cône se déplacent vers la contre-électrode.

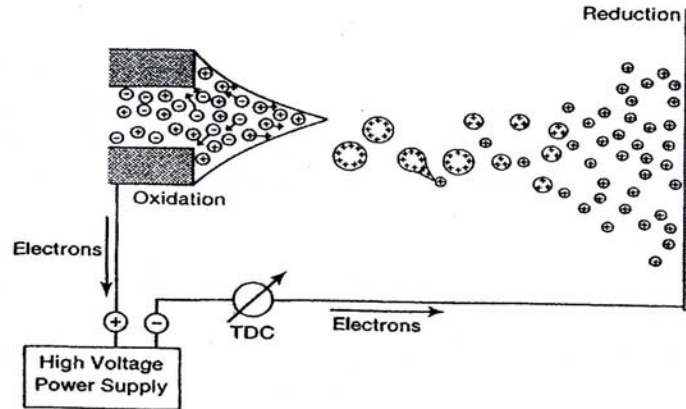


Figure V-4B : Schéma des ions présents en solution sous l'action du champ [72]

L'évaporation du solvant provoque une réduction de la taille des gouttelettes pendant leur déplacement vers la contre-électrode, et leur déformation à cause des forces de frottements (figure V-4C). L'énergie nécessaire pour la désolvatation est fournie par l'énergie thermique à température ambiante. La densité de charge électrique augmente à la surface des gouttelettes jusqu'à la limite de stabilité de Rayleigh. Elles se désagrègent lorsque les forces de répulsion Coulombienne deviennent supérieures aux forces de cohésions du liquide. Cette désagrégation se produit à environ 70 à 80 % de la limite de Rayleigh, et donne naissance à de plus petites gouttelettes polychargées.

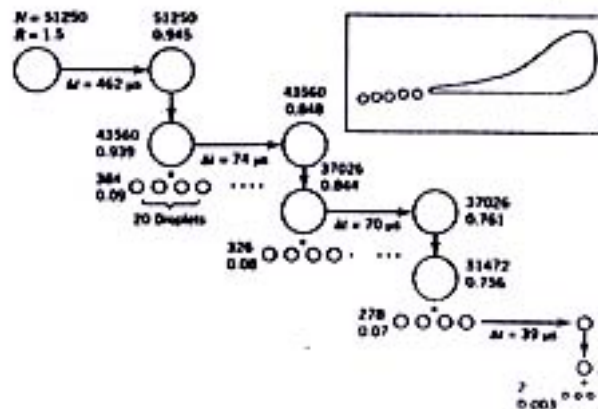


Figure V-4C : Schéma de la fission des gouttelettes au cours du temps [72]

N : nombre de charges élémentaires sur la gouttelette

R : rayon de la gouttelette en  $\mu\text{m}$

$\Delta t$  : temps nécessaire pour que la gouttelette atteigne la taille  
requis  
pour réaliser une fission

Deux mécanismes ont été proposés pour la formation des ions en phase gazeuse :

- Le premier mécanisme proposé par Dole dépend de la formation de gouttelettes extrêmement petites ne contenant qu'un seul ion. L'évaporation du solvant de ces gouttelettes conduit à la production d'ions en phase gazeuse.

- Iribarne et Thomson proposent un nouveau mécanisme : le processus d'évaporation d'ion. Le rayon d'une gouttelette diminue jusqu'à une taille donnée, à partir de laquelle l'émission d'ion en phase gazeuse devient possible. Le processus d'évaporation d'ions est prédominant par rapport aux fissions coulombiennes quand le rayon des gouttelettes est inférieur ou égal à 10 nm.

### V-5. L'ionisation chimique à pression atmosphérique

C'est une technique d'ionisation en phase gazeuse, par conséquent l'acidité (ou basicité) de la phase gazeuse de l'analyte et de la vapeur du solvant ont un rôle important dans le processus. Elle est utilisée pour les composés moyennement polaires.

L'échantillon en solution est nébulisé en fines gouttelettes, qui sont vaporisées dans un tube à haute température (figure V-5). Une haute tension est appliquée sur l'aiguille à la sortie du tube. La haute tension crée une décharge corona, provoquant ainsi la formation d'ions réactifs, par une série de réactions chimiques avec les molécules de solvant et d'azote (gaz). Ensuite, les ions réactifs réagissent avec les molécules de l'échantillon pour engendrer les ions de l'échantillon. Ces ions entrent ensuite dans le détecteur de masse.

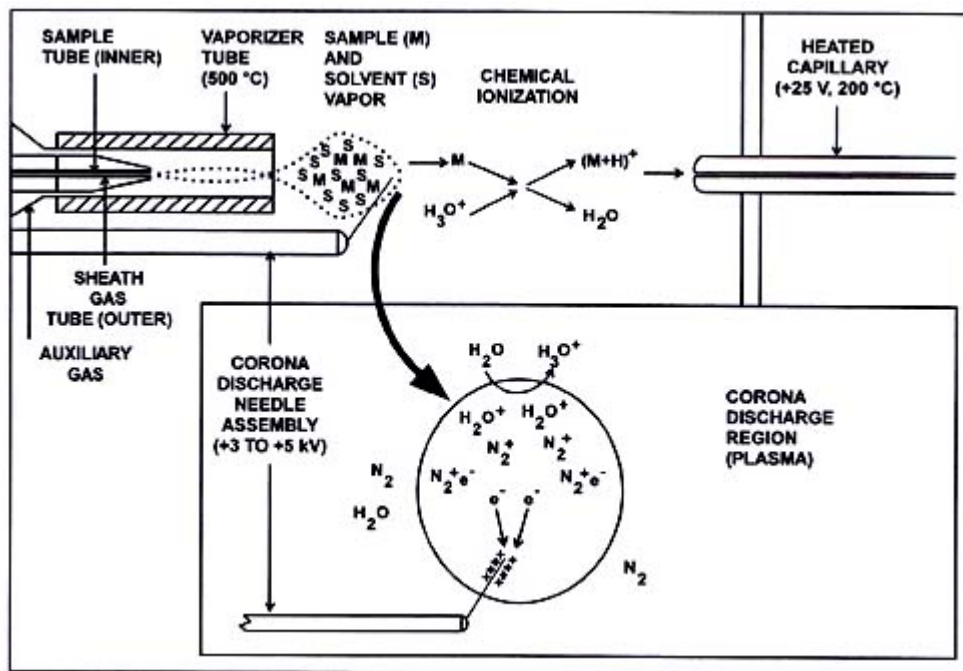
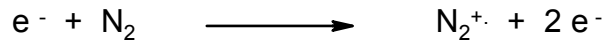


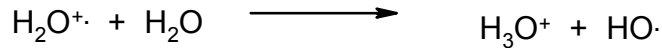
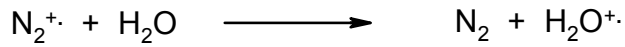
Figure V-5 : Schéma du processus de la formation d'un ion positif (Documentation Finnigan)

En mode positif, l'ionisation de l'échantillon produit une série de réactions, commençant par la formation d'un cation initié avec un électron.

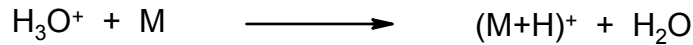
➤ Formation de l'ion primaire



➤ Formation de l'ion secondaire



➤ Transfert de proton



En mode négatif, la formation de l'anion  $(M-H)^-$  s'effectue par l'arrachement d'un proton avec  $OH^-$ .

## V-6. Analyseur quadripolaire

La limite en masse, la transmission et la résolution sont les qualités principales d'un analyseur. La limite en masse détermine la valeur limite du rapport  $m/z$  (masse/charge) mesurable. La transmission correspond au rapport entre le nombre d'ions arrivant au détecteur et celui produit dans la source. La résolution est la capacité de fournir des signaux différenciables pour deux ions de masses voisines.

Le quadripôle utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport  $m/z$ . Il est constitué de quatre barres ayant idéalement une section hyperbolique (figure V-6A).

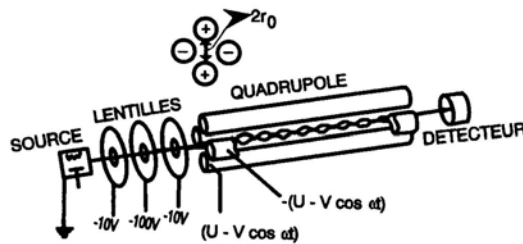


Figure V-6A : Appareil à quadripôles comprenant la source, les lentilles, l'analyseur et le détecteur

Un ion positif pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction.

Les ions cheminant suivant l'axe des  $z$  (figure V-6B) est soumis à l'influence d'un champ électrique total constitué de deux champs superposés :

- champ alternatif quadripolaire
- champ constant résultant de l'application d'un potentiel

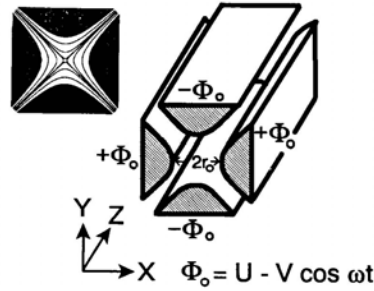


Figure V-6B : Schéma représentant les barres hyperboliques, les potentiels appliqués et les lignes d'équipotentiel [73]

Les équations des potentiels sont les suivantes :

$$\phi_0 = + (U - V \cos \omega t) \text{ et } -\phi_0 = - (U - V \cos \omega t)$$

$\phi_0$  est la tension appliquée aux barres,  $\omega$  la fréquence angulaire,  $U$  la tension continue,  $V$  l'amplitude "zéro du pic" du voltage RF.

Les ions accélérés conservent leur vitesse suivant l'axe  $z$  mais ils sont soumis en  $x$  et  $y$  aux accélérations résultantes des forces dues aux champs électriques. Ces équations de mouvement ont été établies par Mathieu en 1866.

$$F_x = m a = m (d^2x / dt^2) = -ze (\delta\phi / \delta x) \quad \text{avec } m \text{ masse de l'ion, } a \text{ l'accélération}$$

$$F_y = m a = m (d^2y / dt^2) = -ze (\delta\phi / \delta y) \quad -q = ze \text{ la charge}$$

$$u = x \text{ ou } y \quad a_u = (8 ze U / m r_o^2 \omega^2) \quad q_u = (4 ze V / m r_o^2 \omega^2)$$

Elles établissent une relation entre les coordonnées d'un ion et le temps. L'ion pourra traverser le quadripôle sans toucher les barres si  $x$  et  $y$  restent inférieurs simultanément à  $r_o$ , sinon il s'y décharge et ne sera pas détecté.

La valeur de  $r_o$  est constante pour un quadripôle donné alors que la tension continue  $U$  et l'amplitude du voltage  $V$  sont variables. Nous pouvons ainsi représenter les zones de stabilité (figure V-6C) dans un diagramme  $a_u = f(q_u)$  pour une masse  $m$  donnée. Ces zones de stabilité A correspondent aux zones de valeurs de  $U$  et de  $V$  pour lesquelles  $x$  et  $y$  restent inférieurs à  $r_o$  au cours du temps.

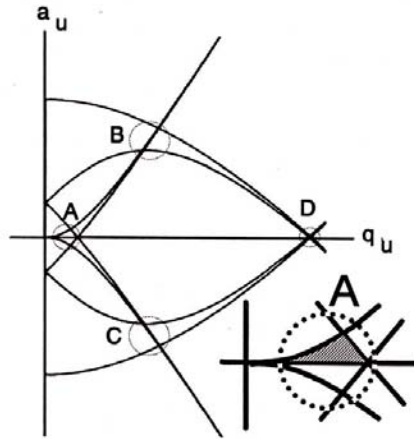


Figure V-6C : Diagramme de stabilité  $a_u = f(q_u)$  d'un ion de masse  $m$  donnée

Les paramètres  $a_u$  et  $q_u$  sont proportionnels à la masse par conséquent la zone A “se déplace” d’une masse à l’autre en gardant la même géométrie (figure V-6D).

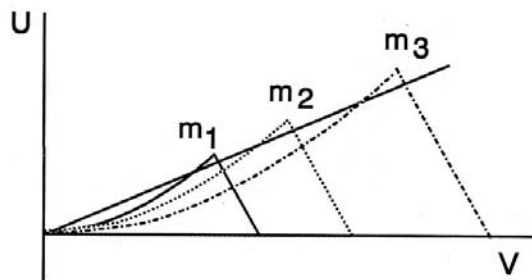


Figure V-6D: Zone de stabilité  $U = f(V)$   
pour des ions de masses différentes  $m_1 < m_2 < m_3$

## V-7. La trappe ionique

La trappe ionique est constituée de trois électrodes hyperboliques :

- une calotte d'entrée, fermant le système optique des ions
- une calotte de sortie, fermant le système de détection des ions
- une électrode circulaire, localisée entre les deux calottes

Les électrodes forment ainsi une cavité (figure V-7A) permettant l'analyse de masse. Les ions présents dans la trappe sont soumis à l'influence d'un champ électrique constitué d'un champ alternatif et d'un champ constant. Les trois électrodes forment ainsi une sorte de quadripôle à trois dimensions, de tension pour l'électrode circulaire  $\phi_0$  et de tension  $-\phi_0$  pour les deux calottes. Les ions sont gardés captifs, “trappés”, sur une trajectoire en forme de huit.

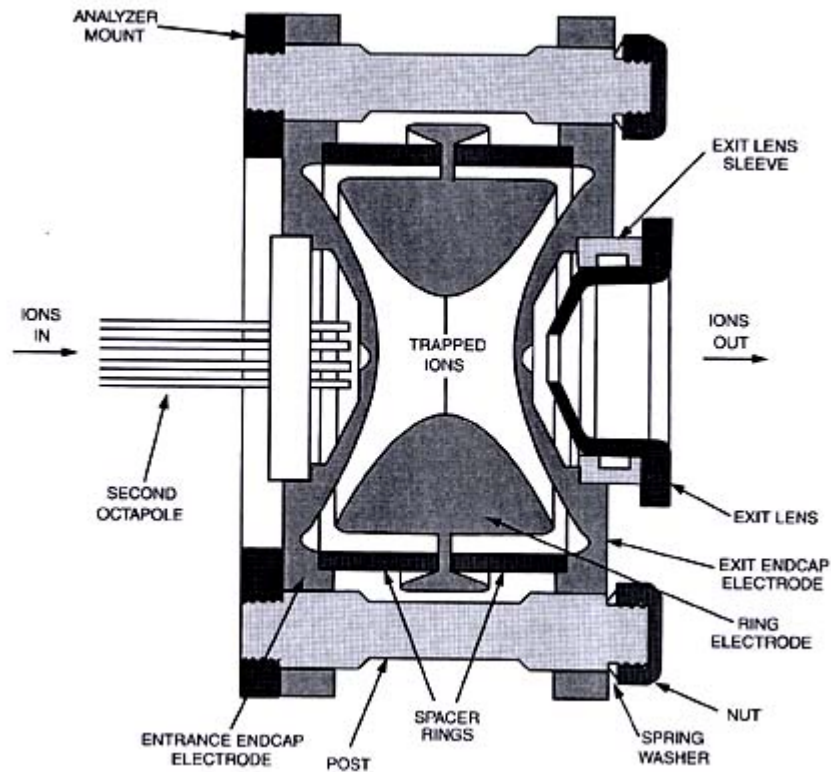


Figure V-7A : Schéma d'une trappe ionique (Documentation Finnigan)

A l'intérieur de la trappe, les ions se repoussent mutuellement et, de ce fait, ont tendance à accroître le rayon de la trajectoire (figure V-B). Une pression de gaz inerte (hélium) est appliquée pour maintenir les ions sur une trajectoire de petite dimension.

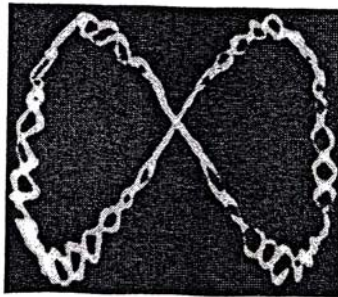


Figure V-7B : Trajectoire suivie par les ions

Les ions sont éjectés de la trappe suivant leur rapport masse sur charge. Les différents processus qui se produisent dans l'analyseur de masse se décomposent en quatre étapes :

- stockage des ions
- isolement des ions (SIM, SRM, CRM et  $MS^n$ )
- collision induisant des dissociations (SRM, CRM et  $MS^n$ )
- détection des ions

Les techniques d'analyse SIM, SRM et CRM, permettent d'obtenir une grande sensibilité de détection. Elles seront utilisées pour la recherche des métabolites, souvent présent à l'état de traces, dans des mélanges complexes ainsi que dans le matériel végétal.

➤ SIM : Selected Ion Monitoring

Les ions formés étant stockés dans la trappe ionique, seuls les ions sélectionnés sont expulsés de l'analyseur et détectés, obtenant ainsi un spectre de masse en mode SIM. Ce mode donne une sensibilité plus importante que le mode de balayage de l'ensemble des masses, Full scan mode.

➤ SRM : Selected Reaction Monitoring

Ce mode de balayage se déroule en deux parties :

- Tous les ions stockés dans la trappe ionique sont expulsés à l'exception des ions parents de masse sélectionnée. Ils sont ensuite excités pour qu'ils puissent rentrer en collision avec les molécules d'hélium présentes dans la trappe, et de ce fait se fragmenter.

- Les ions fils produits sont stockés dans l'analyseur de masse. Seuls les ions fils sélectionnés sont expulsés puis détectés, afin d'obtenir le spectre de masse en mode SRM.

➤ CRM : Consecutive Reaction Monitoring

Ce mode de balayage se déroule en trois parties :

- L'ion parent sélectionné est stocké dans l'analyseur. Il est excité et rentre en collision avec les molécules d'hélium afin de provoquer sa fragmentation en ions fils.

- Tous les ions fils produits sont stockés dans l'analyseur, seuls les ions de masse sélectionnés sont maintenus dans la trappe tandis que les autres sont expulsés. L'ion fils sélectionné devient parent à son tour, rentre en collision avec les molécules d'hélium et produit de nouveaux ions fils.

- Les nouveaux ions fils sont stockés dans l'analyseur. Ceux de masse sélectionnée sont expulsés et détectés, obtenant ainsi le spectre de masse en mode CRM MS<sup>n</sup>. Le processus peut être répété jusqu'à n fois, avec  $n < 8$ .

De même que l'analyseur quadripolaire, la trappe ionique possède un diagramme de zone de stabilité des ions. Ce diagramme dépend également des paramètres a et q provenant des équations de Mathieu.

L'amplitude de voltage pour "trapper" les ions est appliquée sur l'électrode circulaire (figure V-7C). Sur les calottes d'entrée et de sortie est appliquée également une amplitude de voltage de résonance d'excitation - d'éjection des ions.

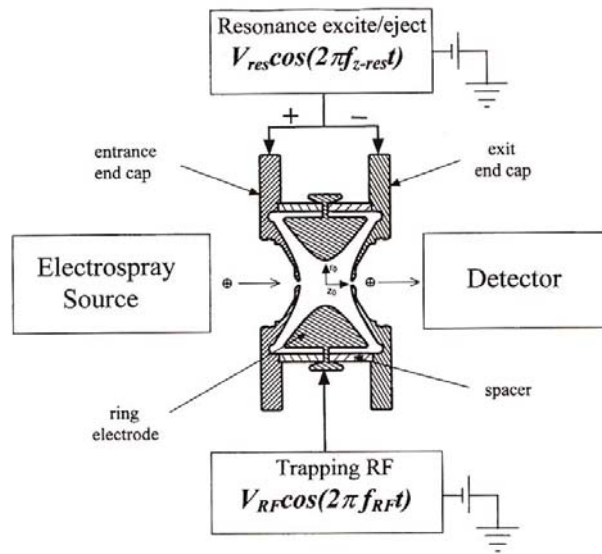


Figure V-7C : Amplitude de voltage appliquée aux trois électrodes

Les équations de Mathieu pour une trappe ionique sont les suivantes :

$$(1) a_z = -2 a_r = (-16e U) / [m (r_o^2 + 2 z_o^2) \Omega^2]$$

$$(2) q_z = -2 q_r = (-8e V) / [m (r_o^2 + 2 z_o^2) \Omega^2]$$

La géométrie de la trappe permet d'établir une troisième équation (3), et de là simplifier les équations (1) et (2) :

$$(3) r_o^2 = 2 z_o^2$$

avec : e charge de l'ion, m masse de l'ion, r<sub>o</sub> rayon interne, z<sub>o</sub> distance du centre de la trappe à la calotte, Ω fréquence, V amplitude de voltage rf, U tension.

Le diagramme est représenté en fonction des paramètres a<sub>z</sub> et q<sub>z</sub> (figure V-7D). Les coordonnées de la ligne de stabilité sont : (a<sub>z</sub>, q<sub>z</sub>) = (0, 0) et (a<sub>z</sub>, q<sub>z</sub>) = (0, 0.908).

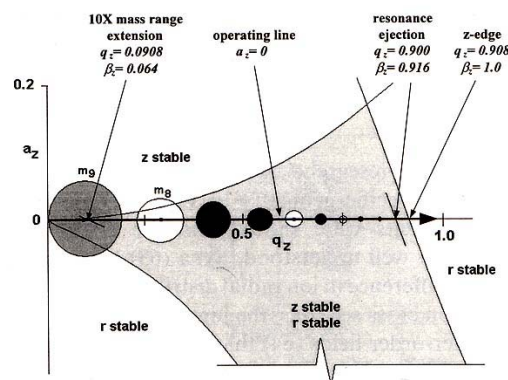


Figure V-7D: Diagramme de stabilité des ions, a<sub>z</sub> = f(q<sub>z</sub>) [71]

La valeur de  $q_z$  est inversement proportionnelle à la masse  $m$ . Plus le rapport  $m/z$  est grand et plus la valeur de  $q_z$  est faible, représenté sur la figure (V-7D) par la différence de taille des cercles (ex :  $m_9$  et  $m_8$ ).

L'analyse d'un ion dépend de l'amplitude rf appliquée sur l'électrode circulaire. La représentation schématique (figure V-7E) illustre les quatre étapes nécessaires de l' "ion-trap scan function".

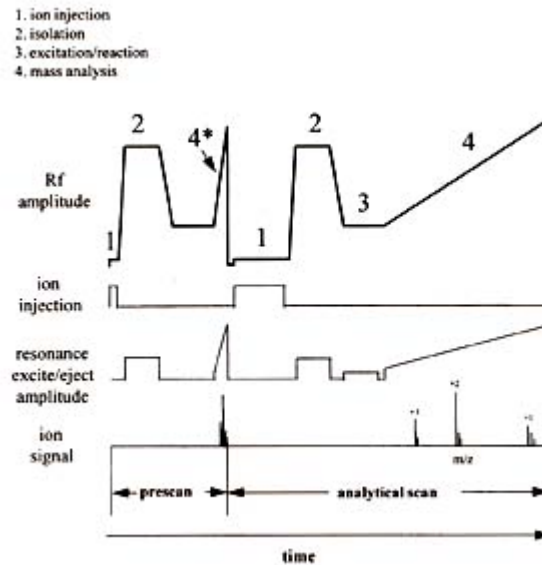


Figure V-7E : Représentation schématique de la fonction scan dans une trappe ionique

La première étape est l'injection de l'ion qui requière un temps de 0.001-1000 ms. Puis l'ion est isolé à l'intérieur de la trappe pour une durée de 5-30 ms, c'est la deuxième étape. Après l'isolation, la phase d'excitation consiste à ce que l'ion emmagasine de l'énergie. Cette troisième étape dure entre 5 et 30 ms. Finalement, la dernière étape est l'analyse de masse, pendant 10 à 400 ms. Les ions sont éjectés séquentiellement en dehors de la chambre QIT, à travers le trou de la calotte de sortie.

### CHAPITRE III :

## METABOLITES ISOLEES ET

*IDENTIFIÉS DU MILIEU DE  
CULTURE*



*Rameau et fruit d'orme de Chine*

## Bibliographie

### *I. Analyses et structures des métabolites isolés du milieu de culture*

Des extraits bruts du milieu de culture liquide, 10 métabolites ont été isolés et identifiés (figure I) dont le composé **1** qui est un nouveau produit naturel.

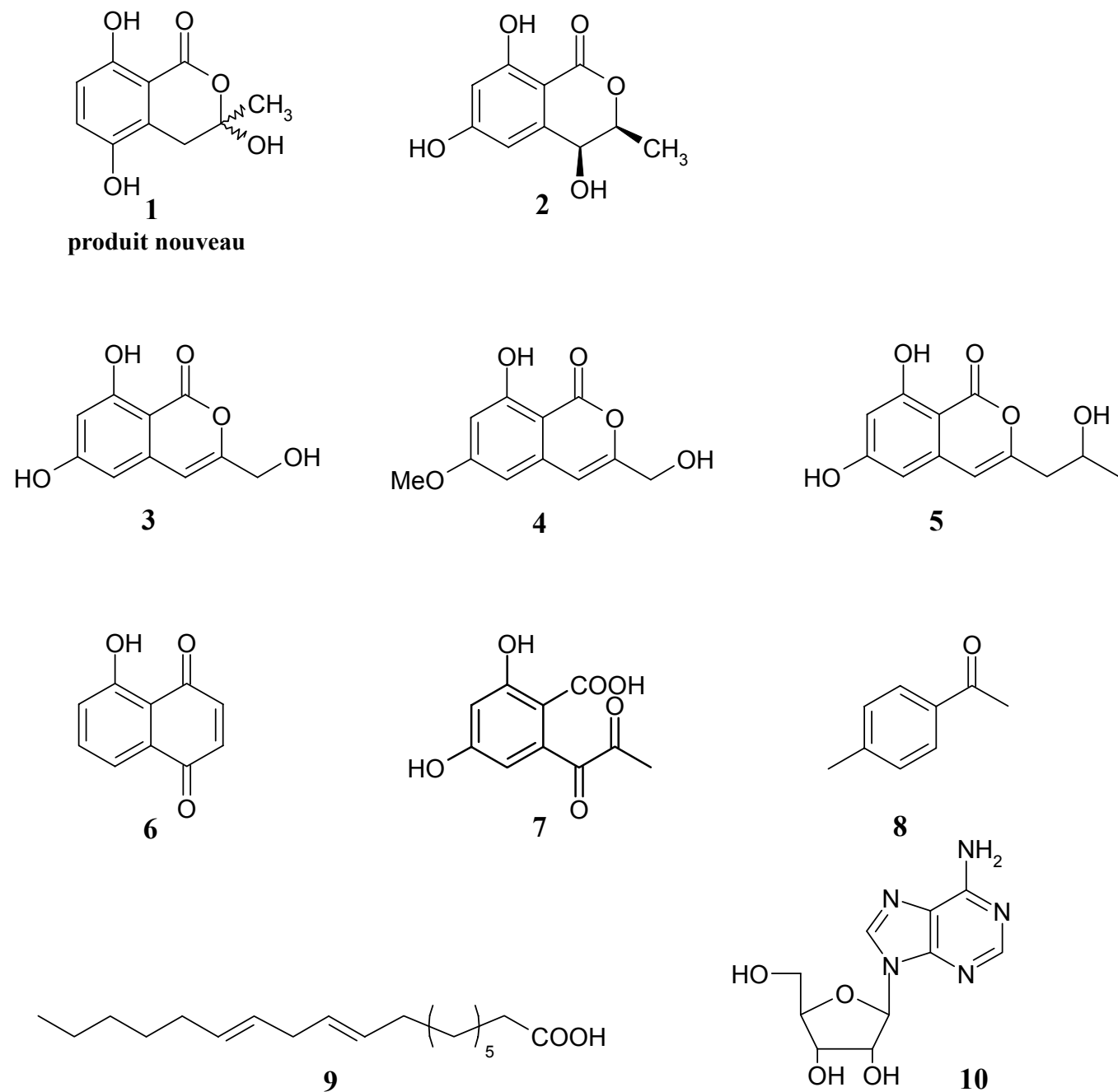
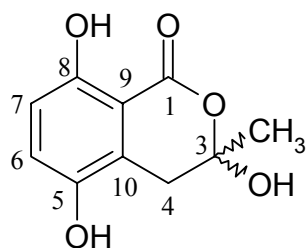


Figure I : Métabolites secondaires isolés du milieu de culture de *Graphium ulmi*

Bibliographie

**I-1. 3-Méthyl-3,5,8-trihydroxy-isochroman-1-one (1)**



*Analyse*

Formule brute : C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>

Poids moléculaire : 210 g.mol<sup>-1</sup>

Quantité de produit : < 1 mg

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 11.15 (*s*, OH-C(8)) ; 7.16 (*d*, *J* = 8.5, H-C(7)) ; 6.80 (*d*, *J* = 8.5, H-C(6)) ; 3.20 (*d*, *J* = 16.2, H-C(4)) ; 3.05 (*d*, *J* = 16.2, H-C(4)) ; 2.05 (*t*, *J* = 2.9, Me).

APCI-MS (négatif) : 209.3 ([*M* - H]<sup>-</sup>) ; 181.6 ([*M* - H - CO]<sup>-</sup>).

Le COSY 45 indique un spectre AB entre les deux protons aromatiques H-C(6) et H-C(7), ainsi qu'entre les deux signaux à 3.20 ppm et 3.05 ppm identifiés comme étant les protons géminés du CH<sub>2</sub> en C(4).

Les données spectroscopiques ne permettent pas de déterminer la stéréochimie du carbone C(3).

Pour confirmer la structure de ce métabolite, des recherches bibliographiques ont été effectuées sur quatre molécules de structure similaire (figure I-1).

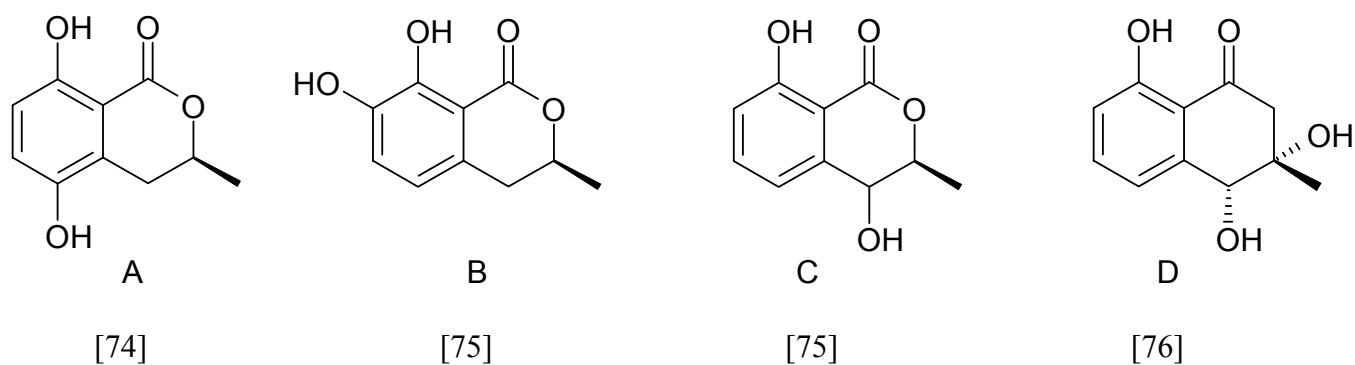


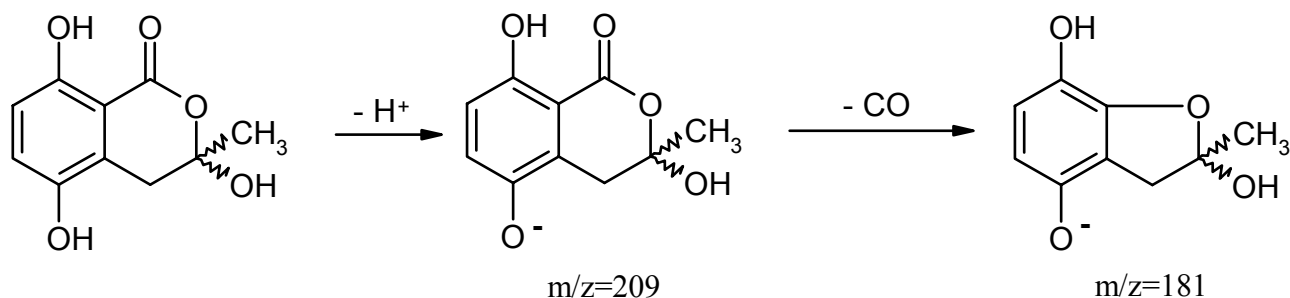
Figure I-1 : Molécules de référence pour la résolution de la structure de **1**

$\delta$ (ppm)	A	B	C	D
H-C(2)				3 et 2.80 ( $J=17.1$ )
H-C(3)	4.70 ( <i>m</i> )	4.75 ( <i>sex</i> , $J=6$ )	4.56 ( <i>dd</i> , $J=6, 2$ )	
H-C(4)	3.05 et 2.55 ( <i>dd</i> )	2.90 ( <i>d</i> , $J=6$ )	4.50 ( <i>d</i> , $J=2$ )	4.76
H-C(5)		7.10 ( <i>d</i> , $J=8$ )	6.95 ( <i>d</i> , $J=4$ )	7.10
H-C(6)	6.65 ( <i>d</i> , $J=9$ )	6.60 ( <i>d</i> , $J=8$ )	7.52 ( <i>dd</i> , $J=4, 3.5$ )	7.52
H-C(7)	7.03 ( <i>d</i> , $J=9$ )		6.88 ( <i>d</i> , $J=3.5$ )	6.93
Me-C(3)	1.38 ( <i>d</i> )	1.60 ( <i>d</i> , $J=6$ )	1.55 ( <i>d</i> , $J=6$ )	1.30

Le spectre du composé **1** ne renferme pas de protons dont les déplacements chimiques sont entre 4 et 5 ppm, donc le C(3) est entièrement substitué. Les déplacements chimiques, des molécules A et B, des deux protons en position 4 correspondent à l'ordre de grandeur de ceux relevé pour notre métabolite. Les protons aromatiques de **1** s'avèrent être en positions 6 et 7 comme dans la molécule A. Pour des composés de structures identiques, les deux protons en C(4) sont non équivalents lorsqu'il y a deux hydroxydes en para l'un de l'autre sur le phényle. Les valeurs des déplacements chimiques à 3.20 et à 3.05 ppm des deux protons H-C(4) permet d'établir l'hypothèse que les deux hydroxydes sont en positions 5 et 8. Les molécules C et D n'ont pas de système AB pour les protons aromatiques. Elles permettent d'identifier la position de l'hydroxyle et du méthyle de **1**, par rapport à la valeur des déplacements de leurs substituant sur leurs carbones C(3) et C(4).

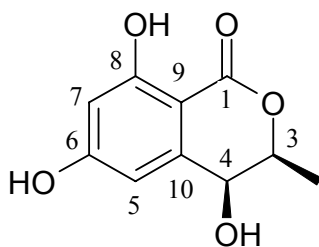
D'après la littérature, dans la grande majorité des structures similaires au composé **1**, la configuration absolue du C(3) est R. Nous pouvons envisager qu'il en est de même pour l'isochroman-1-one **1** isolé du milieu de culture de *G. ulmi*.

Schéma de fragmentations de masse :



## I-2. 3-Méthyl-4,6,8-trihydroxy-isochroman-1-one (2)

## Bibliographie



## *Analyse*

Formule brute :  $C_{10}H_{10}O_5$   
Poids moléculaire :  $210 \text{ g.mol}^{-1}$

Quantité de produit :  $< 1 \text{ mg}$   
UV (MeOH) : 220 (100), 260 (25), 295 (10)

Composé très sensible à la lumière

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 6.56 (*d*,  $J = 1.75$ , H-C(5)) ; 6.40 (*d*,  $J = 1.75$ , H-C(7)) ; 5.31 (*d*,  $J = 4.2$ , H-C(4)) ; 4.07 (*dd*,  $J = 4.2, 6.5$ , H-C(3)) ; 1.24 (*d*,  $J = 6.5$ , Me).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 170.74 (C(10)) ; 167.04 (C(6)) ; 166.59 (C(1)) ; 159.92 (C(8)) ; 103.98 (C(5)) ; 103.01 (C(7)) ; 85.49 (C(4)) ; 70.12 (C(3)) ; 18.05 (Me).

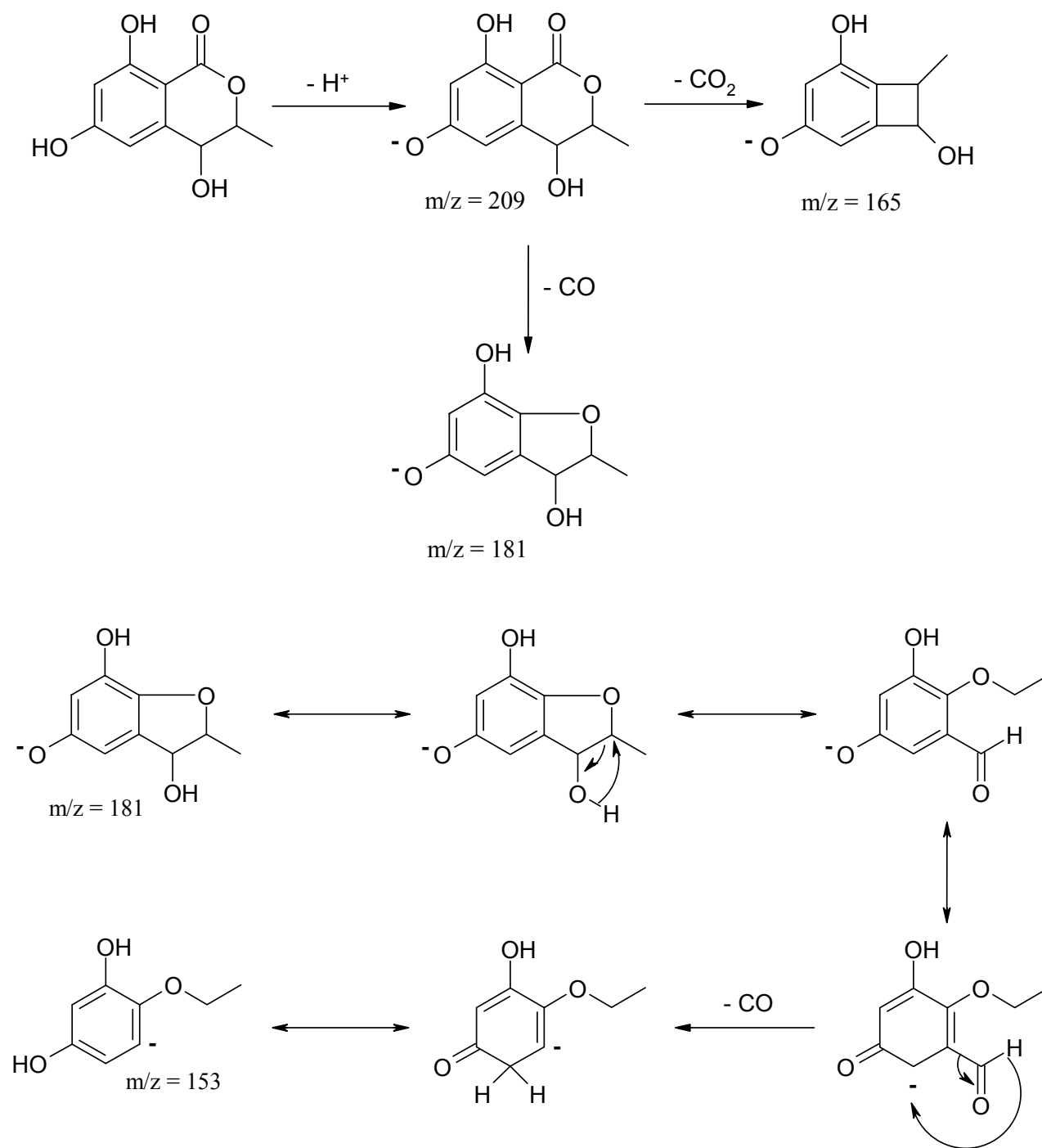
ESI-MS (négatif) : 209.1 ( $[M - H]^-$ ) ; 181.0 ( $[M - H - \text{CO}]^-$ ) ; 165.1 ( $[M - H - \text{CO}_2]^-$ ) ; 153.8 ; 139.1.

Le COSY 45 indique un couplage entre les deux protons aromatiques H-C(5) et H-C(7), entre H-C(3) et H-C(4) ainsi qu'entre le méthyle et H-C(3) un couplage  $^3J$ . D'après le DEPT 135, il n'y a pas de groupement  $\text{CH}_2$  dans la structure de la molécule.

En ESI-MS négatif [77], la perte de 44 à partir de l'ion moléculaire 209 uma  $[M - H]^-$ , indique un groupement  $\text{CO}_2$  dans la molécule.

Schéma de fragmentations de masse :

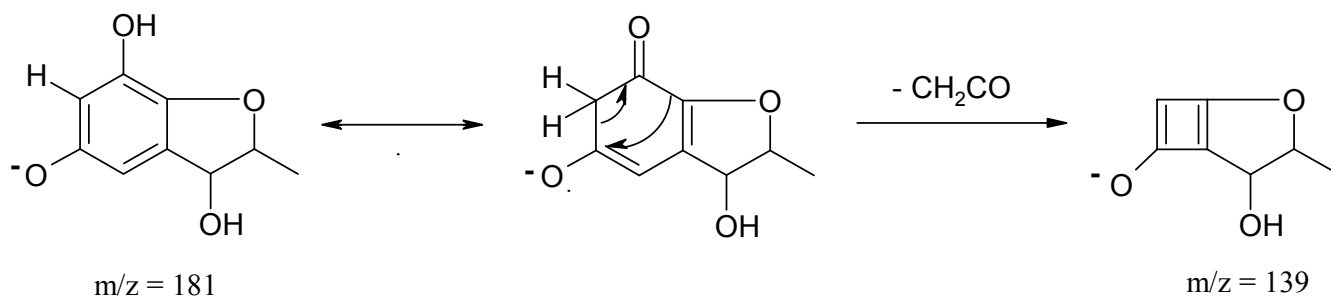
Bibliographie



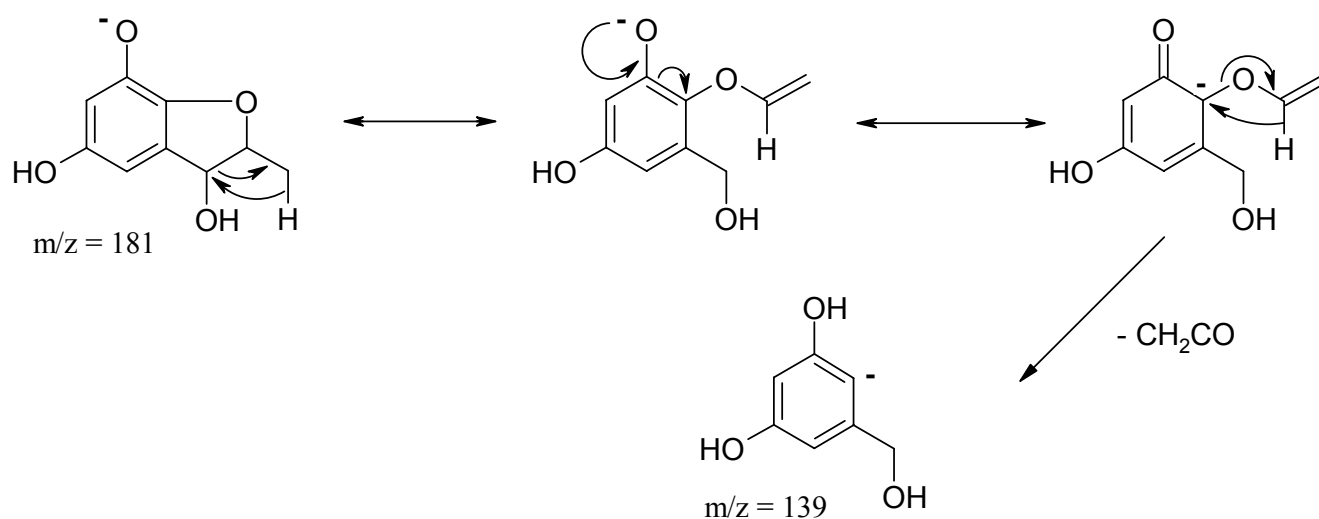
Mécanismes pour la perte du groupement  $H_2C=C=O$  :

i) A partir du cycle benzénique

## Bibliographie

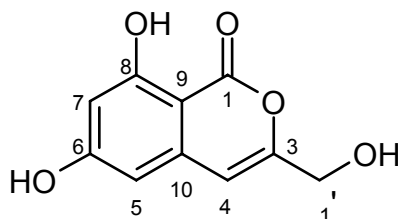


ii) A partir du cycle à 5



Cette molécule a été isolée pour la première fois en 1977 de *Cercospora taiwanensis* [78]. En 1999, elle a été retrouvée dans une culture de *Phomopsis helianthi* [79] et caractérisée comme une phytotoxine qui se décompose à la lumière en molécules non toxiques.

### I-3. 6,8-Dihydroxy-3-hydroxyméthyl-isochromen-1-one (3)



## Analyse

Formule brute :  $C_{10}H_8O_5$

## Bibliographie

Poids moléculaire : 208 g.mol<sup>-1</sup>

Quantité de produit : < 1 mg

UV (MeOH) : 245 (100), 275 (20), 290 (13), 330 (15).

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 10.76 (*s*, OH-C(8)) ; 6.6 (*d*, *J*= 2.2, H-C(5)) ; 6.4 (*d*, *J*= 2.2, H-C(7)) ; 6.3 (*s*, H-C(4)) ; 5.05 (*d*, *J*= 2.2, H-C(1')) ; 4.96 (*d*, *J*= 2.2, H-C(1')) .

EI-MS (positif) : 208 (81, *M*<sup>+</sup>) ; 190 (5) ; 180 (28) ; 177 (100) ; 164 (7) ; 163 (13) ; 162 (10) ; 149 (25) ; 133 (5) ; 121 (98) ; 105 (4) ; 77 (9).

DCI-MS (positif) : 226 ([*M* + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>) ; 209 ([*M* + H]<sup>+</sup>).

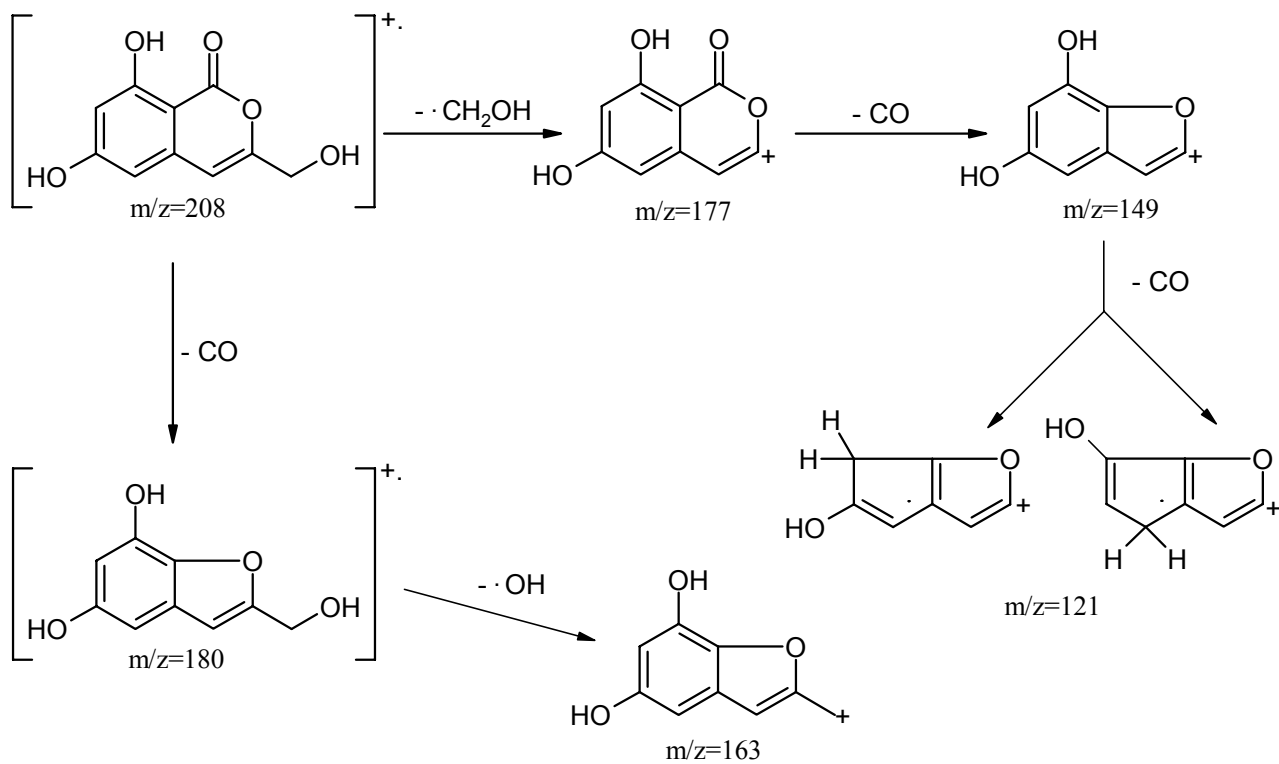
Le spectre UV , bandes à 245, 275 et 330 nm, permet d'identifier la structure d'une isocoumarine avec une double liaison entre les C(3) et C(4).

Sa masse [80,81,82,83] est égale à 208 uma, avec le fragment (*M*-CH<sub>2</sub>OH)<sup>+</sup> qui est le pic de base à 177 uma.

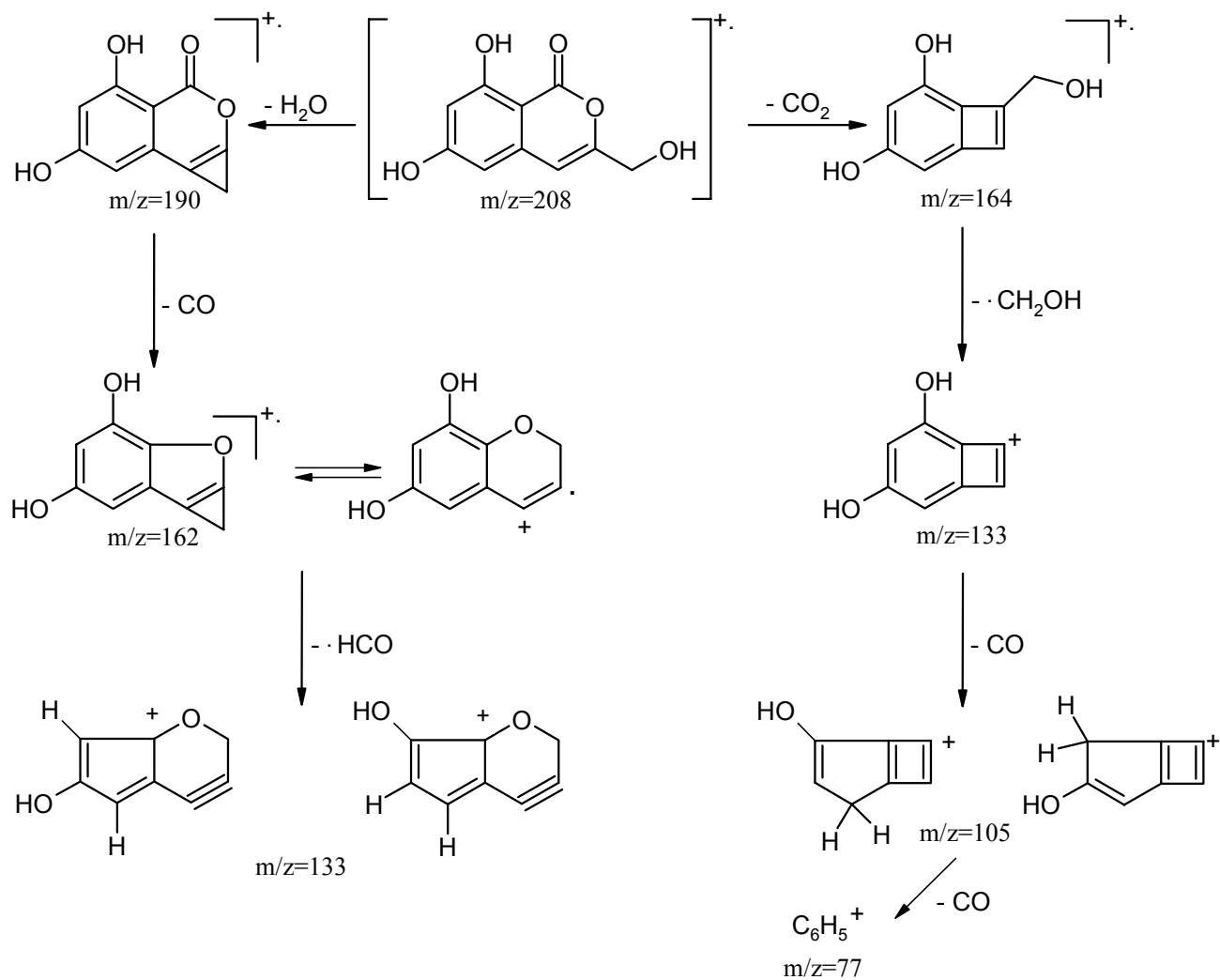
Les signaux à 5.05 ppm et 4.96 ppm confirment la présence d'un groupement méthylène. Les déplacements chimiques des protons aromatiques de 6.6 à 6.3 ppm indiquent une isocoumarine trisubstituée en positions 3, 6 et 8. Le groupement hydroxy (OH-C(8)) fortement déblindé à 10.76 ppm est caractéristique d'un hydroxy à coté d'un carbonyle qui forme ainsi une liaison hydrogène.

Schéma de fragmentations de masse :

Bibliographie

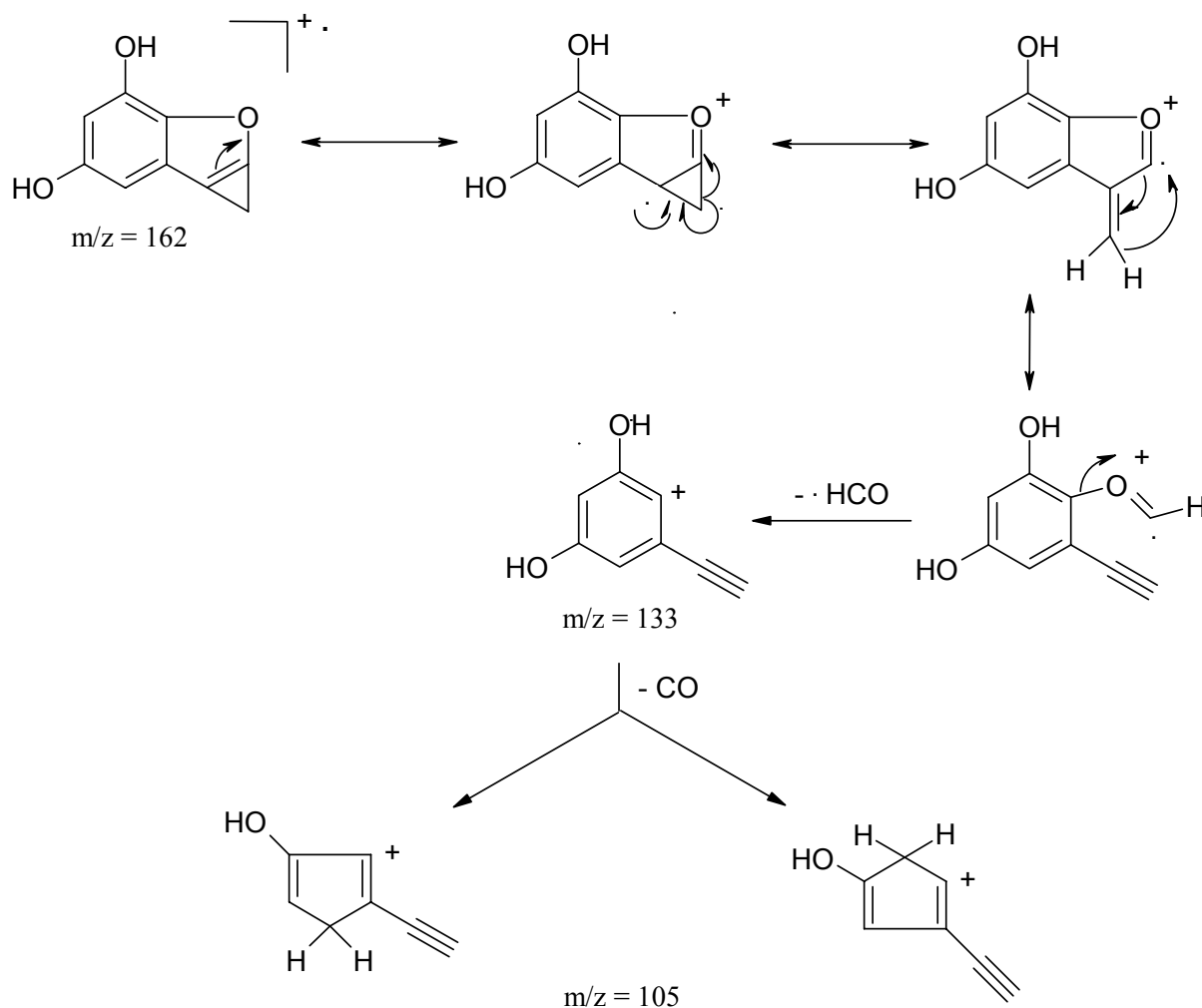


Bibliographie



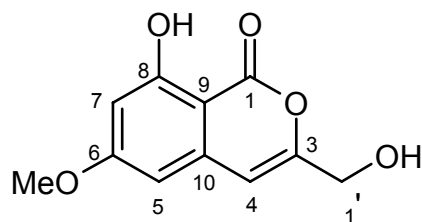
Un autre mécanisme peut-être proposé pour la perte de  $HCO\cdot$  à partir de l'ion 162 uma après ouverture des cycles à 3 et à 5 atomes. Le fragment à 133 uma ainsi obtenu, et suivi de la perte d'un carboxyle pour donner l'ion à 105 uma.

## Bibliographie



Ce composé a été isolé en 1977 pour la première fois de *Ceratocystis minor* [84,85]. Il a été par la suite identifié dans les cultures des trois autres champignons responsables de la maladie des taches bleues des pins : *Ceratocystis clavigera*, *C. ips* et *C. huntii* [86]. Puis également obtenu en 1994 d'une souche de *Streptovercillium eurociticum* [87], en 1996 de *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea* et *C. fimbriata* var. *platani* [88,89]. En 1999, il a été réisolé d'une souche *Stagonospora*, agent pathogène du liseron des haies [90].

### I-4. 8-Hydroxy-3-hydroxyméthyl-6-méthoxy-isochromen-1-one (4)



Nom commun : Cytogénine

## Bibliographie

## *Analyse*

Formule brute : C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>

Poids moléculaire : 222 g.mol<sup>-1</sup>

Quantité de produit : < 1mg

UV (MeOH) : 243 (100), 275 (10), 325 (10).

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 11 (*s*, OH-C(8)) ; 6.60 (*s*, H-C(4)) ; 6.49 (*d*, *J* = 2.2, H-C(5)) ; 6.41 (*d*, *J* = 2.2, H-C(7)) ; 4.40 (*s*, H-C(1')) ; 4.30 (*s*, OH-C(3')) ; 3.80 (*s*, Me).

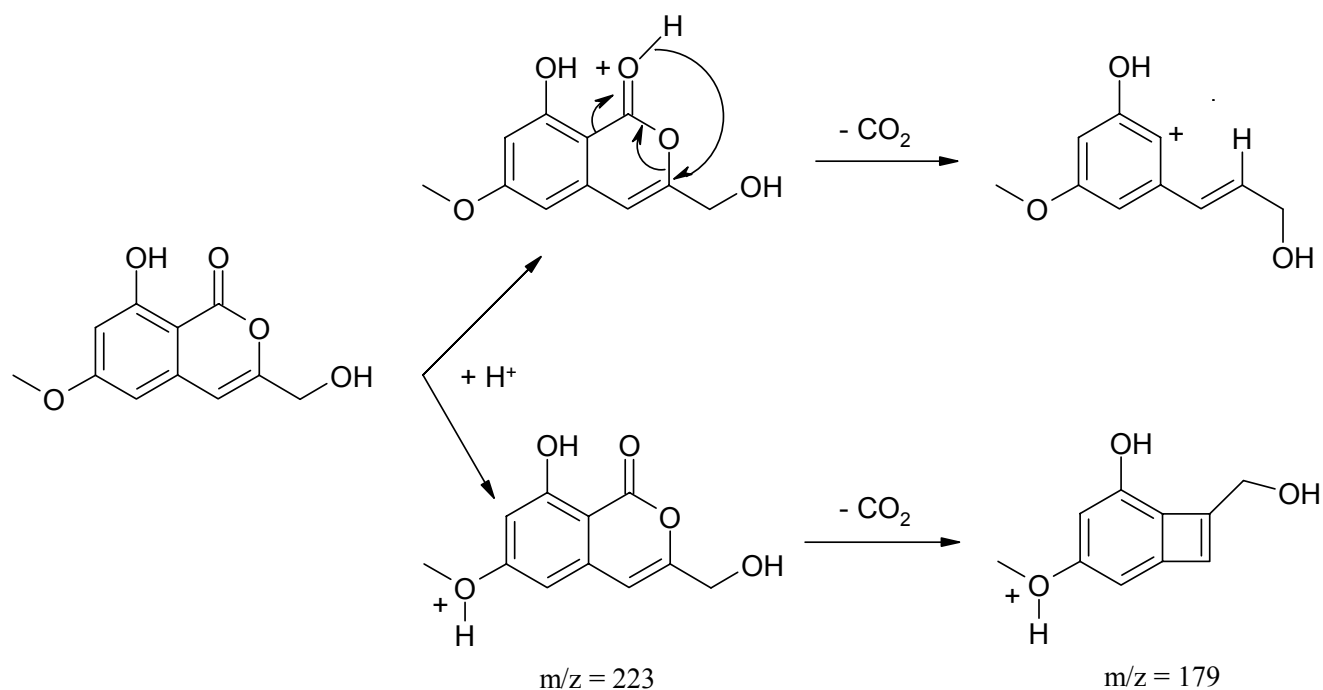
EI-MS (positif) : 222 (75, M<sup>+</sup>) ; 205 (3) ; 204 (5) ; 194 (20) ; 193 (52) 192 (21) ; 191 (100) ; 177 (13) ; 163 (21) ; 135 (80).

ESI-MS (positif) : 223.5 ([M + H]<sup>+</sup>) ; 179.1 ([M + H - CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>).

Le spectre UV est typique de la structure d'une isocoumarine, double liaison C(3)-C(4).

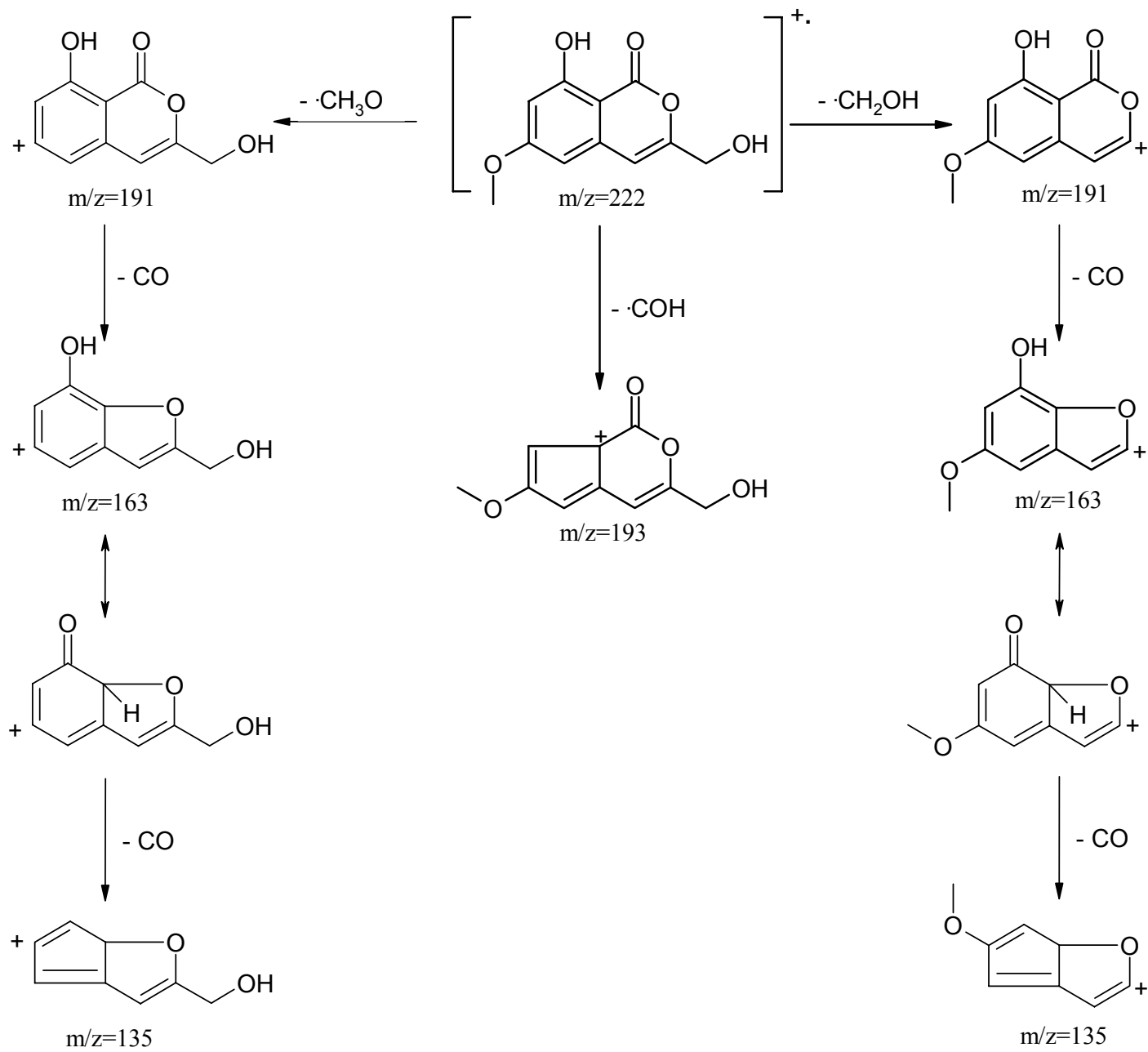
Le signal à 3.80 ppm indique un groupement méthoxy et les valeurs des déplacements chimiques des protons aromatiques correspondent à ceux d'une isocoumarine trisubstituée sur les carbonnes C(3), C(6) et C(8).

Schéma de fragmentation de masse en ESI<sup>+</sup> [91] :

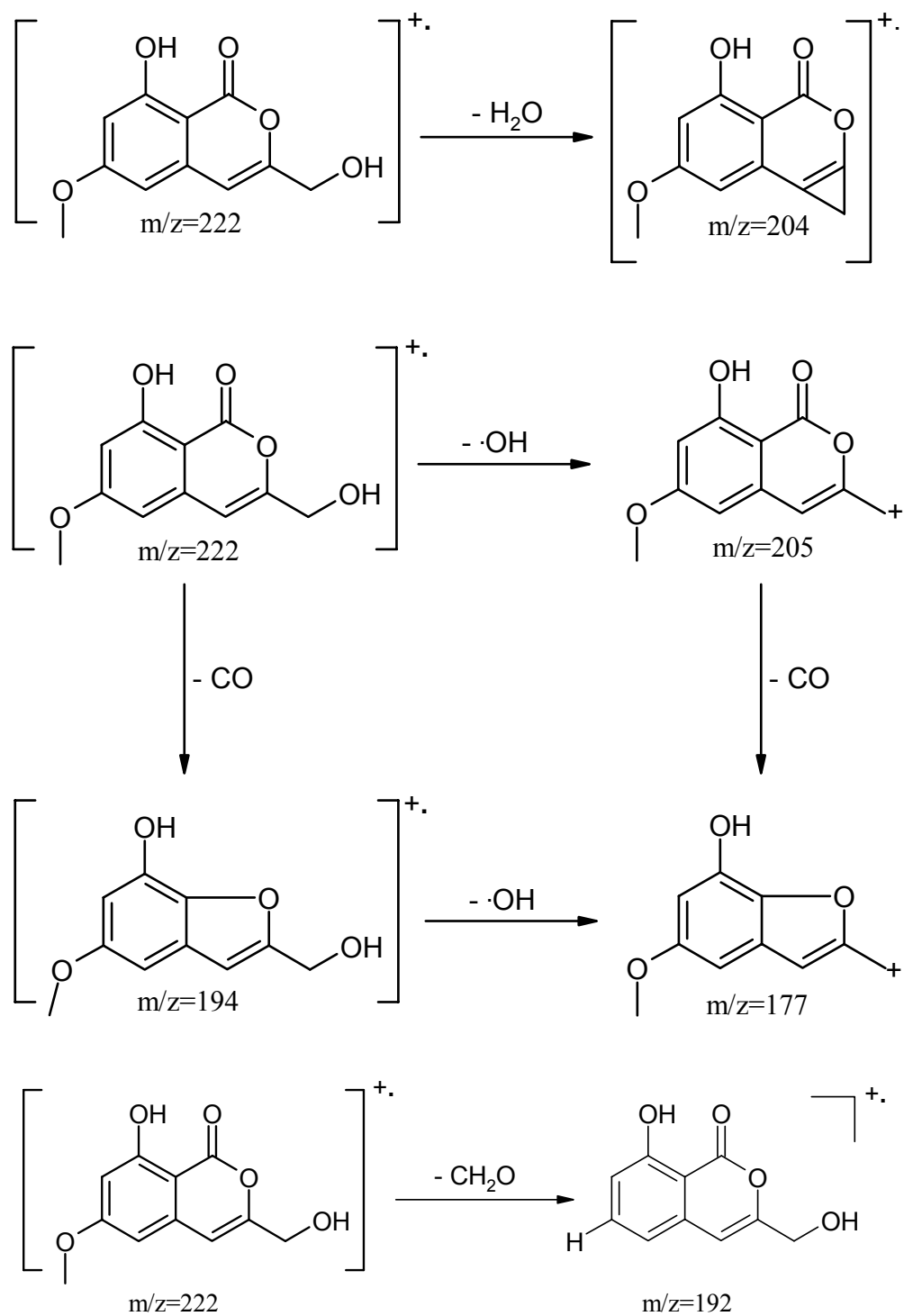


Bibliographie

Schéma de fragmentations de masse en EI<sup>+</sup> :



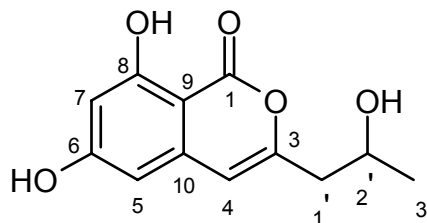
## Bibliographie



Cette isocoumarine a été isolée en 1994 à partir d'une souche de *Streptovercillium eurociticum* [87], puis en 1996 de *C. fimbriata* var. *coffea* et *C. fimbriata* var. *platani* [88,89].

### I-5. 6,8-Dihydroxy-3-(2-hydroxy-propyl)-isochromen-1-one (5)

## Bibliographie



Nom commun : (+) orthosporine.

### *Analyse*

Formule brute : C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>

Poids moléculaire : 236 g.mol<sup>-1</sup>

Quantité de produit : 1.5 mg

UV (MeOH<sub>l</sub>) : 236, 244 (100), 279 (20), 293, 331 (18).

<sup>1</sup>H-NMR :

Signaux	CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> (400MHz)	CDCl <sub>3</sub> (200MHz)
	11.27 ( <i>s</i> , OH-C(8))	10.9 ( <i>s</i> , OH-C(8))
H-C(4)	6.54 ( <i>s</i> )	6.13 ( <i>s</i> )
H-C(5)	6.53 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2.2)	6.27 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2.2)
H-C(7)	6.49 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2.2)	6.17 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2.2)
H-C(2')	4.3 ( <i>m</i> , <i>ABX</i> )	4.1 ( <i>m</i> )
H-C(1')	2.7 ( <i>m</i> , <i>ABX</i> , <i>J</i> = 14.7, 5.6, 8)	2 ( <i>m</i> )
H-C(3')	1.35 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6.2)	1.15 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6.2)
	3 ( <i>s</i> , OH-C(2'))	

Les valeurs de déplacement des signaux des trois protons H-C(4), H-C(5) et H-C(7) sont plus déblindés dans l'acétone-d<sub>6</sub> que dans le CDCl<sub>3</sub>.

<sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) : 171 (C(10)) ; 165.9 (C(6)) ; 163.9 (C(1)) ; 155.8 (C(8)) ; 140.3 (C(3)) ; 105.8 (C(5)) ; 102.8 (C(7)) ; 101.6 (C(4)) ; 99 (C(9)) ; 64.9 (C(2')) ; 43.3 (C(1')) ; 23 (C(3')).

EI-MS (positif) : 236 (22, *M*<sup>+</sup>) ; 221 (2) ; 219 (2) ; 193 (15) ; 192 (100) ; 177 (7) ; 164 (23) ; 163 (17) ; 150 (5) ; 146 (29) ; 135 (6) ; 121 (19).

DCI-MS (positif) : 254 ([*M* + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>) ; 237 ([*M* + H]<sup>+</sup>).

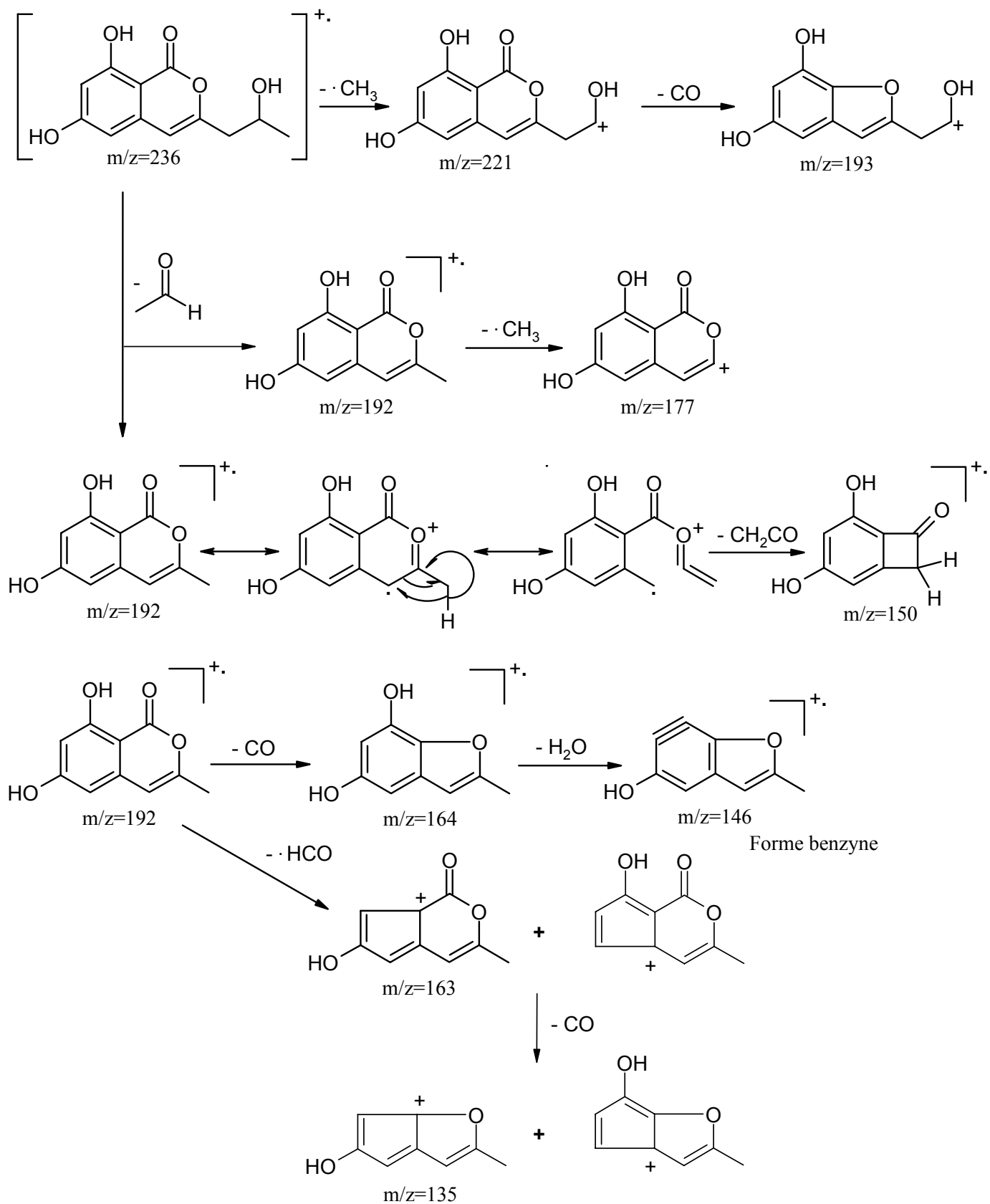
ESI-MS (négatif) : 235.5 ([*M* - H]) ; 191.2 ([*M* - H - CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>) ; 147.2.

## Bibliographie

Les spectres UV indiquent également une structure identique aux composés 3 et 4. Les déplacements de H-C(1'), H-C(2'), et H-C(3') avec les valeurs du  $^{13}\text{C}$ , signalent un enchaînement  $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$ . Le méthylène en position C(1') forme un système ABX avec H-C(2'). Le poids moléculaire est confirmé avec le spectre de masse en DCI-MS (+), par l'obtention des ions 237 uma ( $\text{M}+1$ )<sup>+</sup> et 254 uma ( $\text{M}+14$ )<sup>+</sup>.

Schéma de fragmentations de masse en  $\text{EI}^+$  :

Bibliographie



## Bibliographie

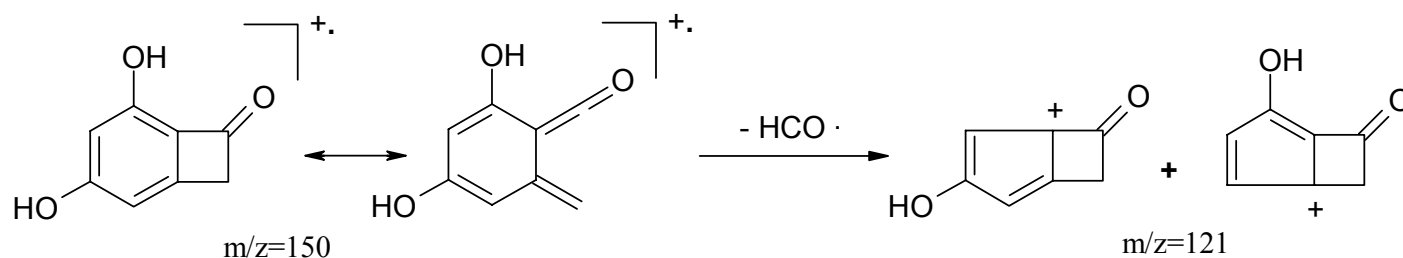
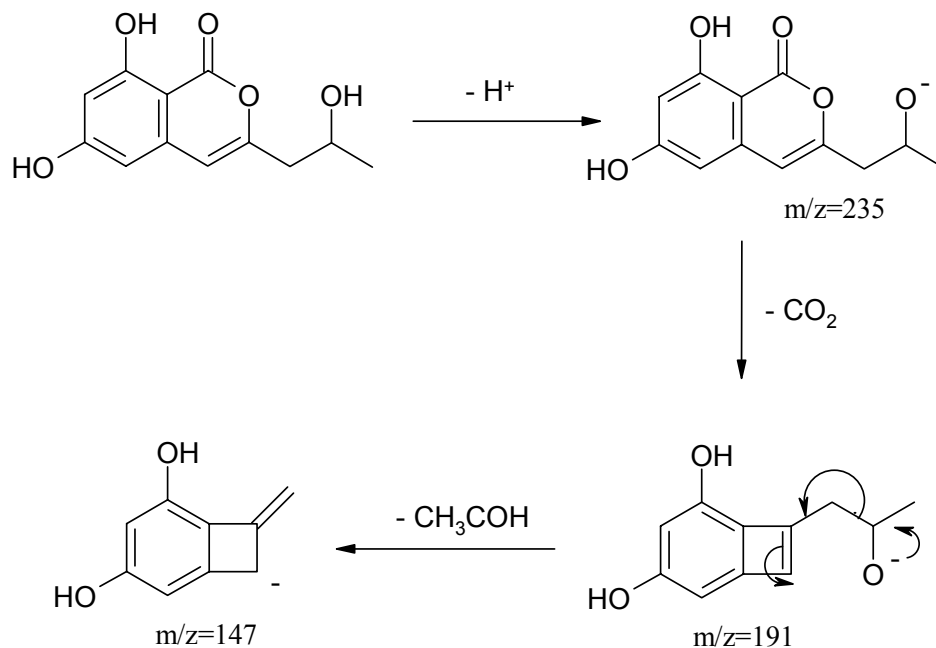


Schéma de fragmentations de masse en ESI<sup>-</sup> :

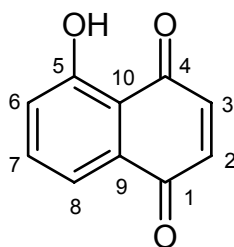


Cette substance a été isolée pour la première fois en 1988 de *Drechslera siccans* [92], agent pathogène de l'avoine. Puis en 1989 de *Rhynchosporium orthosporum* [93] où elle a été décrite comme une toxine de l'herbe des vergers. Le composé 5 a été également retrouvé dans les milieux de culture de *C. fimbriata* var. *coffea* et *C. fimbriata* var. *platani* ainsi que dans le *Stragonospora* [88,89,90]. En 1991, elle a été mentionnée comme un métabolite secondaire de *Pyricularia oryzae* [94].

En 2001, une étude a été effectuée sur l'orthosporine, isolé de *Aspergillus ochraceus*, sur sa fragmentation par impact électronique à haute résolution [95]. Les fragments obtenus sont les ions à 192 (perte de  $C_2H_4O$ ), 164 (perte de  $CHO\cdot$ ), 177 (perte de  $CH_3\cdot$ ) et 121 (perte de  $C_2O_2$ ) uma.

## I-6. 5-Hydroxy- $\{1,4\}$ -naphthoquinone (6)

## Bibliographie



Nom commun : Juglone.

### *Analyse*

Formule brute :  $C_{10}H_6O_3$

Poids moléculaire :  $174 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Quantité de produit :  $< 1 \text{ mg}$

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) : 11.93 (*s*, OH-C(8)) ; 7.79 (*dd*,  $J = 7.5$ , H-C(6)) ; 7.59 (*dd*,  $J = 1, 7.5$ , H-C(5)) ; 7.34 (*dd*,  $J = 1, 7.5$ , H-C(7)) ; 7.10 (*d*,  $J = 10.3$ , H-C(3)) ; 7.06 (*d*,  $J = 10.3$ , H-C(2)).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) : 191.21 (CO) ; 184.43 (CO) ; 161.62 (C(8)) ; 140.07 (C(2)) ; 139.10 (C(3)) ; 137.15 (C(6)) ; 132.44 (C(10)) ; 124.29 (C(7)) ; 118.87 (C(5)) ; 115.44 (C(9)).

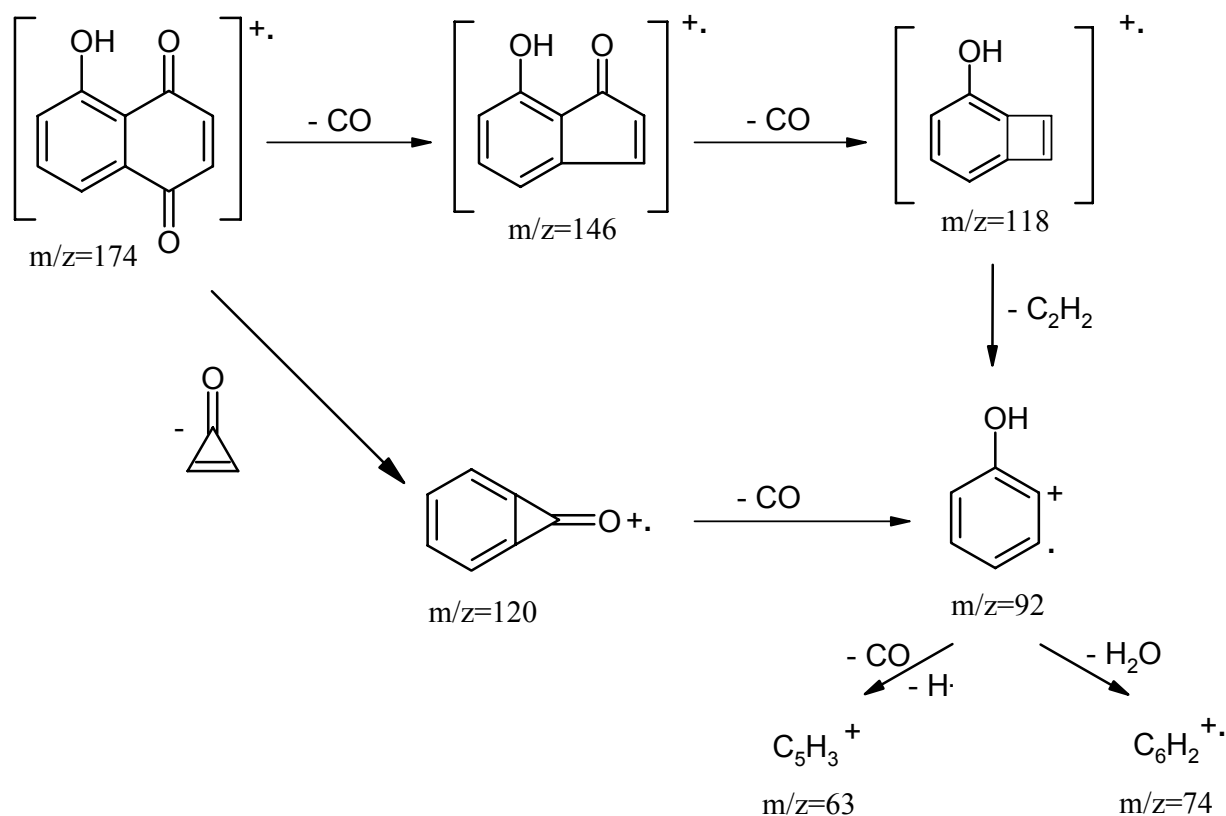
EI-MS (positif) : 174 (100,  $M^+$ ) ; 146 (18) ; 120 (33) ; 118 (46) ; 92 (32) ; 74 (7) ; 63 (32).

Les valeurs des déplacements chimiques en  $^1\text{H-NMR}$  indiquent seulement la présence de protons aromatiques. Les trois massifs les plus déblindés et les couplages  $^3\text{J}$  et  $^4\text{J}$  montrent un cycle benzénique trisubstitué avec 3H adjacents. En spectrométrie de masse, les pertes successives de carbonyle indiquent une structure de type quinone.

Les valeurs spectrales obtenues avec le produit commercial confirment la structure.

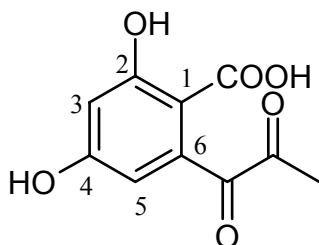
Schéma de fragmentations de masse :

## Bibliographie



La juglone a été isolée en 1973 comme une toxine de *Pterocarya fraxinifolia* [96] et dans certaines espèces de *Lomatia* [97]. Elle a été également extraite d'une culture de *Juglans nigra* et de *Juglans regia*, agents pathogènes des noyers [98,99]. En 1986, elle a été retrouvée dans *Penicillium diversum* var. *aureum* [100].

### I-7. Acide 2,4-dihydroxy-6-(2-oxo-propionyl)-benzoïque (7)



#### Analyse

Formule brute :  $C_{10}H_8O_6$

Poids moléculaire :  $224 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

## Bibliographie

Quantité de produit : 1 mg

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) : 6.41 (*d*,  $J = 2.2$ , H-C(5)) ; 6.32 (*d*,  $J = 2.2$ , H-C(3)) ; 4.86 (*s*, OH-C(4)) ; 2.29 (*s*, Me).

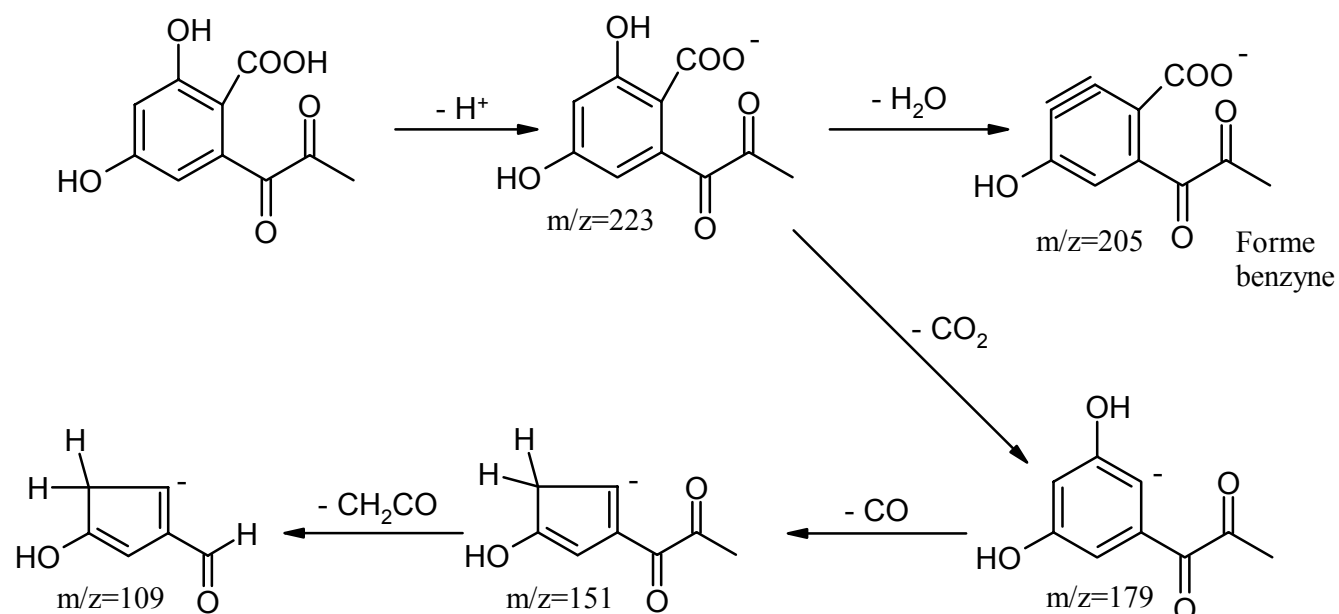
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) : 173.54 (CO) ; 163.39 (C(4)) ; 161.88 (C(2)) ; 109.86 (C(1)) ; 106.22 (C(5)) ; 104.71 (C(3)) ; 23.89 (Me).

ESI-MS (négatif) : 223.1 ( $[M - \text{H}]^-$ ) ; 205.1 ( $[M - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$ ) ; 194.9 ( $[M - \text{H} - \text{CO}]^-$ ) ; 179.0 ( $[M - \text{H} - \text{CO}_2]^-$ ) ; 151.1 ; 109.2.

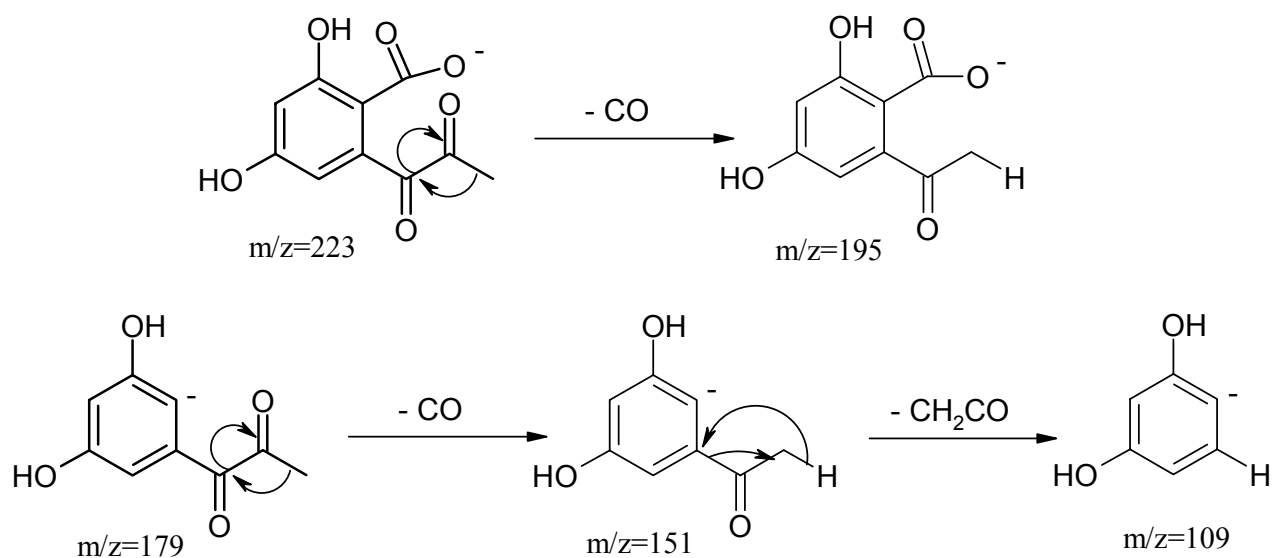
Les valeurs de 2.29 ppm en  $^1\text{H-NMR}$  et 23.89 ppm en  $^{13}\text{C-NMR}$  indiquent un groupe  $\text{CH}_3\text{CO}$ . Les déplacements chimiques des deux protons aromatiques situés en méta l'un de l'autre indiquent un cycle benzénique tétra-substitué.

En spectrométrie, la perte de 44 uma qui donne l'ion 179 uma désigne une fonction acide carboxylique dans la molécule.

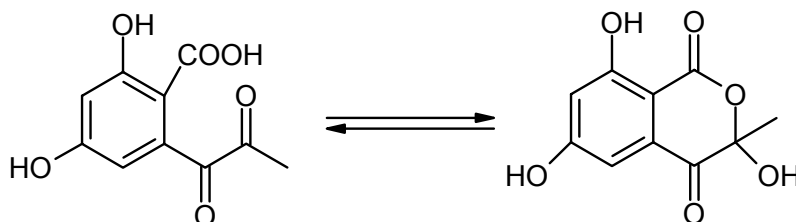
Schéma de fragmentations de masse :



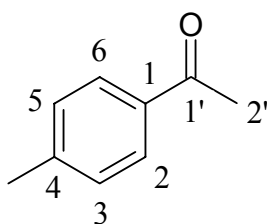
## Bibliographie



Cette molécule a été isolée ainsi que sa forme lactonisée [101] en 1991 [102,103], comme métabolite secondaire de *Penicillium brevicompactum*. Ces deux structures se distinguent aisément grâce aux spectres ultra-violet.



### I-8. p-Tolyl-éthanone (8)



#### *Analyse*

Formule brute : C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O

Poids moléculaire : 134 g.mol<sup>-1</sup>

Quantité de produit : 1.2 mg

## Bibliographie

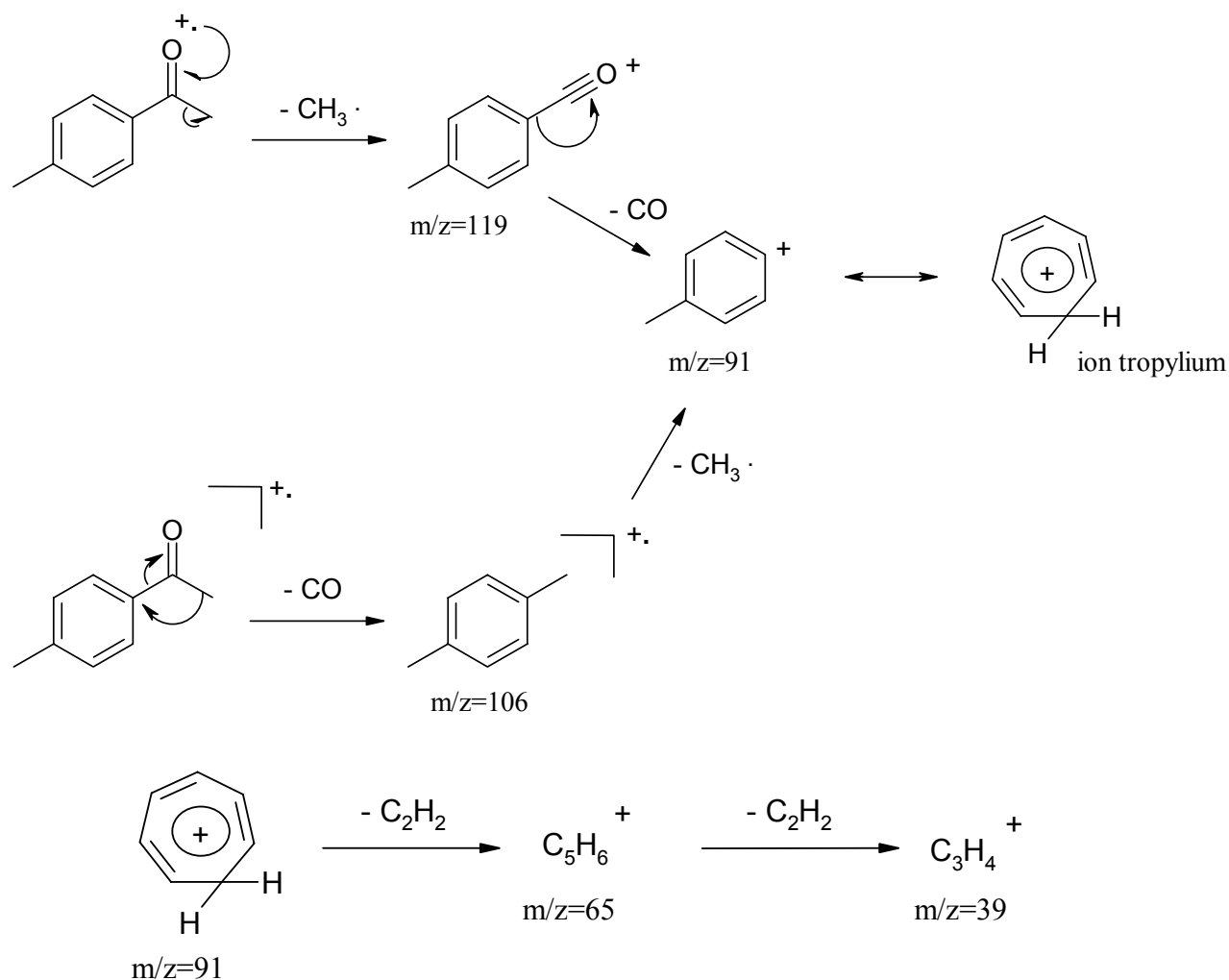
$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) : 7.86 (*ddd*,  $J = 8$ , H-C(2), H-C(6)) ; 7.30 (*ddd*,  $J = 8, 0.7$ , H-C(3), H-C(5)) ; 2.53 (*s*, Me-C(2')) ; 2.38 (*s*, Me-C(4)).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) : 197.37 (CO) ; 144.35 (C(4)) ; 135.76 (C(1)) ; 129.96 (C(5), C(3)) ; 129.09 (C(6), C(2)) ; 26.54 (Me) ; 21.46 (Me).

EI-MS (positif) : 134 (34,  $M^+$ ) ; 119 (100) ; 106 (13) ; 91 (75) ; 65 (25) ; 39 (20).

En  $^1\text{H-NMR}$ , les deux signaux comptant pour deux protons chacun forment un système AA'BB', le cycle benzénique est substitué en para. En EI-MS, la perte de 15 uma indique la présence d'un groupe  $\text{CH}_3$  dans le composé ainsi que pour l'ion tropylium, un groupe toluyle. La fonction carbonyle est signalée par la perte de 28 entre les ions 119 et 91 uma.

Schéma de fragmentations de masse :

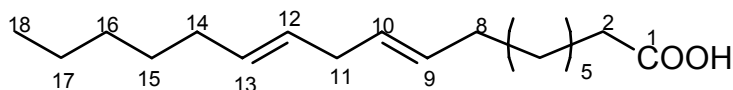


Cette molécule a été extraite en 1948 [104] des huiles essentielles de cabreuva et de bois de rose. En 1971, elle a été décrite comme un des constituants de la fumée de cigarette

## Bibliographie

[105]. Elle a été isolée en 1976 de *Cymbopogon commutatis* [106] dans le cadre d'une étude sur la fleur du soudan.

### I-9. Acide octadeca-9,12-dienoïque (9)



Nom commun : Acide linoléique.

#### *Analyse*

Formule brute :  $C_{18}H_{32}O_2$

Poids moléculaire :  $280 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Quantité de produit :  $< 1 \text{ mg}$

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 11.65 (*s*, OH-C(1)) ; 5.3 (*m*, H-C(9), H-C(10), H-C(12), H-C(13)) ; 2.76 (*t*,  $J = 6$ , H-C(11)) ; 2.32 (*t*,  $J = 7$ ) ; 2.05 (*m*,  $J = 7$ , H-C(8), H-C(14)) ; 1.62 (*t*,  $J = 7$ ) ; 1.30 (*m*, 14H) ; 0.88 (*t*,  $J = 7$ , H-C(18)).

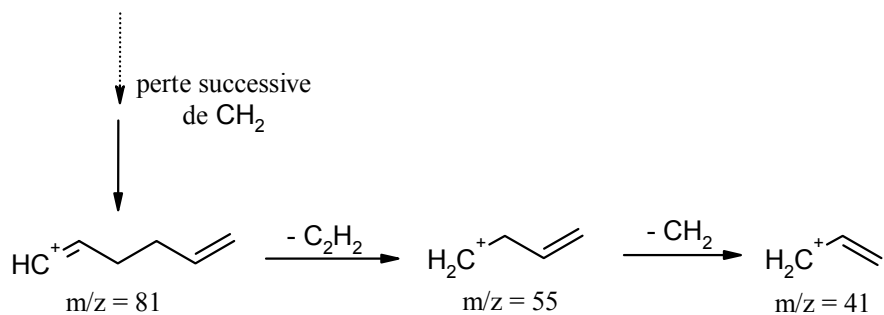
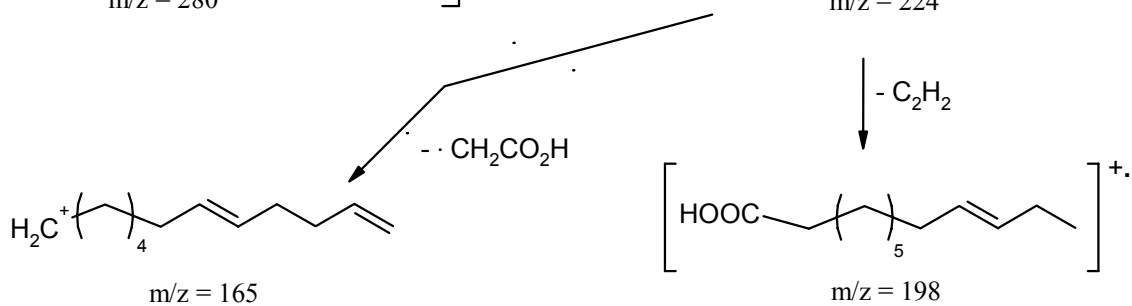
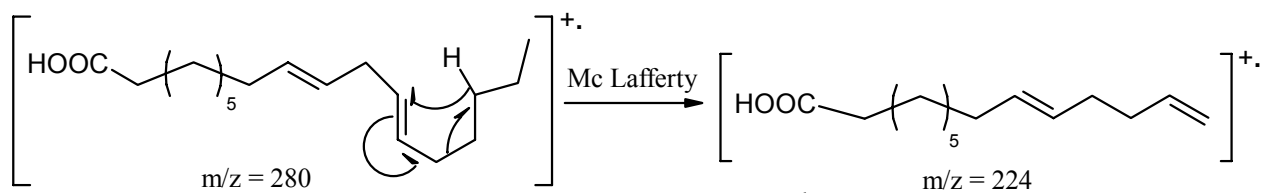
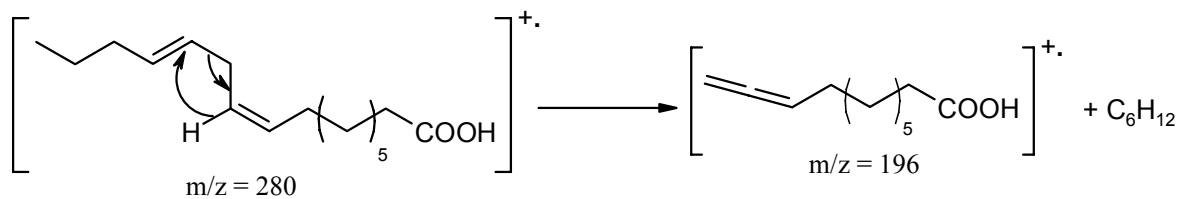
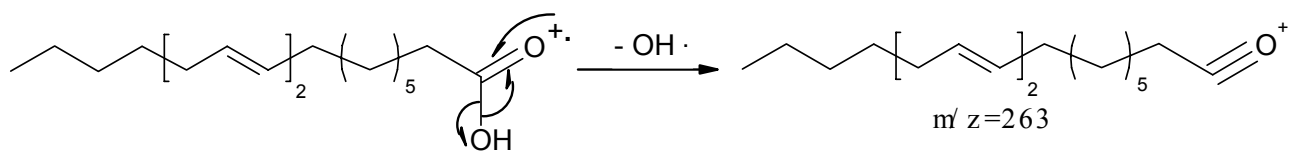
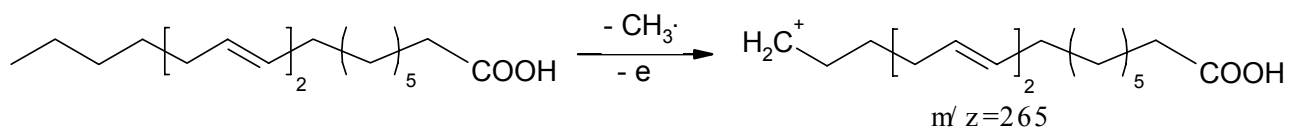
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 180.46 (CO) ; 129.96, 129.78, 127.97, 127.81 (C(9), C(10), C(12), C(13)) ; 34.02 ; 31.47 ; 29.53 ; 29.30 ; 29.10 ; 29.01 ; 28.98 ; 27.12 ; 27.09 ; 25.54 (C(11)) ; 24.57 ; 22.52 ; 13.94 (C(18)).

EI-MS (positif) : 280 (25,  $M^+$ ) ; 265 (5) ; 263 (5) ; 224 (4.5) ; 198 (18) ; 196 (19) ; 170 (10) ; 165 (6) ; 151 (7) ; 137 (10) ; 123 (18) ; 109 (25) ; 95 (48) ; 81 (73) ; 55 (60) ; 41 (58).

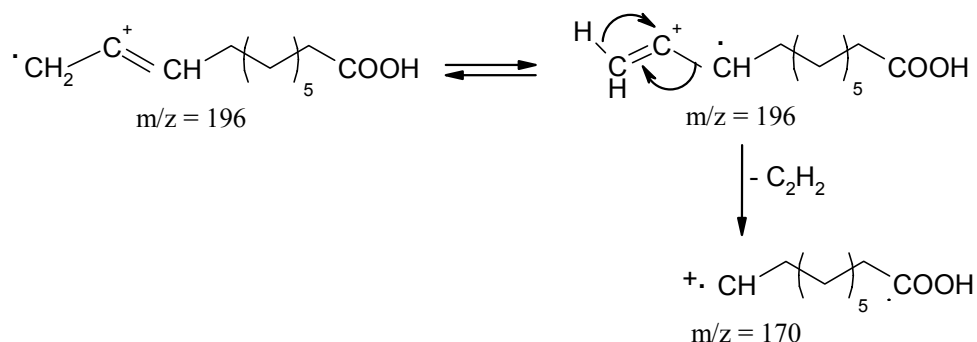
Les valeurs spectrales obtenues avec le produit commercial confirment la structure.

Schéma de fragmentations de masse :

Bibliographie

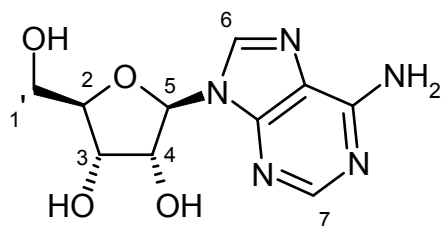


## Bibliographie



L'acide linoléique induit la formation d'organes de fructification asexuée du type *Graphium* chez *Ceratocystis ulmi* [107,108]. En 1982, il a été isolé dans une culture de *Hibiscus esculentus* [109]. Une étude est alors effectuée entre la composition des acides gras en fonction des différents stades de la plante pendant la germination.

## I-10. Adénosine (10)



### *Analyse*

Formule brute :  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$

Poids moléculaire :  $267 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Quantité de produit : 2 mg

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 8.40 (s, H-C(7)) ; 8.27 (s, H-C(6)) ; 6.05 (d,  $J = 6.4$ , H-C(5)) ; 4.83 (dd,  $J = 6.4, 5.1$ , H-C(4)) ; 4.41 (dd,  $J = 5.1, 2.6$ , H-C(3)) ; 4.26 (ddd,  $J = 2.5, 2.6$ , H-C(2)) ; 3.97 (dd,  $J = 12.5, 2.5$ , H-C(1'')) ; 3.83 (dd,  $J = 12.5, 2.5$ , H-C(1')).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 90.6 (C(4)) ; 87.5 (C(1)) ; 74.8 (C(3)) ; 72 (C(2)) ; 62.8 (C(1')).

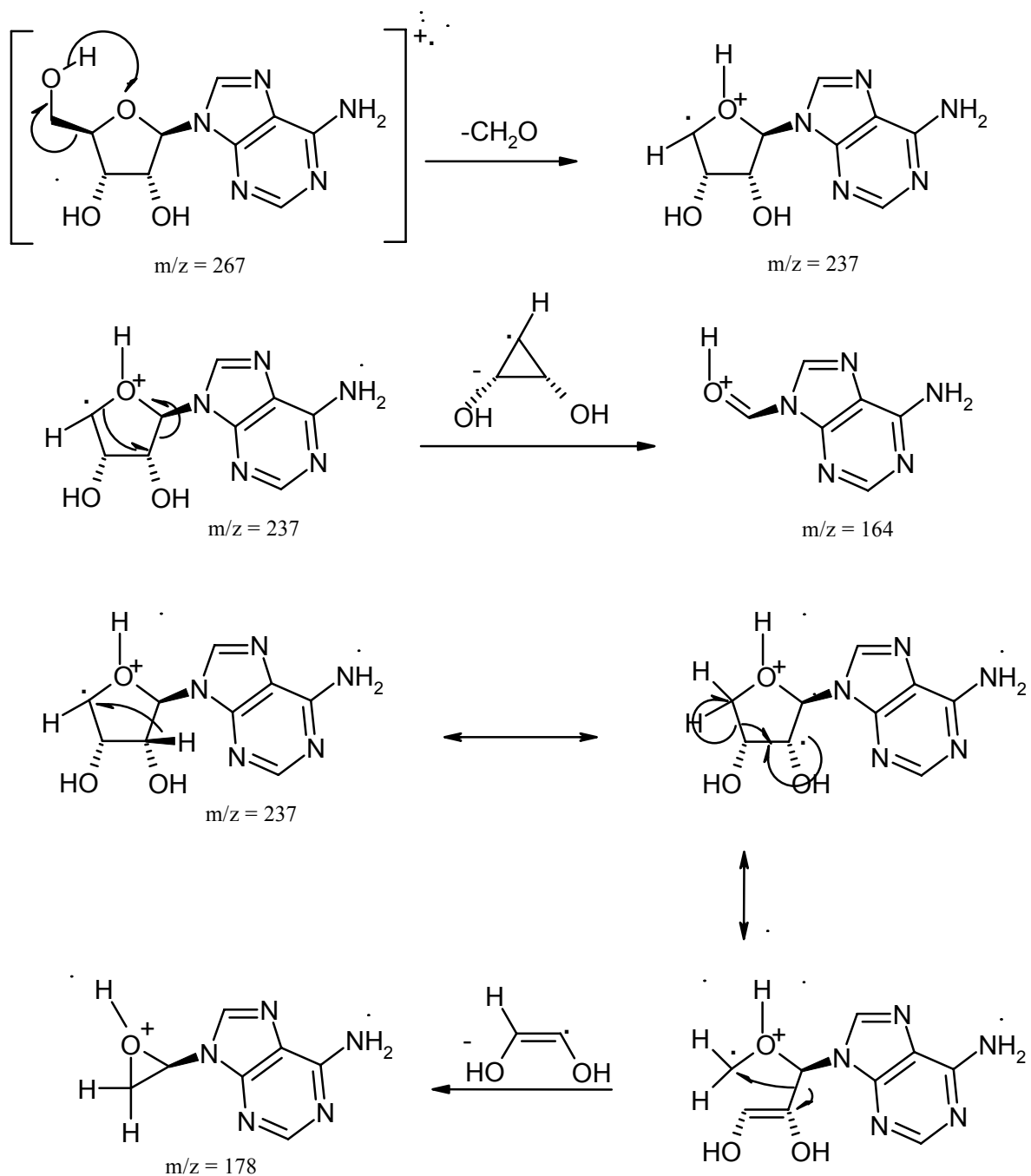
EI-MS (positif) : 267 (2,  $M^+$ ) ; 237 (7.5) ; 178 (25) ; 164 (62.5) ; 136 (76) ; 135 (100) ; 108 (45) ; 81 (33) ; 73 (43).

Les valeurs spectrales obtenues avec le produit commercial confirment la structure.

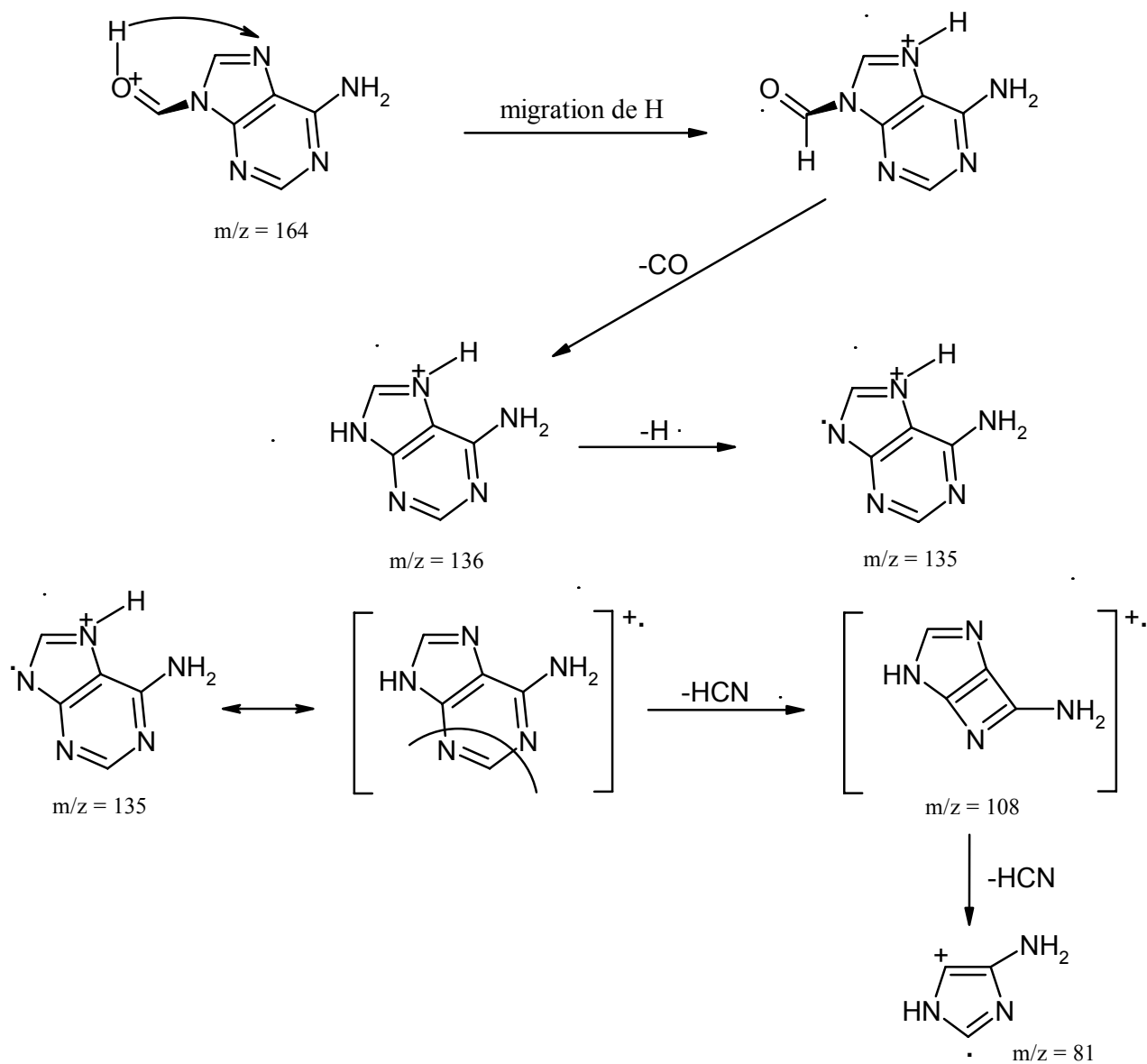
## Bibliographie

Schéma de fragmentations de masse :

Bibliographie



Bibliographie

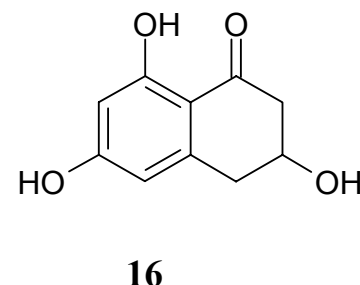
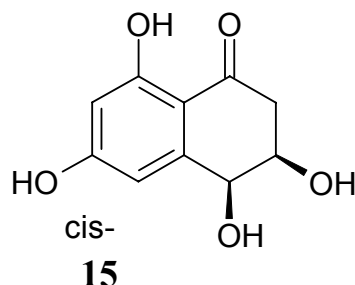
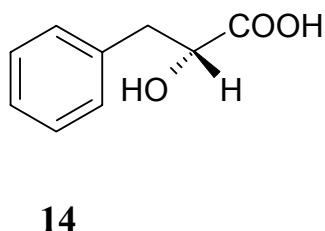
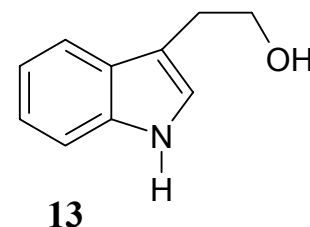
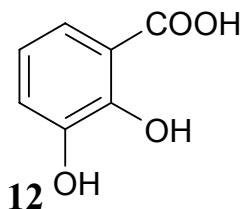
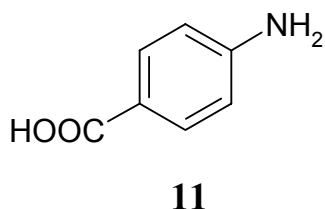


Cette substance constitue la base de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP [110]. L'adénosine triphosphatée (ATP) tient un rôle central dans les échanges énergétiques des systèmes biologiques.

## II. Métabolites identifiés par LC-MS<sup>n</sup>

### II-1. Généralités

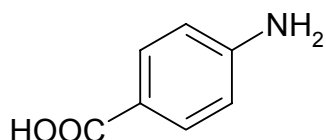
Ces six molécules ont été identifiés par la méthode de LC-ESI/MS<sup>n</sup> :



Leur temps de rétention est déterminé en chromatographie liquide et leur fragmentation en spectrométrie de masse par injection directe et ionisation avec une source électrospray. Dans le but de détecter les ions dans la matrice complexe, nous utilisons les modes Full ms<sup>n</sup>, SIM ms et SRM ms<sup>n</sup>.

La recherche de ces composés a été effectuée dans plusieurs extraits bruts pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

### II-2. Acide para-aminobenzoïque (11) [111]



Formule brute : C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N

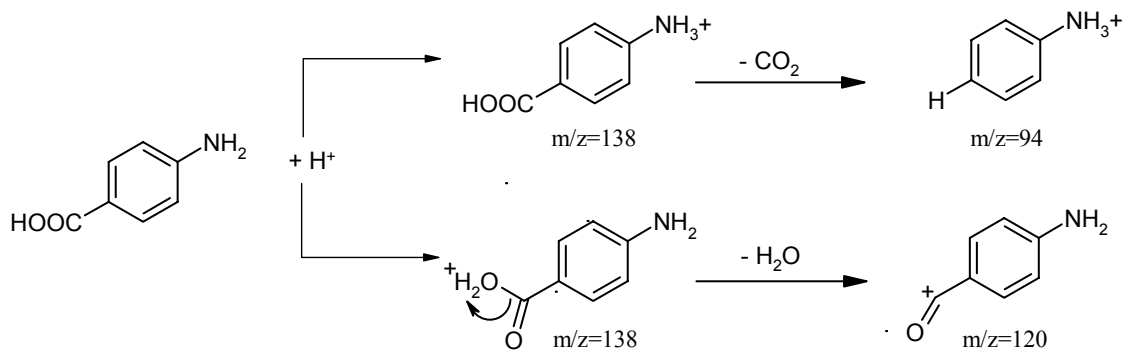
Poids moléculaire : 137 g.mol<sup>-1</sup>

Temps de rétention : 4 min

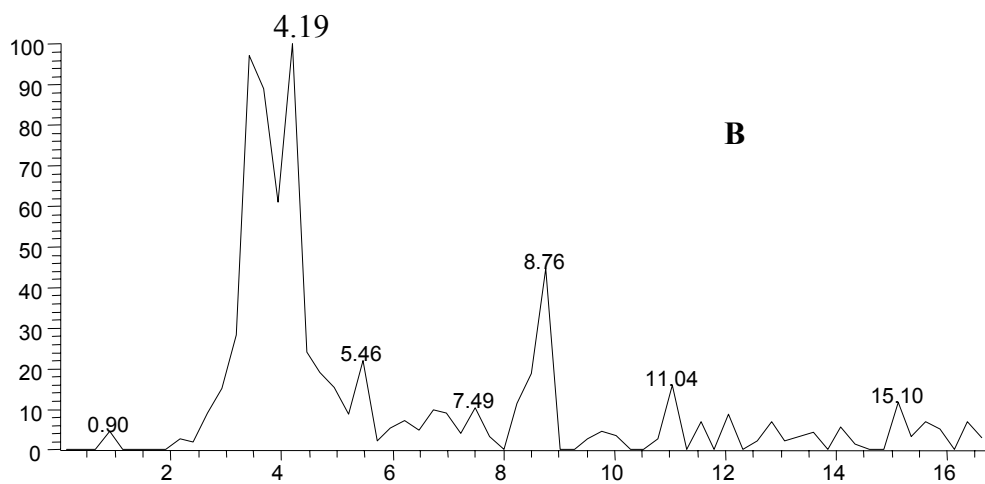
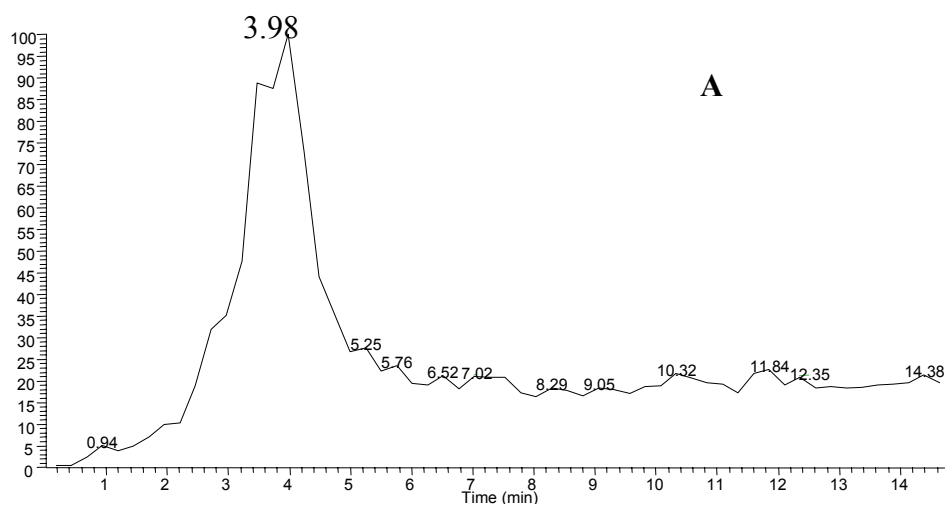
## Bibliographie

SM (ESI, mode positif),  $m/z$  : Full ms 138 uma  $[M + H]^+$  ; Full  $ms^2(138)$  120 uma  $[(M + H) - H_2O]^+$  ; Full  $ms^2(138)$  94 uma  $[(M + H) - CO_2]^+$ .

Schéma de fragmentations de masse :



Une fonction acide carboxylique donne lieu à un élargissement des pics du chromatogramme (figures II-2A et II-2B).



## Bibliographie

Figure II-2A : Chromatogrammes de l'acide p-aminobenzoïque  
A : Courant ionique SIM ms [137-139] du produit pur  
B : Courant ionique SIM ms [137-139] de l'extrait brut

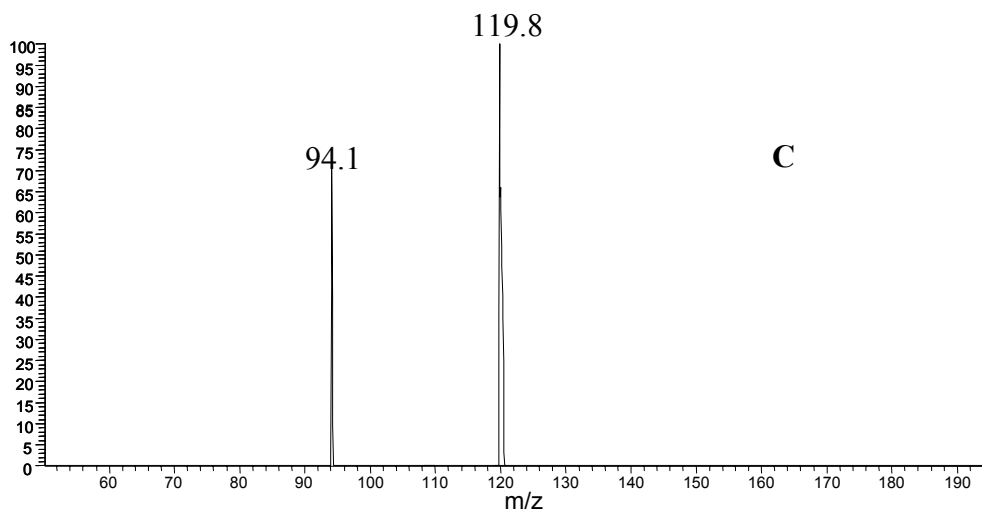
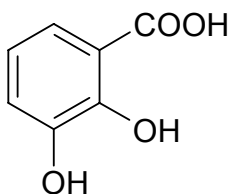


Figure II-2B : Spectre de l'acide p-aminobenzoïque  
C : Fragmentation Full ms<sup>2</sup> 138 uma

### II-3. Acide 2,3-dihydroxybenzoïque (12)



Formule brute : C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>

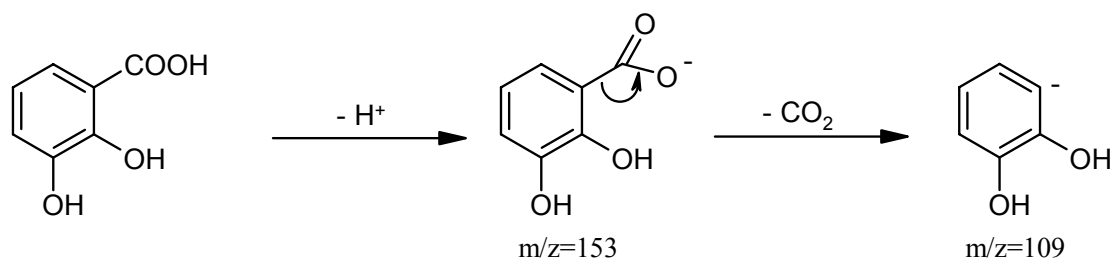
Poids moléculaire : 154 g.mol<sup>-1</sup>

Temps de rétention : 3.5 min

SM (ESI, mode négatif), m/z : Full ms 153 uma [ M – H ]<sup>-</sup> ; Full ms<sup>2</sup> (153) 109 uma [ (M – H)-CO<sub>2</sub> ]<sup>-</sup>.

Schéma de fragmentations de masse :

## Bibliographie



Afin de corroborer la présence du composé, les temps de rétention du produit pur et celui obtenu dans l'extrait brut (figure II-3A) sont comparés en mode négatif SIM ms (153 uma).

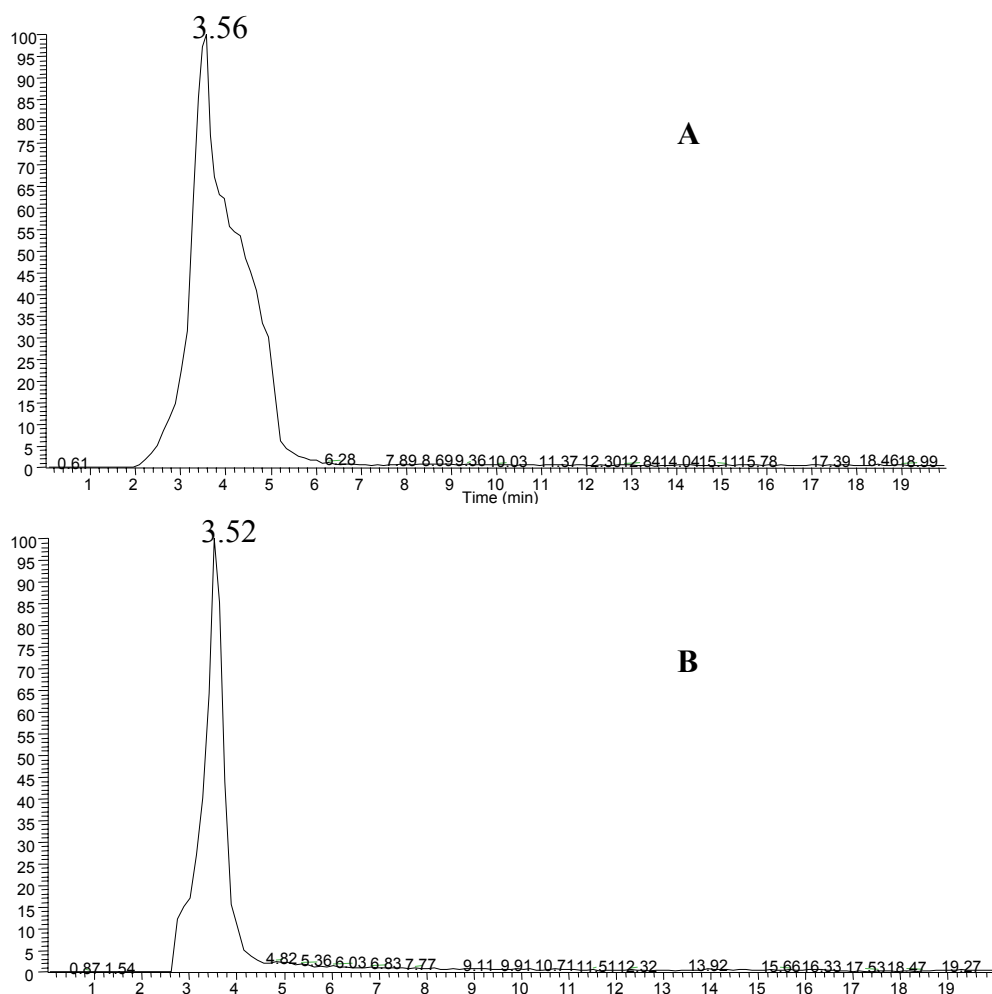


Figure II-3A : Chromatogrammes de l'acide 2,3-Dihydroxybenzoïque  
A : Courant ionique SIM ms [152-154] du produit pur  
B : Courant ionique SIM ms [152-154] de l'extrait brut

Le spectre de fragmentation de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque est représenté sur la figure II-3B.



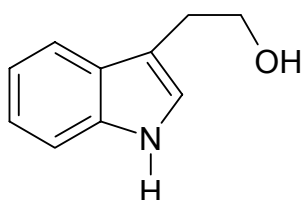
Figure II-3B : Spectre de l'acide 2,3-Dihydroxybenzoïque  
C : Fragmentation Full ms<sup>2</sup> 153 uma

En 1961, l'acide 2, 3-dihydroxybenzoïque est isolé pour la première fois dans une culture de *Claviceps paspali* [112]. Ce métabolite a été également isolé en 1969 d'une souche de *Azotobacter vinelandii* [113], en 1974 de *Aspergillus fumigatus* [114] et en 1986 des trois espèces de *Ceratocystis* responsables de la maladie des tâches bleues des pins [86].

Une propriété importante de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque est la possibilité de complexer le fer [86,115]. L'étude effectuée in vitro dans une culture de *Septoria nodorum* et de *Pyrenophora teres* [116] permet de mettre en évidence la diminution de la germination des spores lorsque le fer est complexé par cette acide. Des tests in vivo sur des arbres infectés montrent des résultats semblables. Une étude identique est réalisée sur l'agent pathogène de la banane [117], le *Colletotrichum musae*.

Dans une culture de *Penicillium roquefortii*, il est identifié comme un anti-oxydant [118]. En 1994 ce composé est testé avec succès comme anti-fongique sur cinq champignons : *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* et *Alternaria* sp., agents pathogènes respectifs du raisin, de l'orange, de la laitue, du concombre et de l'artichaut [119].

#### II-4. Tryptophole (13)



Formule brute : C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ON

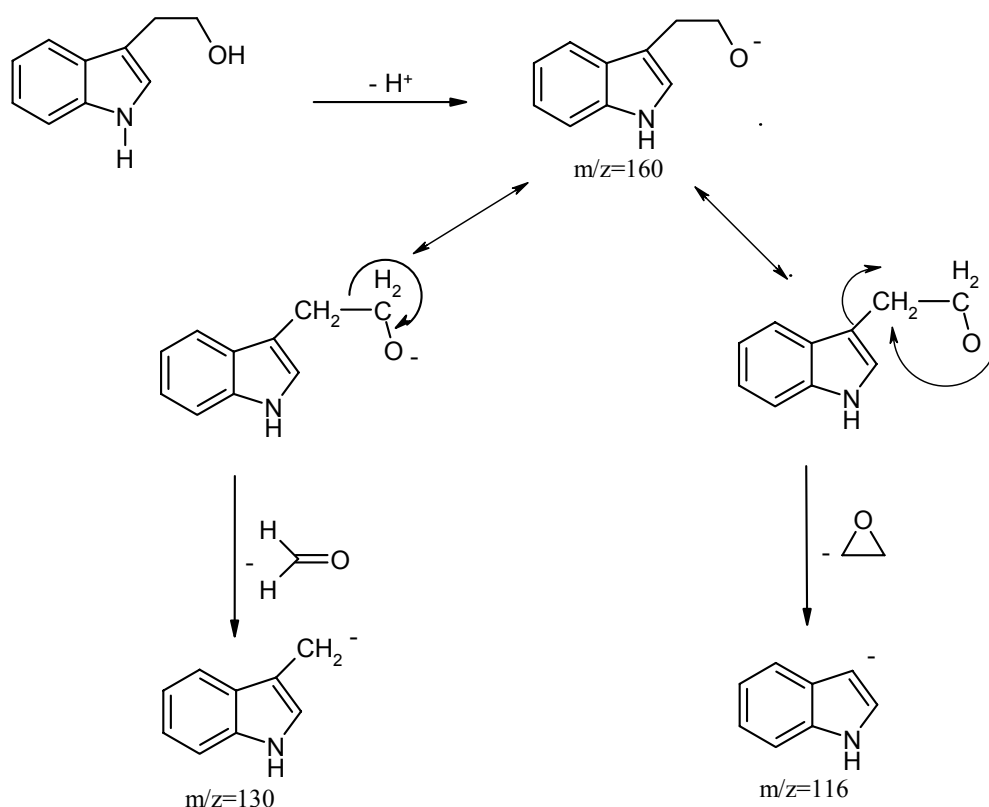
Poids moléculaire : 161 g.mol<sup>-1</sup>

## Bibliographie

Temps de rétention : 29.6 min

SM (ESI, mode négatif), m/z : Full ms 160 uma [ M - H ]<sup>-</sup> ; Full ms<sup>2</sup>(160) 142 uma [ (M - H)-H<sub>2</sub>O ]<sup>-</sup> ; Full ms<sup>2</sup>(160) 132 uma [ (M - H)-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ]<sup>-</sup> ; Full ms<sup>2</sup>(160) 130 uma [ (M - H)-CH<sub>2</sub>O ]<sup>-</sup> ; Full ms<sup>2</sup>(160) 116 uma [ (M - H)-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O ]<sup>-</sup>.

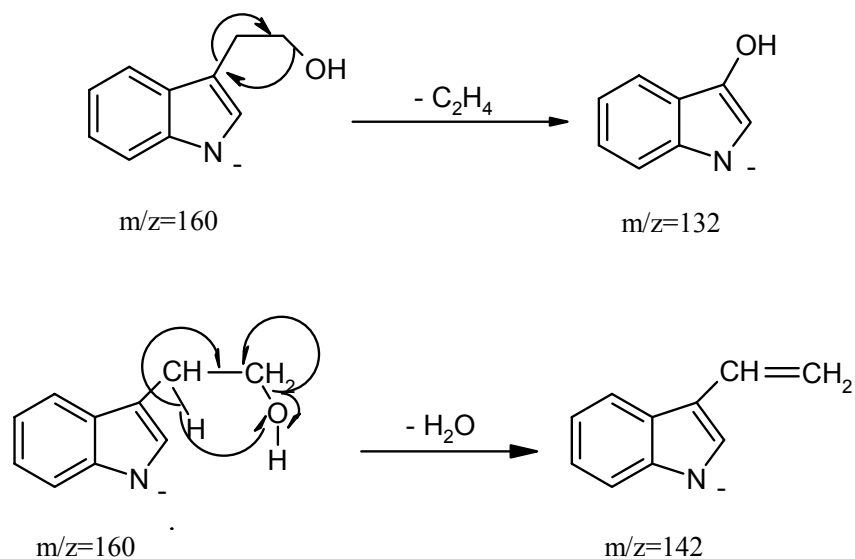
Schéma de fragmentations de masse :



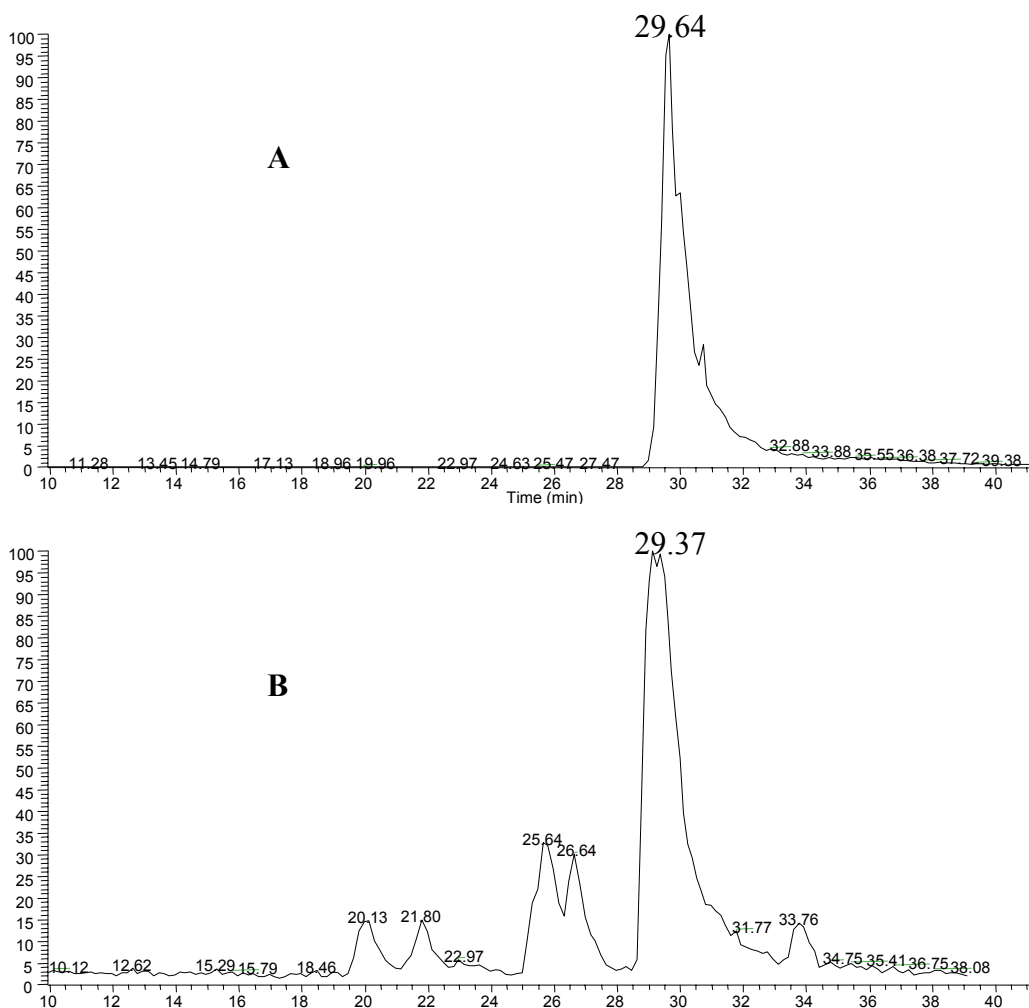
Les valeurs du pKa de la fonction alcool primaire et celle de l'amine de l'indole sont de même ordre de grandeur : pKa (alcool, DMSO)  $\sim$  28 et pKa (NH indole, DMSO)  $\sim$  23. Nous pouvons envisager la possibilité que la déprotonation se fasse sur ces deux fonctions.

## Bibliographie

Mécanismes proposés pour la perte de l'éthylène et de la molécule d'eau :



Les temps de rétention du tryptophole sont comparés en mode SIM ms [159-161] (figure II-4A).



## Bibliographie

Figure II-4A : Chromatogrammes du tryptophole  
A : Courant ionique SIM ms [159-161] du produit pur  
B : Courant ionique SIM ms [159-161] de l'extrait brut

Les spectres de fragmentations obtenus par LC-MS et en injection directe sont représentés figure II-4B.

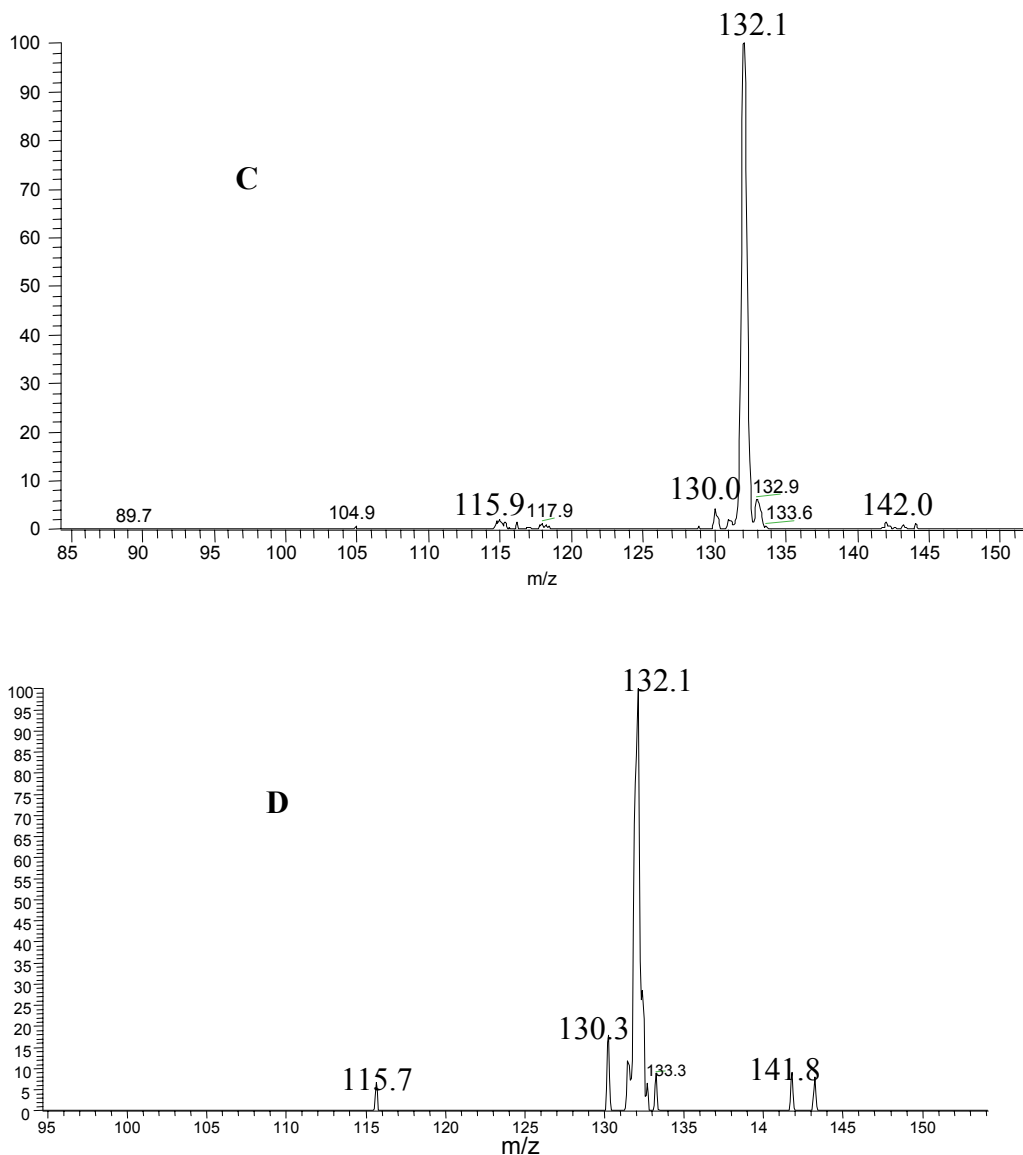


Figure II-4B : Spectres du tryptophole  
C : Fragmentation Full  $ms^2$  160  $\mu$ ma en injection directe  
D : Fragmentation Full  $ms^2$  160  $\mu$ ma en LC-MS

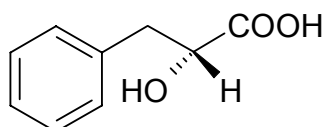
Des métabolites dérivés du tryptophole, conjugués avec des esters et/ou des unités glycosides, ont été isolés dans des bactéries, des thallophytes et des graines de plantes. Par exemple, le tryptophole sous forme galactosilé a été retrouvé dans les algues *Chlorella*, *Euglena* et *Ochromonas* [120].

## Bibliographie

Le composé 13 a été également isolé dans une culture de *Rhizoctonia solani* [121], de *Epichloe festucae* [122] et d'une éponge marine l'*Ircinia spinulosa* en 2000 [123].

Une étude a été réalisée en 2000 sur la biosynthèse du méthyl-tryptamine dithiocarbamate, composé isolé des souches virulentes et non virulentes de l'agent pathogène *Phoma lingam*. Les résultats indiquent que le tryptophole est un co-métabolite présent seulement dans la forme non virulente du champignon [124].

### II-5. Acide D(+)-3-phenyllactique (14)



Formule brute :  $C_9H_{10}O_3$

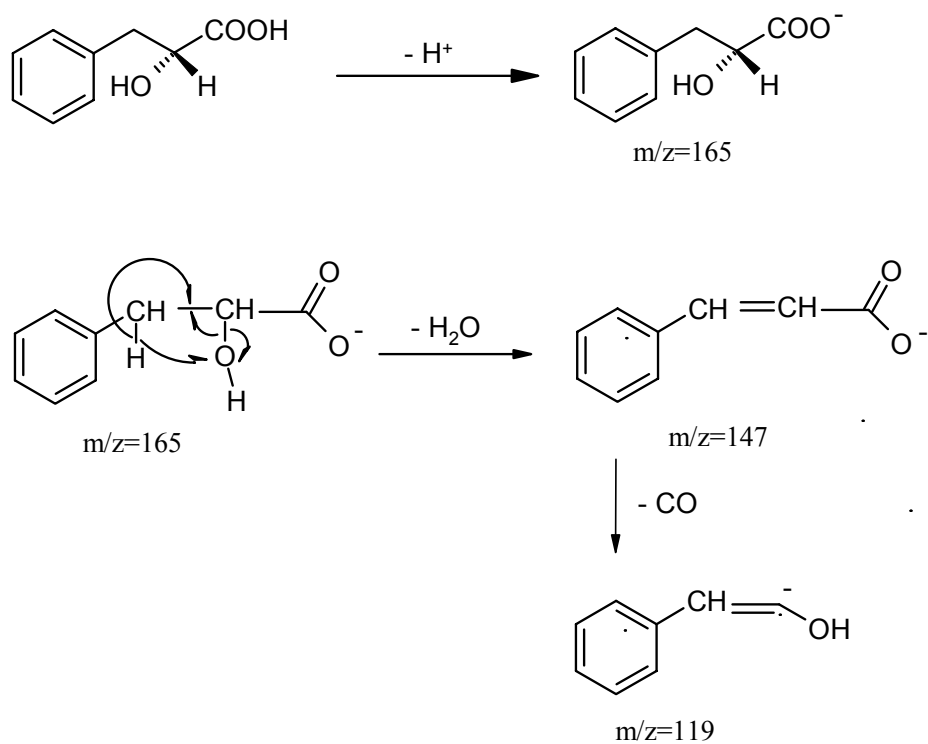
Poids moléculaire :  $166 \text{ g.mol}^{-1}$

Temps de rétention : 5.2 min

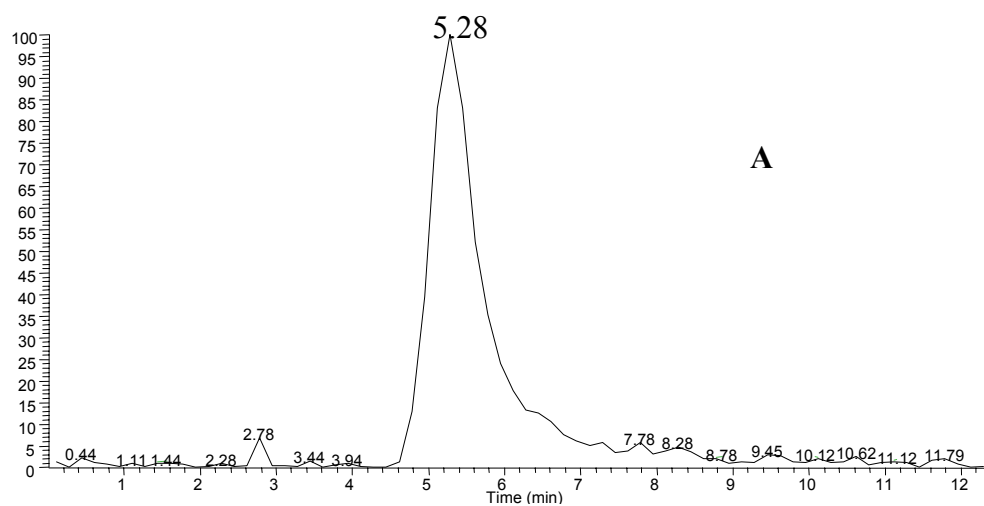
SM (ESI, mode négatif), m/z : Full ms 165 uma  $[M - H]^-$  ; Full ms<sup>2</sup>(165) 147 uma  $[(M - H) - H_2O]^-$  ; Full ms<sup>3</sup>(165, 147) 119 uma [perte de CO ]<sup>-</sup>.

Schéma de fragmentations de masse :

## Bibliographie



Les valeurs des temps de rétention sont de 5.28 min et 5.11 min avec des spectres de fragmentations identiques, par conséquent le métabolite est présent dans l'extrait brut (figure II-5A).



## Bibliographie

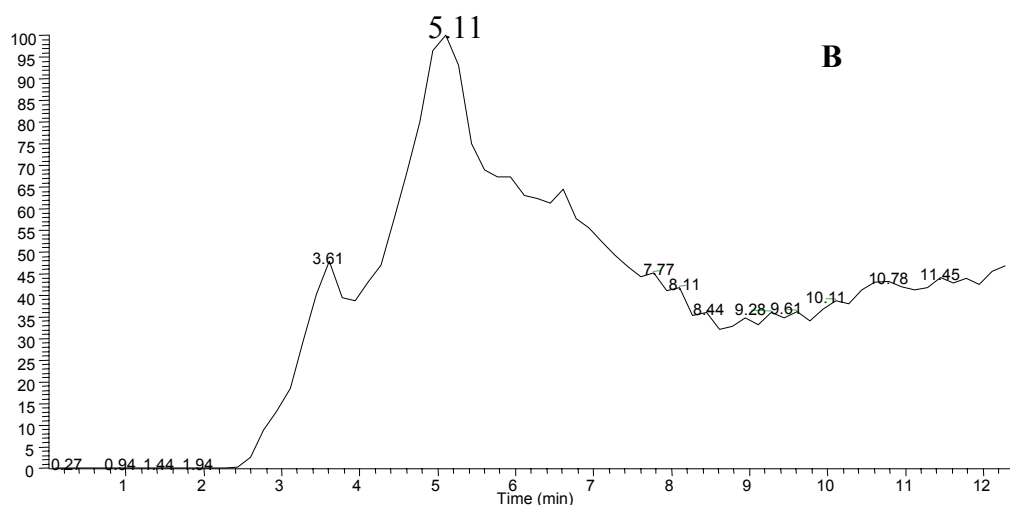


Figure II-5A : Chromatogrammes de l'acide D(+)-3-Phényllactique  
A : Courant ionique SIM ms [164-166] du produit pur  
B : Courant ionique SIM ms [164-166] de l'extrait brut

La fragmentation de l'acide phényllactique est représentée en mode négatif Full ms<sup>2</sup> 165 uma (figure II-5B).

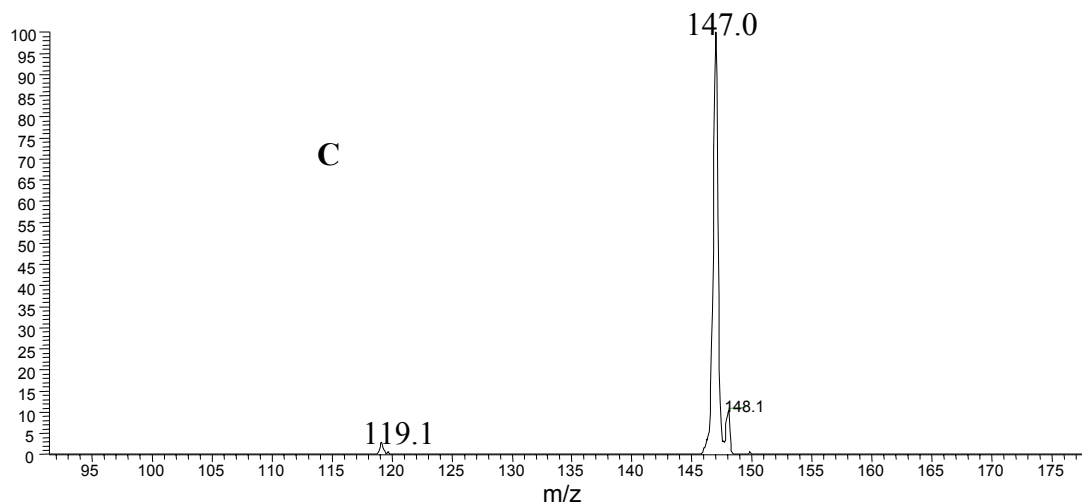


Figure II-5B : Spectre de l'acide D(+)-3-Phényllactique  
C : Fragmentation Full ms<sup>2</sup> 165 uma

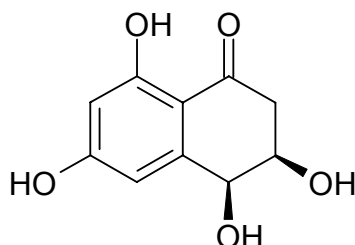
L'acide phényllactique est un co-métabolite de l'acide 6-méthylsalicylique [125].

En 1975, il est isolé dans une culture de *Aspergillus sojae* [126], puis en 1986 dans *Ceratocystis clavigera*, *C. ips* et *C. huntii* [86] responsables de la maladie bleue des pins. En 1995, ce métabolite est également retrouvé dans une culture de *Ophiostoma crassivaginata* [127].

## Bibliographie

Le composé 14 est décrit comme un anti-fongique du champignon *Lactobacillus plantarum* [128].

### II-6. Cis 1(2H) 3, 4-Dihydro-3, 4, 6, 8-tétrahydroxynaphtalénone (15)



Formule brute :  $C_{10}H_{10}O_5$

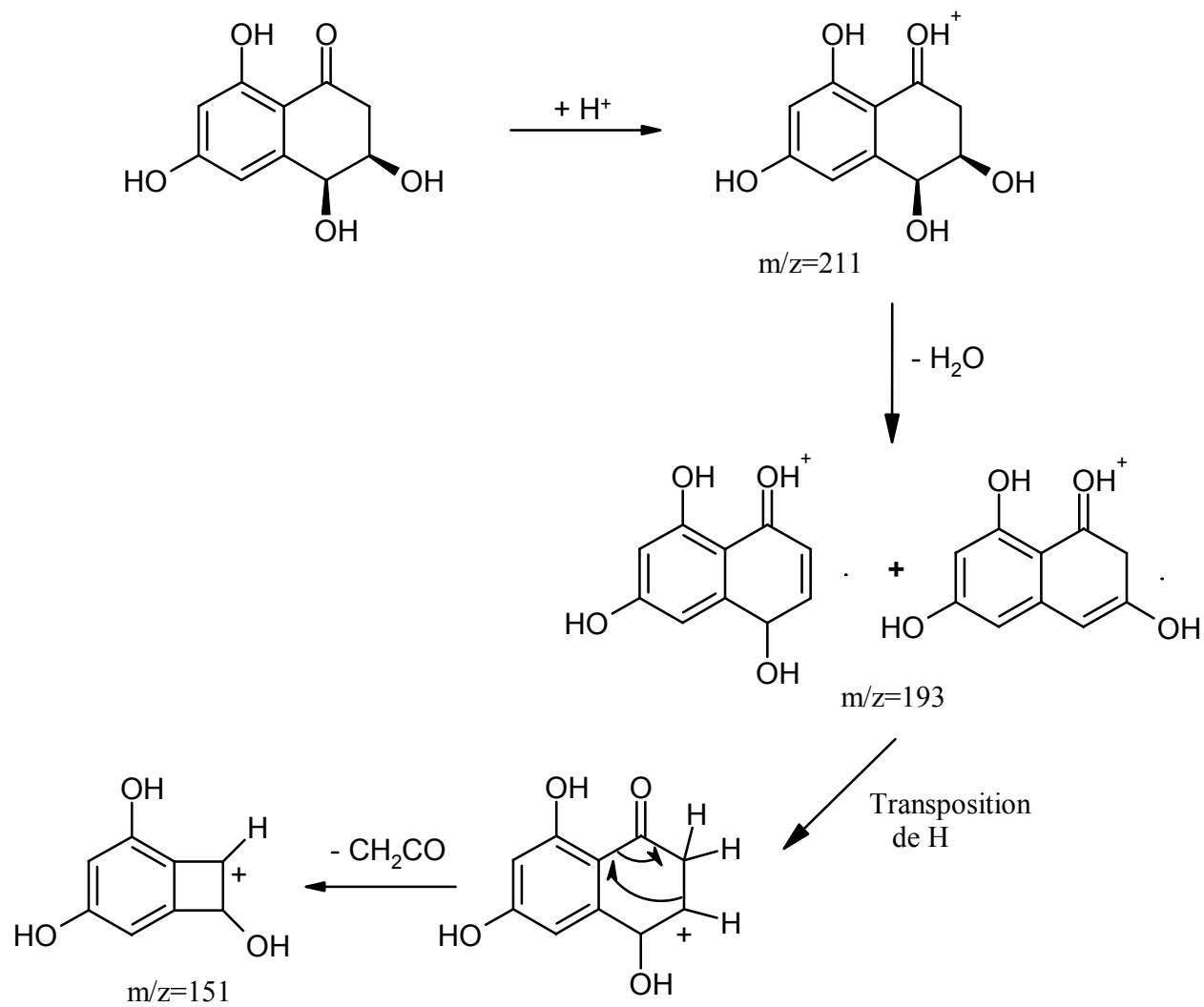
Poids moléculaire :  $210 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Temps de rétention : 17.2 min

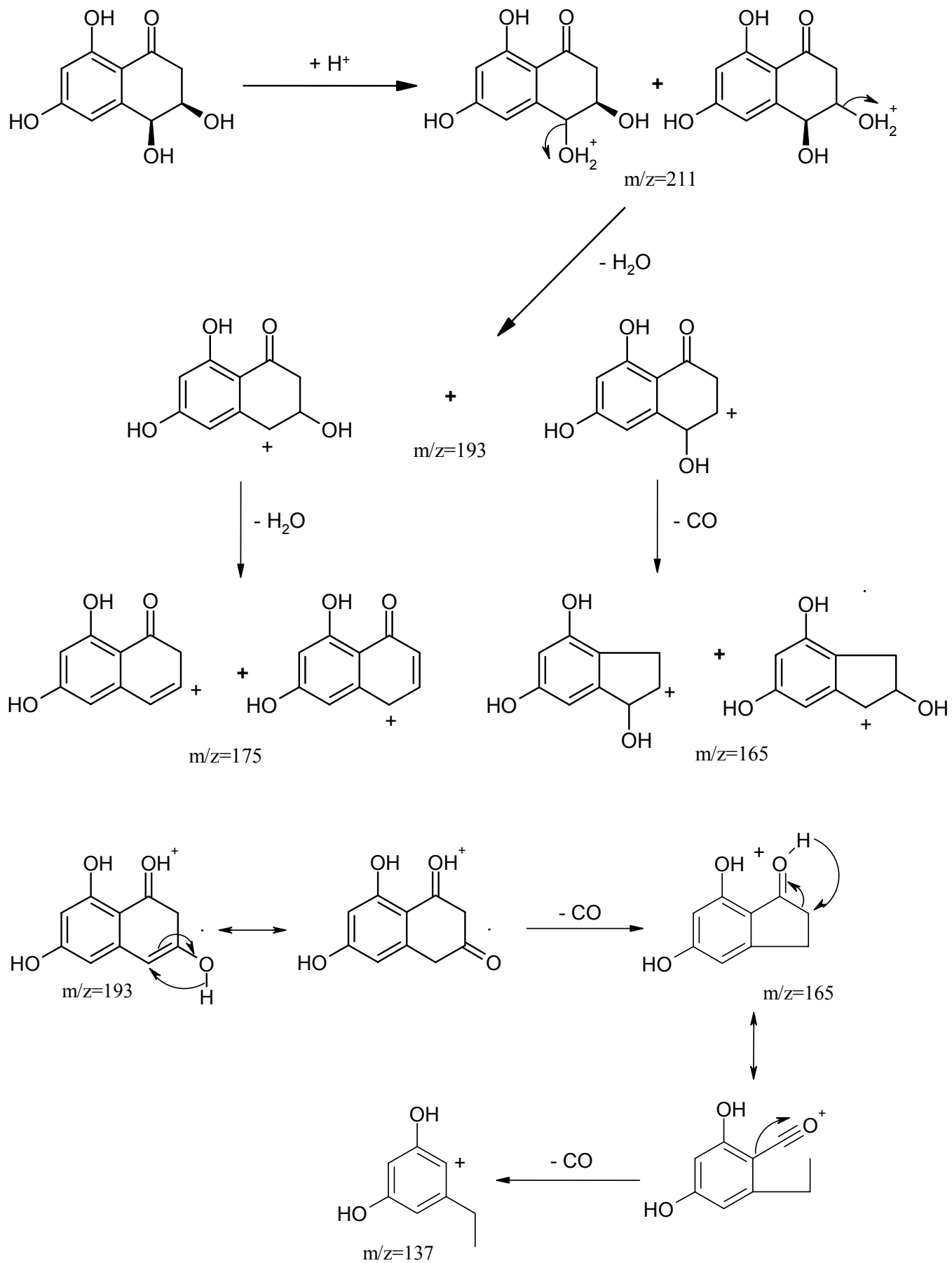
SM (ESI, mode positif), m/z : Full ms 211 uma [  $M + H$  ]<sup>+</sup>; Full ms<sup>2</sup>(211) 193 uma [  $(M + H) - H_2O$  ]<sup>+</sup>; Full ms<sup>3</sup>(211, 193) 175 uma [ perte de  $H_2O$  ]<sup>+</sup>; Full ms<sup>3</sup>(211, 193) 165 uma [ perte de CO ]<sup>+</sup>; Full ms<sup>3</sup>(211, 193) 151 uma [ perte de  $CH_2CO$  ]<sup>+</sup>; Full ms<sup>4</sup>(211, 193, 165) 137 uma [ perte de CO ]<sup>+</sup>.

Schéma de fragmentations de masse :

Bibliographie



*Bibliographie*



## Bibliographie

Le métabolite a été isolé en 1973 d'une souche de *Pyricularia oryzae* et considéré comme une substance phytotoxique [129].

En 1974, il a été retrouvé dans une culture de *Phialophora lagerbergii* [130], puis en 1977 dans le champignon *Ceratocystis minor* [85]. En 1980, le composé 15 fut également isolée de l'agent pathogène *Verticillium dahliae* [131], puis en 1996 de *Ceratocystis fimbriata coffea* [88] et *C. fimbriata platani* [89].

Les expériences en LC-MS de l'extrait brut et de la référence (produit pur) démontrent la similitude des valeurs des RT, en mode SIM ms [210-212] (figure II-6A). Les spectres de fragmentations du composé 5, Full ms<sup>2</sup> 211 et Full ms<sup>3</sup> (211,193), sont représentés sur la figure II-6B.

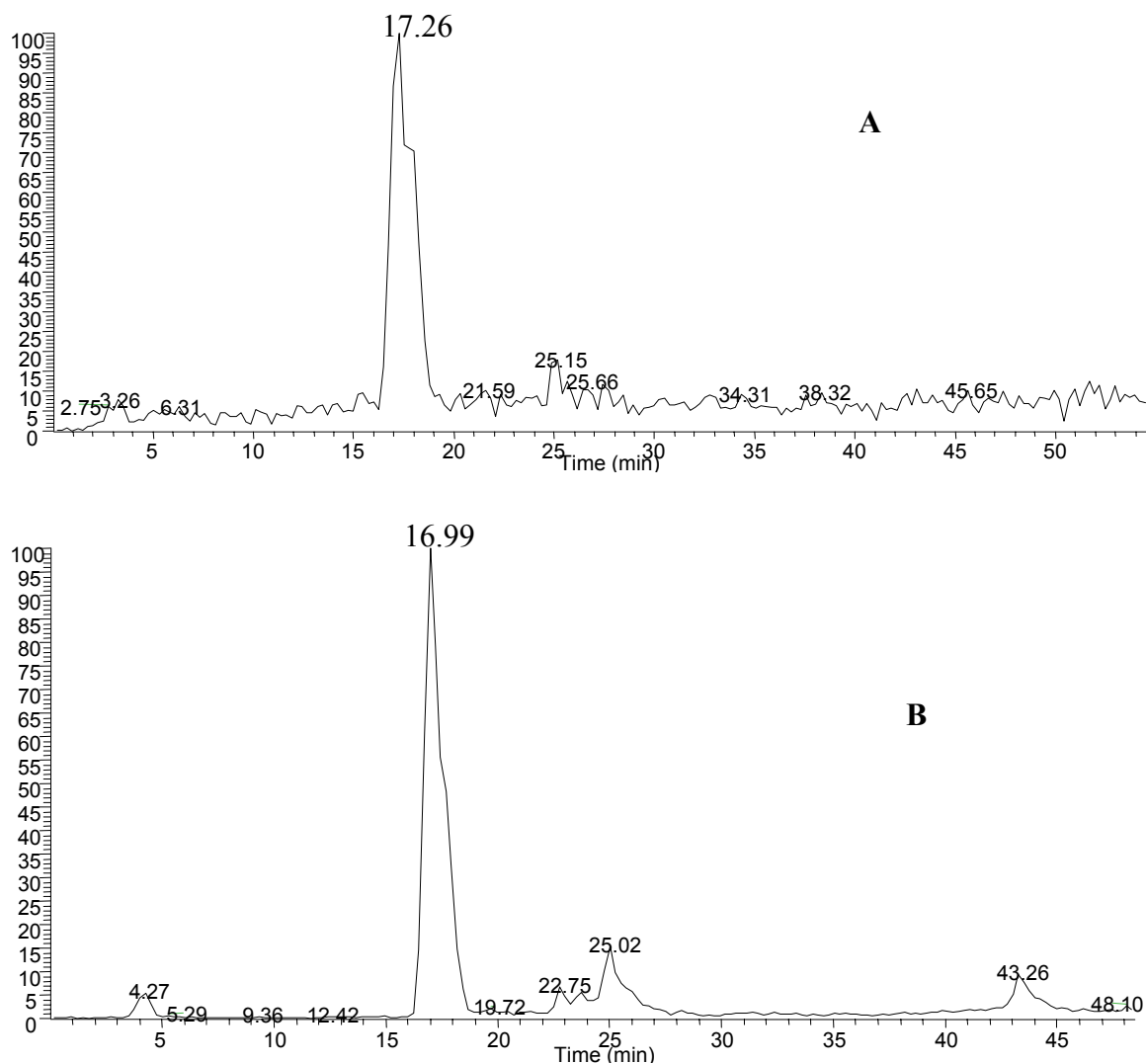


Figure II-6A : Chromatogrammes de la cis-Tétrahydroxynaphtalénone

Bibliographie

A : Courant ionique SIM ms [210-212] du produit pur  
B : Courant ionique SIM ms [210-212] de l'extrait brut

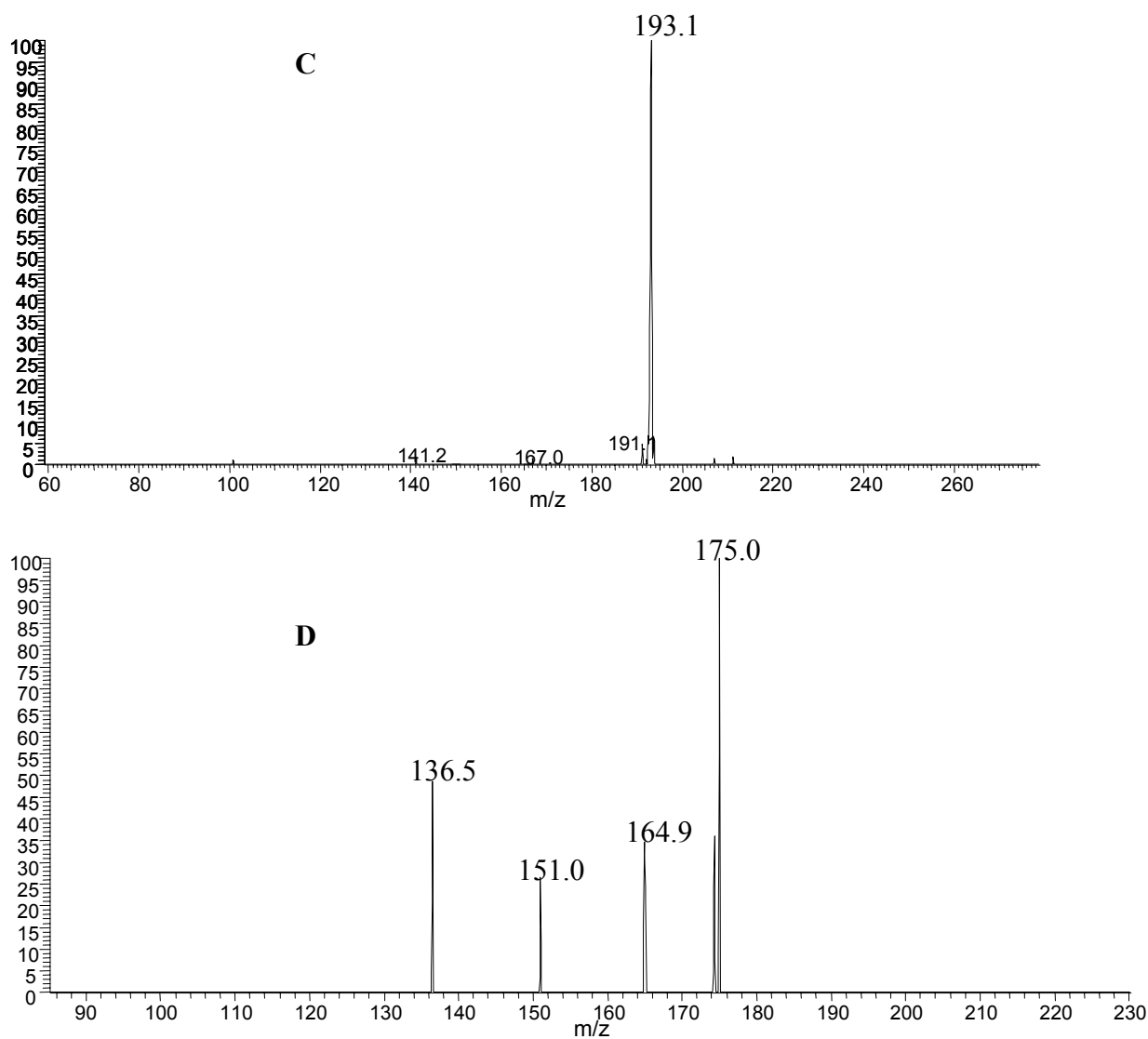


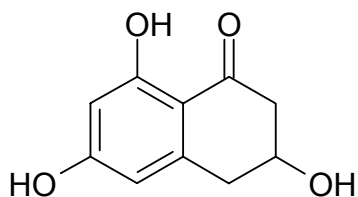
Figure II-6B : Spectres de la cis-Tétrahydroxynaphtalénone

C : Fragmentation Full  $ms^2$  211 uma

D : Fragmentation Full  $ms^3$  (211,193) uma

**II-7. 1(2H) 3, 4-Dihydro-3, 6, 8-trihydroxynaphtalénone (16)**

## Bibliographie



Nom commun : Scytalone

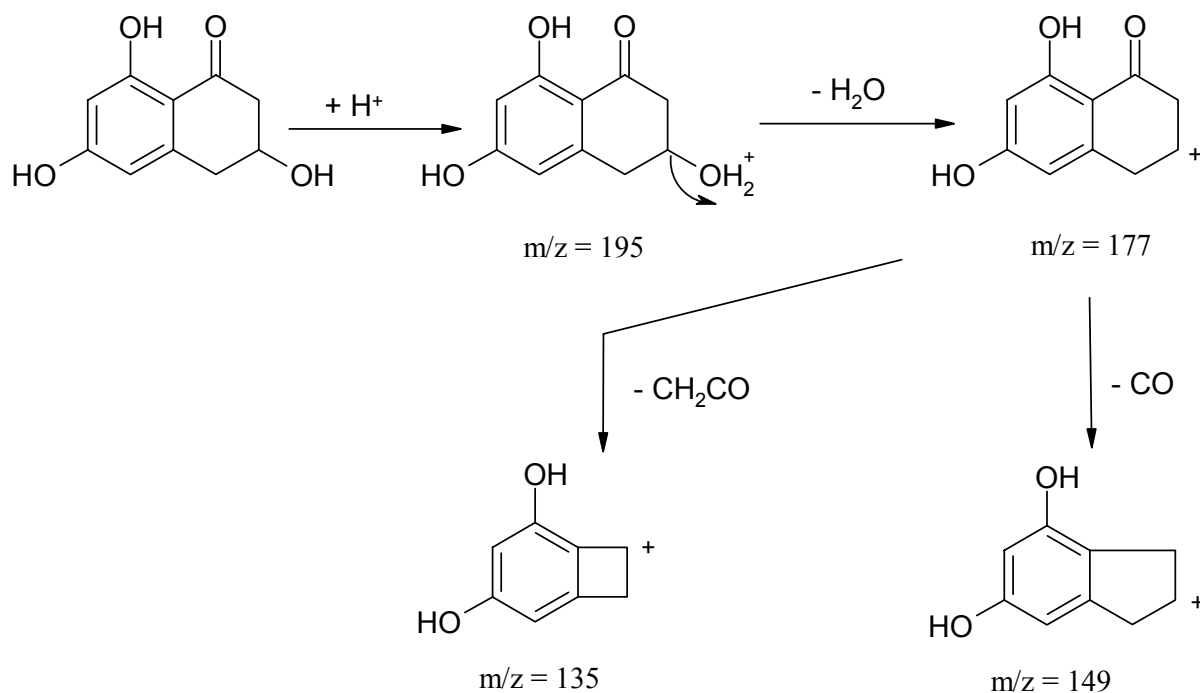
Formule brute :  $C_{10}H_{10}O_4$

Poids moléculaire :  $194 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

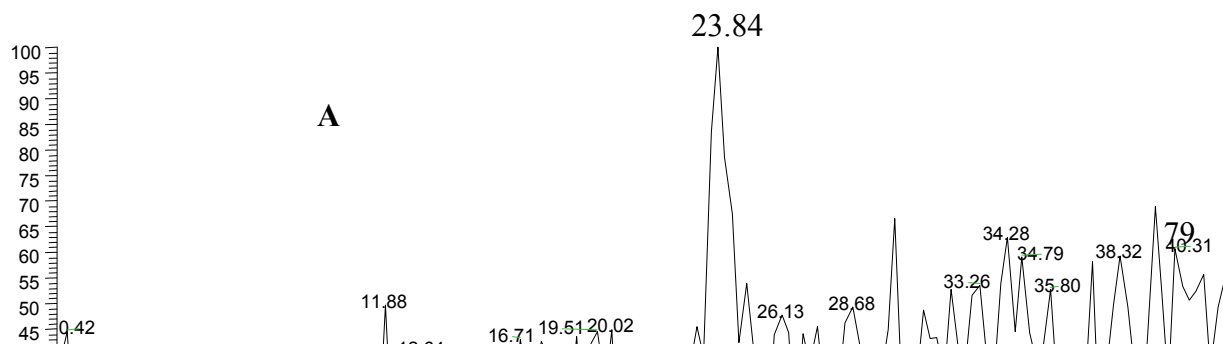
Temps de rétention : 23.8 min

SM (ESI, mode positif),  $m/z$  : Full  $ms$  195 uma  $[M + H]^+$  ; Full  $ms^2$  (195) 177 uma  $[(M + H) - H_2O]^+$  ; Full  $ms^3$  (195, 177) 149 uma  $[perte \text{ de } CO]^+$  ; Full  $ms^3$  (195, 177) 135 uma  $[perte \text{ de } CH_2CO]^+$ .

Schéma de fragmentations de masse :



Les deux chromatogrammes LC-MS en mode SIM  $ms$  [194-196] de la scytalone permettent de conclure à la présence de cette molécule dans l'extrait brut fongique (figure II-7A).



Bibliographie

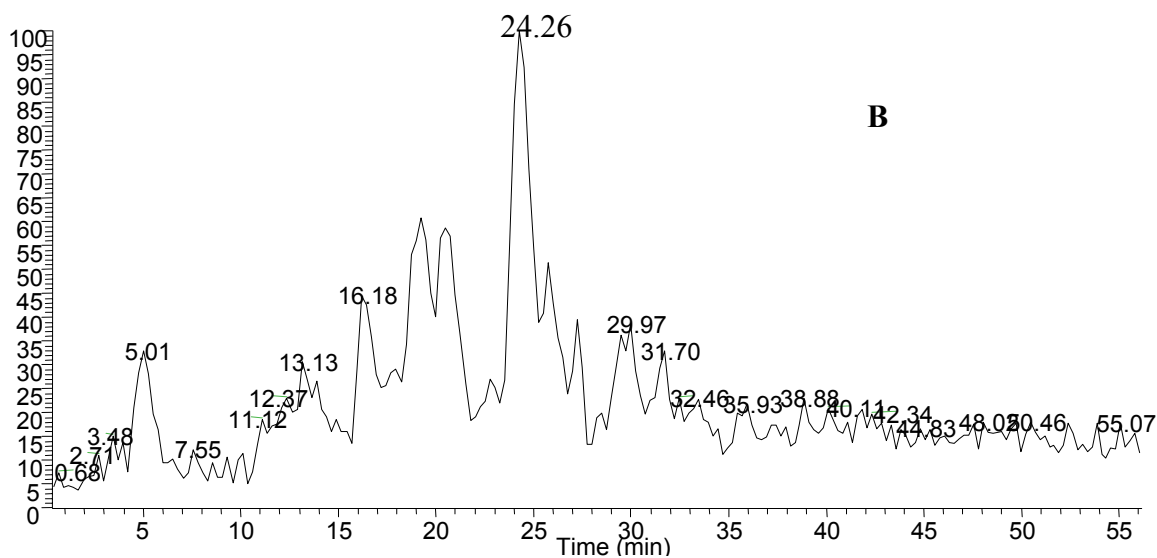


Figure II-7A : Chromatogrammes de la scytalone  
A : Courant ionique SIM ms [194-196] du produit pur  
B : Courant ionique SIM ms [194-196] de l'extrait brut

Sur la figure II-7B est représentée la fragmentation de la scytalone, en mode Full ms<sup>2</sup> 195 uma.

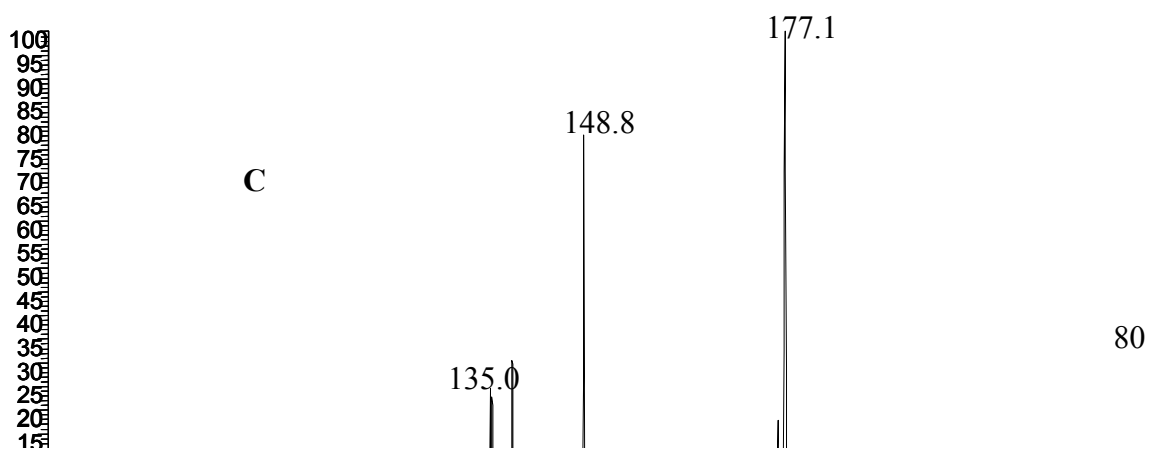


Figure II-7B : Spectre de la scytalone  
C : Fragmentations Full ms<sup>2</sup> 195 uma

La scytalone a été isolée de plusieurs champignons, répertoriés dans le tableau suivant :

<b>Dates</b>	<b>Agents pathogènes</b>	<b>Références</b>
1972	<i>Scytalidium</i>	[132,133]
1974	<i>Phialophora lagerbergii</i>	[130]
1977	<i>Ceratocystis minor</i>	[84,85]
1978	<i>Verticillium dahliae</i>	[134]
1994	<i>Valsa ambiens</i>	[135]

En 1981, l'étude de la biosynthèse de la scytalone démontre qu'elle dérive d'une tétralone participant ainsi à la biosynthèse de la mélanine [136,137].

En 2000, ce métabolite est identifié dans le *Phaeoacremonium chlamydosporum* [138], un des champignons responsable de l'esca (maladie de la vigne).

**CHAPITRE IV :**  
**TESTS BIOLOGIQUES**



*Rameau d'orme nain*

## Bibliographie

Les métabolites (isolés, identifiés) en quantité suffisante provenant de *Graphium ulmi* ont été soumis à des tests biologiques afin d'évaluer leur toxicité. Au laboratoire, les tests furent réalisés sur des plantules de tomate reconnus pour être sensible aux toxiques, et sur des feuilles d'orme champêtre. Des tests sur des cals d'orme ont été également effectués par la société Technivit (France).

### *III. Tests sur plantules de tomate*

Les tests sur les plantules de tomate sont à titre indicatif. Ils sont utilisés sur des fractions d'extrait brut pour estimer leurs toxicités (figure I). Seules les fractions toxiques feront l'objet de recherches : purification et isolement des métabolites.

Les plantules de tomate de la variété Bony Best utilisées pour les tests possèdent deux cotylédons et deux feuilles, de hauteur 6 à 8 cm, pesant entre 85 et 100 mg. Les échantillons sont déposés dans des piluliers de 2,5 mL et sont dissous dans une solution d'eau distillée à 2 % d'acétone. Les plantules sont débarrassées de leurs racines sous l'eau, et plongées dans les différentes solutions à tester.

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

L'état de chaque plantule est relevé au cours du temps.

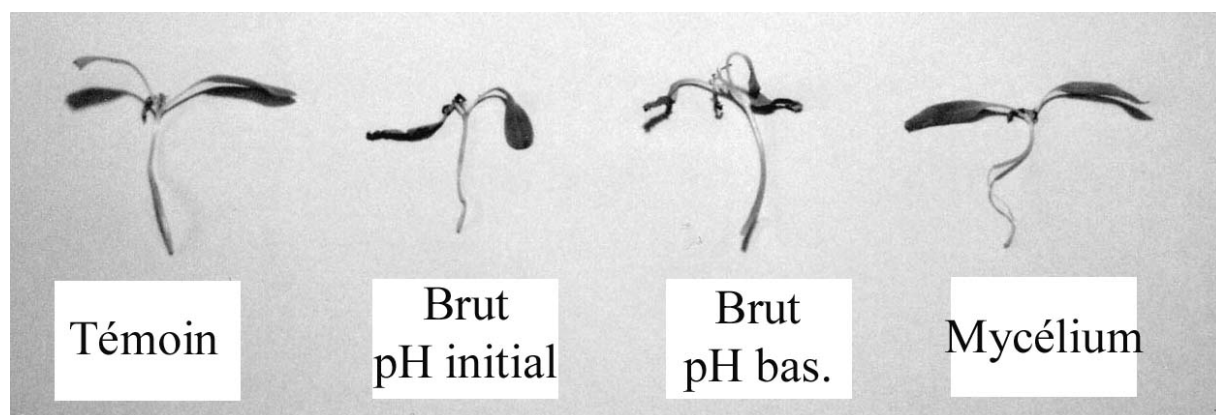


Figure I : Tests sur les bruts à pH initial, pH basique et sur le mycélium.

Pour l'extrait brut à pH initial (environ pH = 5), il y a un flétrissement des cotylédons et une nécrose de la tige. Les substances présentes dans l'extrait brut à pH basique provoquent un flétrissement des cotylédons. Dans le cas du mycélium, seul la tige est nécrosée.

L'ensemble des métabolites présents dans chacun des trois extraits bruts ont un mode d'action différent, qui donne lieu à une symptomatologie différente.

*Tests sur carrée de feuilles d'orme*

Les tests sur carrée de feuilles découlent des procédures décrites par Ho Park et al. [139], Sugawara et al. [140], lesquels entaillent des tissus végétaux afin de les soumettre aux éventuelles toxines.

Ces tests sont réalisés sur des feuilles d'orme fraîchement cueillies découpées sous l'eau en carrée de 1 cm de côté. Elles sont ensuite plongées dans une solution de 980  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et de 20  $\mu\text{L}$  d'éthanol, qui sera notre solution témoin. Les composés (figure IIA) sont dissous dans la solution précédente et sont testés à différentes concentrations.

Le changement de l'état des feuilles est répertorié au cours du temps.

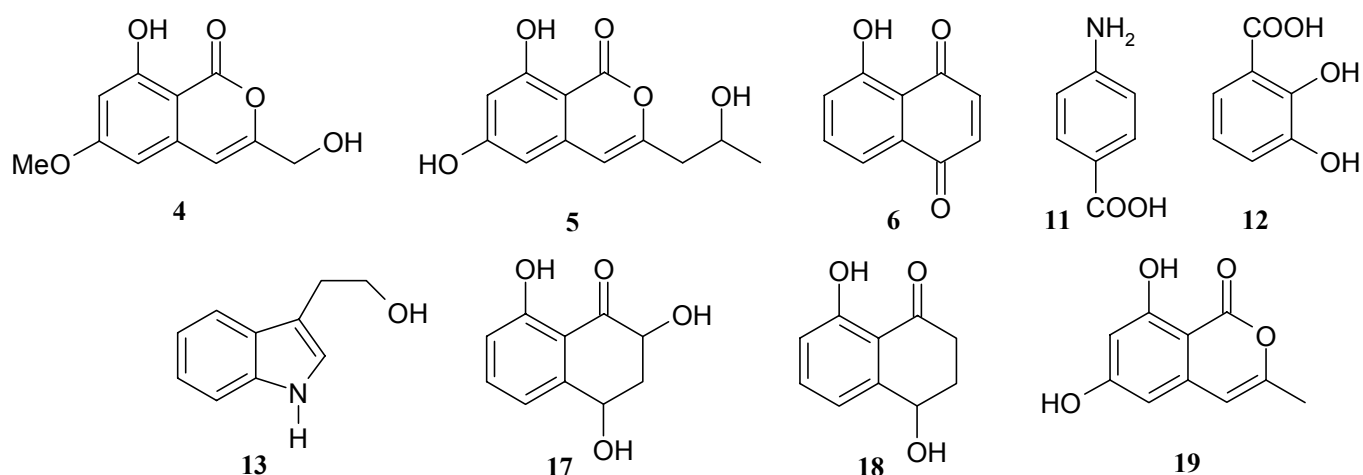


Figure IIA : Métabolites testés sur les feuilles

La quantité de produit isolé pour les composés **4**, **5**, **17**, **18** et **19** n'a permis de tester qu'une seule concentration (tableau IIB).

Heures	blanc	4	5	17	18	19
		50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0.35 $\text{mg.mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0.2 $\text{mg.mL}^{-1}$
début	-	-	-	-	-	-
1H00	-	-	-	-	-	-
2H30	-	-	-	-	-	-
18H30	-	-	-	-	-	-
24H50	-	-	-	-	-	-
42H30	-	-	-	-	-	-
51H00	-	-	-	+-, *	-	-

Tableau IIB : Résultats des tests pour les métabolites 4, 5, 17, 18 et 19

## Bibliographie

D'après les résultats obtenus, les métabolites n'ont pas d'effet toxique sur les feuilles d'orme.

Pour les composés **6**, **11**, **12** et **13** (produits commerciaux) (tableau IIC), les concentrations testées sont de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Heure	Blanc	6				11				12				13			
		1	500	100	50	1	500	100	50	1	500	100	50	1	500	100	50
début	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1H00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	+-	-	-	-	-	-	-
2H30	-	-	-	-	-	*	-	-	-	+	+	+-	-	-	-	-	-
18H30	-	+-	-	-	-	+- *	-	-	-	+++	+++	+-	-	*	-	-	-
24H50	-	+-	-	-	-	+- *	-	-	-	+++	+++	+-	-	⊖	-	-	-
42H30	-	+ *	+-	-	-	+- *	-	-	-	+++	+++	+	-	⊖	-	-	-
51H00	-	++ *	+-	-	-	+- *	-	-	-	+++	+++	++ *	-	⊖	♣	-	-

Tableau IIC : Résultats des tests pour les métabolites 6, 11, 12 et 13

### Légendes des tableaux :

+- : nécrose brune de 0.5 mm

++ : nécrose brune de la moitié de la feuille

\* : taches brunes

♣ : nervures brunes, couleur de la feuille vert très foncé

⊖ : nécrose brune de 1mm

+++ : nécrose brune sur la totalité de la

feuille

⊖ : couleur vert foncé - marron de la

Le métabolite **12**, l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque, est celui qui présente la plus grande toxicité à partir d'une concentration de  $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  après 2H30. Une apparition de nécrose a lieu pour une concentration de  $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  seulement 1H après avoir plongé la feuille dans la solution.

L'acide para-aminobenzoïque **11** et la juglone **6** provoquent une nécrose de la feuille pour une concentration de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , dix fois plus élevée que pour l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque. Ultérieurement, ces molécules ont déjà été classées comme des phytotoxines dans la littérature.

## Bibliographie

Le tryptophole, métabolite **13**, produit une variation de couleur de la feuille ainsi que des nervures mais pas de nécrose sur les bords de celle-ci. Ces symptômes apparaissent à partir d'une concentration de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Pour ce métabolite un mode action différent est envisageable.

### *Tests sur des cals d'orme*

Les tests sur cals d'orme permettent l'étude des effets des produits sur la croissance cellulaire des cals. L'espèce d'orme est le *Ulmus campestris* provenant du Berry (France). Les explants utilisés sont constitués de tissus comprenant le cambium associé avec un peu de xylème et de phloème (figure IIIA).

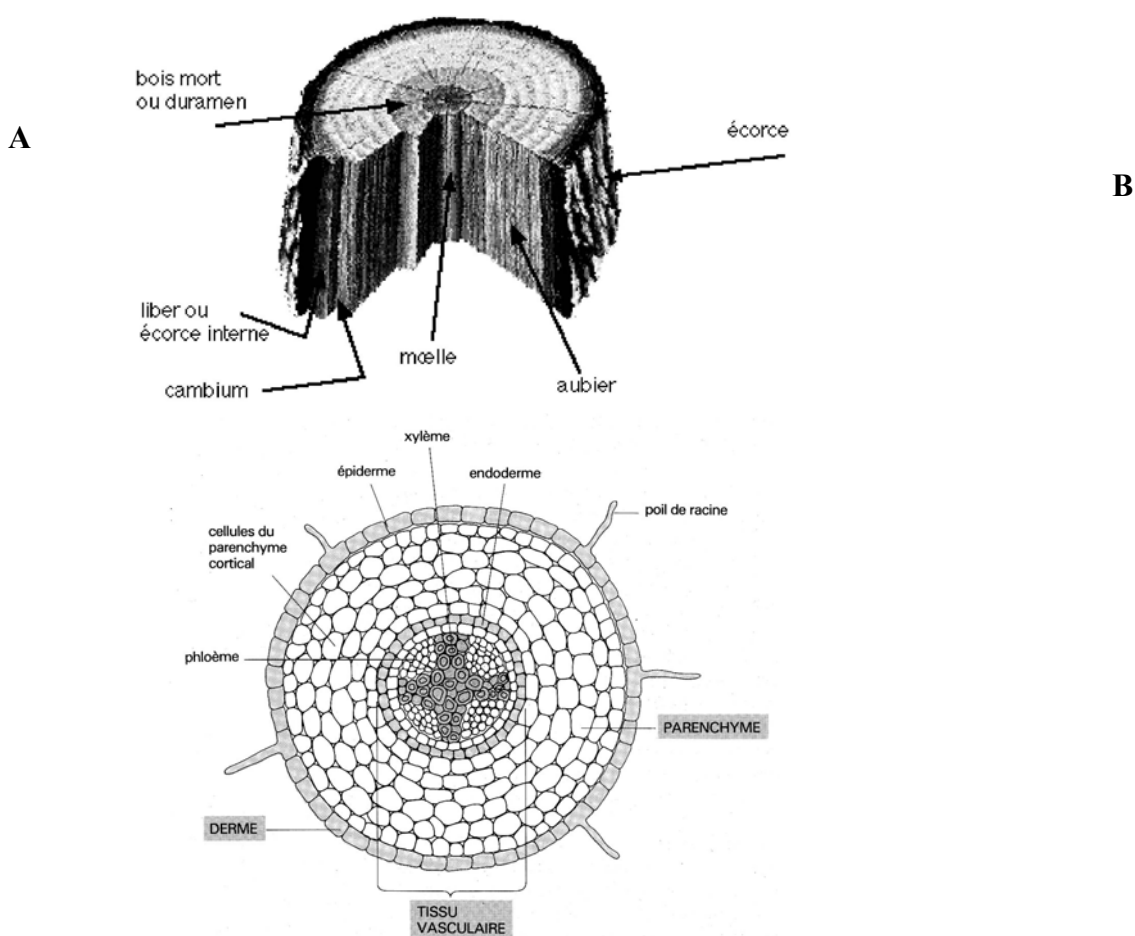


Figure IIIA : A : Schéma représentant la coupe d'un morceau de bois  
B : Coupe transversale d'une extrémité de racine

Le problème majeur lors de la dissection des explants est l'oxydation très rapide des tissus et l'apparition de phénols provoquant une nécrose des cellules extérieures. Afin de pallier ce phénomène, qui entraîne une perte de rendement dans la production des cals, un milieu contenant du charbon actif peut-être utilisé.

## Bibliographie

Cinq métabolites (figure IIIB) ont été testés à cinq concentrations différentes : 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$  et 1000  $\mu\text{M}$ .

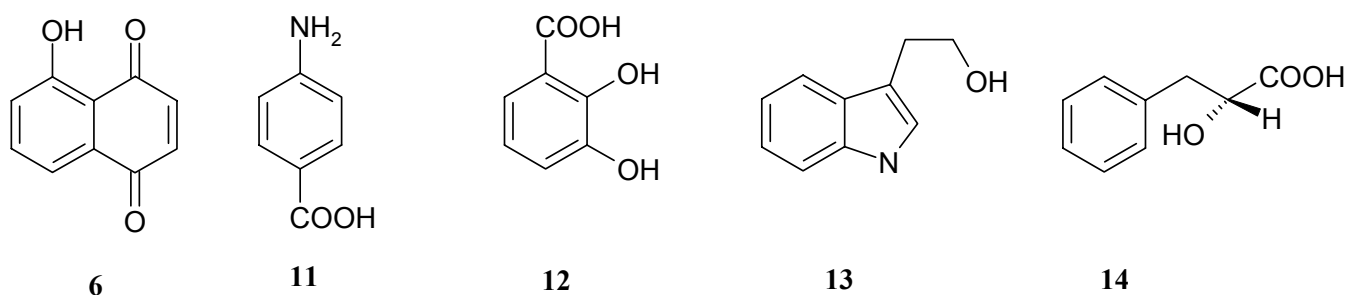


Figure IIIB : Métabolites testés sur cals d'orme

Les composés ne sont pas autoclavés afin d'éviter leur dégradation. Ils sont dilués dans de l'alcool à 70° puis ils sont ajoutés au milieu de culture. Pour chaque produit et concentration, trois répétitions sont effectuées contenant chacun deux cals (figure IIIC). Trois boîtes témoins sans produit sont également mises en culture.



Figure IIIC : Photographie de cals sur boîte de pétri

## Bibliographie

Une observation régulière des cals d'orme a été faite dans le but de noter leur survie. L'observation finale étant effectuée au bout de trois semaines de culture. Les résultats pour chaque métabolite sont répertoriés dans les tableaux suivants :

Tableau III-1 : Juglone (6)

Concentration	100 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	750 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
<b>Résultats</b>	Nécrose après 24 H	Nécrose après 24 H	Nécrose après 24 H	Nécrose après 24 H	Nécrose après 24 H

Selon la concentration du composé, le milieu se colore du jaune pâle au jaune foncé.

Tableau III-2 : Acide 4-aminobenzoïque (11)

Concentration	100 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	750 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
<b>Résultats</b>	1 cal survivant	Nécrose après 14 jours	Aucune survie après 21 jours	Nécrose après 7 jours	Nécrose après 7 jours

Tableau III-3 : Acide 2,3-dihydroxybenzoïque (12)

Concentration	100 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	750 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
<b>Résultats</b>	Survie peu de développement	Croissance puis nécrose après 14 jours	2 cal survivants après 21 jours	Nécrose après 3 jours	Nécrose après 3 jours

Le milieu se colore légèrement du rosé au violet pour les concentrations 500, 750 et 1000  $\mu\text{M}$ .

Tableau III-4 : Tryptophole (13)

Concentration	100 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	750 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
<b>Résultats</b>	Très bonne croissance Identique au témoin	Très bonne croissance Identique au témoin	Bonne croissance	Croissance puis début de nécrose après 14 jours	Croissance puis début de nécrose après 14 jours

Tableau III-5 : Acide D(+)-3-phényllactique (14)

## Bibliographie

Concentration	100 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	750 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
<b>Résultats</b>	Très bonne croissance Début de nécrose à 21 jours	Bonne croissance Début de nécrose	Croissance lente d'1 cal à partir de qqes cellules non nécrosées	Nécrose totale au bout de 14 jours	Début de nécrose au bout de 7 jours, 1 cal survivant à 21 jours

Le composé 14 ne colore pas le milieu de culture mais il se dégage une odeur fétide.

Le métabolite 6 s'avère être le composé le plus toxique puisqu'il y a une nécrose des cals après seulement 24 H, ceci même pour la concentration de 100  $\mu\text{M}$ . L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque et la juglone provoquent une nécrose respectivement au bout de trois et sept jours pour des concentrations de 750 et 1000  $\mu\text{M}$ .

Les composés 13 et 14 donnent lieu à une croissance des cals puis à un début de nécrose à partir de deux semaines de culture. La toxicité est probablement due à l'accumulation de ces métabolites à l'intérieure des cellules, provoquant une nécrose à partir d'une quantité maximale.

## *CHAPITRE V:*

### *ETUDE DU MATERIEL VEGETAL*

#### *DE L'ORME*

Bibliographie



*L'orme à feuilles de charme*

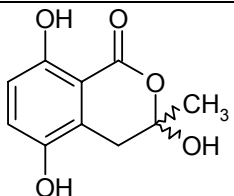
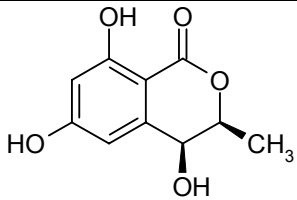
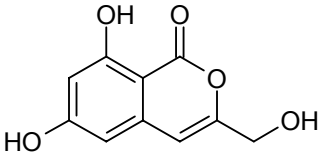
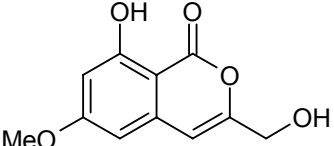
### IV. Généralités

L'étude du matériel végétal a été réalisée sur des bois malade et sain, ainsi que dans la sève et les feuilles. L'espèce d'orme utilisée est l'orme champêtre, très répandue en Suisse. Le matériel végétal sain provient d'un arbre âgé de quatre ans, ne possédant aucuns symptômes foliaires, de nécrose et sans présence de scolytes ou de larves. Après extraction pendant 24 h au soxlet, les extraits bruts subissent une "flash chromatographie" afin d'effectuer une séparation grossière en quelques fractions (hexane / acétate d'éthyle / acétone / éthanol / méthanol). Les différents extraits bruts étant très complexes, les expériences ont lieu en premier sur les fractions puis les résultats obtenus sont vérifiés sur ces bruts.

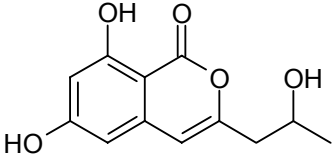
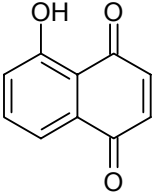
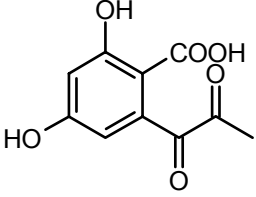
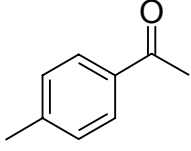
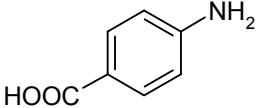
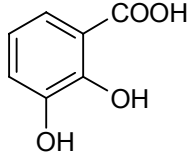
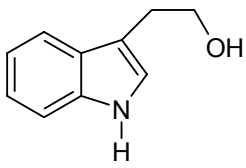
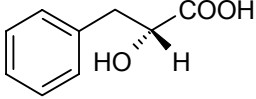
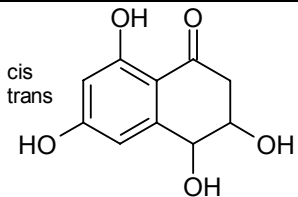
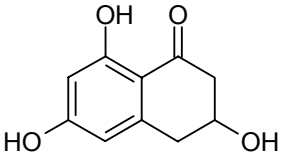
Les recherches des métabolites sont effectuées avec la méthode LC-MS<sup>n</sup>. Le programme en chromatographie liquide est identique à celui utilisé durant l'isolement des composés (chapitre II). En spectrométrie de masse, la source employée est une source ESI avec un split post-colonne. Afin de faciliter l'ionisation des composés et pour une meilleure détection, une injection de 3  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$  solution à 5 % s'effectue en continu après le split.

Tous les métabolites sont injectés préalablement pur dans le but d'établir leurs temps de rétention et leurs fragmentations.

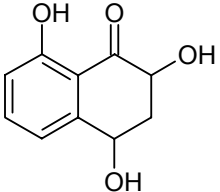
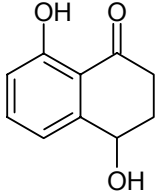
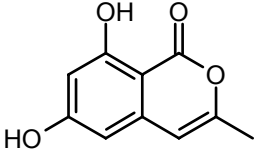
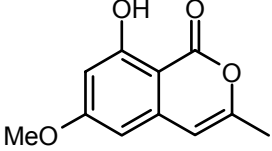
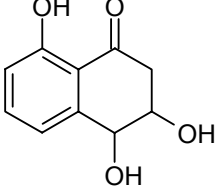
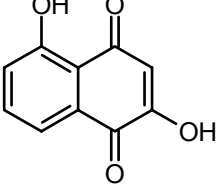
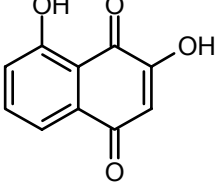
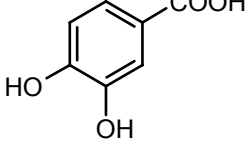
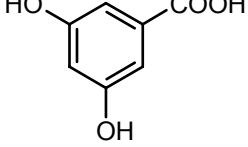
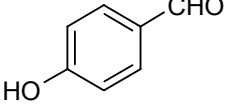
Les métabolites recherchés sont répertoriés dans le tableau suivant :

Molécules	(N°)	Masse ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Temps de rétention (min)
	1	210	37.4
	2	210	17.8
	3	208	27.6
	4	222	37.5

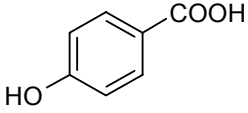
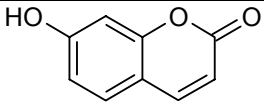
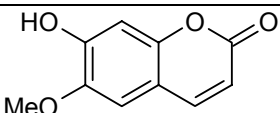
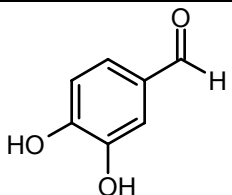
Bibliographie

	<b>5</b>	236	34.4
	<b>6</b>	174	38.2
	<b>7</b>	224	5
	<b>8</b>	134	38.7
	<b>11</b>	137	4
	<b>12</b>	154	3.6
	<b>13</b>	161	29.6
	<b>14</b>	166	5.2
	<b>15</b>	210	17.2 (cis) et 34.2 (trans)
	<b>16</b>	194	23.8

*Bibliographie*

	<b>17</b>	194	35.1
	<b>18</b>	178	28.1
	<b>19</b>	192	36.8
	<b>20</b>	206	48.2
	<b>21</b>	194	31.4
	<b>22</b>	190	9-11.5
	<b>23</b>	190	27
	<b>24</b>	154	7.8
	<b>25</b>	154	3.4
	<b>26</b>	122	21.9

## Bibliographie

	<b>27</b>	138	4.5
	<b>28</b>	162	27.4
	<b>29</b>	192	28.2
	<b>30</b>	138	17.5

## Recherche dans le bois malade

Le bois malade est transformé en sciure puis extrait à l'éther et à l'hexane. L'extrait brut "éther" est passé sur une colonne de silice avec un gradient de solvants (hexane / méthanol), sept fractions sont recueillies. En ce qui concerne l'extrait brut "hexane", trois fractions sont récupérées après passage sur colonne avec les solvants acétate d'éthyle, acétone et éthanol.

La recherche dans le bois malade a permis d'identifier sept molécules dans le brut extrait à l'éther et neuf molécules dans le brut extrait à l'hexane (figures IIA et IIB).

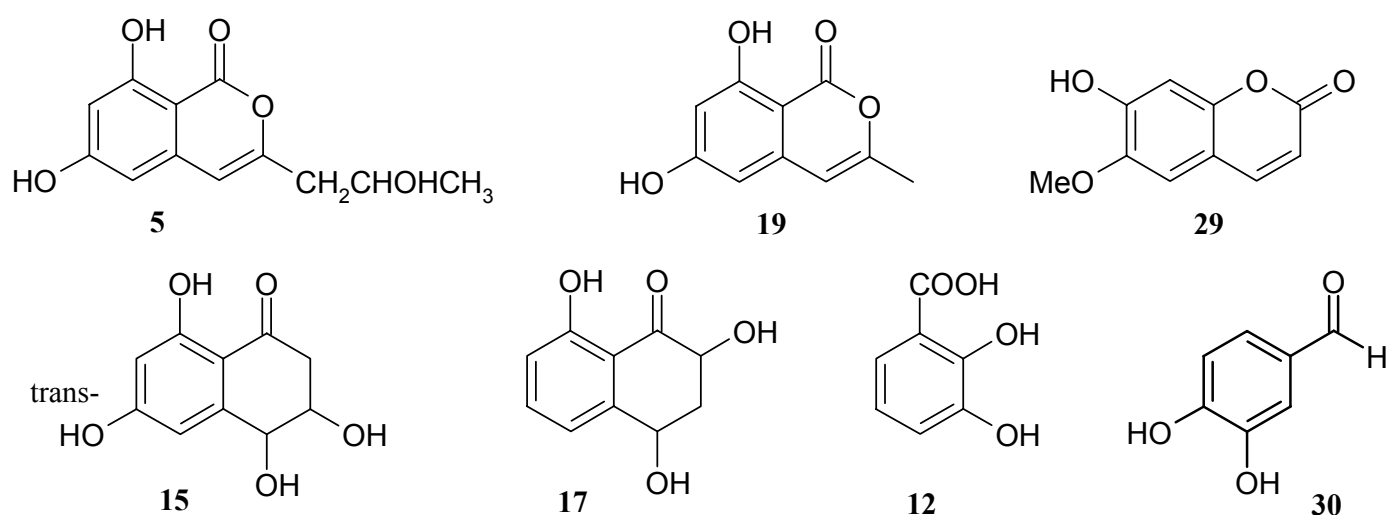


Figure IIA : Métabolites détectés dans le bois malade extrait à l'éther

## Bibliographie

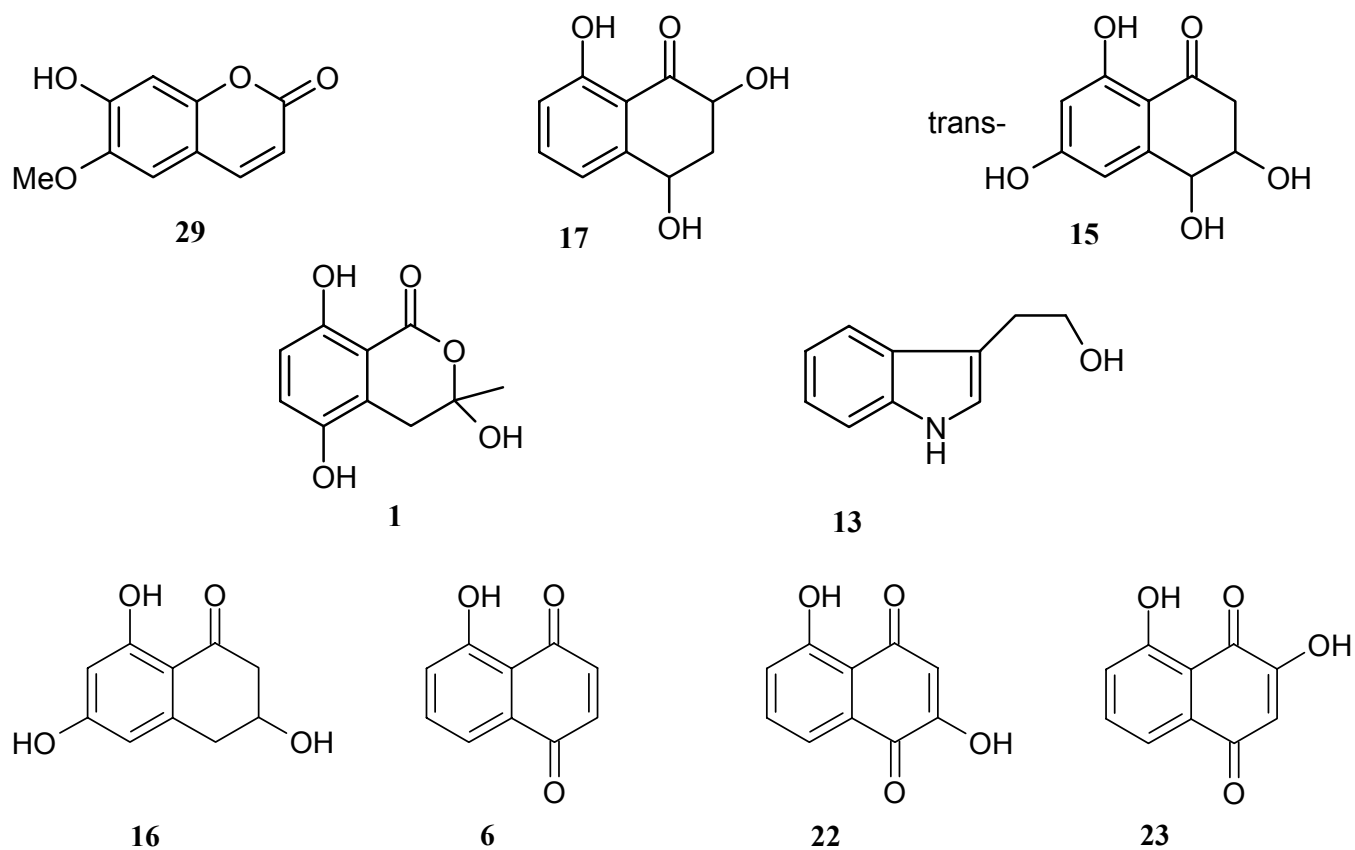


Figure IIB : Métabolites détectés dans le bois malade extrait à l'hexane

## **Extrait étheré**

**II-1.1** Le composé **5**, la (+)-orthosporine, a été identifié avec un temps de rétention égal à 34.2 min, en mode positif SIM sur l'ion 237 uma (figure II-1.1).

## Bibliographie

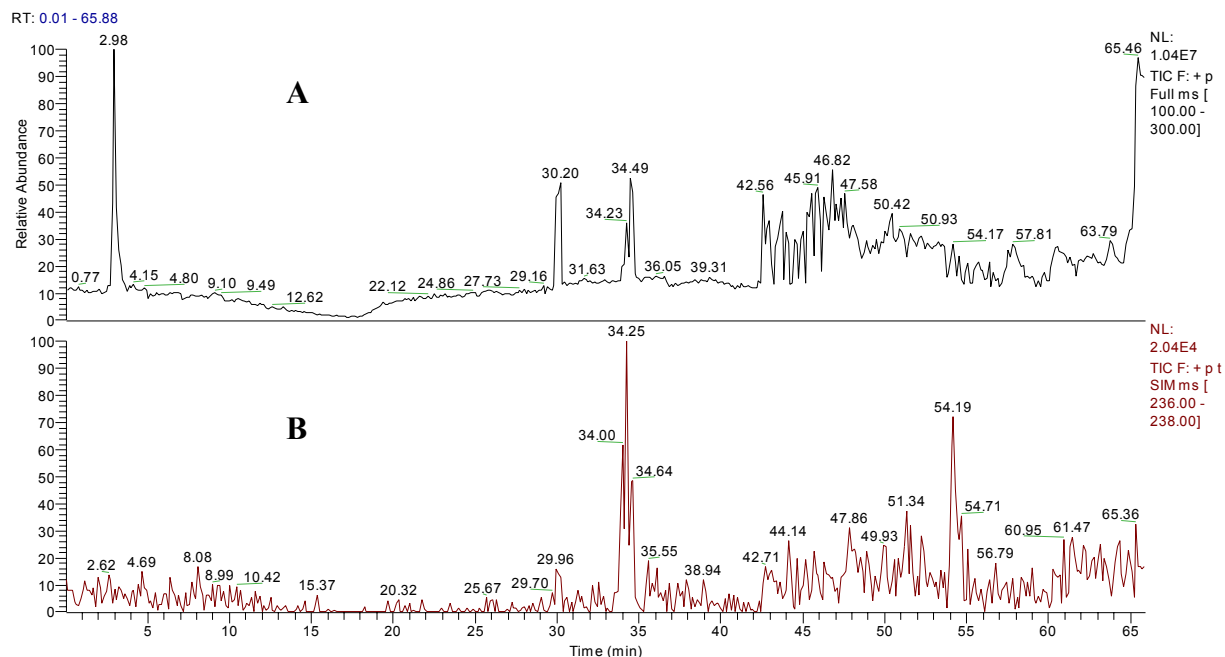


Figure II-1.1 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (237 uma)

II-1.2 La présence de 6,8-dihydroxy-3-méthyl-isochromen-1-one **19**, a été corroborée en mode SIM positif sur l'ion 193 uma, à un temps de rétention égal à 36.4 min (figure II-1.2).

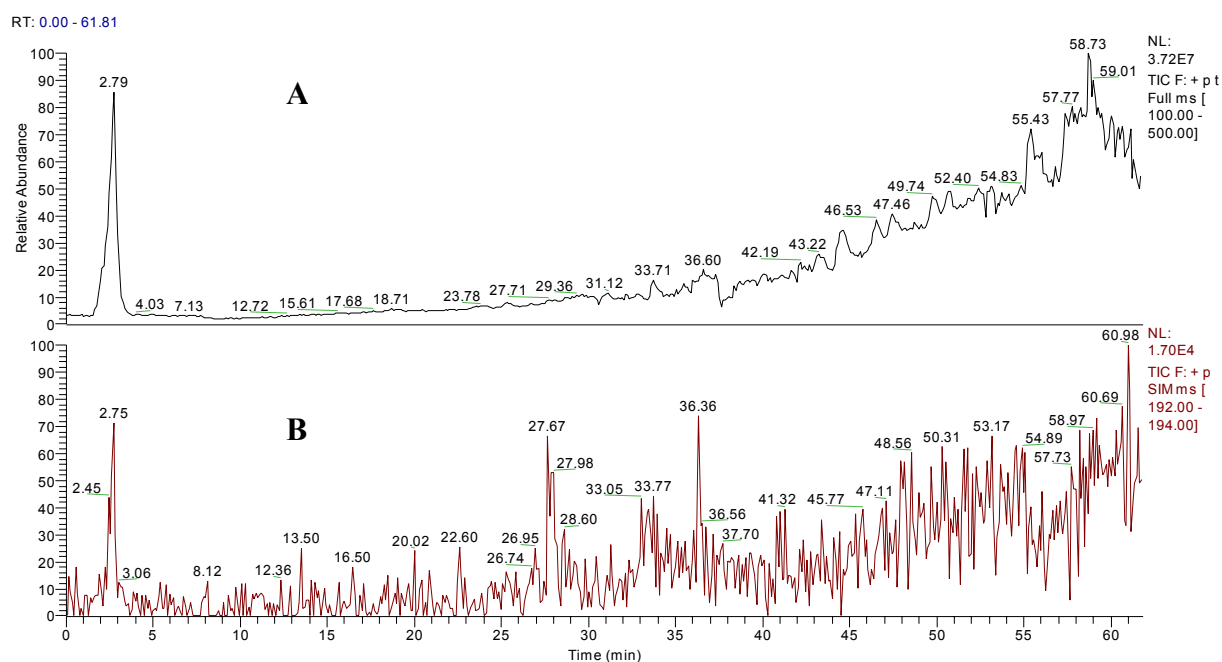


Figure II-1.2 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (193 uma)

II-1.3 La scopolétine **29**, a été constatée dans l'extrait brut "éther" à un temps de rétention de 27.7 min, en mode SIM positif sur l'ion 193 uma (figure II-1.3).

## Bibliographie

RT: 0.00 - 61.81

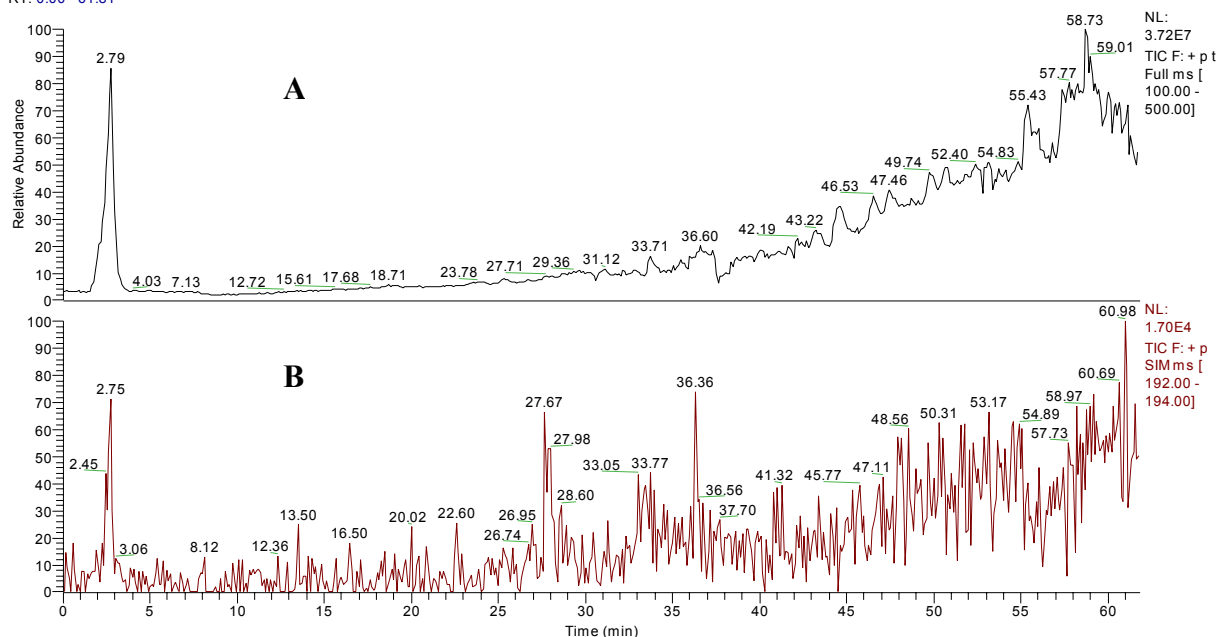


Figure II-1.3 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (193 uma)

**II-1.4** La trans-4-hydroxycytalone **15**, a été retrouvé dans deux fractions différentes à des temps de rétention respectifs de 34.1 et 34.8 min. La recherche a été effectuée en mode positif SIM sur l'ion 211 uma (figures II-1.4A, II-1.4B).

RT: 0.00 - 70.12

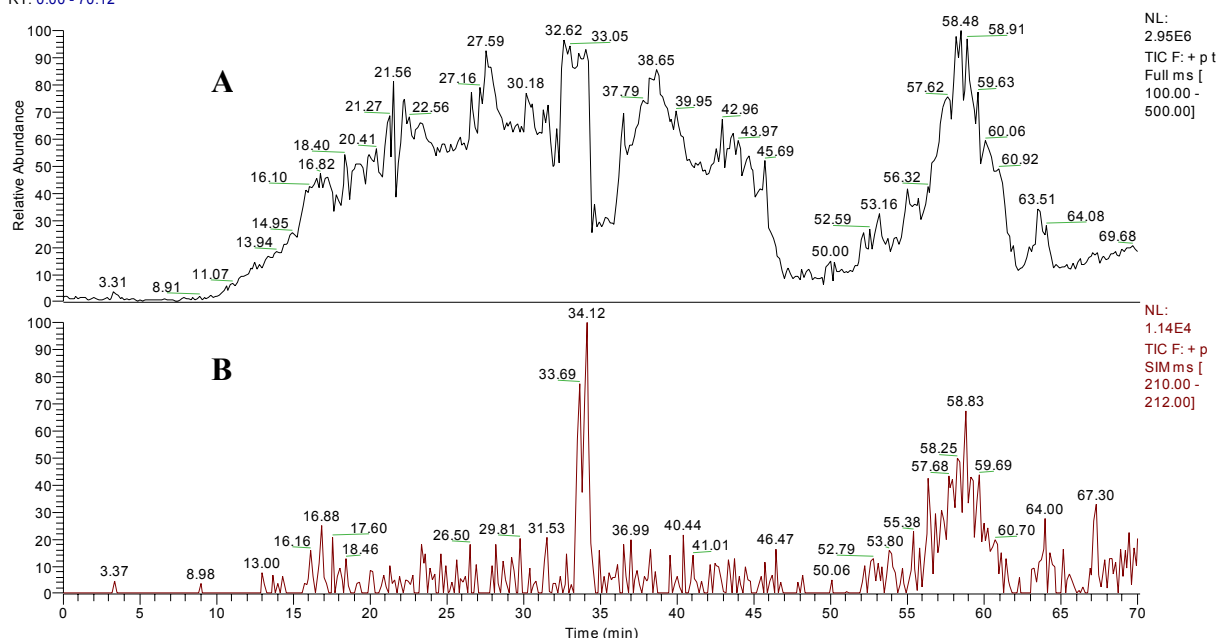


Figure II-1.4A : A : Chromatogramme du courant ionique total de la 1<sup>ère</sup> fraction  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (211 uma)

## Bibliographie

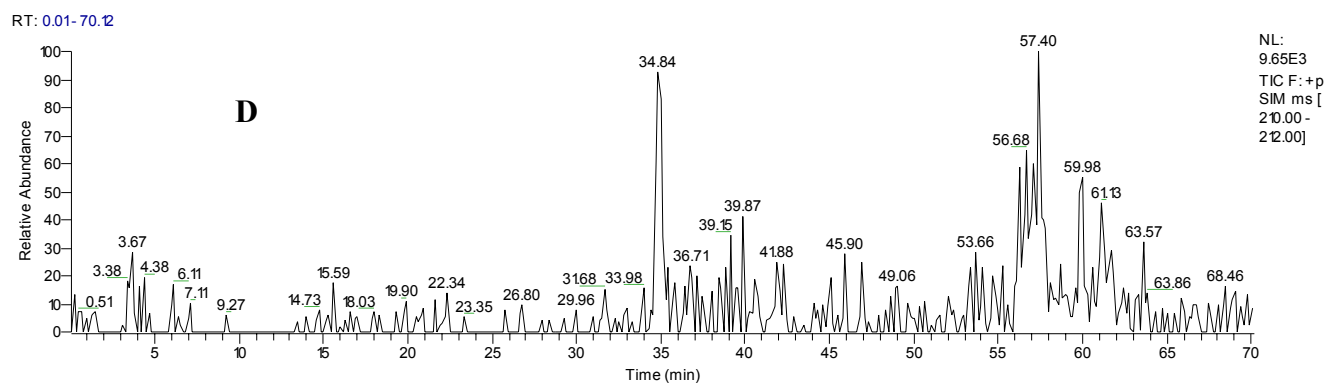
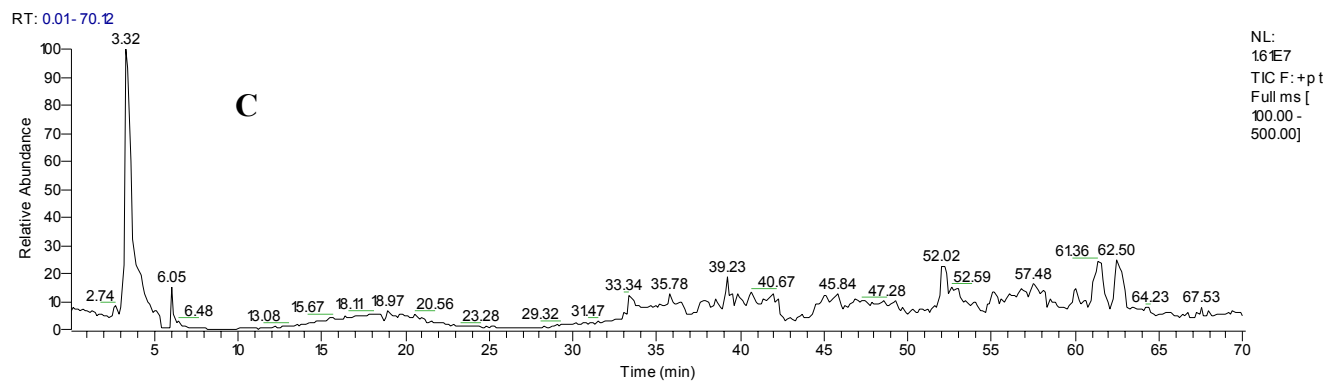


Figure II-1.4B : C : Chromatogramme du courant ionique total de la 2<sup>ème</sup> fraction  
D : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (211 uma)

II-1.5 Le composé **17** a été identifié en mode SIM positif sur l'ion 195 uma, à un temps de rétention de 34.5 min (figure II-1.5).

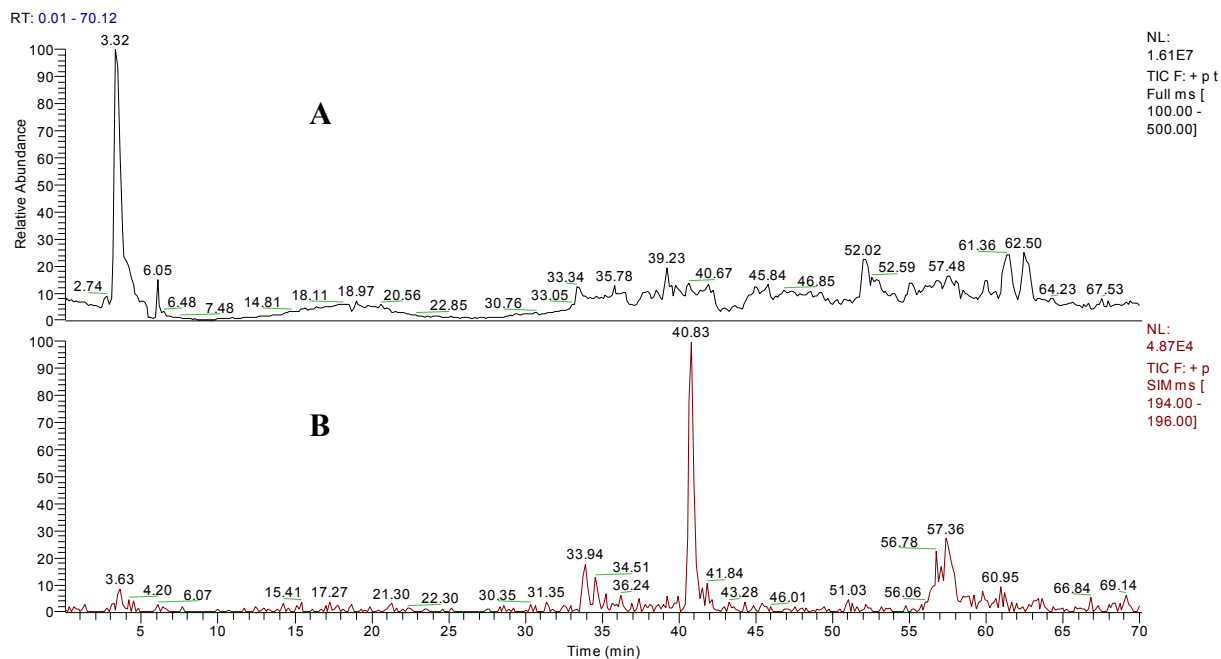


Figure II-1.5 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (195 uma)

## Bibliographie

**II-1.6** La présence de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque **12** a été confirmée à un temps de rétention de 3.7 min. Les expériences ont été effectuées en mode SIM négatif (153 uma) (figure II-1.6).

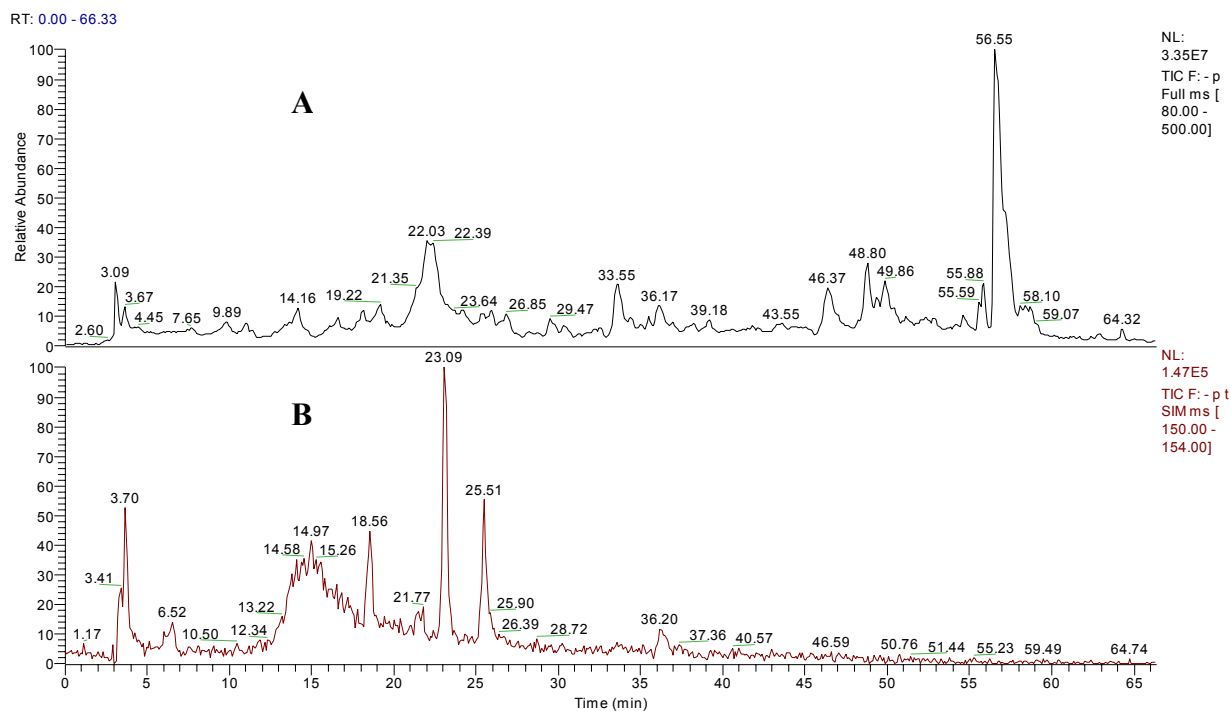


Figure II-1.6 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (153 uma)

**II-1.7** Le protocatéchualdéhyde **30** a été détecté à un temps de rétention égal à 17.7 min, en mode SIM positif (139 uma) (figure II-1.7).

## Bibliographie

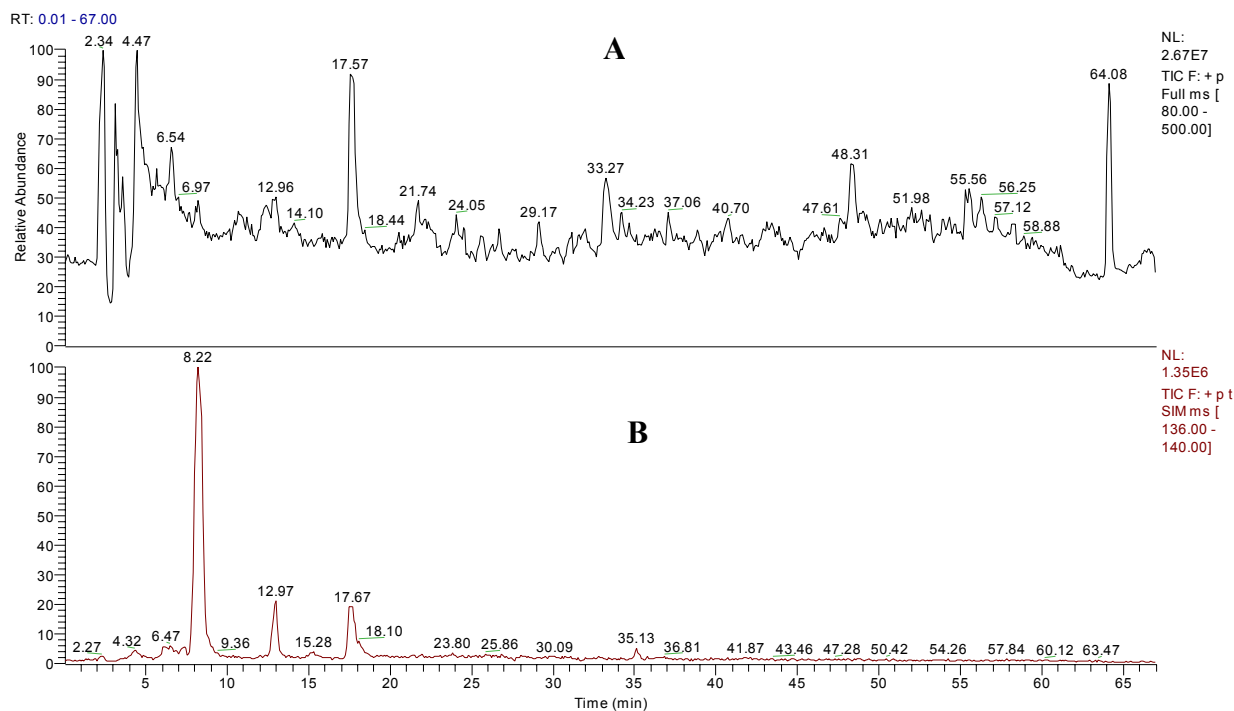


Figure II-1.7 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (139 uma)

## Extrait hexanique

II-2.1 La scopolétine **29** a été identifiée dans l'extrait brut hexanique à un temps de rétention de 28.2 min, en mode SIM positif sur l'ion 193 uma (figure II-2.1).

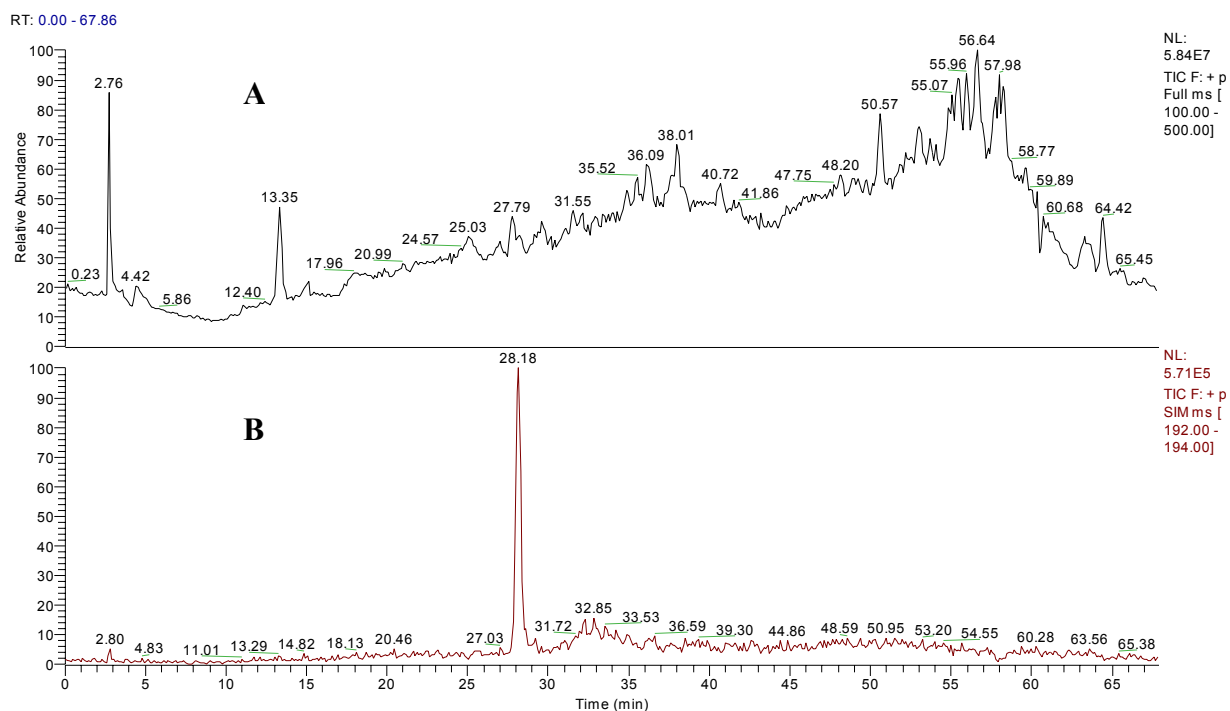


Figure II-2.1 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (193 uma)

## Bibliographie

**II-2.2** La présence de **17** a été constatée dans deux fractions à des temps de rétention de 34.6 et 34.9 min. Les recherches sont effectuées en mode SIM positif (195 uma) (figure II-2.2).

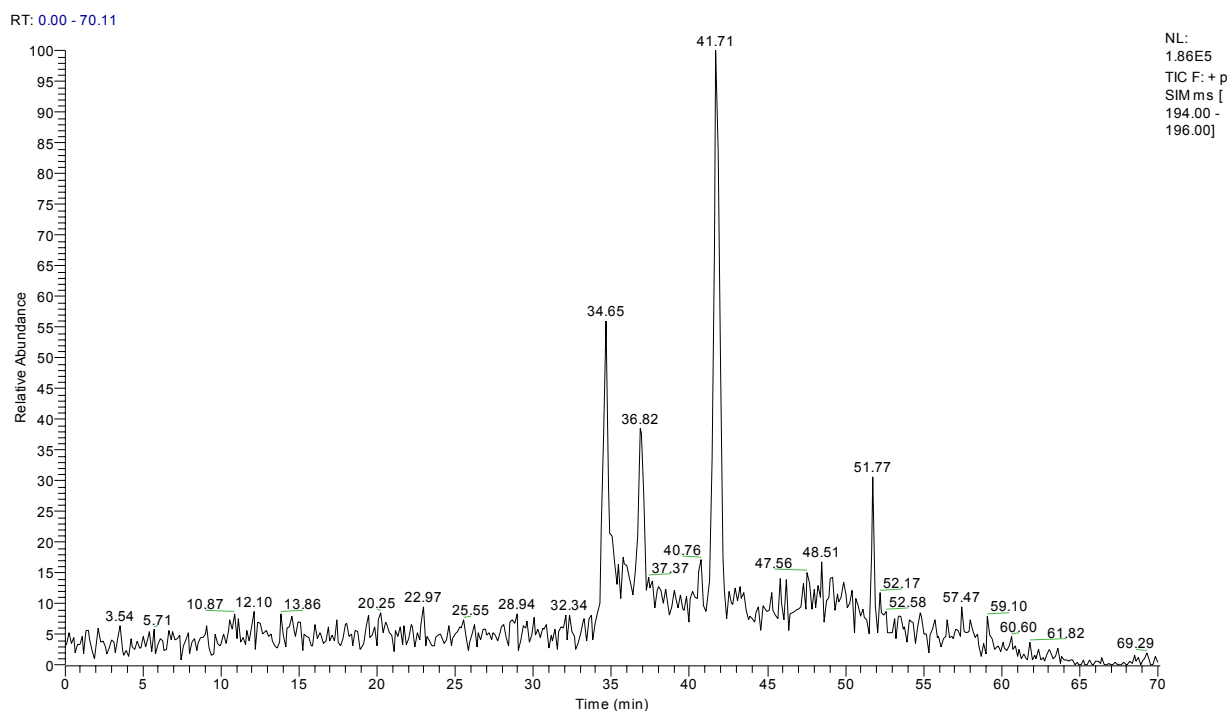
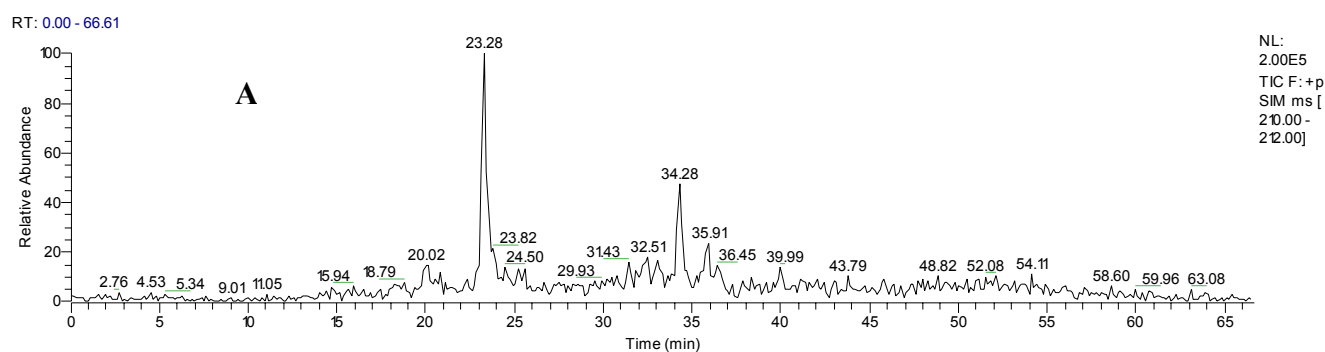
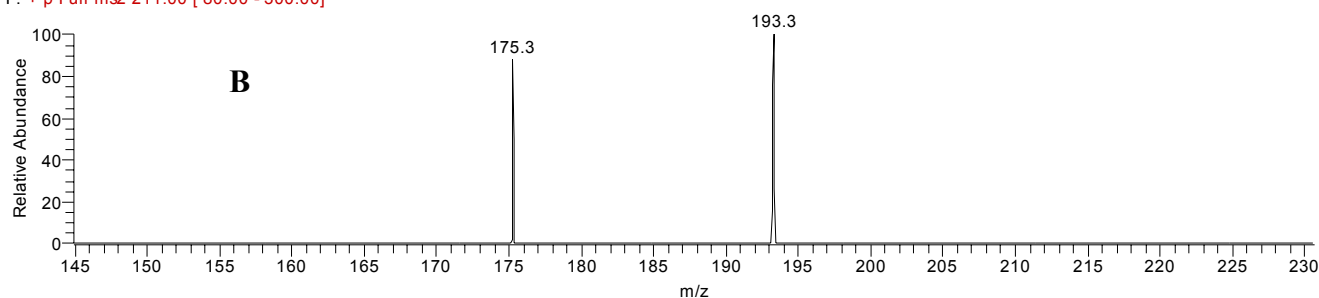


Figure II-2.2 : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (195 uma)

**II-2.3** Le métabolite **15** a été retrouvé dans deux fractions à des temps de rétention de 33.9 et 34.3 min, en mode SIM positif sur l'ion 211 uma et en mode Full MS<sup>2</sup> (211) (figure II-2.3).



S#: 1012-1016 RT: 34.35-34.49 AV: 2 NL: 2.46E2  
F: + p Full ms<sup>2</sup> 211.00 [ 80.00 - 300.00]



## Bibliographie

Figure II-2.3 : A : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (211 uma)  
B : Fragmentation en mode Full ms<sup>2</sup> 211 uma

**II-2.4** Le nouveau métabolite secondaire **1**, 3-méthyl-3,5,8-trihydroxy-isochroman-1-one, isolé précédemment dans le milieu de culture fongique a été identifié en mode SIM positif sur l'ion 211 uma. Le temps de rétention est égal à 37.5 min (figure II-2.4).

RT: 0.01 - 53.62

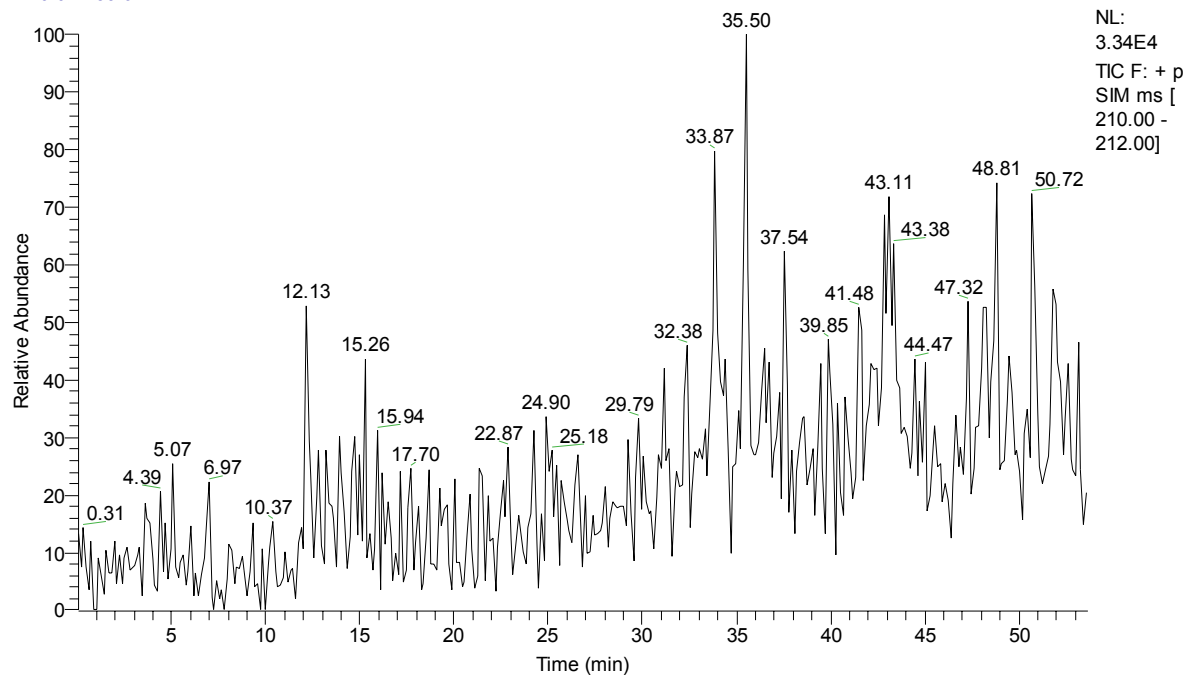


Figure II-2.4 : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (211 uma)

**II-2.5** Le tryptophole **13** a été détecté à un temps de rétention de 29.6 min, en mode SIM positif sur l'ion 162 uma (figure II-2.5).

## Bibliographie

RT: 0.01 - 70.07

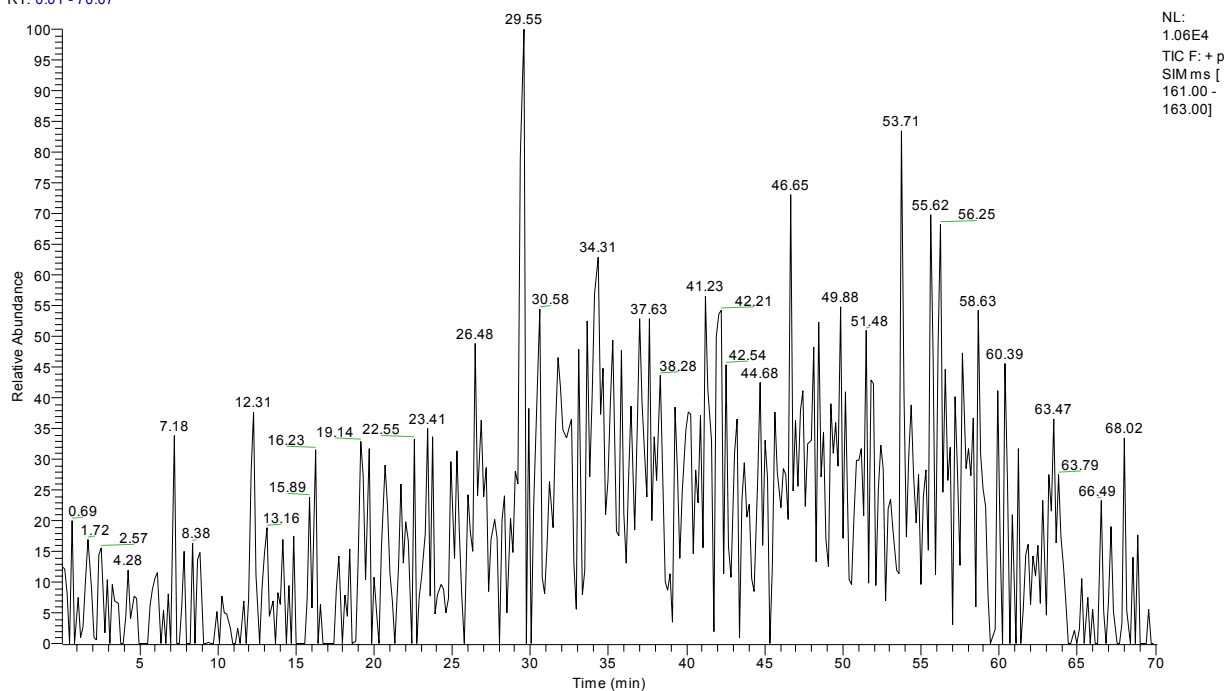


Figure II-2.5 : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (162 uma)

**II-2.6** La scytalone **16** a été retrouvée dans l'extrait brut à un temps de rétention égal à 23.3 min, en mode positif SIM ms [190-196], (figure II-2.6).

RT: 0.00 - 70.02

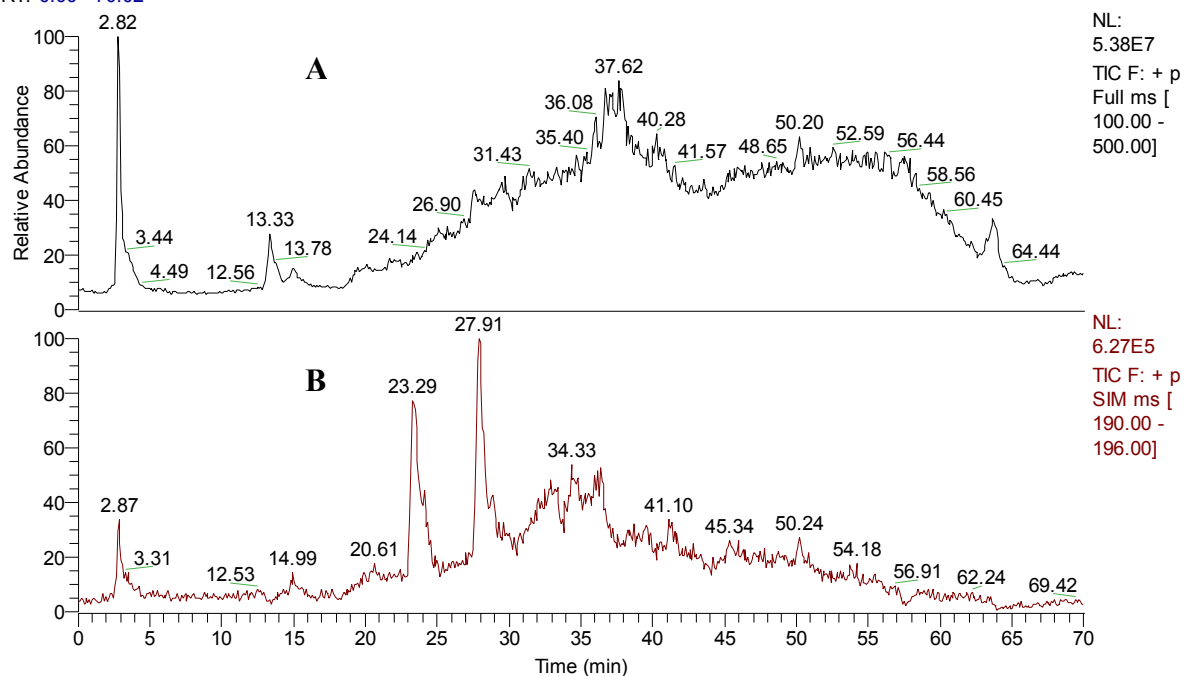
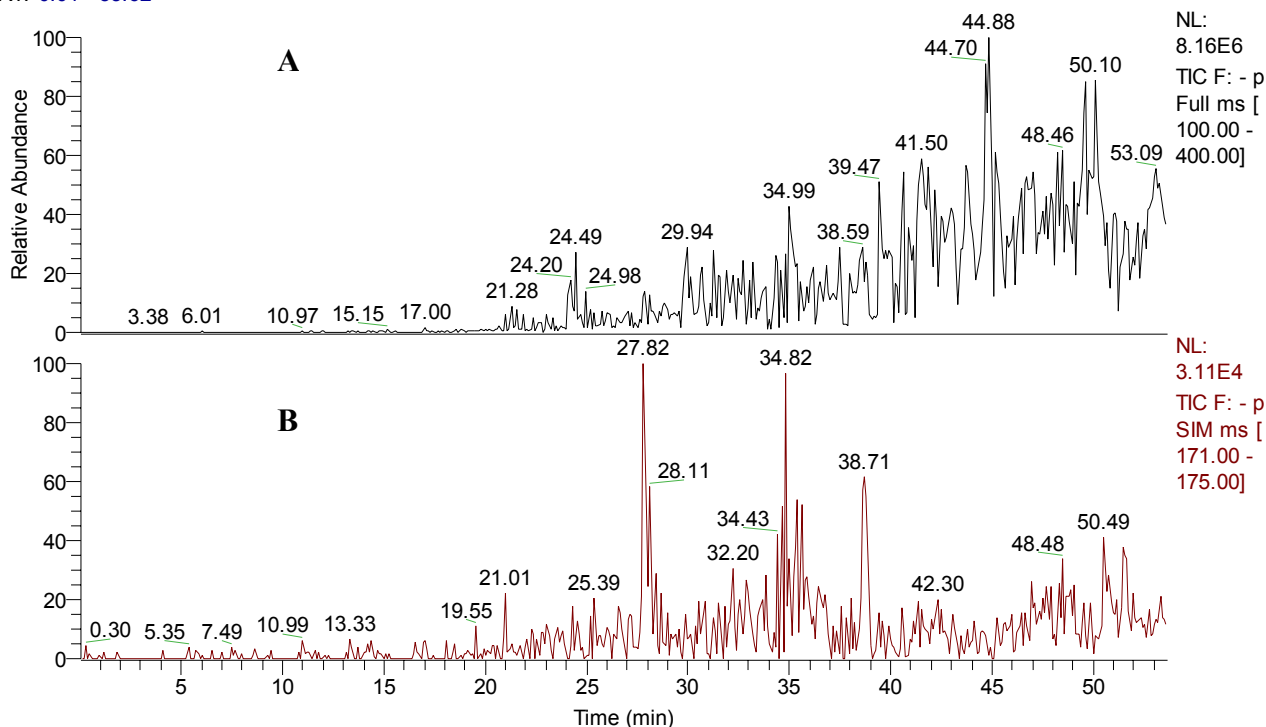


Figure II-2.6 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (195 uma)

## Bibliographie

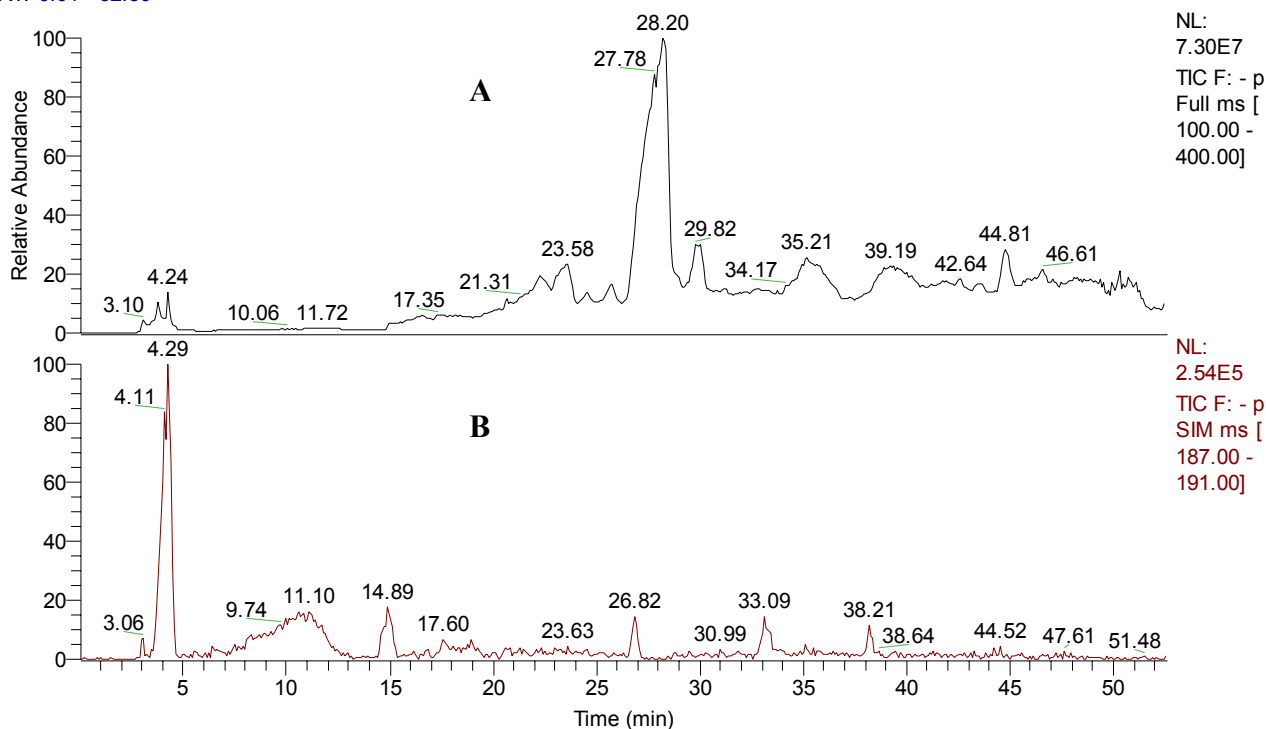
**II-2.7** Le métabolite **6** a été détecté dans la fraction acétate d'éthyle, en mode SIM négatif sur l'ion 173 uma. Le temps de rétention de la juglone est de 38.7 min (figure II-2.7).

RT: 0.01 - 53.62



**II-2.8** Avec une plage de rétention de 10-11 min, la présence dans la fraction la plus polaire de la 2-hydroxyjuglone **22** a été confirmée dans le brut, en mode négatif SIM ms (189), (figure II-2.8).

RT: 0.01 - 52.59



## Bibliographie

Figure II-2.8 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (189 uma)

**II-2.9** Dans la fraction acétone, la 3-hydroxyjuglone **23** a été détecté à un temps de rétention de 26.9 min en mode négatif SIM sur l'ion 189 uma (figure II-2.9).

RT: 0.01 - 49.43

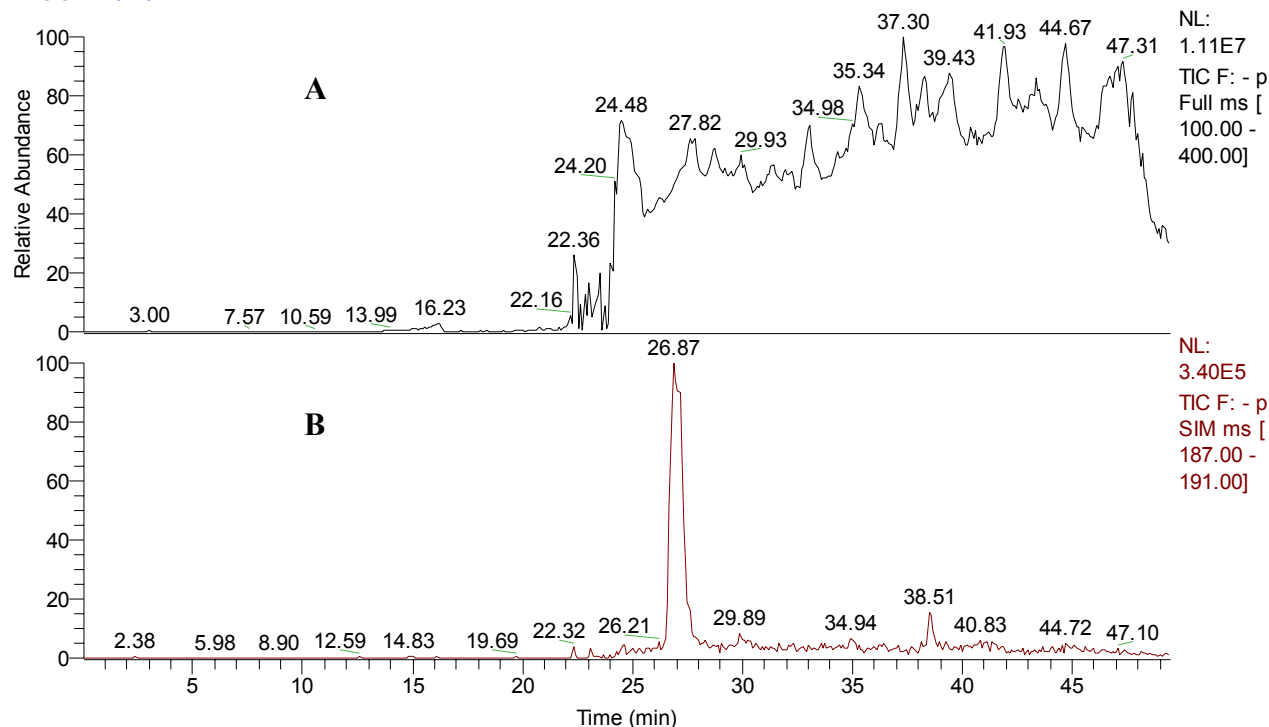


Figure II-2.9 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (189 uma)

### Recherche dans le bois sain

Le bois sain mis en copeaux et en sciure est extrait avec de l'éther. Six fractions sont récoltées pendant la chromatographie de l'extrait brut. Les expériences effectuées en LC/ESI-MS permettent de d'identifier quatre métabolites (figure III).

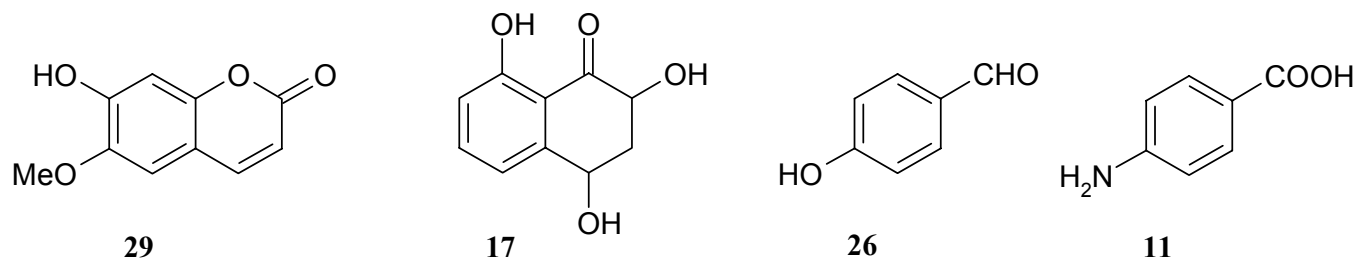


Figure III : Métabolites détectés dans le bois sain

## Bibliographie

**III-1** La scopolétine **29** a été retrouvée dans plusieurs fractions, avec des temps de rétention de 28.2, 28.5, 28.6 et 28 min. Les recherches ont été effectuées en mode SIM positif sur l'ion 193 uma (figures III-1).

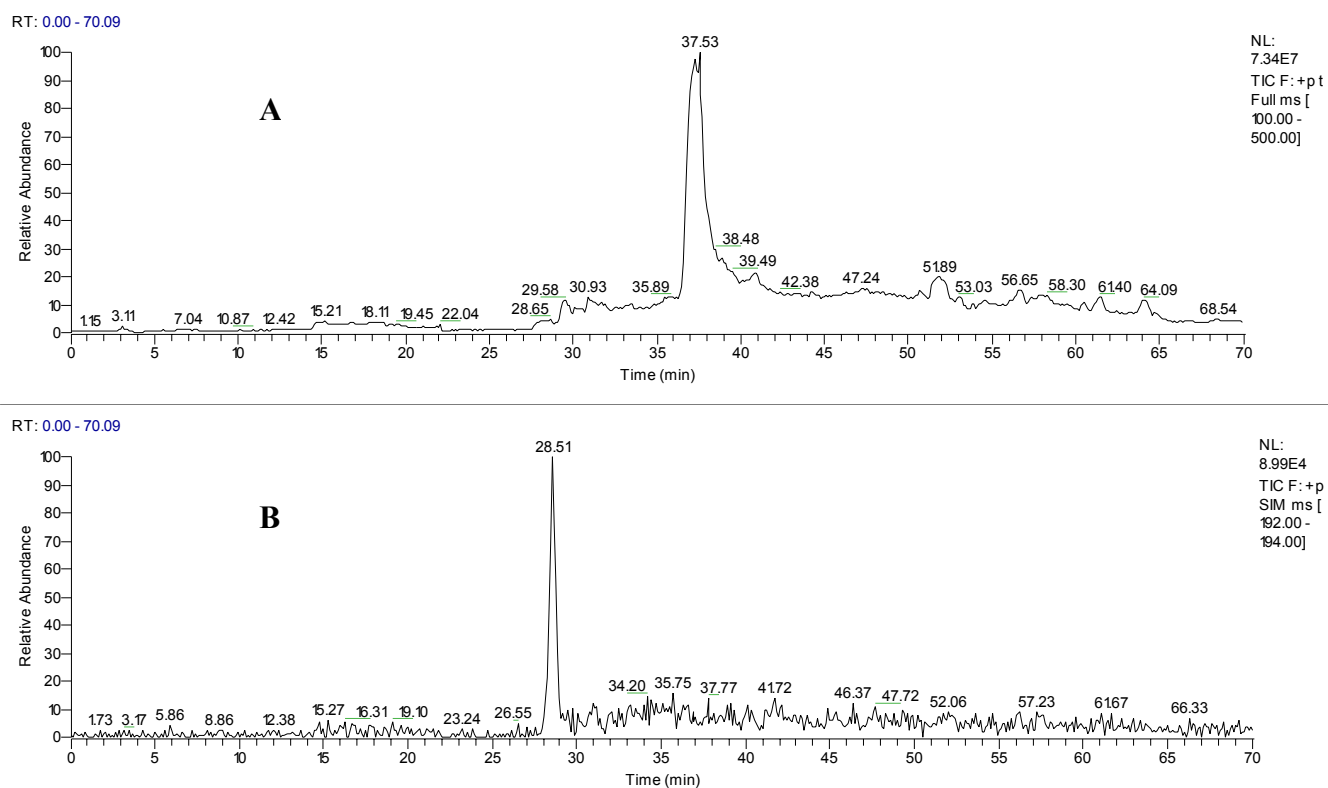
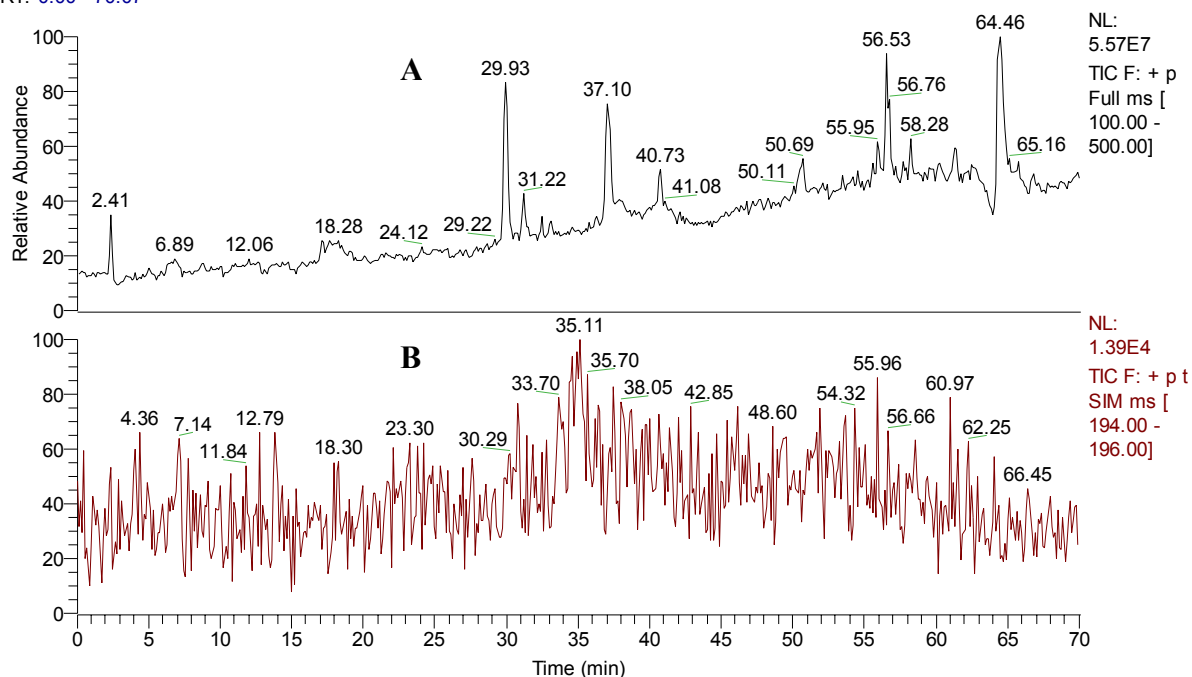


Figure III-1 : A : Chromatogramme du courant ionique total d'une des fractions  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (193 uma)

**III-2** A un temps de rétention de 35.1 min, la présence du métabolite **17** a été confirmée dans l'extrait brut de bois sain en mode SIM positif sur l'ion 195 uma (figure III-2).

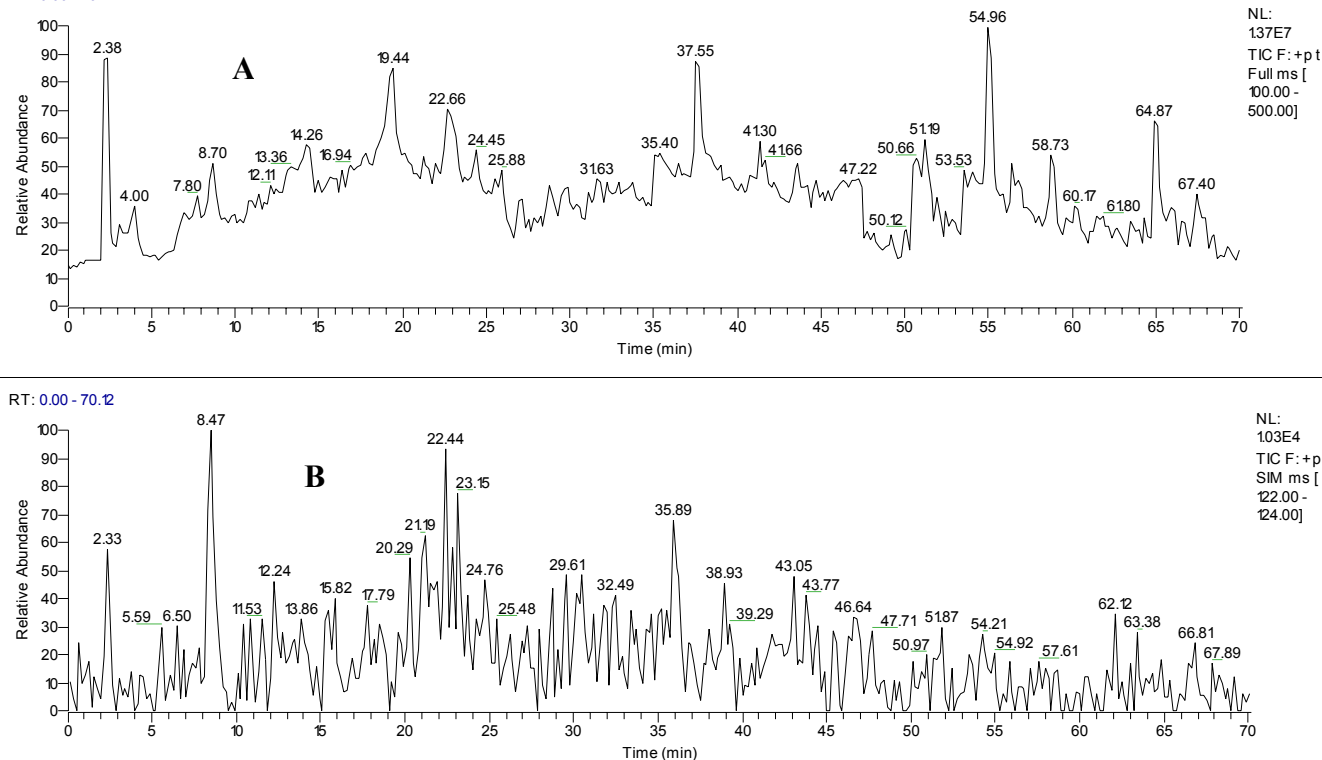
## Bibliographie

RT: 0.00 - 70.07



**III-3** Le 4-hydroxybenzaldéhyde **26** a été identifié dans l'extrait brut. Le temps de rétention est égal à 22.4 min. Les expériences sont réalisées en mode SIM positif sur l'ion 123 uma (figure III-3).

RT: 0.00 - 70.12



## Bibliographie

**III-4** A un temps de rétention de 3.9 min, la présence l'acide p-aminobenzoïque **11** a été confirmée, en mode SIM sur l'ion 136 uma (figure III-4).

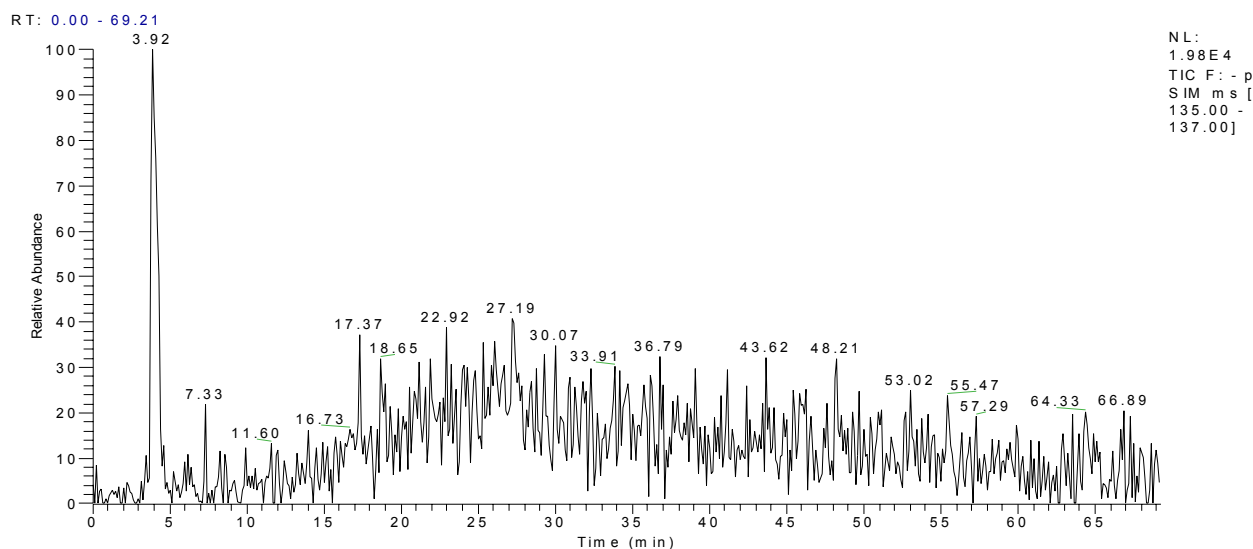


Figure III-4 : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (136 uma)

## Recherche dans les feuilles saines

L'extraction du matériel végétal est réalisée avec de l'éther, après passage sur la colonne de silice six fractions sont récupérées. La recherche dans les feuilles cueillies sur un arbre sain a abouti à l'identification de trois molécules (figure IV).

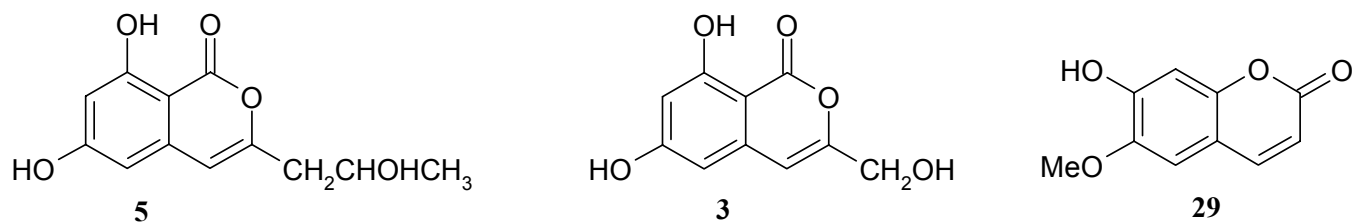


Figure IV : Métabolites détectés dans les feuilles

**IV-1** La (+)-orthosporine **5** a été détectée en mode positif SIM sur l'ion 237 uma, à un temps de rétention égal à 34.9 min (figure IV-1).

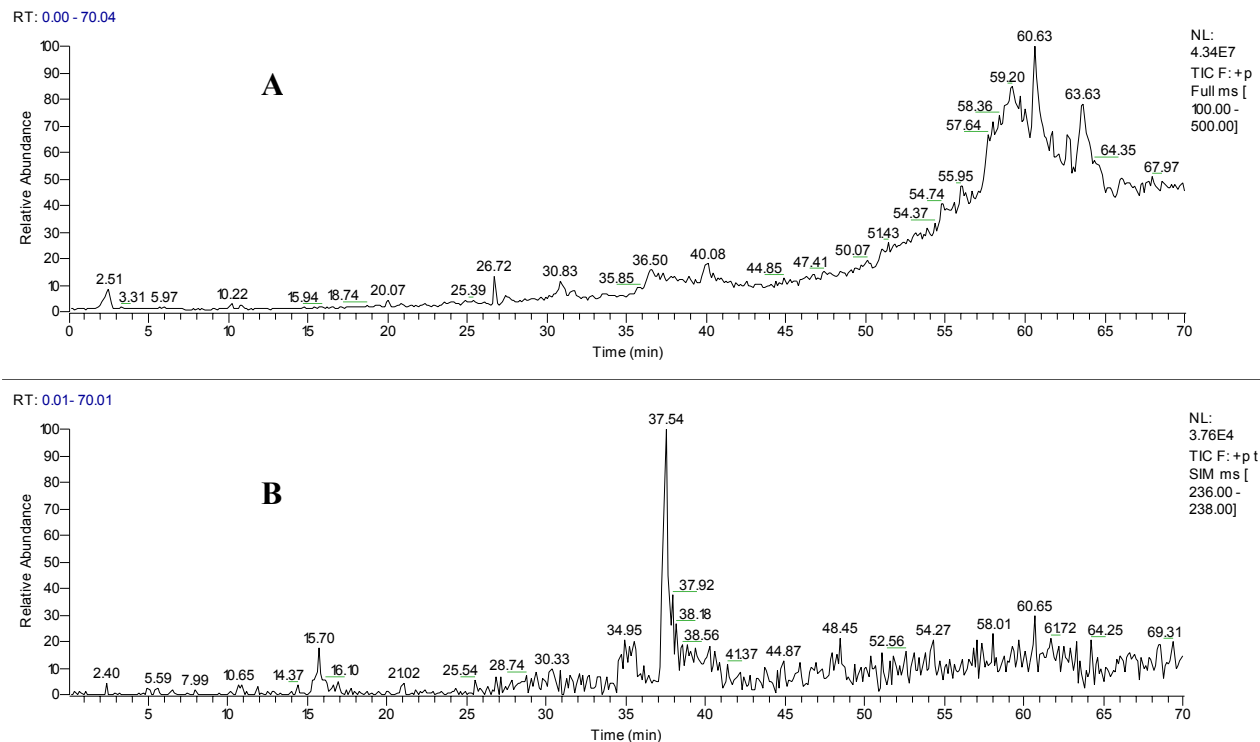


Figure IV-1 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (237 uma)

**IV-2** La 6,8-dihydroxy-3-hydroxyméthyl-isochromen-1-one **3** a été identifiée dans deux fractions différentes. Les temps de rétention sont égaux à 28 et 27.7 min. Les recherches ont été effectuées en mode positif SIM sur l'ion à 209 uma (figures IV-2A et IV-2B).

## Bibliographie

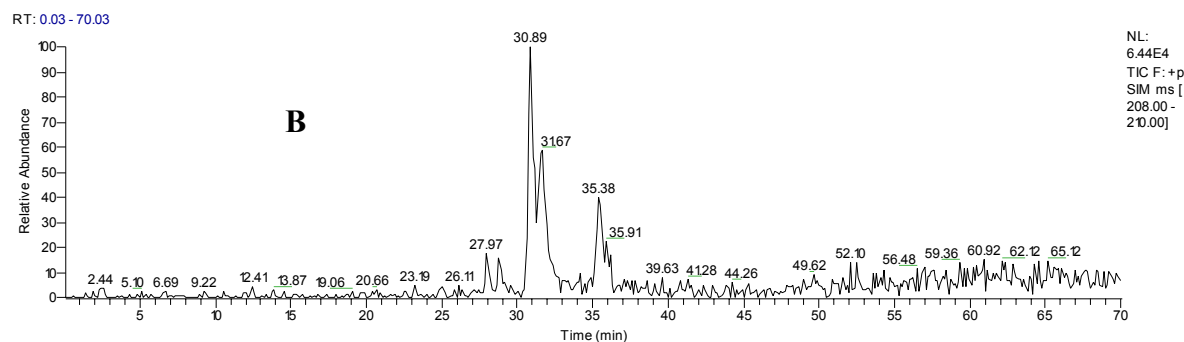
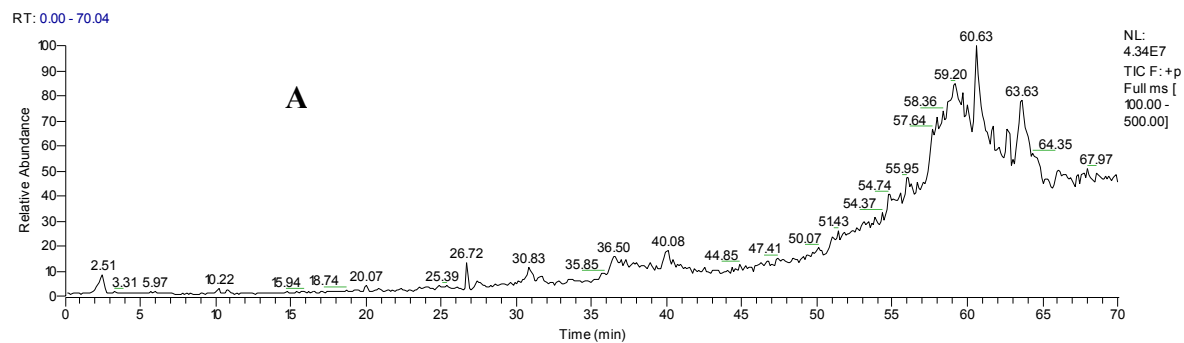


Figure IV-2A : A : Chromatogramme du courant ionique total dans la 1<sup>ère</sup> fraction  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (209 uma)

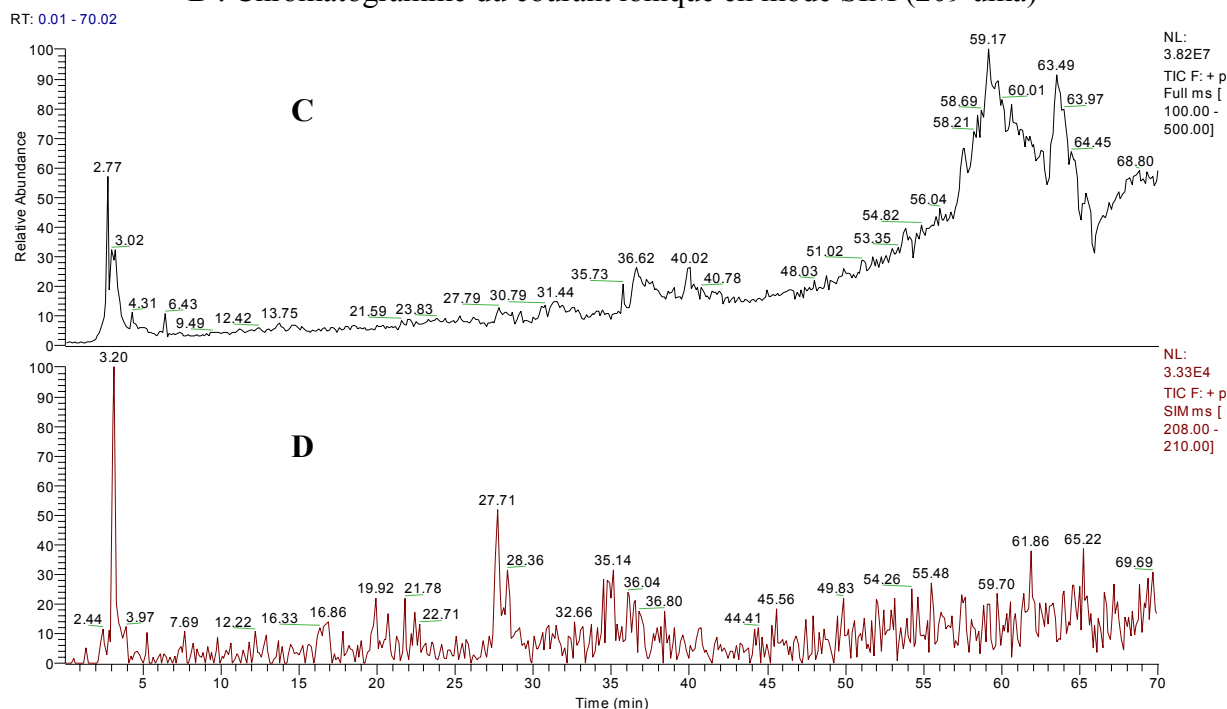
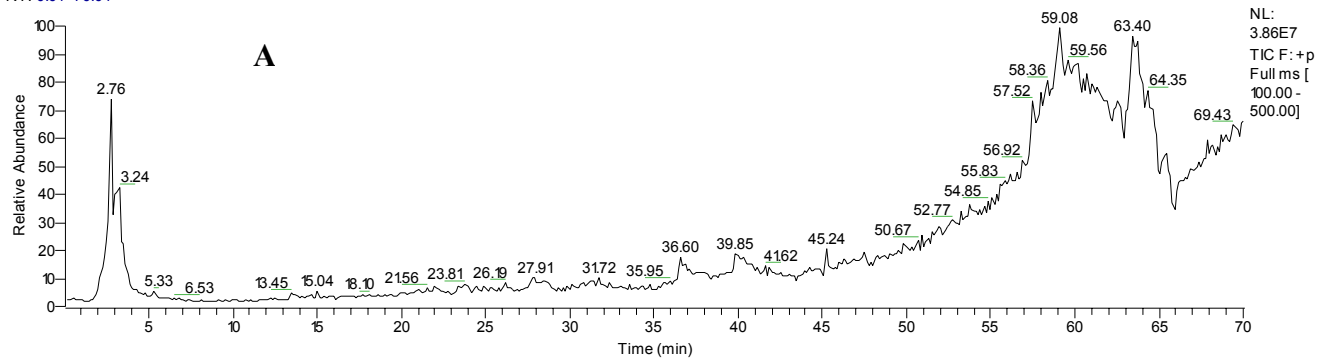


Figure IV-2B : C : Chromatogramme du courant ionique total dans la 2<sup>ème</sup> fraction  
D : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (209 uma)

**IV-3** La scopolétine **29** a été observée dans deux fractions avec le même temps de rétention de 27.7 min, en mode SIM positif sur l'ion 193 uma (figures IV-3A et IV-3B).

## Bibliographie

RT: 0.01 - 70.04



RT: 0.03 - 70.03

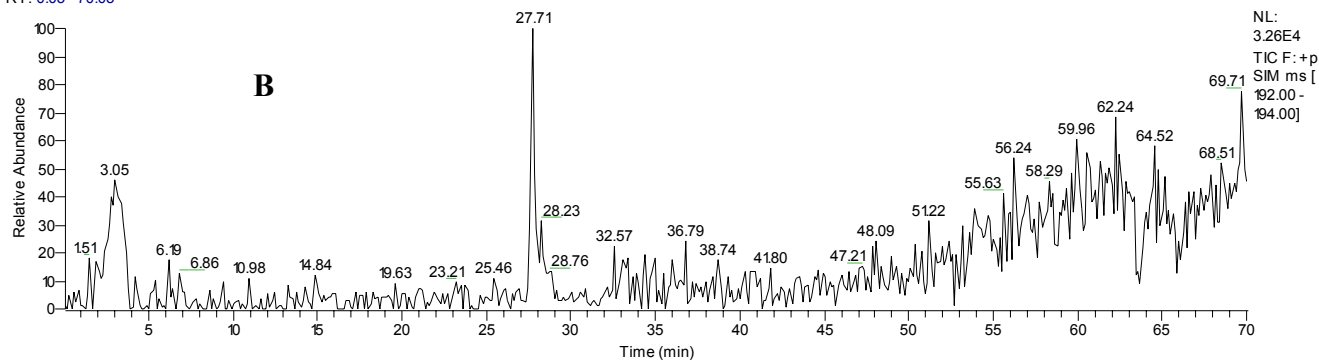
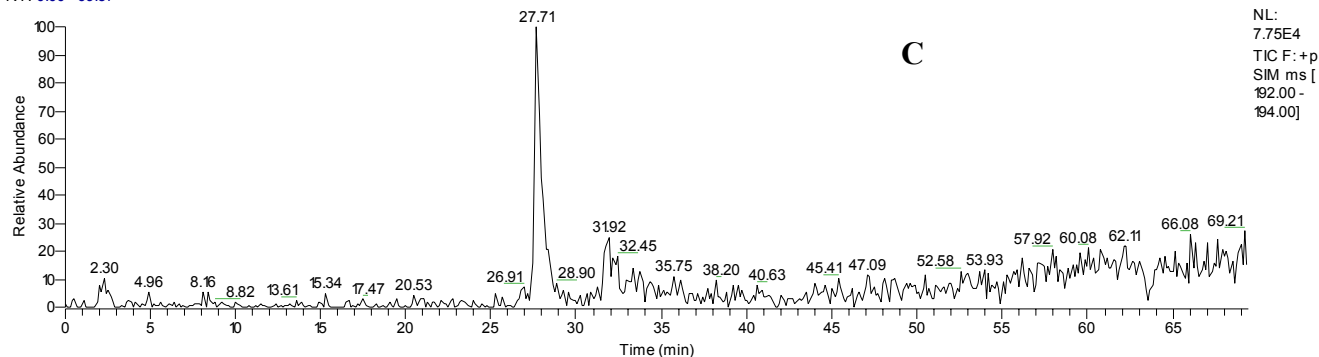


Figure IV-3A : A : Chromatogramme du courant ionique total de la 1<sup>ère</sup> fraction  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (193 uma)

RT: 0.00 - 69.37



S#: 836 RT: 27.78 AV: 1 NL: 1.80E4

F: + p Full ms [ 100.00 - 500.00]

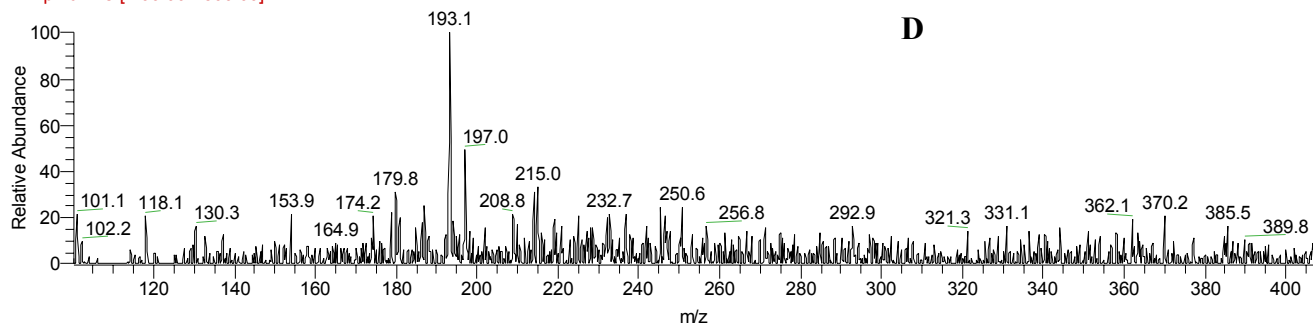


Figure IV-3B : C : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (193 uma) 2<sup>ème</sup> fraction

D : Spectre Full MS à RT = 27.8 min, [ M + H ]<sup>+</sup>

*Recherche dans la sève saine*

L'extraction de la sève élaborée est effectuée avec de l'éther à pH = 6, valeur initiale du matériel végétal. Le brut de la sève est ensuite traité avec de la soude jusqu'à un pH = 10 et extrait avec de l'acétate d'éthyle. Pour chaque valeur de pH, deux fractions sont récupérées et cinq molécules ont été identifiées (figure V).

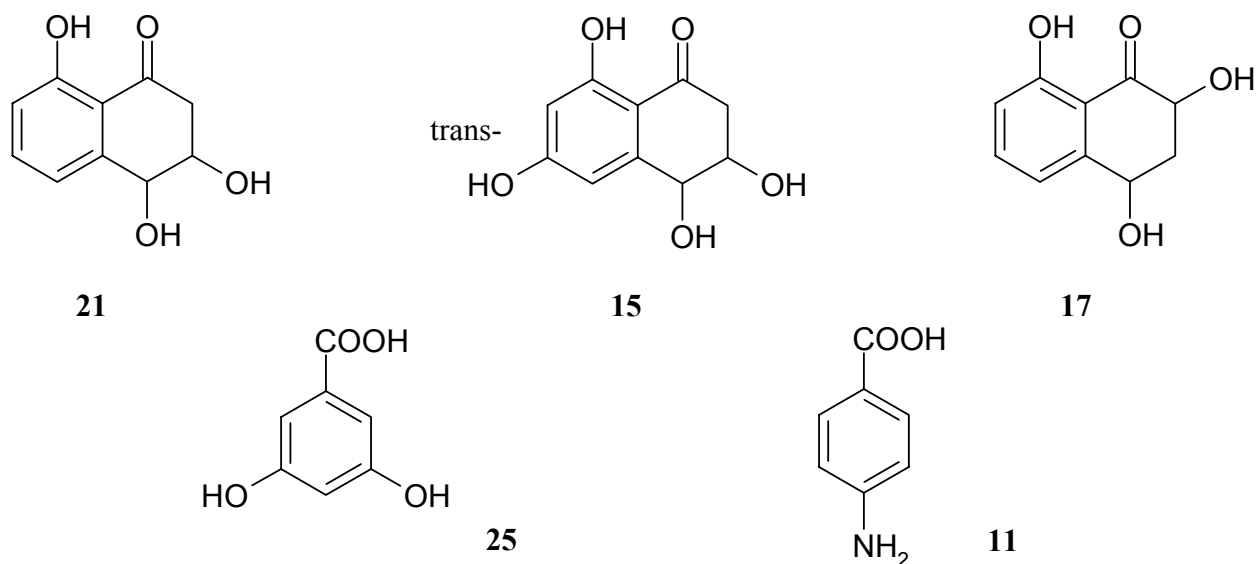
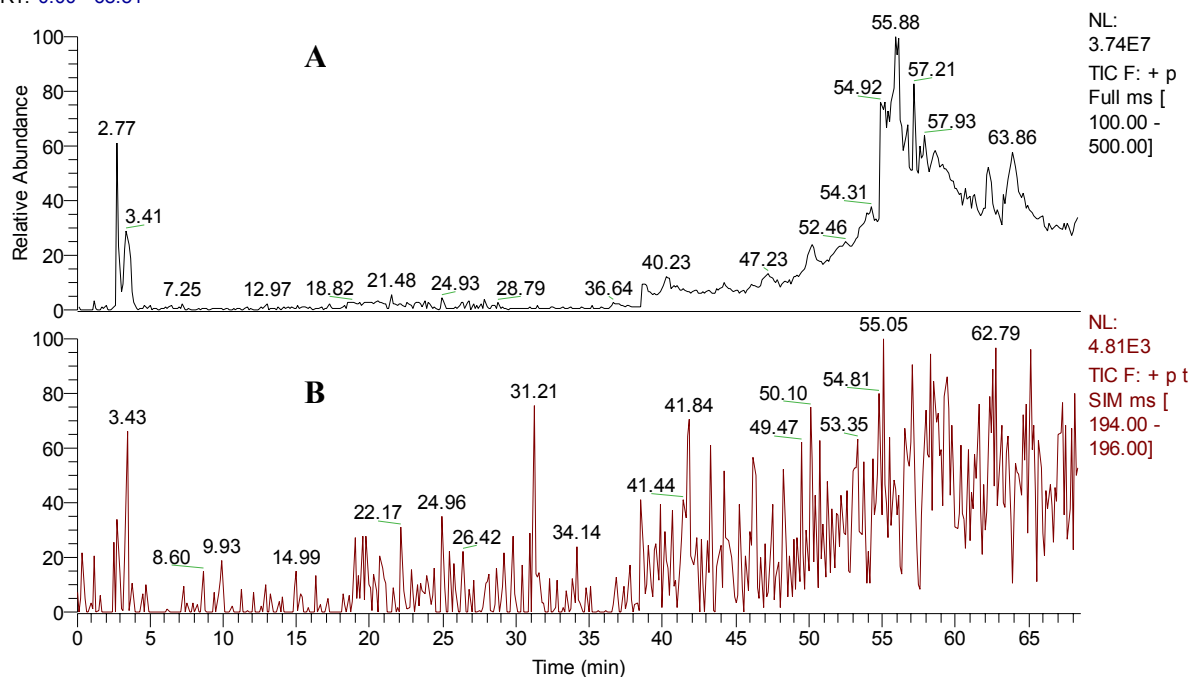


Figure V : Métabolites détectés dans la sève

**V-1** Le 1(2H)-3,4-dihydro-3,4,8-trihydroxynaphthalénone **21** a été observé dans les deux fractions à pH acide. Les temps de rétention sont 31.8 et 31.2 min. La recherche est réalisée en mode positif SIM sur l'ion 195 uma (figure V-1).

## Bibliographie

RT: 0.00 - 68.51



**V-2** La trans 1(2H) 3,4-dihydro-3,4,6,8-tétrahydroxynaphthalénone **15** a été caractérisée dans la 1<sup>er</sup> fraction à pH acide, en mode SIM positif sur l'ion 211 uma à un temps de rétention de 34.4 min (figure V-2).

RT: 0.00 - 70.02

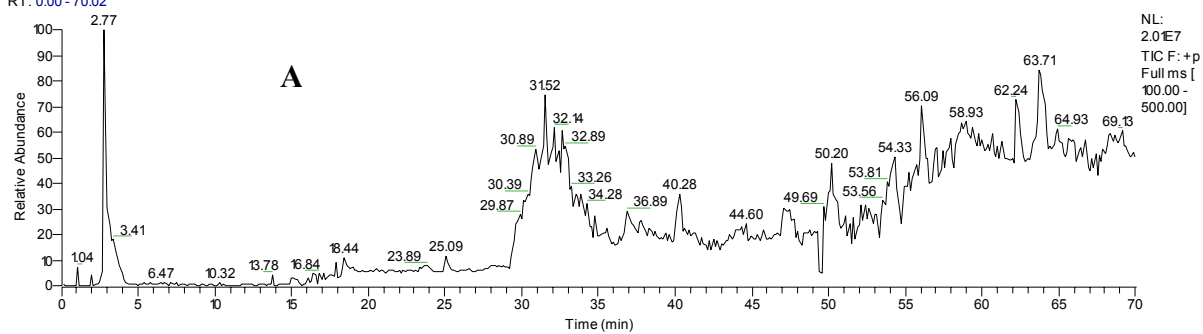


Figure V-2 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (211 uma)

## Bibliographie

**V-3** Egalement dans la 1<sup>er</sup> fraction à pH acide, l'acide 4-aminobenzoïque **11** a été identifié en mode positif SIM sur l'ion 138 uma, à un temps de rétention égal à 3.9 min (figure V-3).

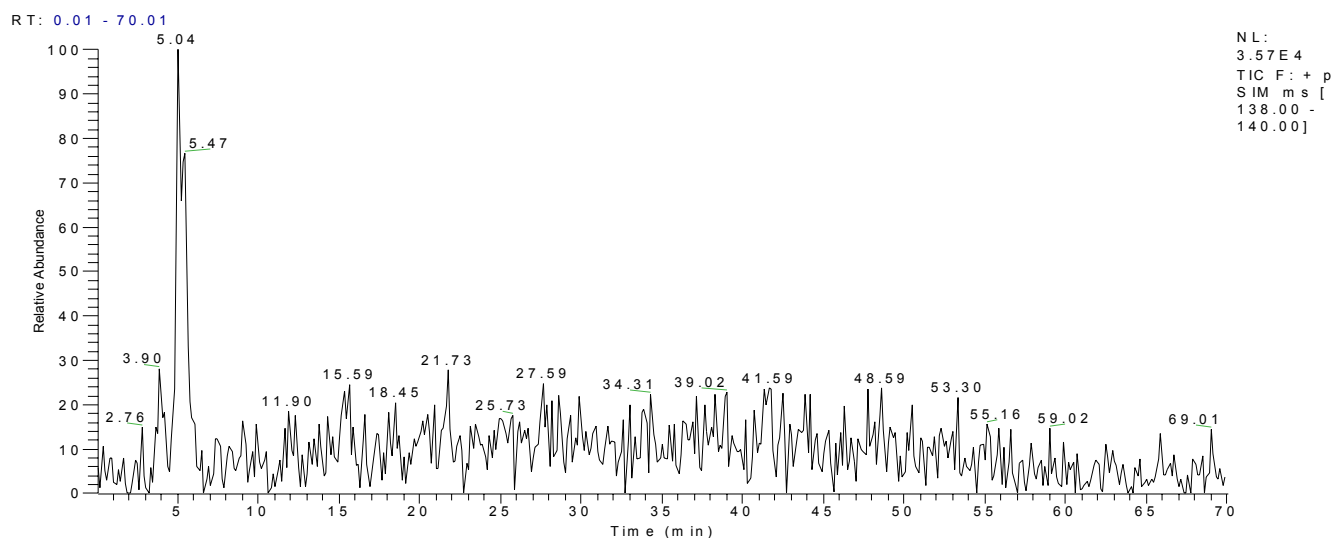


Figure V-3 : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (138 uma)

**V-4** Le métabolite **17** a été retrouvé dans la 2<sup>ème</sup> fraction à pH basique à un temps de rétention de 35.5 min, en mode SIM positif sur l'ion 195 uma (figure V-4).

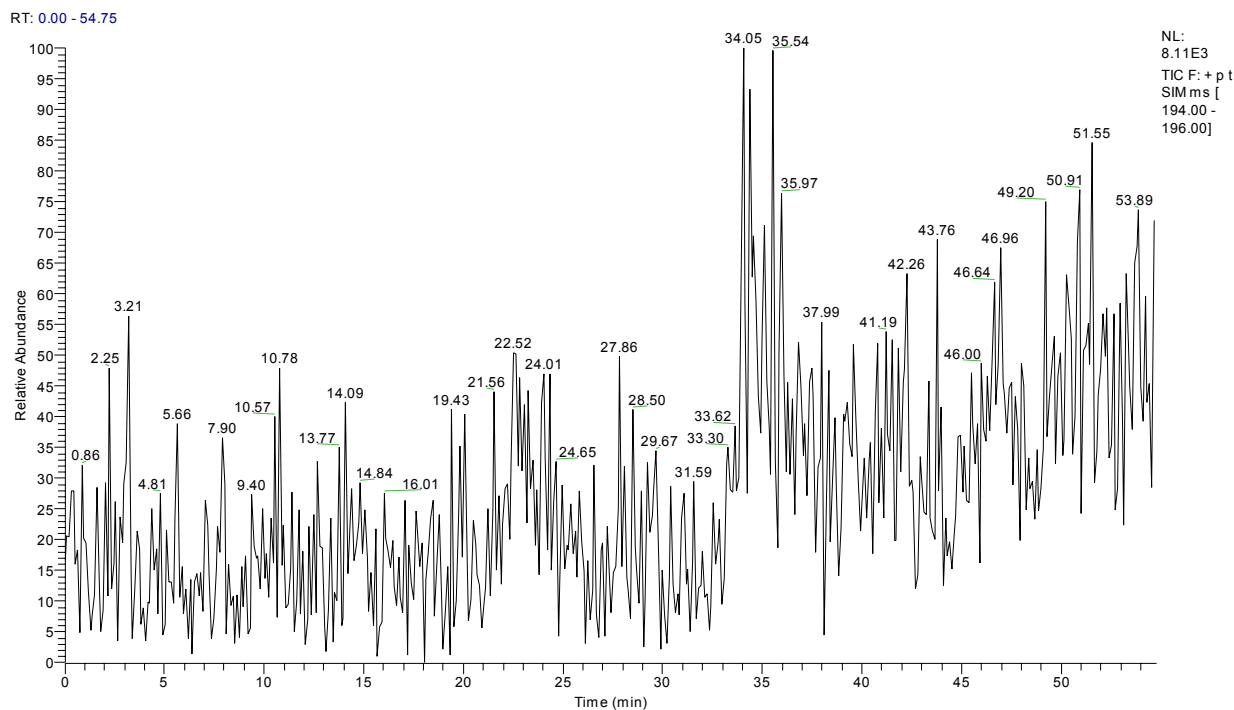


Figure V-4 : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (194 uma)

## Bibliographie

**V-5** La présence de l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque **25** a été décelée en mode négatif SIM ms (153 uma), dans la 1<sup>ère</sup> fraction à pH = 6, à un temps de rétention de 3.5 min (figure V-5).

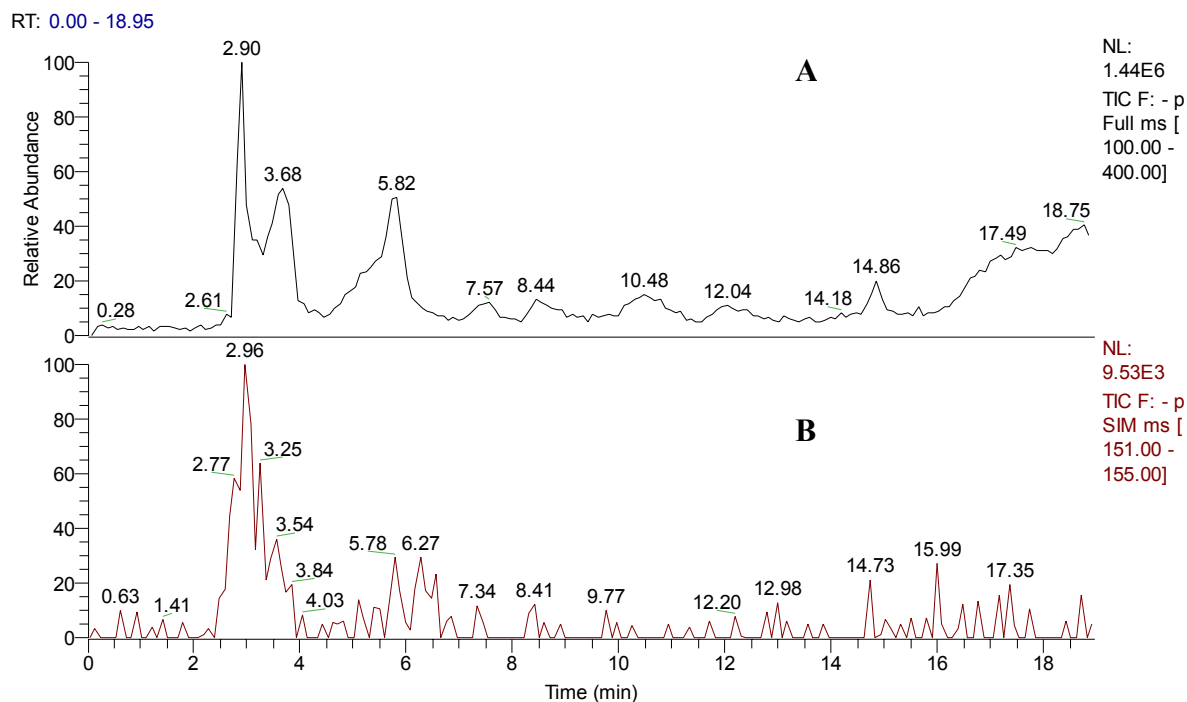


Figure V-5 : A : Chromatogramme du courant ionique total  
B : Chromatogramme du courant ionique en mode SIM (153 uma)

## *Récapitulatif des résultats*

Dans les deux extraits brut du bois malade, treize métabolites différents ont été identifiés. En ce qui concerne les parties saines de l'arbre, le nombre de composés détectés est de quatre dans le bois, de trois dans les feuilles et de cinq dans la sève.

- Métabolites présents uniquement dans les extraits bruts de bois malade  
Neuf composés : 1, 6, 12, 13, 16, 19, 22, 23 et 30.
- Métabolites présents dans le bois malade et le matériel végétal sain  
Quatre composés : 5, 15, 17 et 29.
- Métabolites présents dans le matériel végétal sain  
Quatre composés : 3, 11, 21, 25 et 26.

*CHAPITRE VI :*  
*ETUDE DU MATERIEL VEGETAL*  
*DU PLATANE*



*Feuille de Platane*

## V. Introduction

N. Burki a isolé et identifié treize molécules durant son travail de thèse [89] sur la maladie du platane. Les recherches effectuées dans ce chapitre portent sur l'étude du matériel végétal du bois de platane (infecté, sain) dans le but de confirmer la présence des phytotoxines isolées précédemment.

Dans un second temps, il s'agit de trouver des analogies entre les deux espèces pathogènes de *O. novo-ulmi* (anciennement *Ceratocystis*) et *C. fimbriata* sp. *platani*, responsables respectivement de la maladie de l'orme et du platane.

### Le chancre du platane

Le platane est implanté en Europe depuis quatre siècles. Il est très apprécié pour son esthétisme et sa résistance à la pollution en fait un candidat idéal pour l'ornement des villes.

On dénombre dix espèces de platane : *P. chiapensis*, *P. terrii*, *P. lindeniana*, *P. mexicana*, *P. oaxacana*, *P. racemosa*, *P. wrightii*, ainsi que le *P. occidentalis*, le *P. orientalis*, et le *P. acerifolia* qui sont les trois variétés principales.

La maladie, nommée le chancre coloré du platane, est d'origine fongique. L'agent pathogène est le *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani* ([19,141,142], famille des ascomycètes). Elle est apparue dans les années trente aux Etats-Unis, puis dès le début de 1970 dans une partie de l'Europe (Italie, France [143,144], Espagne, Belgique, Turquie). En 1986, la maladie est signalée en Suisse dans le sud du Tessin.

La symptomatologie du platane malade [145,146,147,148] se traduit par une nécrose de l'écorce qui vire au brun-rouge (figure I-1) et se crevasse profondément. Les nouvelles branches naissantes dépérissent, le feuillage jaunit puis flétrit. La maladie progresse uniquement durant les mois d'été. L'arbre meurt au bout de trois à cinq ans après contamination.



Figure I-1 : Nécrose d'un tronc de platane malade

## Bibliographie

### Métabolites fongiques

Les métabolites ont été isolés d'une souche de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*, provenant du Tessin (Suisse). Le champignon est régulièrement repiqué sur boîte de pétri dans un milieu malt extract-agar 2%.

Le milieu de culture liquide est le suivant :

Glucose	100 g	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.5 g
L-asparagine	5 g	sol. oligoéléments	1 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.5 g	eau distillée	5 l

La solution d'oligoéléments contient pour 1 l d'eau distillée additionnée d'une goutte d'acide sulfurique concentré : 0.4 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.45 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.025 g MnSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O et 0.025 g CuSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O.

Après quatre semaines, temps optimum pour les cultures, le mycélium est séparé de la phase aqueuse par centrifugation puis par filtration sur célite. Les extraits bruts (figure I-2A) sont obtenus par extraction avec l'acétate d'éthyle à pH = 5 et à pH basique.

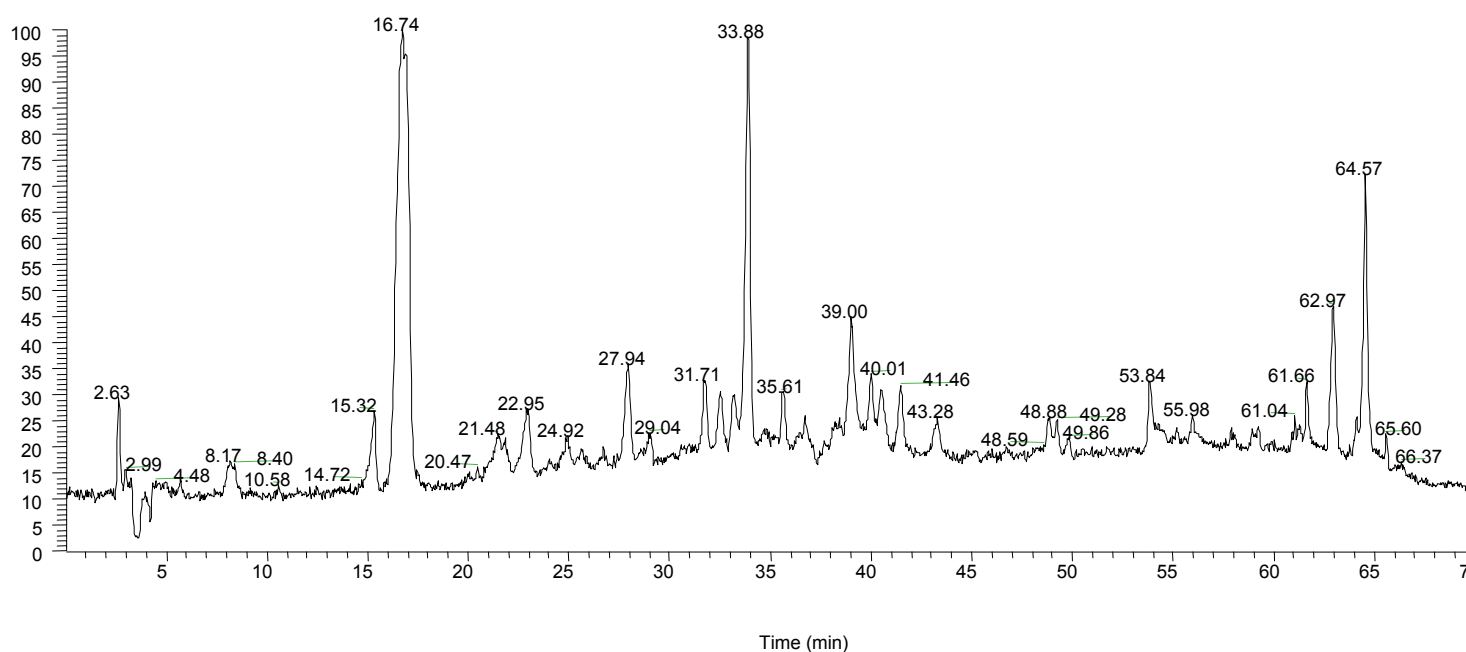


Figure I-2A : Chromatogramme d'un extrait brut à pH = 5

Les différents bruts sont fractionnés par chromatographie sur silice avec un gradient de solvants méthanol/hexane. Les fractions obtenues sont purifiées par chromatographie sur phase inverse RP-C18 (gradient eau / méthanol), par chromatographie sur silice ou sur couche mince.

Du milieu de culture fongique, 13 molécules ont été isolées et identifiées [89,149,150] (figure I-2B).

## Bibliographie

Une protéine a été également isolée en 1992 d'une culture de *Ceratocystis fimbriata*, appelée fimbriatan. Puis en 1999, une autre protéine phytotoxique est découverte. Elle est nommée cerato-platanin, par similitude avec la cerato-ulmine (protéine de l'orme) [151,152].

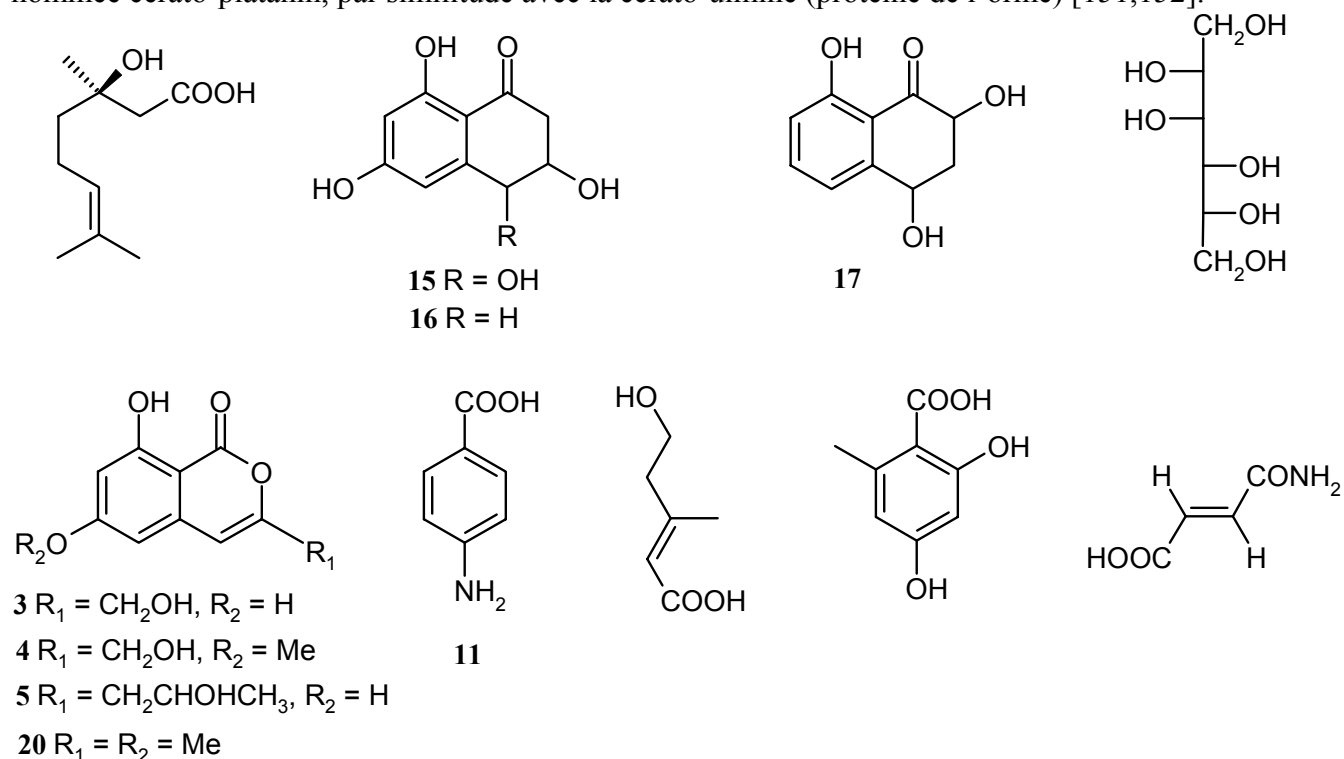


Figure I-2B : Métabolites fongiques isolés de *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani* [89]

## Tests de toxicité

Les métabolites ont été soumis à des tests sur des feuilles de platane afin de déterminer leur activité toxique. Les produits sont dissouts dans une solution aqueuse d'eau distillée à 2% d'éthanol. Les feuilles fraîchement cueillies sont plongées dans ces solutions, après avoir été découpées en carré de 1 cm de coté. Les symptômes sont répertoriés au cours du temps. Huit composés se révèlent actifs : **15** cis, **17** cis et trans, **16**, **3**, **4**, **5** et **11**, pour des concentrations allant de 1 à 0.5 mg.L<sup>-1</sup>.

Les molécules **4** et **5** provoquent un faible brunissement de la tige de la feuille alors que **15** cis et **3** entraînent un brunissement important. La scytalone **16** induit un flétrissement puis une nécrose de la feuille. Les deux composés apparaissant comme les plus toxiques pour les feuilles de platane sont **17** et **11**. La naphthalénone **17** (cis et trans) engendre une nécrose brune sur la feuille (figure I-3).

L'acide p-aminobenzoïque occasionne une nécrose de la tige et de la feuille.

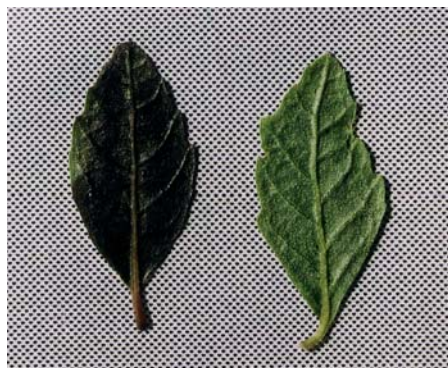


Figure I-3 : Tests de la feuille pour le composé 17  
Gauche = échantillon, Droite = témoin (2 % éthanol)

La 3-hydroxyjuglone s'avère être la substance la plus toxique. Elle ne provient pas directement des extraits bruts fongiques mais de la dégradation oxydative de 1(2H) 3,4-dihydro-2,4,8-trihydroxynaphtalénone 17. Cette dégradation spontanée est constatée naturellement en solution lorsque le pH est supérieur à 5.

### *Recherche en LC-MS<sup>n</sup> dans le matériel végétal*

#### **Préparation des échantillons**

Les différents types de bois sont extraits en continu avec un soxlet pendant une journée dans l'acétone, l'éther. Les extraits bruts obtenus sont très complexes. Afin d'optimiser la recherche en LC/MS<sup>n</sup>, les extraits sont fractionnés sur une colonne de silice avec un éluant hexane/EtOAc/AcOH 1%. Les expériences sont d'abord effectuées sur les fractions, puis dans un second temps sur les extraits bruts.

#### **Méthode**

La technique d'analyse employée fait appel à la chromatographie liquide couplée avec un spectromètre de masse à trappe ionique (LCQ Finnigan).

Le programme HPLC utilisé est le suivant :

Temps (min)	H <sub>2</sub> O (%)	MeOH (%)
5	90	10
35	40	60
40	40	60
60	0	100
70	0	100

Le débit de l'éluant est de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La quantité injectée est de 20 µL. Les analyses s'effectuent sur une colonne phase inverse RP-C18. Pour obtenir un flux de 100 µL.min<sup>-1</sup> à l'entrée de la source électrospray ou APCI, un split post-colonne de 10 % est réalisé entre

## Bibliographie

l'appareil HPLC et le spectromètre de masse permettant ainsi une augmentation de la sensibilité.

## Matériel végétal

Le matériel végétal provient de Forte dei Marmi, en Italie. Un platane, *Platanus orientalis*, a été artificiellement contaminé en janvier 1995 par l'injection de spores sous l'écorce. Deux types de bois infectés se différencient :

➤ Malato : L'extrait malato (figure II-1A) correspond au bois le plus infecté par le champignon. Ce sont les parties encore vivantes de l'arbre colonisé par le parasite. Le bois nécrosé a un aspect noirâtre.

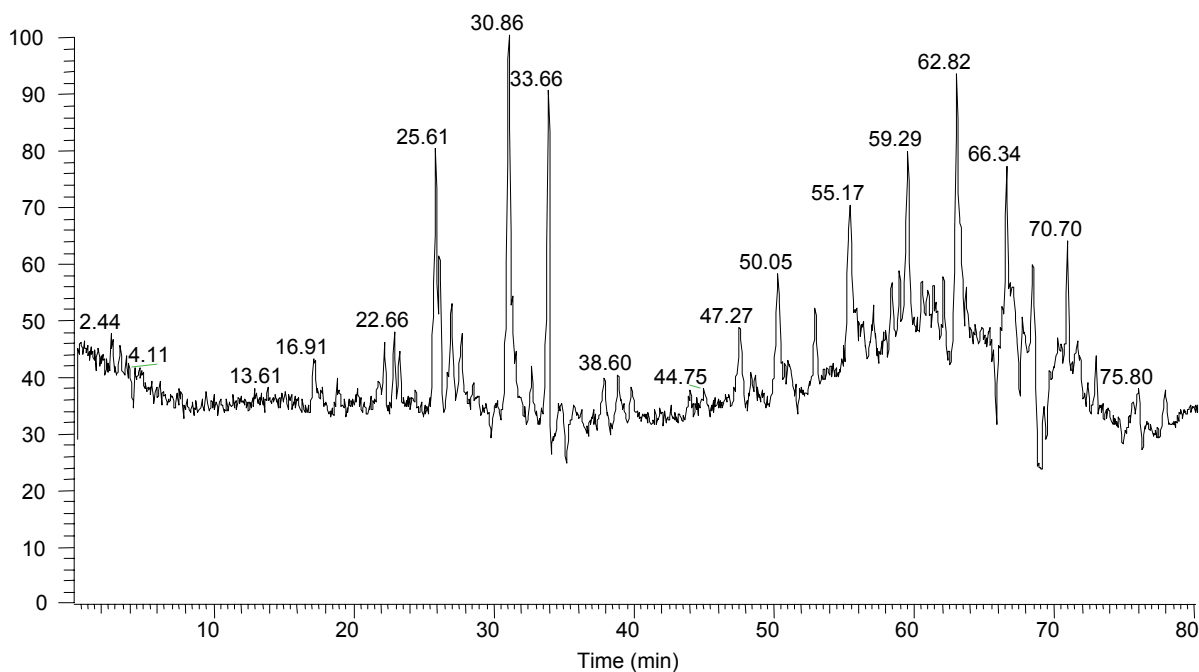


Figure II-1A: Chromatogramme de l'extrait brut malato

➤ Pianta malata : L'extrait pianta malata (figure II-1B) sont les parties saines et vivantes de l'arbre malade situées plus en amont du front de progression du champignon. Ce matériel végétal permet d'observer la diffusion des toxines au sein du platane et la formation de substances de défense.

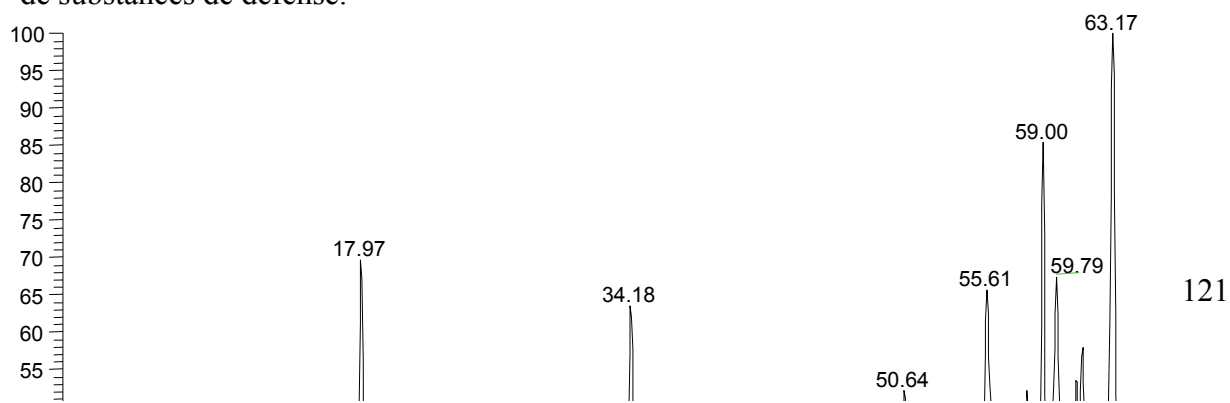


Figure II-1B : Chromatogramme de l'extrait brut pianta malata  
Le bois sain, nommé sano (figure II-1C) servira de témoin dans la recherche en LC/MS<sup>n</sup> des métabolites fongiques.

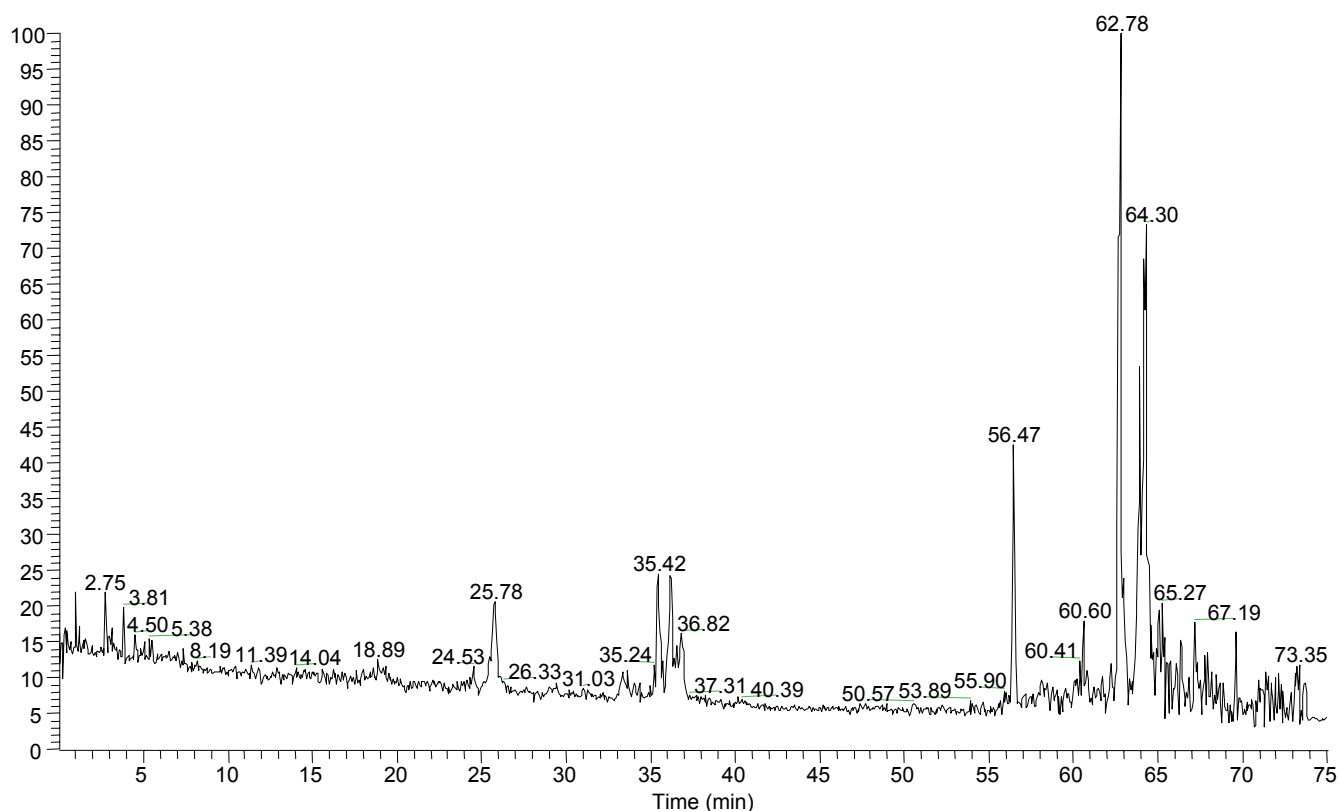
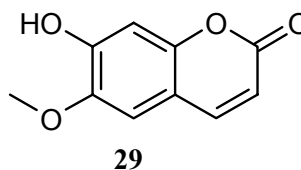
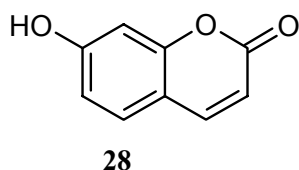


Figure II-1C : Chromatogramme de l'extrait brut sano

## Recherche en LC/MS<sup>n</sup>

## Bibliographie

Les expériences ont été réalisées pour les composés : **4**, **17** (cis, trans), **20** et sur deux phytoalexines : l'umbélliférone **28** et la scopolétine **29** [153,154,155].



Pour chaque métabolite, les temps de rétention et les ions fils sont répertoriés dans le tableau suivant :

Molécules	Temps de rétention (min)	Masse (uma)	Fragmentations (uma)
<b>4</b>	33.9	222	189
<b>17 trans</b>		194	-----
<b>17 cis</b>	29.3	194	175, 165, 149
	47.5	206	
<b>28</b>	26.3		133
<b>29</b>	28.9		165, 149, 133

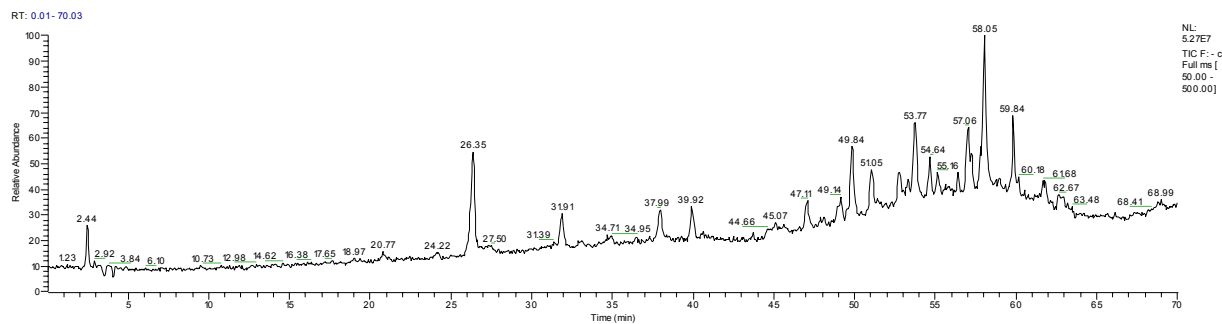
Les recherches s'avèrent difficiles à cause de la matrice complexe et de la présence des composés à l'état de traces. L'utilisation du mode SIM est indiquée puisqu'il permet un accroissement de la sélectivité pour une masse donnée par rapport au mode Full ms qui balaye une gamme de masse beaucoup plus large. Seront utilisées pour les expériences les modes Full ms, SIM et SRM. Ce dernier permet la vérification des fragments par rapport à la référence.

### ***Bois malade : Malato***

Dans l'extrait brut malato, tous les composés ont été détectés. La présence de la 2-hydroxyjuglone et de la 3-hydroxyjuglone dans le bois infecté a pu être mise en évidence.

**II-4.1.1** L'umbélliférone **28** a été décelée en mode Full ms négatif  $[M - H]^-$ , et en mode SRM  $ms^2$  (161 uma) à un temps de rétention de 26.3 min (figures II-4.1.1A, II-4.1.1B). Elle est présente dans les fractions moyennement polaires de l'extrait brut.

## Bibliographie



S#: 1312 RT: 26.35 AV: 1 NL: 1.64E7  
F: - c Full ms [ 50.00 - 500.00]

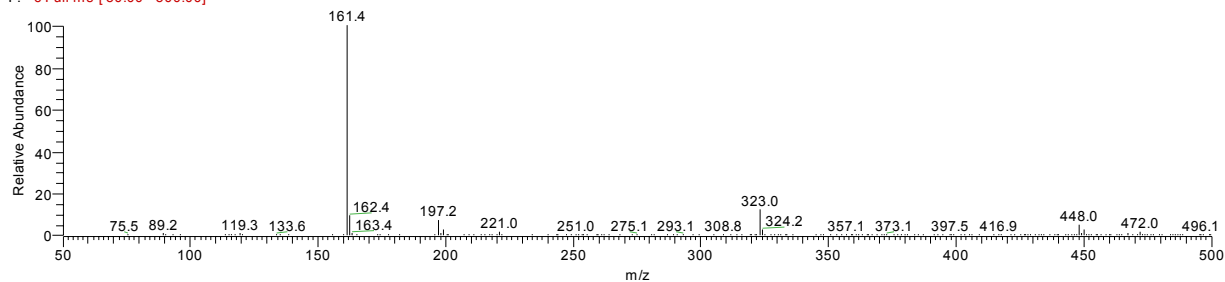
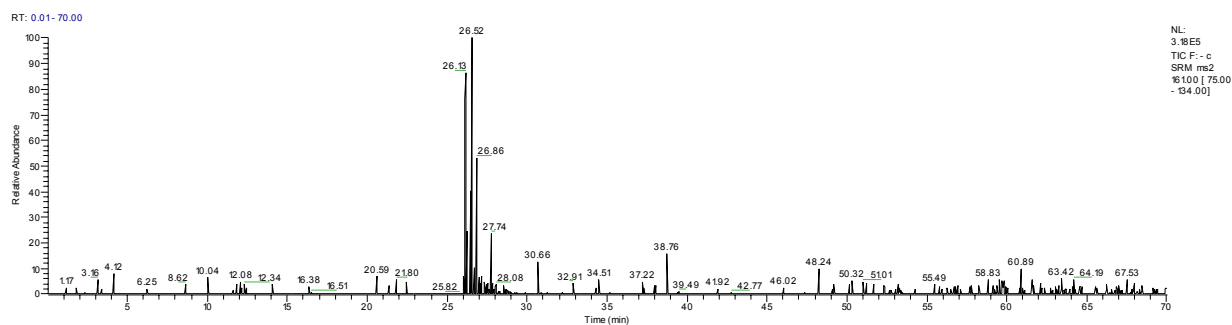


Figure II-4.1.1A : Haut : Chromatogramme du courant ionique total Full ms [50-500]  
Bas : Spectre à RT = 26.3 min, Full ms [50-500]



S#: 1668 RT: 26.47 AV: 1 NL: 6.54E4  
F: - c SRM ms2 161.00 [ 75.00 - 134.00]

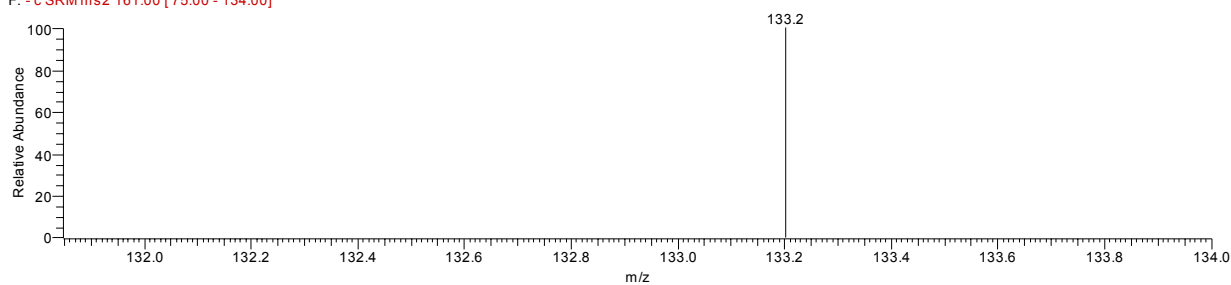
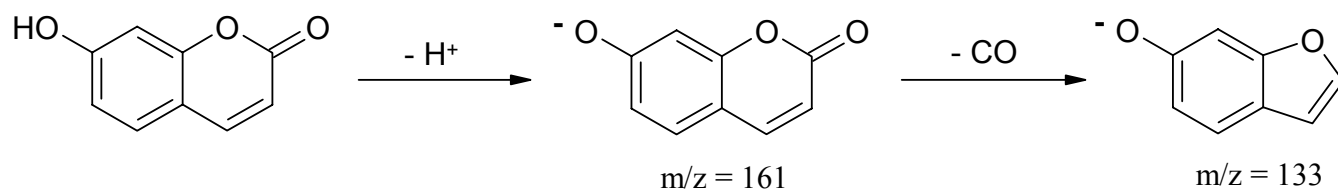


Figure II-4.1.1B : Haut : Chromatogramme du courant ionique SRM ms<sup>2</sup> 161 [75-134]  
Bas : Spectre à RT = 26.5 min, SRM ms<sup>2</sup> 161 uma

Schéma de fragmentation de masse :

## Bibliographie



**II-4.1.2** La scopolétine **29** a été détectée en mode SIM positif sur l'ion 193 uma [M + H]<sup>+</sup>, et ses ions fils en mode SRM ms<sup>2</sup> (193) (figures II-4.1.2A, II-4.1.2B). Le temps de rétention est égal à 28.6 min. Elle apparaît dans les fractions à pH acide et basique, ainsi que dans les fractions neutres moyennement polaires.

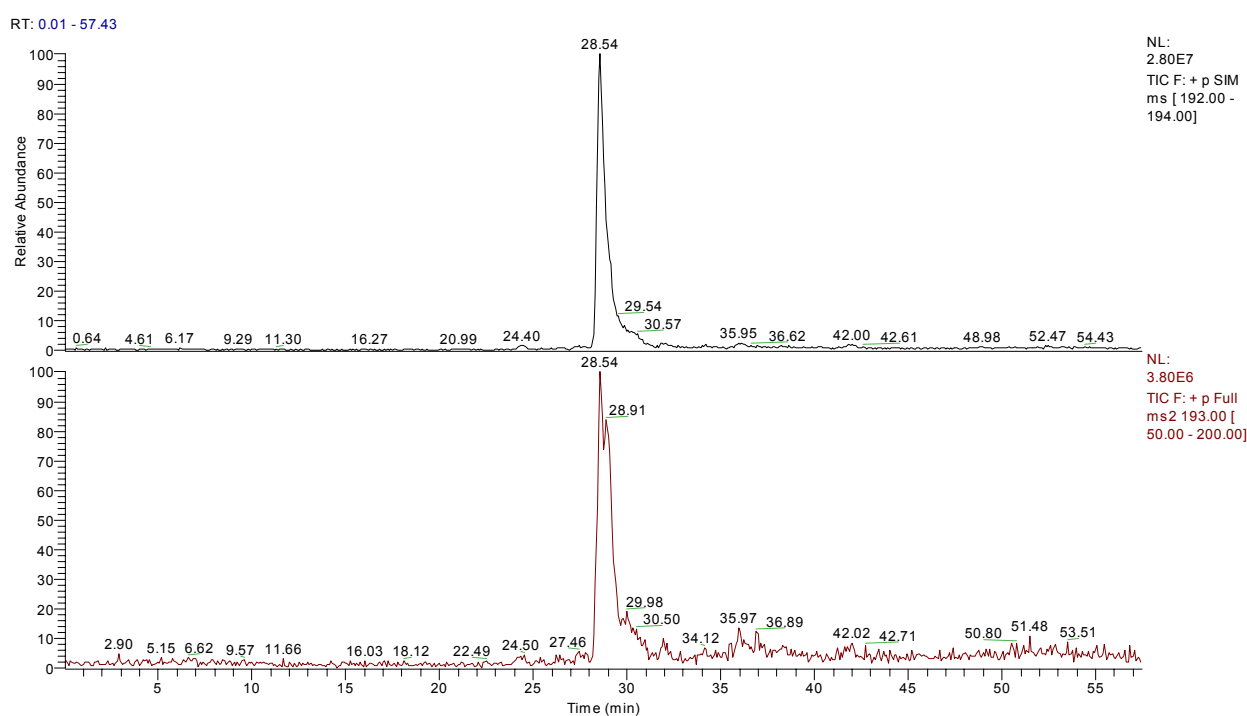
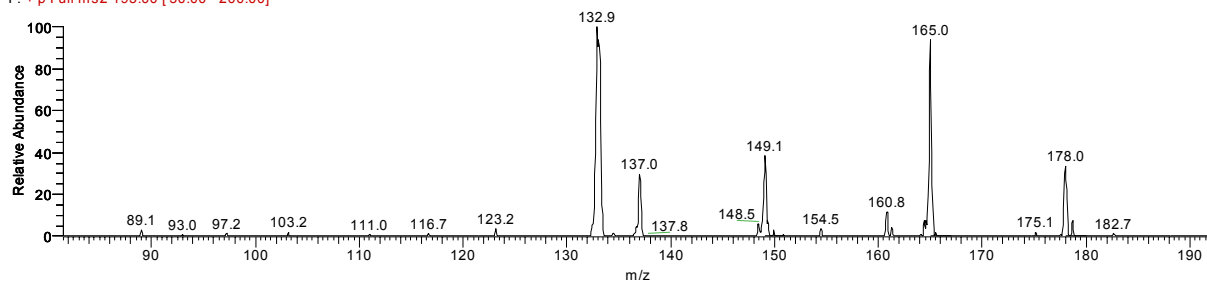


Figure II-4.1.2A : Haut : Chromatogramme du courant ionique SIM ms [192-194]  
Bas : Chromatogramme du courant ionique Full ms<sup>2</sup> 193 uma

## Bibliographie

S#: 1649 RT: 28.62 AV: 1 NL: 1.86E5  
 F: + p Full ms2 193.00 [50.00 - 200.00]



RT: 0.01-57.43

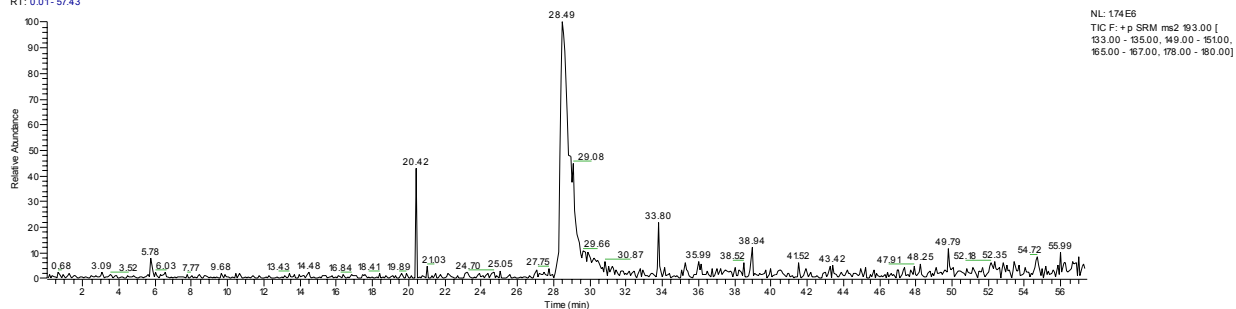
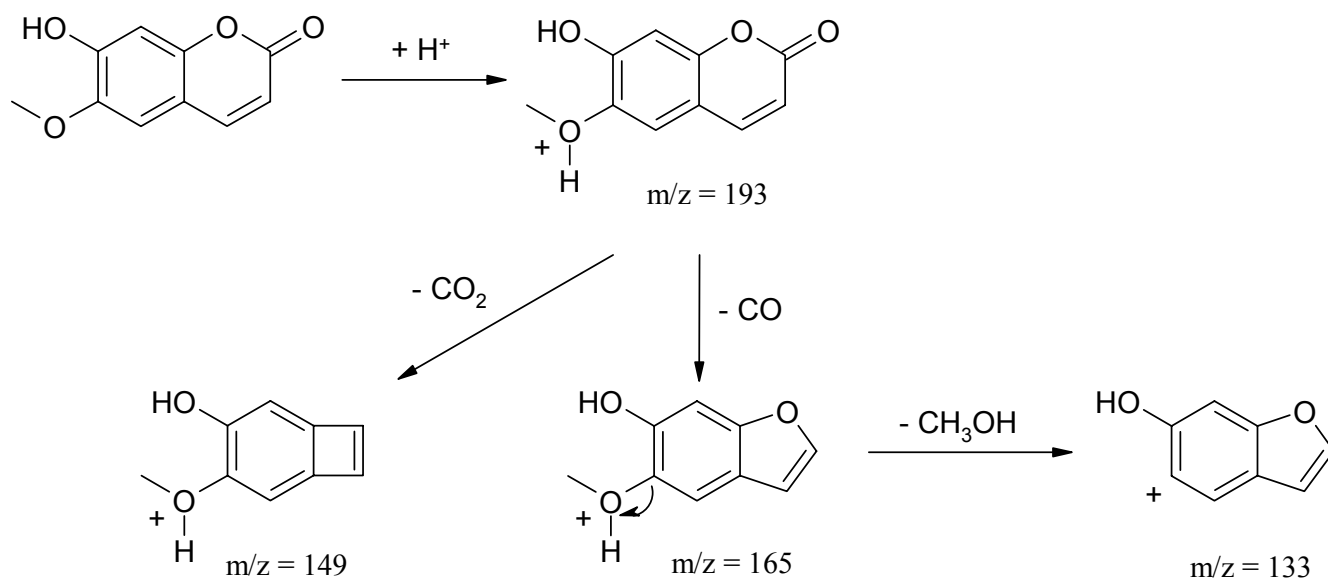


Figure II-4.1.2B : Haut : Spectre à RT = 28.6 min, Full ms<sup>2</sup> 193 uma  
 Bas : Chromatogramme du courant ionique, SRM ms<sup>2</sup> 193 [133-135, 149-151, 165-167, 178-180]

Schéma de fragmentations de masse :



## Bibliographie

**II-4.1.3** L'isocoumarine **20** est présente dans les fractions les moins polaires à un temps de rétention de 47.2 min. Les expériences sont réalisées en mode Full ms négatif [M - H]<sup>-</sup> et en mode SRM ms<sup>2</sup> 205 [133-191] (figure II-4.1.3).

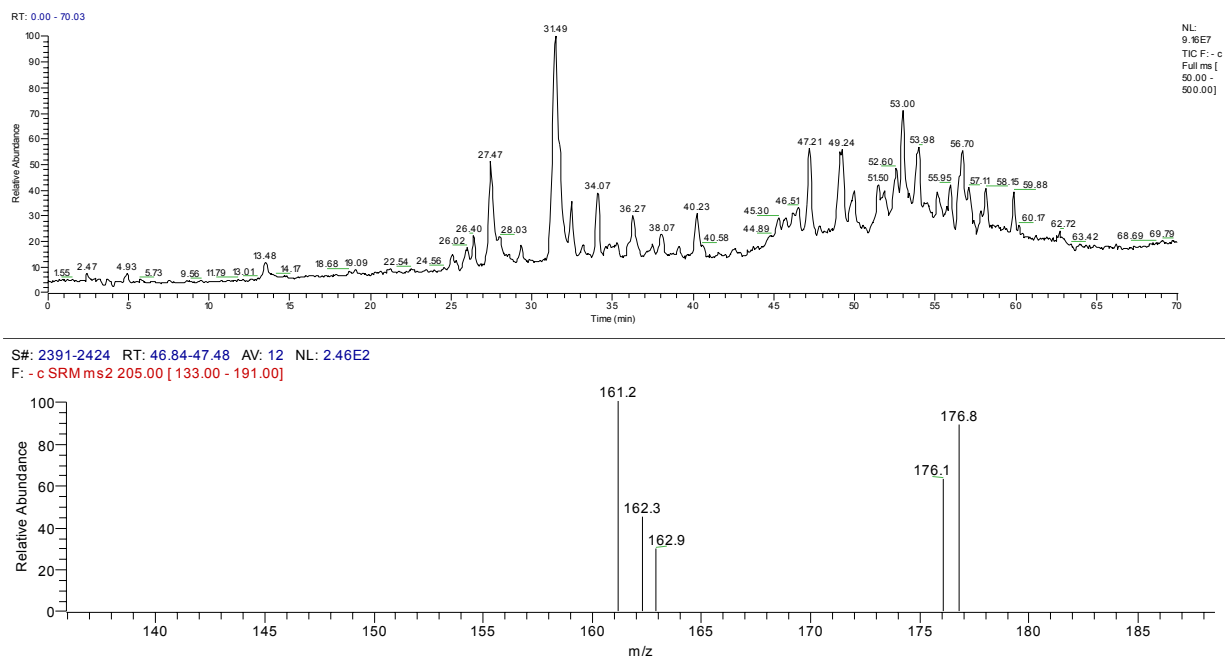
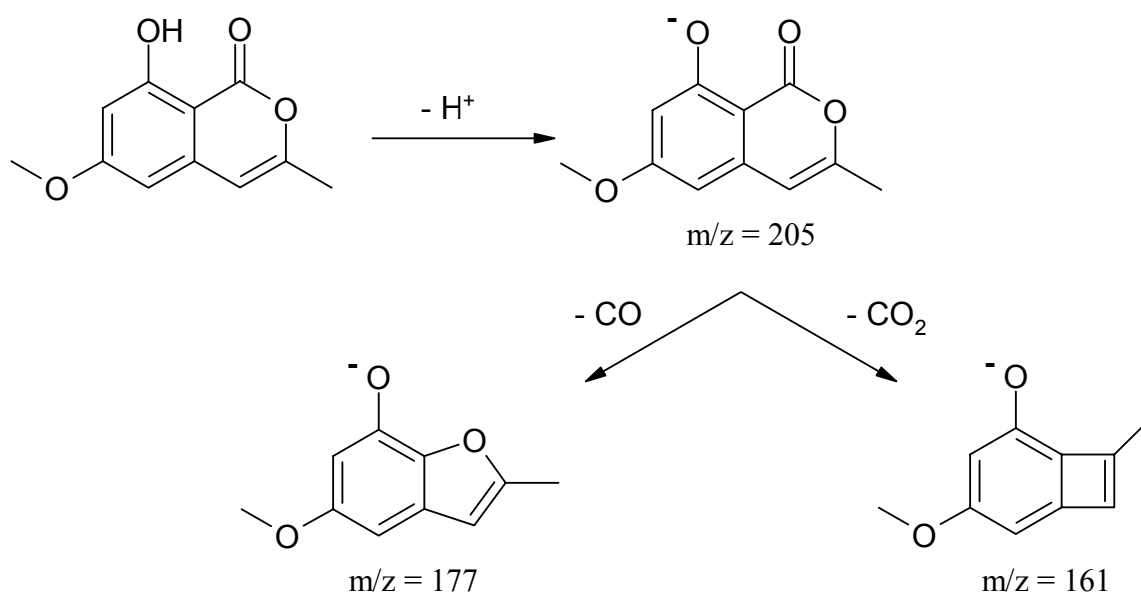


Figure II-4.1.3 : Haut : Chromatogramme du courant ionique total Full ms [50-500]  
Bas : Spectre à RT = 46.8-47.5 min, SRM ms<sup>2</sup> 205 uma

Schéma de fragmentations de masse :



## Bibliographie

**II-4.1.4** Le composé **17** cis a été détecté en mode négatif  $[M - H]^-$  à un temps de rétention de 29.5 min. La forme trans n'a pas été soumise à de nombreuses expériences dans le matériel végétal puisque le produit de référence avait commencé à se dégrader. Malgré tout, son RT supposé est égal à 36.5 min. La détection de ces métabolites est d'autant plus difficile qu'ils s'oxydent facilement à l'air (figure II-4.1.4A). La fragmentation de l'ion 193 du composé **3** cis donne trois ions fils : 175, 165 et 149 uma (figure II-4.1.4B).

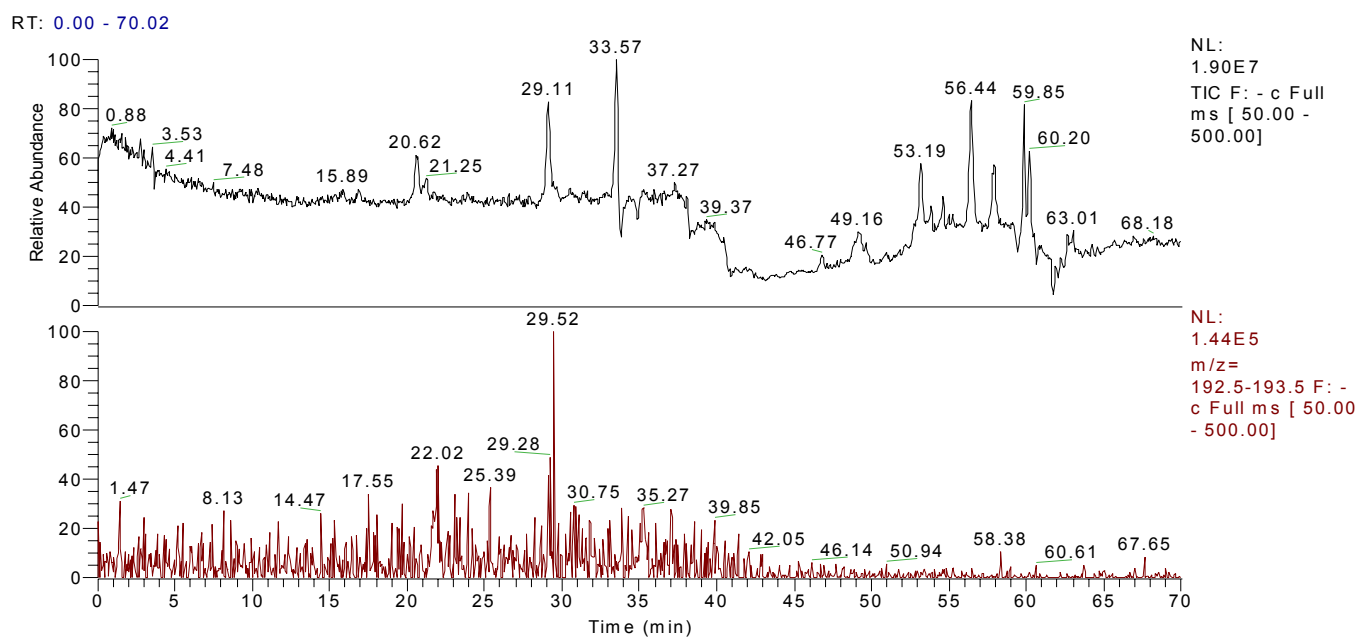
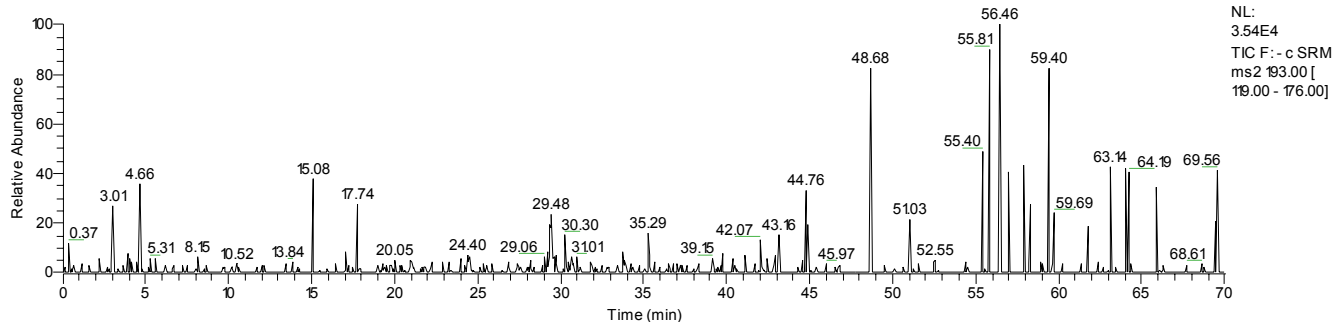


Figure II-4.1.4A : Haut : Chromatogramme du courant ionique total Full ms [50-500]  
Bas : Présence de l'ion 193 uma dans le courant ionique total

## Bibliographie

RT: 0.00 - 70.02



S#: 1466-1508 RT: 28.83-29.65 AV: 15 NL: 1.32E3

F: - c SRM ms<sup>2</sup> 193.00 [ 119.00 - 176.00]

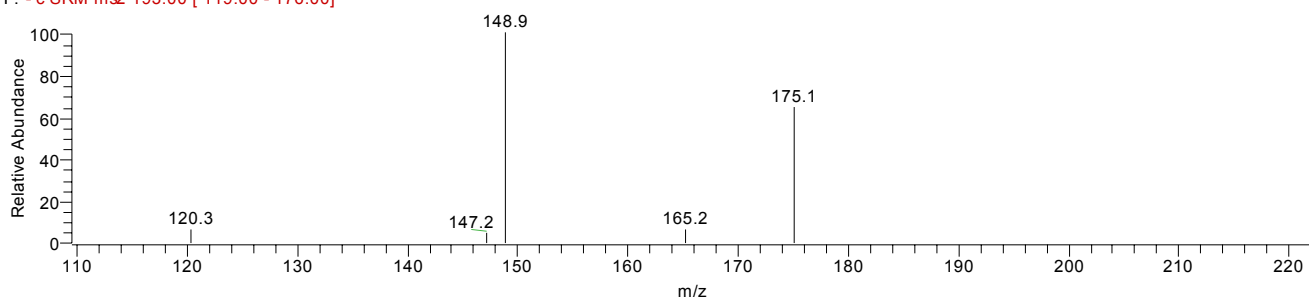
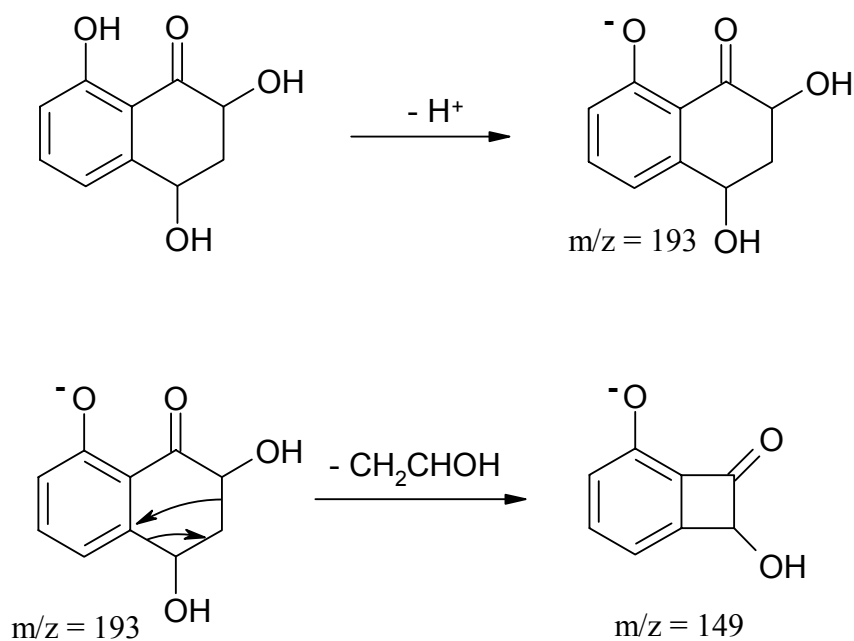


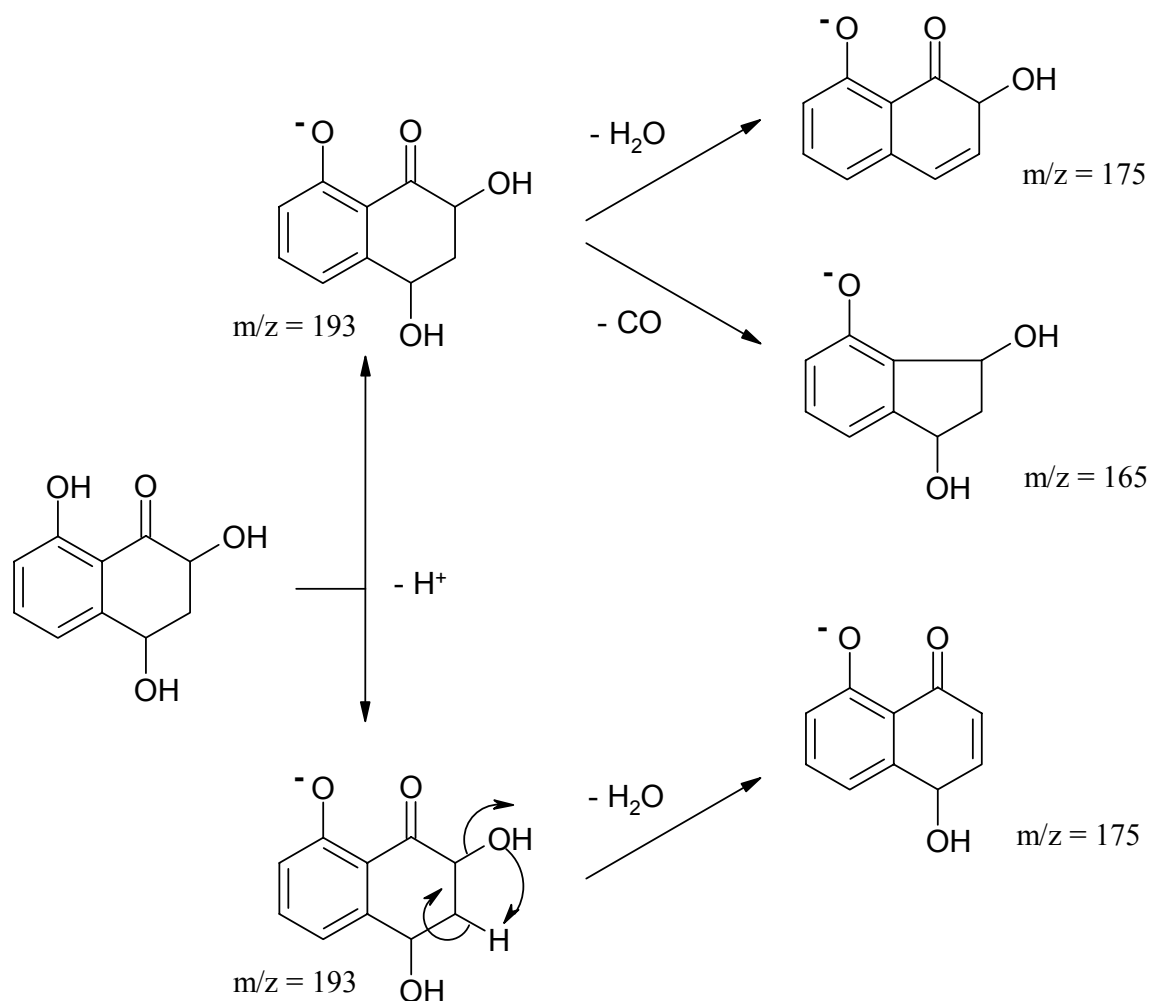
Figure II-4.1.4B : Haut : Chromatogramme du courant ionique SRM ms<sup>2</sup> 193 [119-176]  
Bas : Spectre à RT = 28.8-29.6 min, SRM ms<sup>2</sup> 193 uma

Schéma de fragmentations de masse :

La valeur du pKa du phénol est inférieure à celle de l'alcool, la déprotonation se fera plus favorablement sur le proton du phénol.

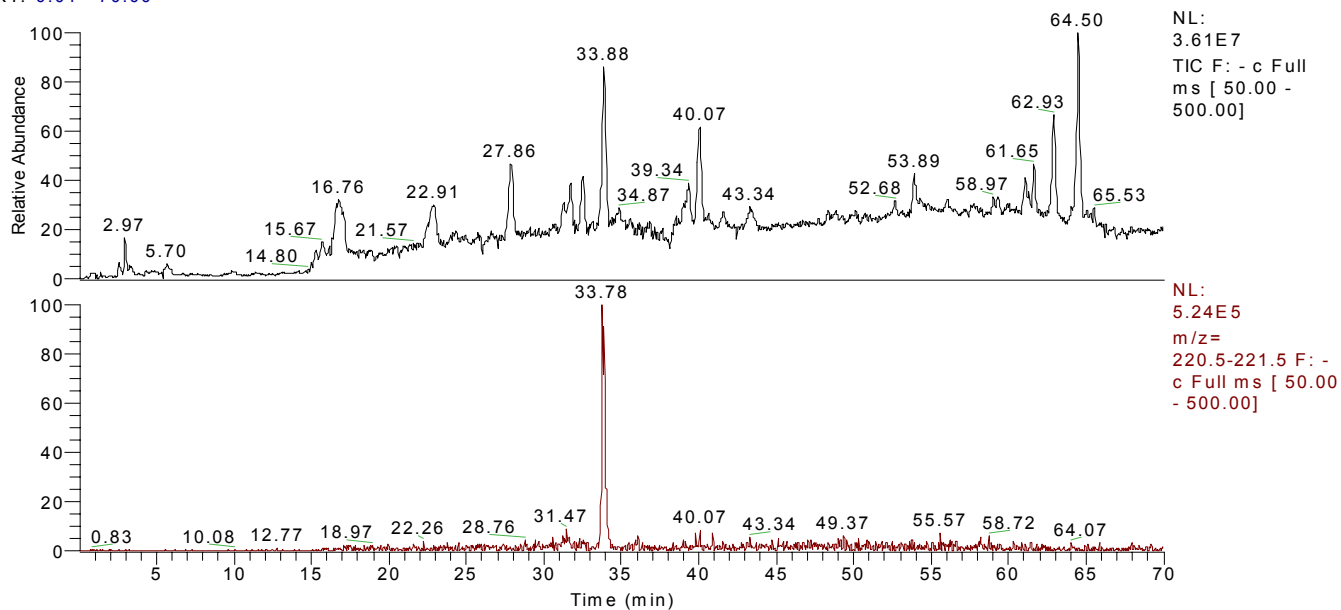


## Bibliographie



**II-4.1.5** La présence dans le brut de l'isocoumarine 4 a été constatée à un temps de rétention de 33.9 min. Les expériences sont effectuées en mode négatif Full ms [50-500] (figure II-4.1.5A) et en mode SRM  $\text{ms}^2$  221 [133-191] (figure II-4.1.5B).

RT: 0.01 - 70.00



## Bibliographie

Figure II-4.1.5A : Haut : Chromatogramme du courant ionique total Full ms [50-500]  
Bas : Présence de l'ion 221 uma dans le courant ionique total

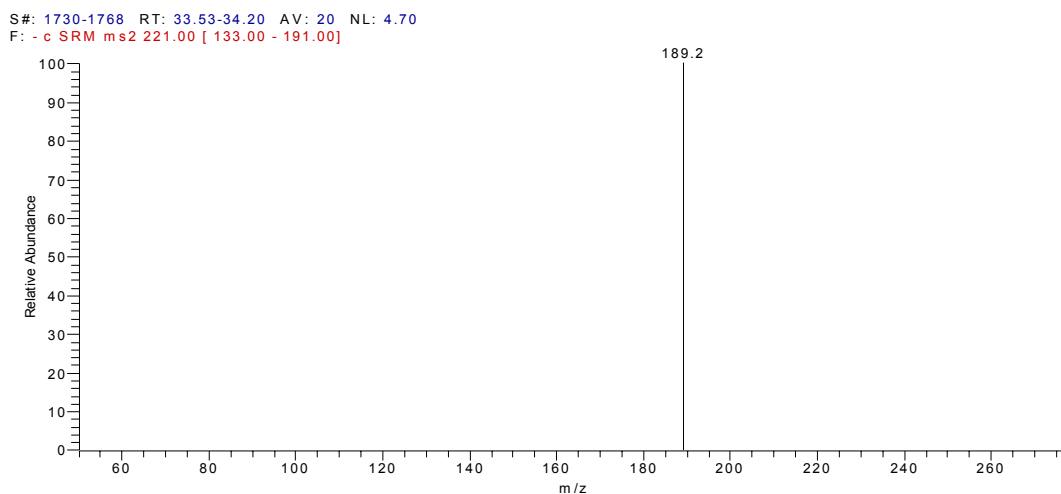
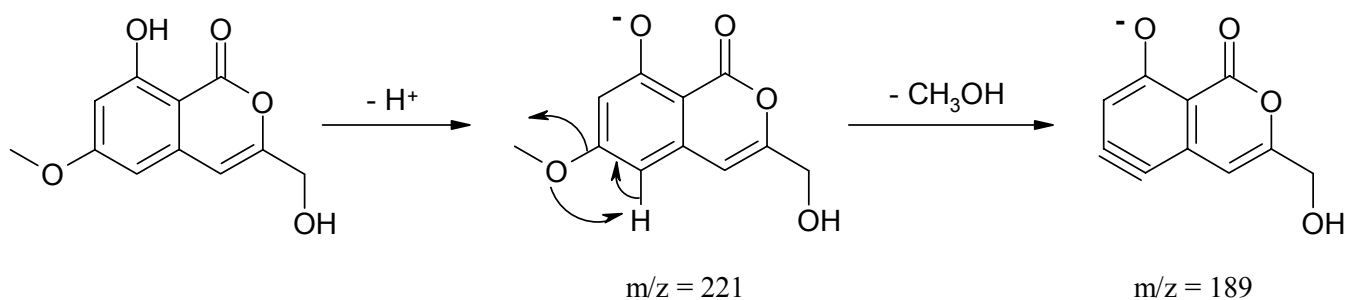


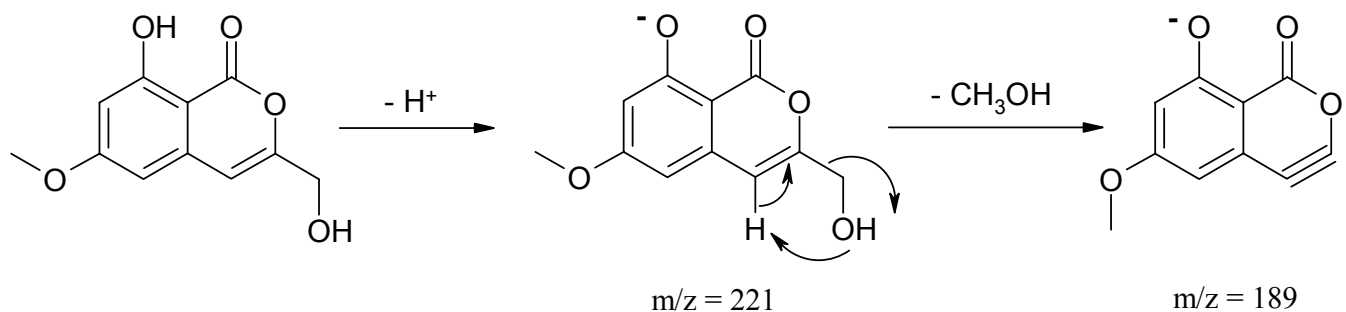
Figure II-4.1.5B : Spectre à RT = 33.5-34.2 min, SRM ms<sup>2</sup> 221 uma

Schéma de fragmentations de masse :

Si le proton arraché est celui du phénol, la délocalisation de la charge négative se fait dans tout le cycle stabilisant ainsi cette forme. La fragmentation à partir du méthoxy donne une forme benzyne peu stable.



La perte de CH<sub>3</sub>OH peut provenir également du groupement en R<sub>1</sub>.



## Bibliographie

**II-4.1.6** La 2-hydroxyjuglone **22** a été décelée en mode SIM négatif sur l'ion 189 uma [ M – H ], avec une plage de rétention de 10.5-11.8 min (figure II-4.1.6). Elle est présente dans le brut extrait à l'éther.

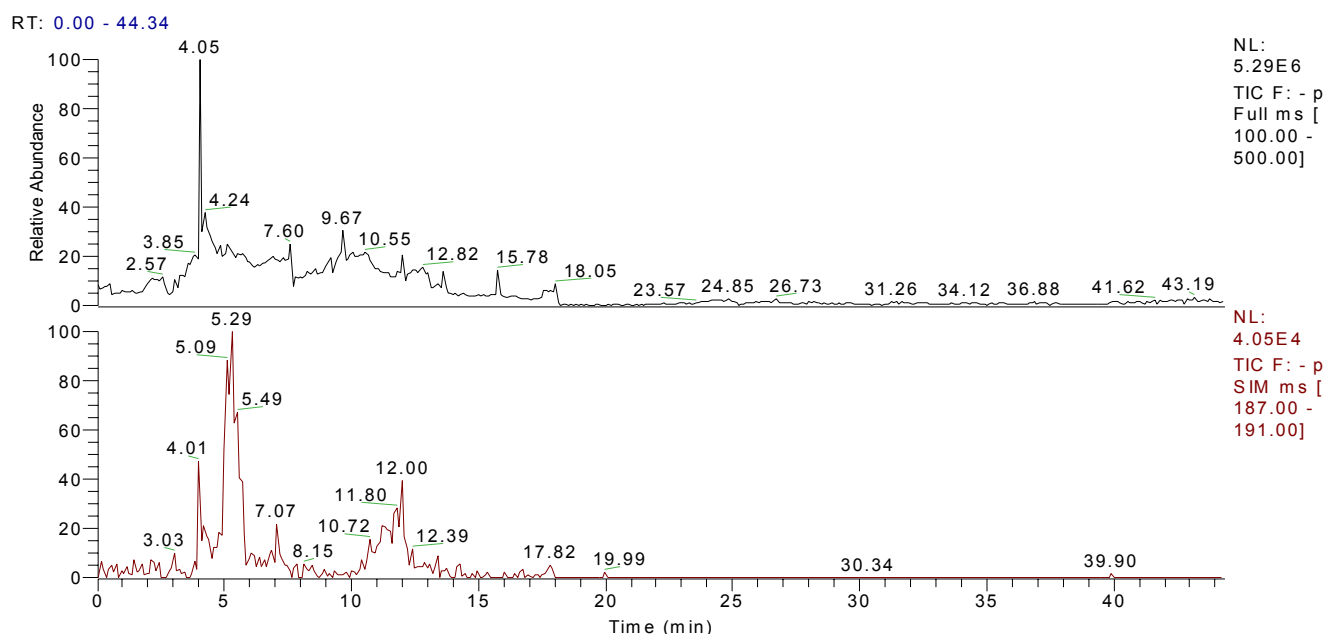


Figure II-4.1.6 : Haut : Chromatogramme du courant ionique total Full ms [100-500]  
Bas : Chromatogramme du courant ionique SIM ms [187-191]

**II-4.1.7** La 3-hydroxyjuglone **23** est présente seulement dans l'extrait brut étheré à un temps de rétention de 27.1 min. Les expériences (figure II-4.1.7) sont réalisées en mode Full ms négatif et en mode SIM ms (189).

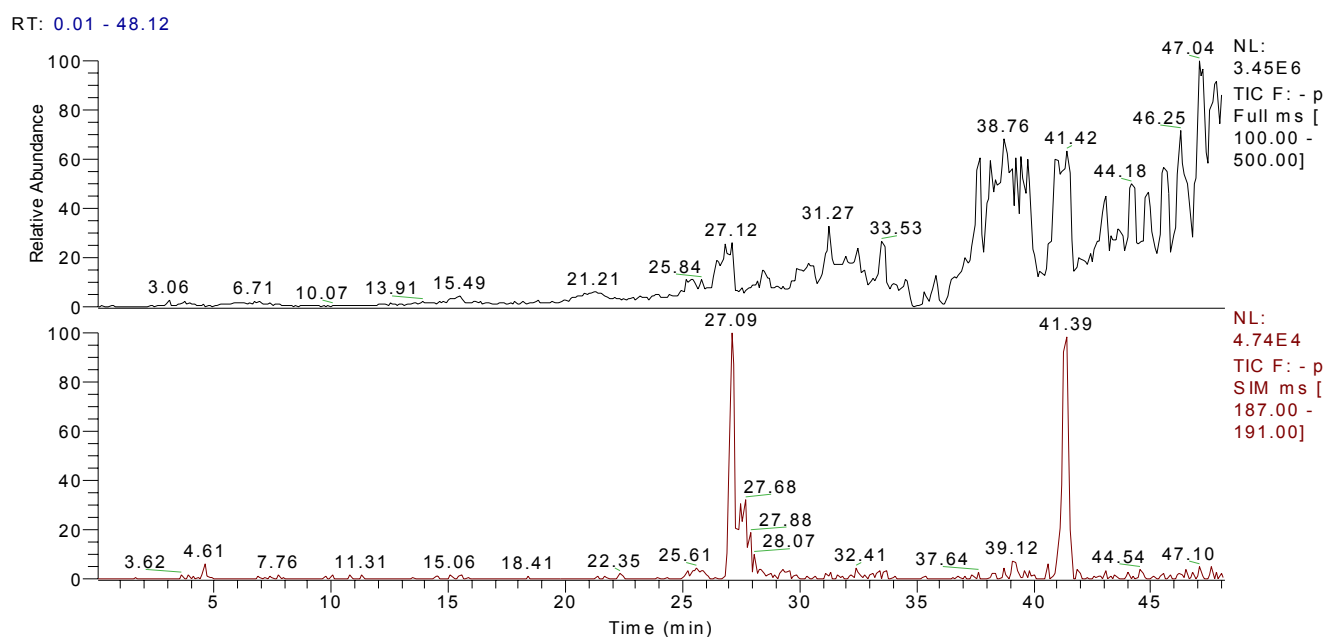


Figure II-4.1.7 : Haut : Chromatogramme du courant ionique total Full ms [100-500]  
Bas : Chromatogramme du courant ionique SIM ms [187-191]

**Bois malade : Pianta malata**

Dans l'extrait brut pianta malata, seulement deux composés ont pu être identifiés : l'umbélliférone et la trans-1(2H) 3,4 dihydro-2,4,8 trihydroxynaphtalénone.

**II-4.2.1** L'umbélliférone **28** a été détectée dans l'extrait brut à un temps de rétention de 26.5 min (figure II-4.2.1).

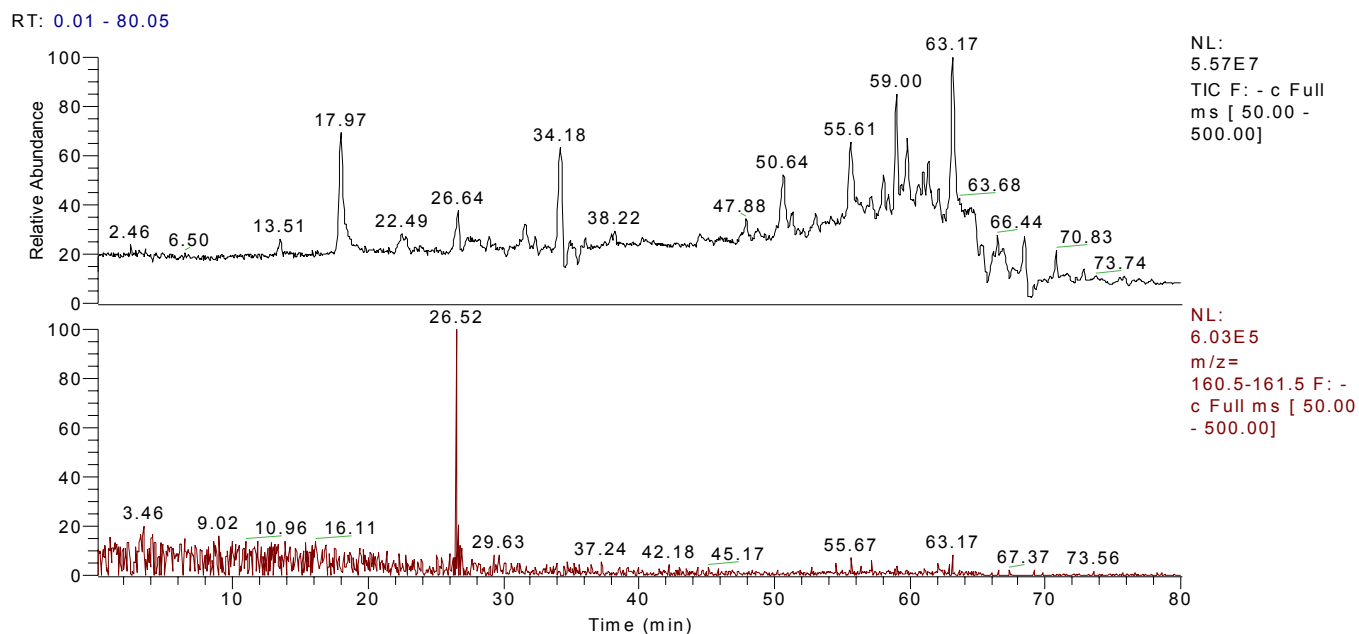
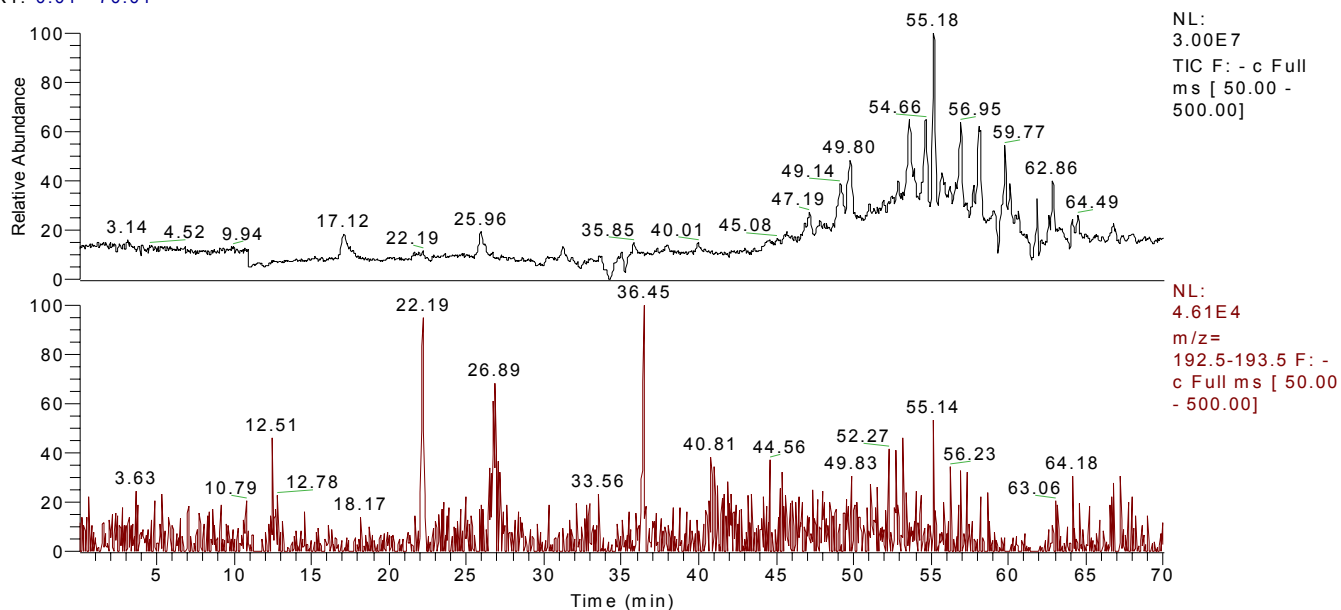


Figure II-4.2.1 : Haut : Chromatogramme du courant ionique total Full ms [50-500]  
Bas : Présence de l'ion 161 uma dans le courant ionique total

**II-4.2.2** La naphthalénone **17** trans a été déterminée dans cet extrait brut à un temps de rétention de 36.4 min (figure II4.2.2).

## Bibliographie

RT: 0.01 - 70.01

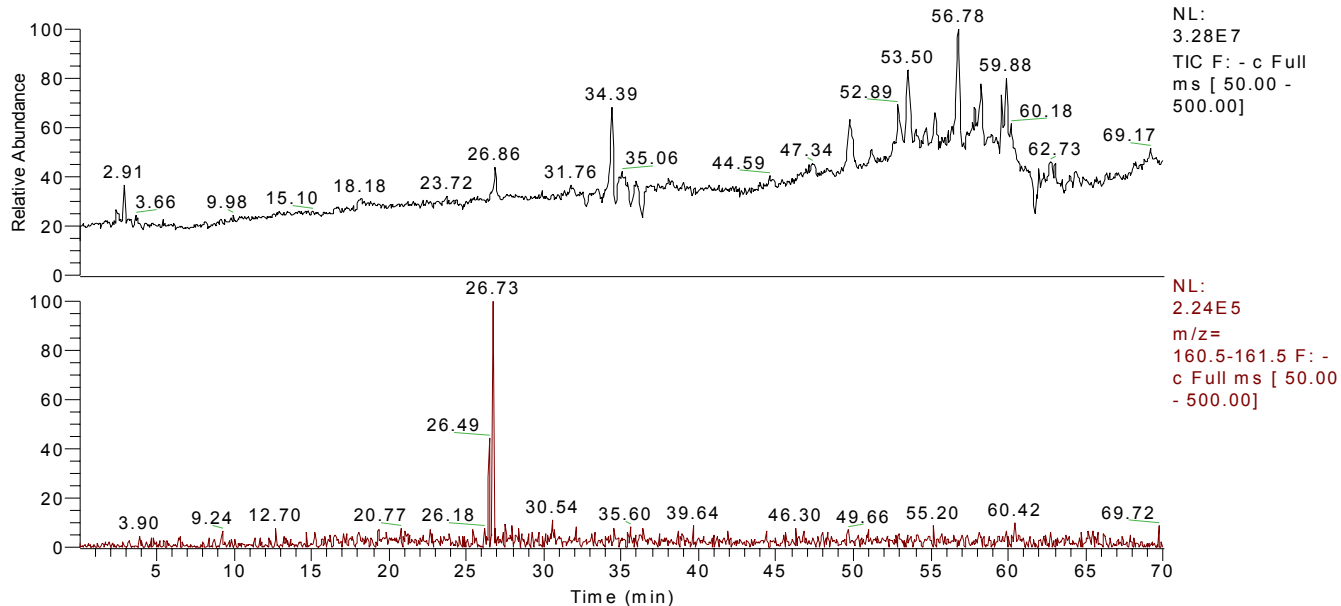


## Bois sain : Sano

Dans le bois sain, les deux métabolites présents sont les phytoalexines **28** et **29**.

**II-4.3.1** L'umbelliférone est présente avec un RT = 26.7 min (figure II-4.3.1).

RT: 0.01 - 70.02



**II-4.3.2** La scopolétine a été détectée pour un RT = 29.3 min (figure II-4.3.2).

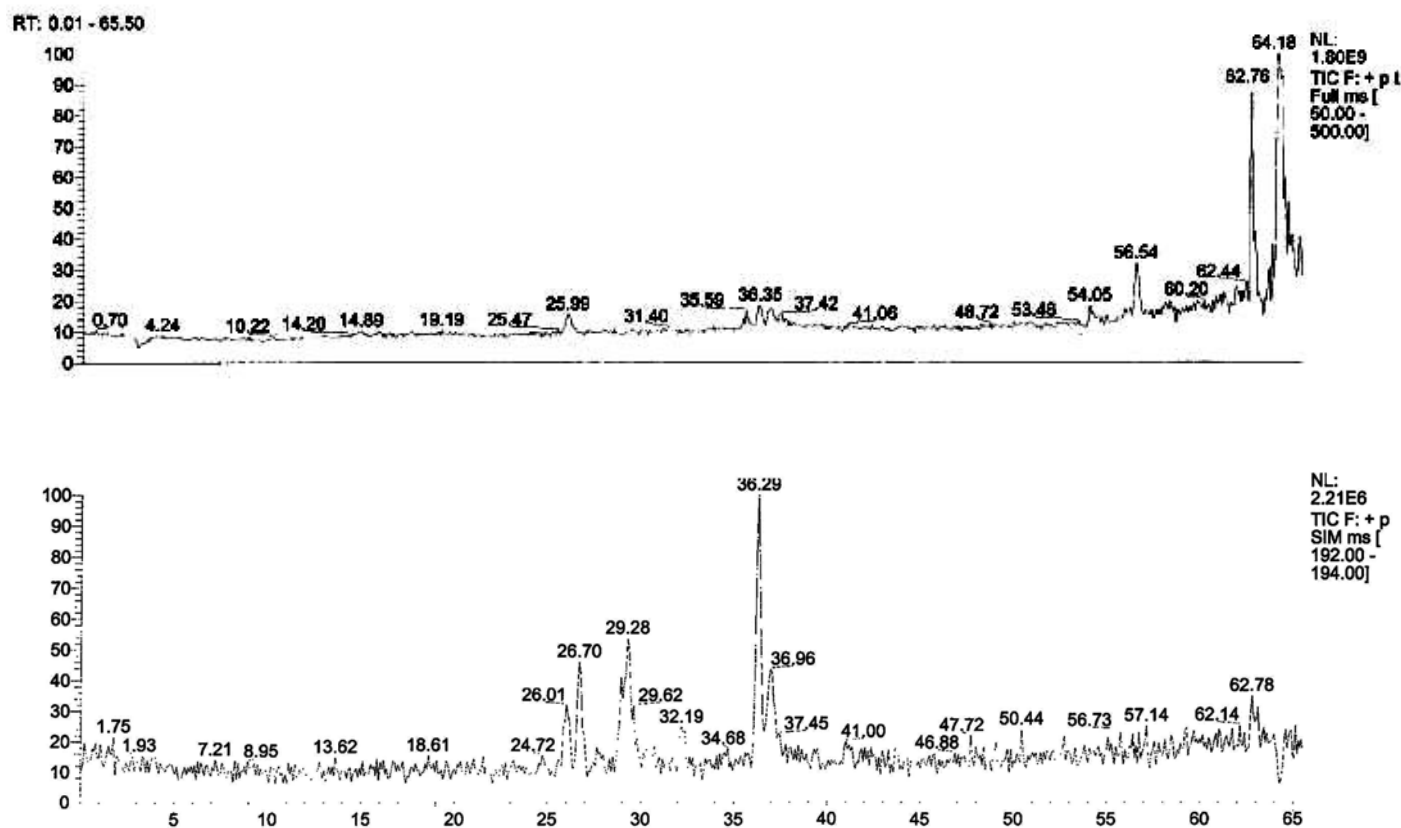


Figure II-4.3.2 : Haut : Chromatogramme du courant ionique total Full ms [50-500]  
Bas : Chromatogramme du courant ionique SIM ms [192-194]

### *Récapitulatif*

L'umbelliférone et la scopolétine sont présentes dans les bois malade et sain, étayant ainsi l'hypothèse de leur propriété de phytoalexine. Qualitativement, d'après les chromatogrammes HPLC des trois extraits bruts, la quantité de ces composés décroît de l'extrait malato à l'extrait sano. Lorsque la présence de l'agent pathogène est détectée, le métabolisme du matériel végétal augmente la production des deux phytoalexines afin de se défendre.

Les deux isocoumarines **4** (8-Hydroxy-3-hydroxyméthyl-6-méthoxy-isochromen-1-one) et **20** (8-Hydroxy-6-méthoxy-3-méthyl-isochromen-1-one) ont été détectées seulement dans l'extrait brut malato. A ce stade des résultats, ces deux métabolites peuvent être considérés comme des phytotoxines potentielles du platane.

La naphthalénone **17** est présente également dans les extraits bruts de bois malade. La stéréochimie de ce composé ainsi que sa facilité à s'oxyder rend difficile sa détection dans le matériel végétal. Sa toxicité apparaît moins importante que celle des isocoumarines. D'autres expériences seront nécessaires afin de confirmer ce résultat ou d'octroyer la toxicité aux composés oxydés.

La 2-hydroxyjuglone **22** et la 3-hydroxyjuglone **23** ont été décelées uniquement dans le bois infecté. Ce sont des toxines, provenant de l'oxydation de naphthalénone ou de la

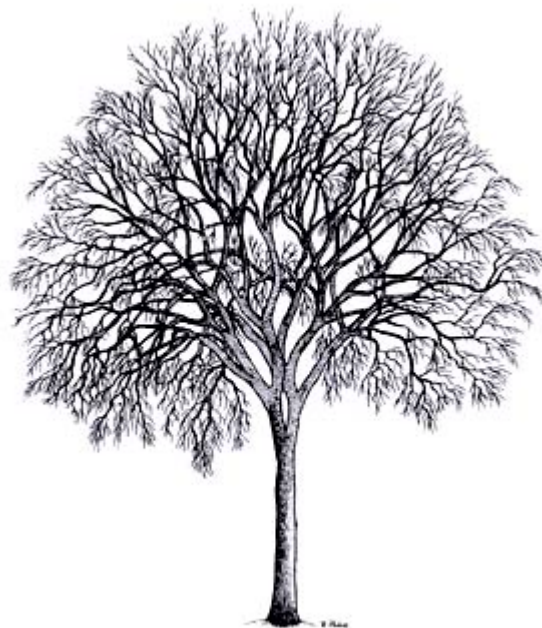
Bibliographie

juglone. Puisqu'elles ne sont pas présente dans le milieu de culture liquide, elles ne peuvent pas être considérées comme des phytotoxines du chancre du platane.

*CHAPITRE*

*VII :*

*DISCUSSIONS*



## Les métabolismes

Le métabolisme primaire est le produit d'un ensemble de réactions chimiques catalysées par des enzymes dont le but est de fournir de l'énergie à l'organisme et des intermédiaires synthétiques, des protéines ou des macromolécules essentielles comme l'ADN.

Le métabolisme secondaire englobe plusieurs procédés synthétiques dont les produits finaux, nommés métabolites secondaires, dont le rôle dans l'organisme n'est pas établi. Ils dérivent d'intermédiaires biosynthétiques du métabolisme primaire (figure I-1).

Alors que le métabolisme primaire est pratiquement le même pour tous les systèmes vivants, le métabolisme secondaire est spécifique à une espèce.

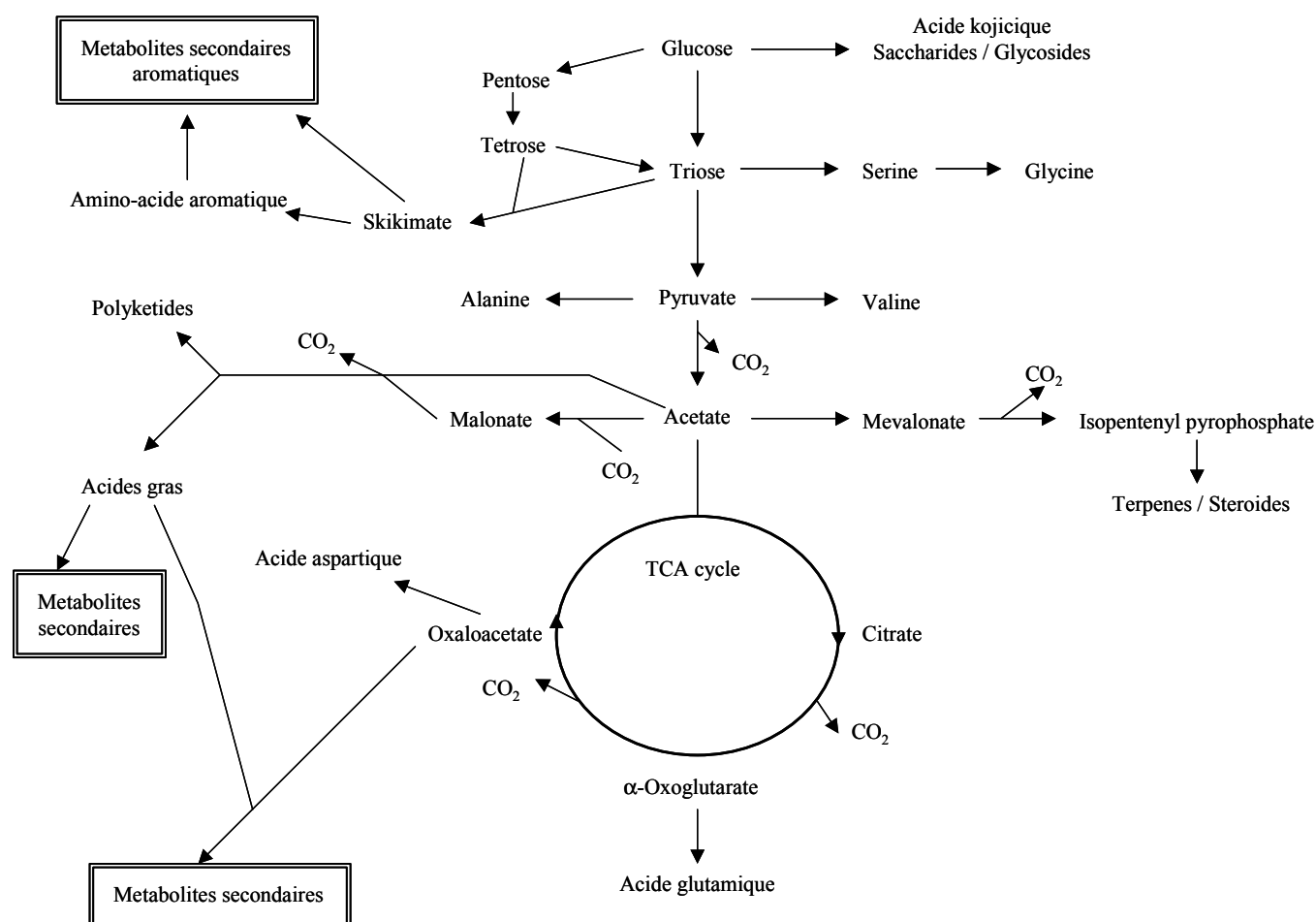


Figure I-1 : Formation des métabolites secondaires par l'intermédiaire du métabolisme primaire [156]

La source de carbone et d'énergie provient essentiellement du glucose. Certains métabolites comme l'acide kojicique dérivent directement de celui-ci. Le glucose est converti en triose, lui-même en pyruvate qui donne l'acétyl CoA qui est le plus important des

## Bibliographie

précurseurs dans le métabolisme secondaire fongique. La carboxylation de l'acétyl CoA donne le malonyl CoA.

La condensation linéaire de l'acétyl CoA avec plusieurs molécules de malonyl CoA conduit aux polycétides ou aux acides gras. Les polycétides sont les composés les plus nombreux parmi les métabolites secondaires des champignons. Les acides gras à leur tour peuvent participer au métabolisme secondaire.

L'acide mévalonique provient de la condensation de trois molécules d'acétyl CoA, intermédiaire clé dans la biosynthèse des terpènes.

Le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) permet l'oxydation du glucose. Il est la source de carbone nécessaire pour former les squelettes des amino-acides. Le cycle TCA est la condensation de l'acétyl CoA et de l'oxaloacetate.

## **Les transformations biochimiques**

Trois procédés biochimiques sont utilisés afin de modifier les composés dans le métabolisme primaire.

### ➤ Oxydation et réduction :

Les réactions sont catalysées par deux types d'enzymes : la déshydrogénase et l'oxydase.

Les réactions de déshydratation sont indispensables dans le métabolisme primaire. Elles interviennent dans toutes les étapes d'oxydation dans le catabolisme du glucose. L'hydrogène est transféré à l'oxygène moléculaire par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire.

Les réactions d'oxydation ont un rôle important dans le métabolisme secondaire. Elles permettent l'introduction d'un atome d'oxygène pour les composés dérivés des polycétides, des terpènes et des stéroïdes.

### ➤ Méthylation :

Cette réaction est probablement à l'origine de toutes les méthylations dans le métabolisme secondaire fongique. Le groupe méthyle provient de la méthionine, activé par une S-adénylation avec l'ATP (adénosine triphosphaté) (figure I-2).

## Bibliographie

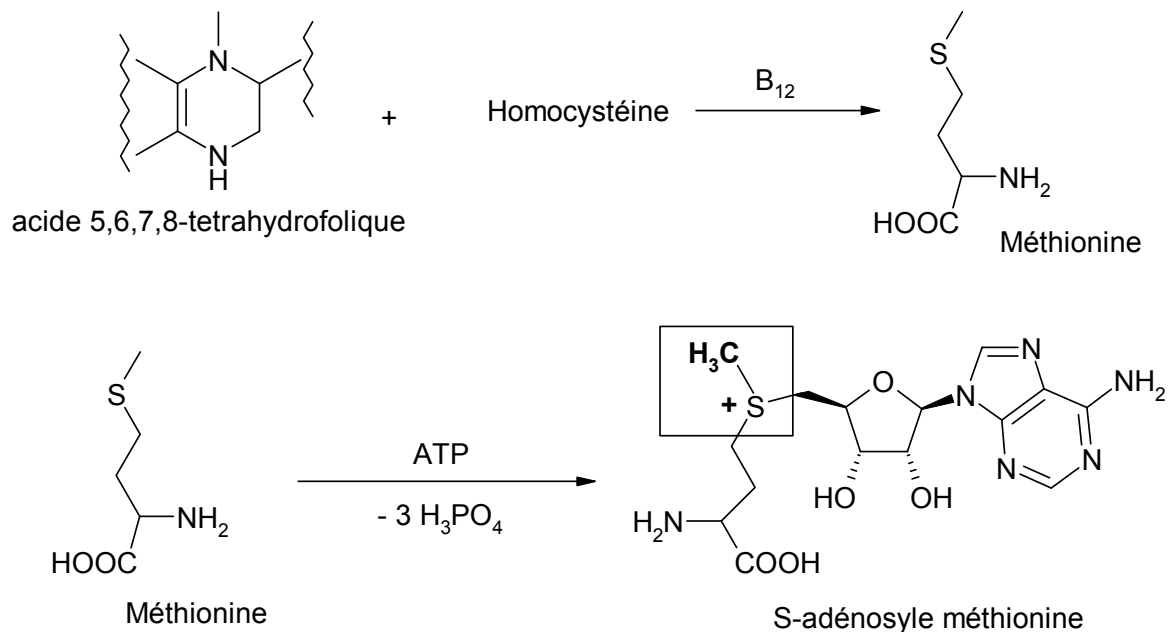


Figure I-2 : Obtention du groupe méthyle [157]

➤ Halogénéation :

Les chlorations sont catalysées avec les chloroperoxydases. Les composés chlorés sont présents essentiellement dans le monde marin.

## **Les métabolites secondaires**

Les précurseurs des métabolites secondaires sont peu nombreux (figure I-3) : principalement l'acide pyruvique et l'acide acétique dont découle l'acétyl CoA.

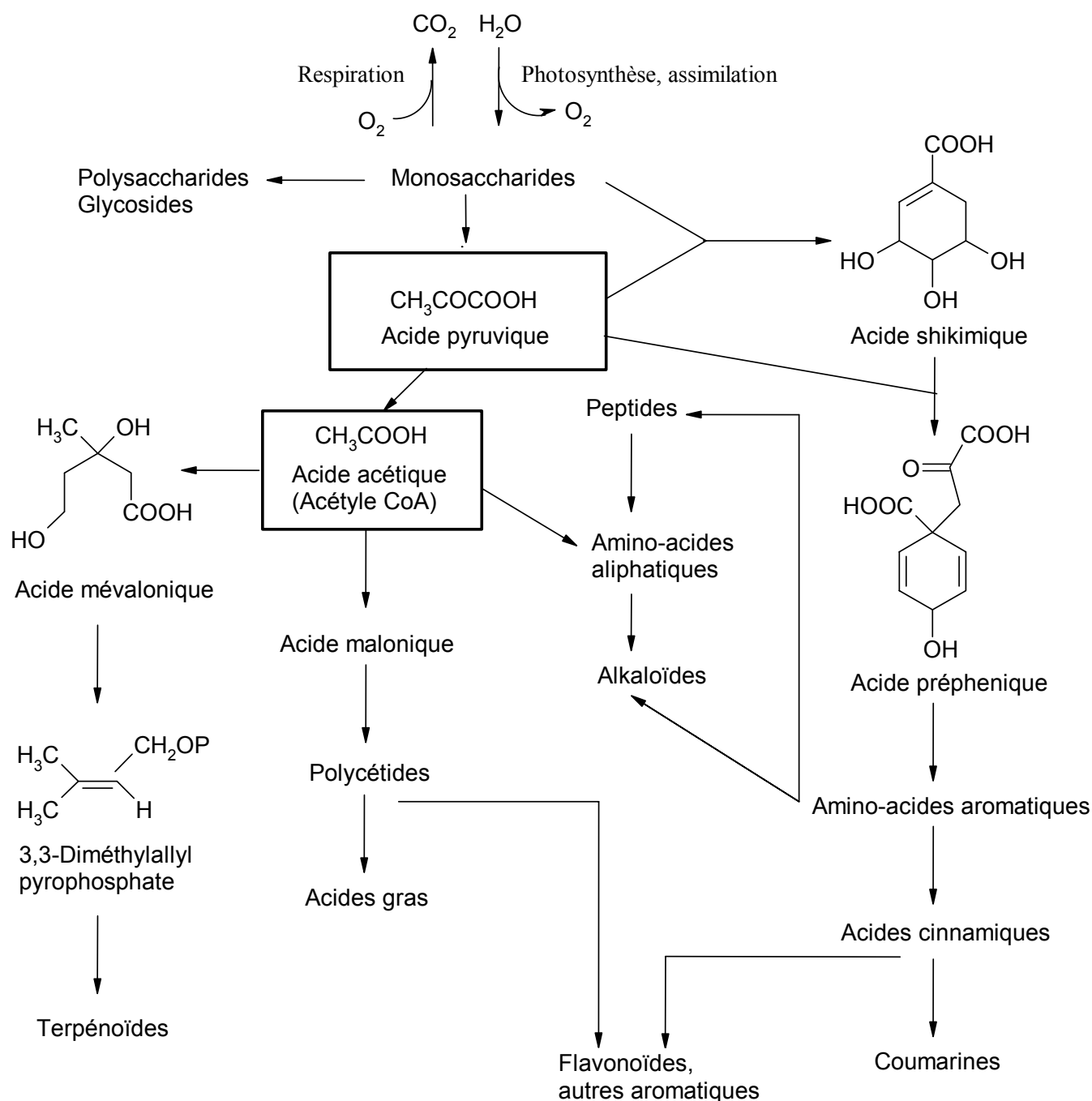


Figure I-3 : Schéma des familles de composés des métabolites secondaires [157]

Les polycétides, les coumarines et les métabolites de l'acide shikimique sont les trois familles de composés dont la recherche en biosynthèse est la plus importante. Elles sont la source de phytotoxines et de phytoalexines dans le métabolisme secondaire fongique.

L'étude de la biosynthèse de composés s'effectue avec trois approches différentes et complémentaires :

- Utilisation de marquage isotopique.

## Bibliographie

- Extraction et purification *in vitro* des enzymes intervenant dans la biosynthèse.
- Etude des mutations génétiques *in vivo* du champignon en bloquant les processus de biosynthèse déjà établis.

## Biosynthèse des métabolites d'*Ophiostoma ulmi*

### Composés 1 et 2

L'origine biosynthétique du 3-méthyl-3,5,8-trihydroxy-isochroman-1-one **1** et du 3-méthyl-4,6,8-trihydroxy-isochroman-1-one **2** n'a pas été étudiée dans la littérature. Leur structure de base étant la melleine (figure I-4.1A), la biosynthèse par la voie des polycétides est envisageable.

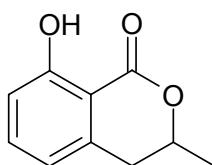


Figure I-4.1A : Structure de la melleine

La biosynthèse de la 6-hydroxymelleine s'effectue avec un pentacétide formé de quatre unités acétates et une unité acétyl CoA [158,159] (figure I-4.1B).

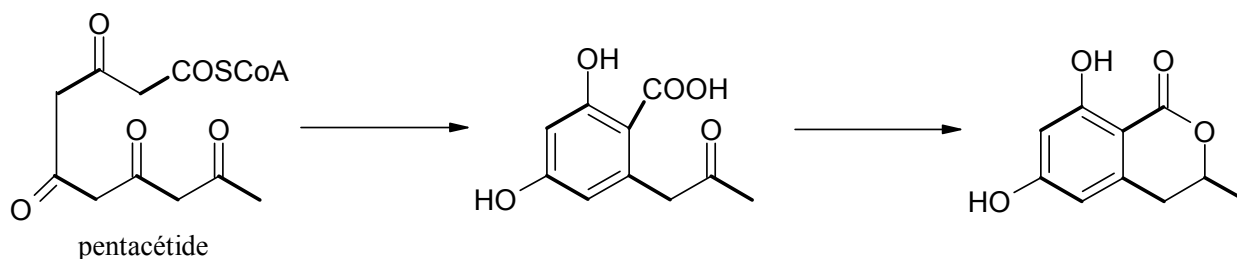


Figure I-4.1B : Biosynthèse de la 6-hydroxymelleine

### Isocoumarines : composés 3 et 4

Les isocoumarines **3** et **4** sont issues de la voie des polycétides, provenant de la condensation de cinq unités acétates. La voie des polycétides est caractéristique des métabolites secondaires des champignons imparfaits, des ascomycètes et plus rarement des basidiomycètes.

Le 6,8-dihydroxy-3-hydroxyméthyl-isochromen-1-one **3** participe à la biosynthèse de la cytogénine **4** (figure I-4.2), antibiotique isolé d'une souche de *Streptoverticillium eurocidicum* [87]. L'étude de la biosynthèse a été faite par marquage isotopique du carbone des groupements acétates ( $^{14}\text{C}$ ).

## Bibliographie

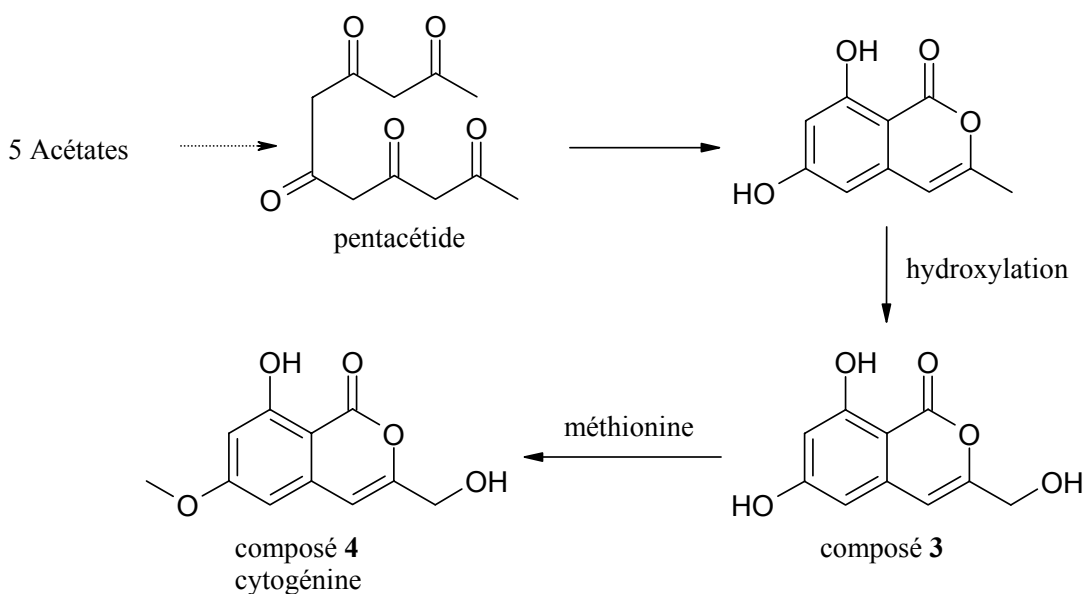


Figure I-4.2 : Biosynthèse des métabolites 3 et 4

### ***Isocoumarine : composé 5***

La (+)-orthosporine est également issue de la voie des polycétides avec six unités acétates (figure I-4.3).

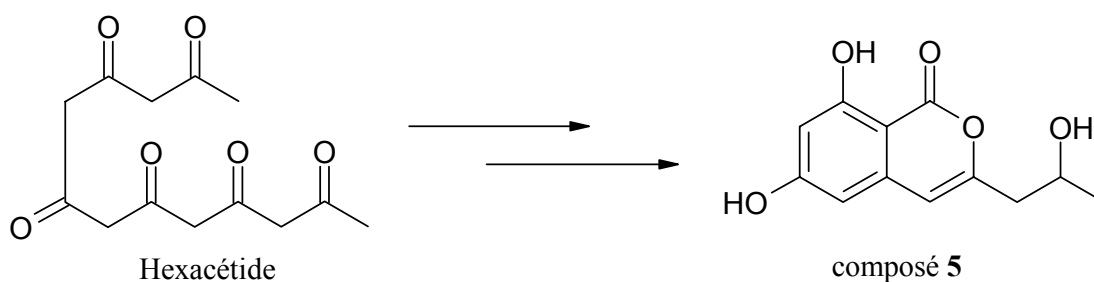


Figure I-4.3 : Biosynthèse de l'orthosporine

### ***Composé 6 : Juglone***

Ce métabolite est connu comme composé toxique pour la tomate, les pommes de terre, les pommes, les myrtilles, la luzerne et les azalées.

Bernthsen et Semper ont synthétisé la 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone pour la première fois en 1887, et elle est caractérisée par Combes en 1907.

La juglone est une substance allélopathique [160], de là découlent deux théories :

➤ La théorie des racines, "root theory" : Cook en 1921 et Massey en 1925 [161] observent un flétrissement et un jaunissement des feuilles sur les tomates et les patates, après inoculation de juglone synthétique. Ils comparent ces symptômes avec celle du noyer, puis concluent que la juglone réside dans les racines et les utilise pour se propager dans tout le

## Bibliographie

matériel végétal. Massey fera des expériences *in vivo* en inoculant la toxine sur des racines de noyer.

➤ La théorie des feuilles, “leaf theory” : Bode en 1958 [162] présente une nouvelle théorie. La toxicité observée est due à la sécrétion dans les feuilles de la juglone, transporté au sol par la pluie. Elle peut ainsi remonter dans la plante par les racines. Cette théorie propose donc que la juglone s'établisse dans les feuilles puis dans les racines et non uniquement dans les racines. Les expériences réalisées sont les suivantes : des tomates plantées sous un noyer protégées de la pluie n'ont pas de symptômes de maladie, alors que les plants non recouverts subissent un flétrissement des feuilles.

En 1950 Dalglish [163] isole le 5-glucoside de la 1,4,5-trihydroxynaphthalene. La juglone est obtenue à partir de ce composé après hydrolyse et oxydation (figure I-4.4A).

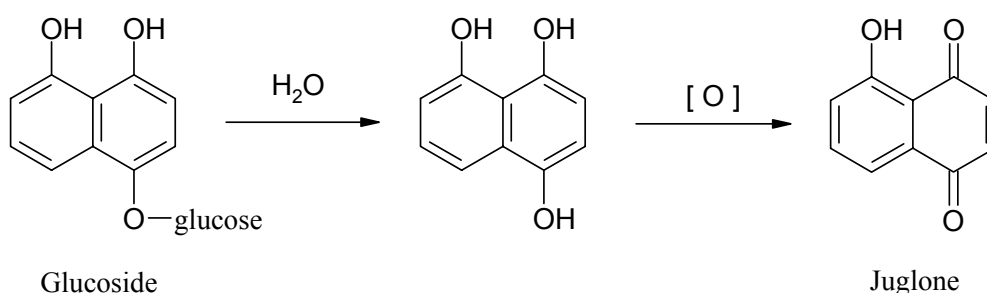


Figure I-4.4A : Transformation du glucoside en juglone

Deux précurseurs [164,165] ont été identifiés dans la biosynthèse du composé **6** par la voie de l'acide shikimique *via* la 1,4-naphthoquinone (figure I-4.4B).

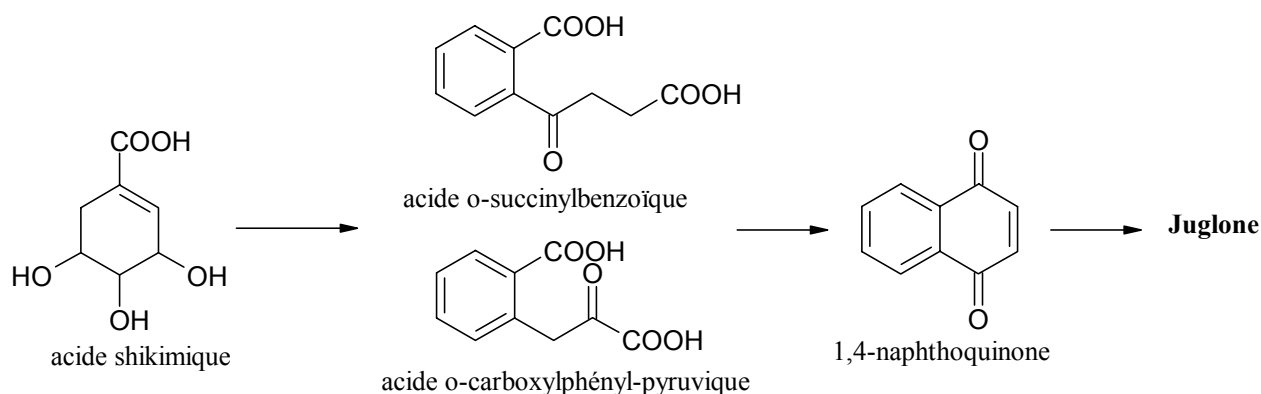


Figure I-4.4B : Biosynthèse de la juglone *via* la 1,4-naphthoquinone

En 1968 Leistner [166], puis en 1976 Müller et Leistner [167], ont déterminé, grâce au marquage au  $^{14}\text{C}$ , que les carbones 9 et 10 et l'hydroxyle en position 5 de la juglone viennent de l'acide shikimique alors que les carbones 2 et 3 ont comme origine l'acide malonique (figure I-4.4C).

Pour l'expérience A, les carbones 1 et 6 de l'acide shikimique ont une répartition 1 : 1 donnant sur les carbones 5, 8, 9 et 10 de la juglone une distribution de 25 % chacun et de 0 %

## Bibliographie

pour le cycle quinone. L'expérience B montre que le marquage sur la fonction acide carboxylique se répartit sur les deux cétones en proportion égale. En ce qui concerne l'expérience C, le méthylène de l'acide malonique est à l'origine des deux méthylènes en position 2 et 3 de la juglone à 92 % et à 0 % pour le cycle benzénique.

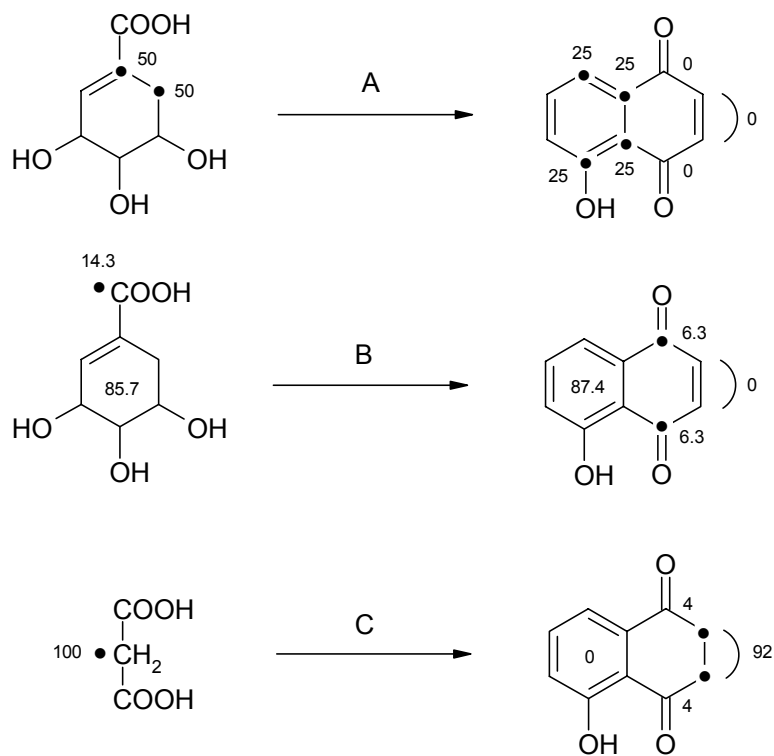


Figure I-4.4C : Origine des carbones de la juglone par marquage isotopique

Dans une culture de *E. coli* mutante, les précurseurs pour la biosynthèse du composé **6** sont la 2-carboxy-4-oxo- $\alpha$ -tetralone (ii) et la 1,4-dihydroxy-2-carboxynaphthalene (iii) *via* l'acide o-succinylbenzoïque (i) [168] (figure I-4.4D).

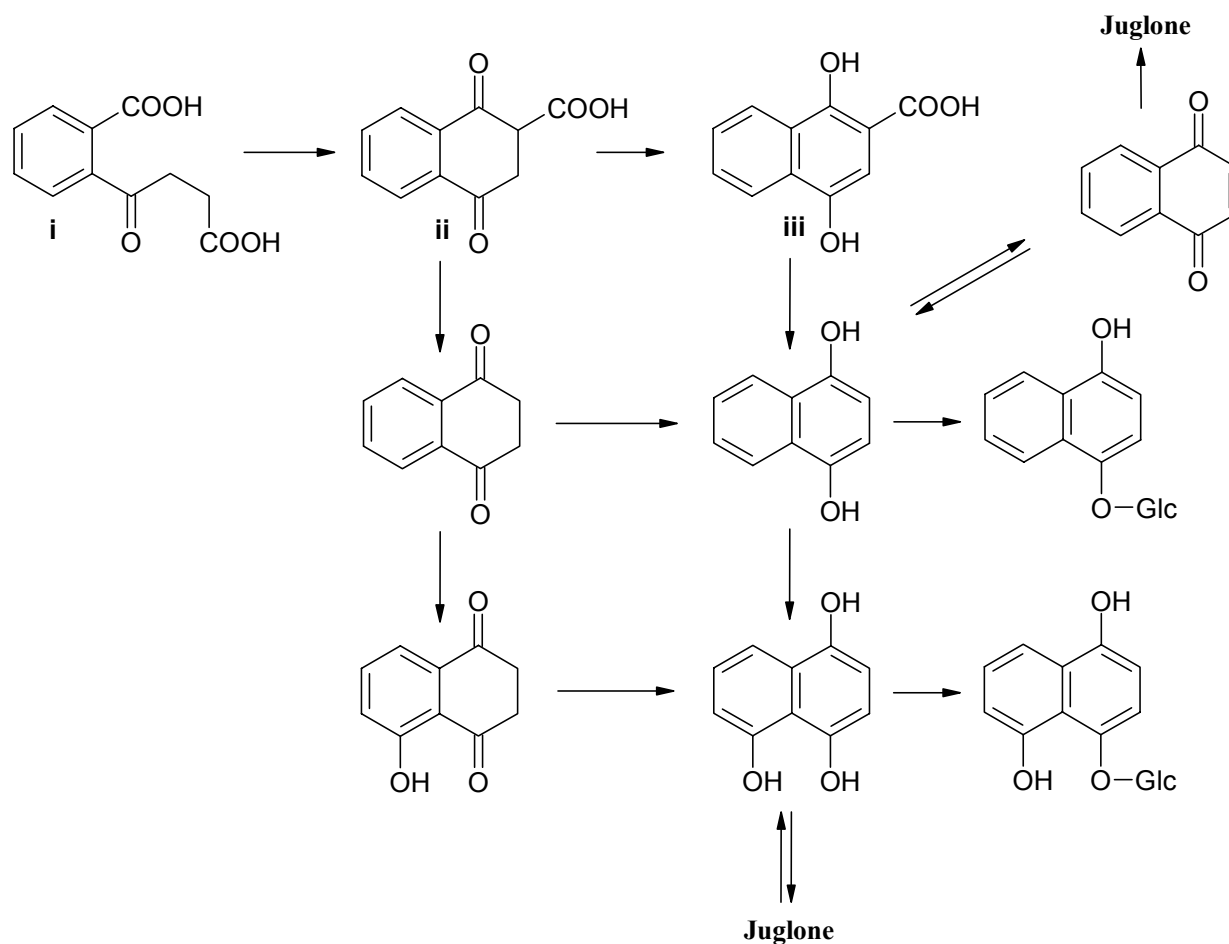


Figure I-4.4D : Biosynthèse de la juglone dans une culture de *E. coli* mutante  
 Le 1,4-dihydroxy-2-carboxynaphthalène produit également par biosynthèse la vitamine K et la lawsone [157,169,170]. La vitamine K est une naphthoquinone qui possède des propriétés anti-hémorragiques. La lawsone est produite à l'état naturel par une plante originaire d'Arabie *Lawsonia inermis* plus connue sous le nom de henné, utilisé pour teindre en noir la laine, la soie et les cheveux.

La juglone est un métabolite phytotoxique isolée de nombreux champignons (*Mycosphaerella fijiensis* [171], *Juglans regia* [168], *Wangiella dermatitidis* [172]). Elle résulte de la biosynthèse de la mélanine par la voie des acétates à partir du composé 1,4,5-trihydroxynaphthalène (figure I-4.4E) suivant une série de réactions d'oxydoréductions et de déshydratations.

Bibliographie

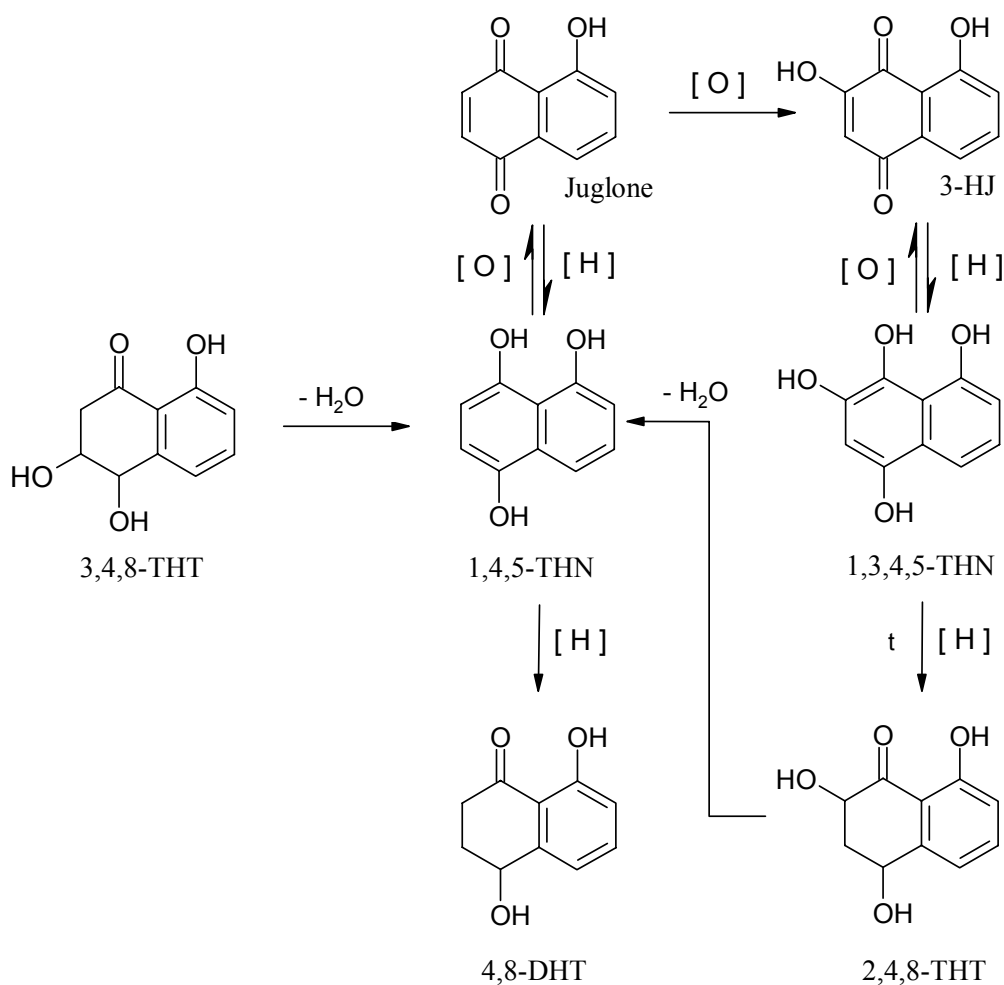


Figure I-4.4E : La juglone d'après la biosynthèse de la mélanine  
 [O] = réaction d'oxydation, [H] = réaction de réduction, -H<sub>2</sub>O = réaction de déshydratation  
 t = site d'inhibition avec le tricyclazole dans *W. dermatitidis*

**Composé 7**

L'acide 2,4-dihydroxy-6-(2-oxo-propionyl)-benzoïque est issu d'une voie polycétide avec cinq unités acétates (figure I-4.5).

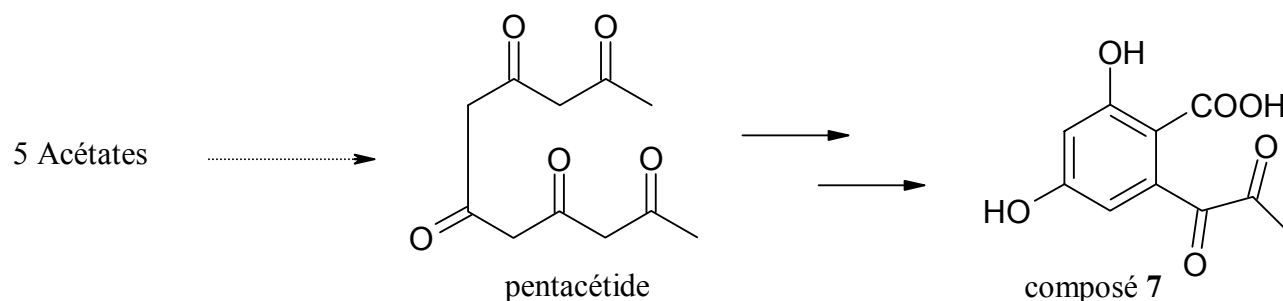


Figure I-5 : Biosynthèse du composé 7

**Composé 9 : Acide linoléique**

La condensation linéaire de plusieurs molécules de malonyl CoA obtenues à partir de l'acide pyruvique et d'acétyl CoA conduit à la formation des acides gras (figure I-4.6A).

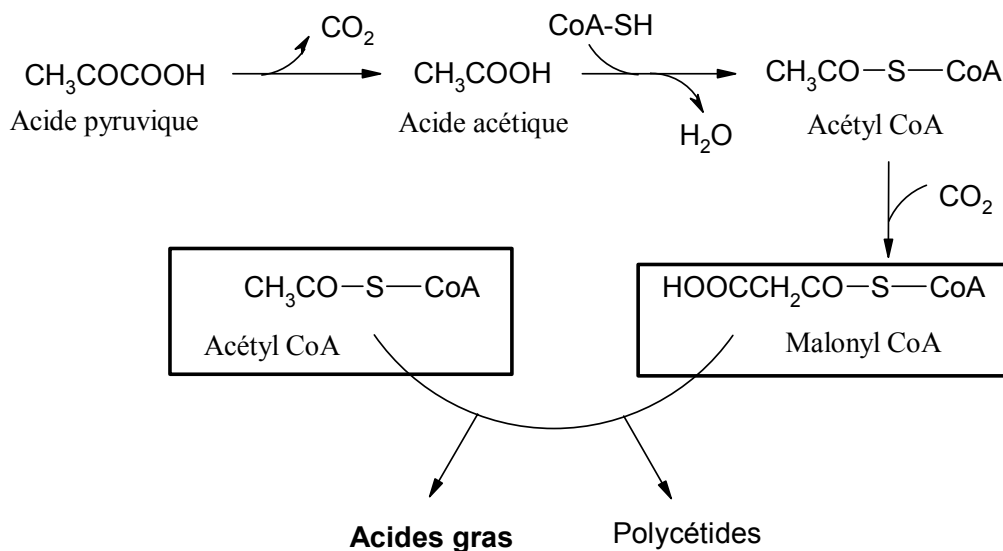


Figure I-4.6A : Formation des acides gras à partir de l'acide pyruvique

L'acide linoléique est obtenu à partir d'une série de réactions de déshydrogénation (figure I-4.6B).

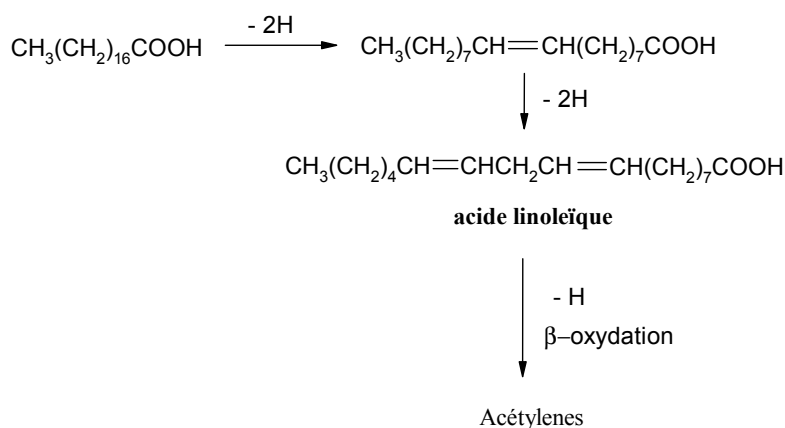


Figure I-4.6B : Biosynthèse de l'acide linoléique

Le métabolisme des acides gras a quatre rôles physiologiques majeurs :

- Eléments constitutifs des phospholipides et des glycolipides, constituants importants des membranes biologiques.
- Les protéines cytosoliques solubles peuvent avoir un ancrage membranaire grâce à la liaison covalente d'un acide gras.

## Bibliographie

- Ils sont utilisés comme source d'énergie, sous forme de triacylglycérols ou esters non chargés du glycérol.
- Certains dérivés d'acides gras servent d'hormones et de messagers intracellulaires.

Les acides gras sont liés au coenzyme CoA avant d'être oxydés. L'adénosine triphosphate (ATP) active la formation d'une liaison thioester entre le groupe carboxyle d'un acide gras et le groupe sulfhydryle du CoA. Cette réaction d'activation s'effectue dans la membrane mitochondriale externe, où elle est catalysée par l'acyl CoA synthase (appelée aussi acide gras thiokinase).

### **Composé 10 : Adénosine**

Cinq métabolites dont l'adénosine possédant une base purine ont été isolés de divers champignons (figure I-4.7A). Les composés b, c et d sont formés à partir de l'adénosine sans clivage au niveau de la liaison C-N entre le ribose et la purine.

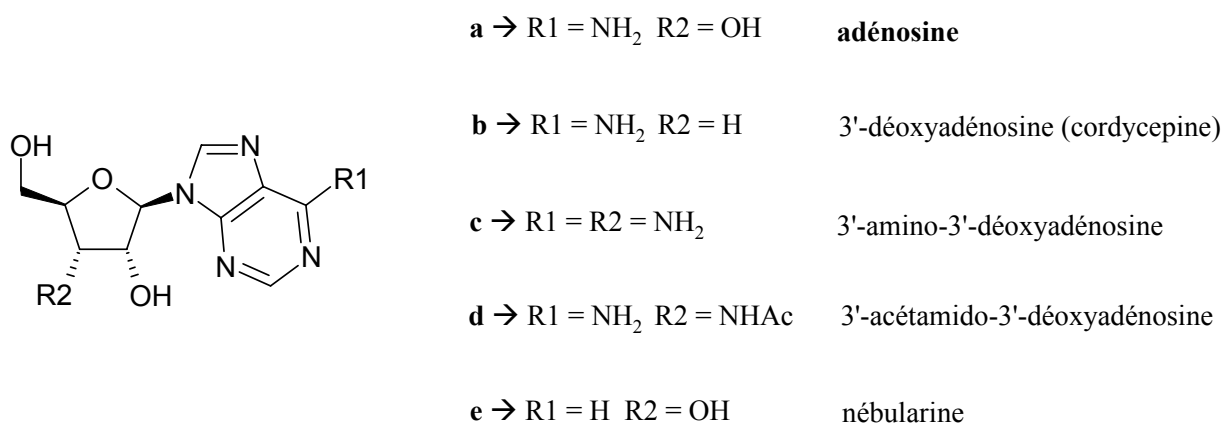


Figure I-7A : Structures de l'adénosine et de ces 4 dérivés

Le précurseur [156] de la biosynthèse de l'adénosine est le ribose phosphaté sur l'alcool primaire (figure I-4.7B).

Bibliographie

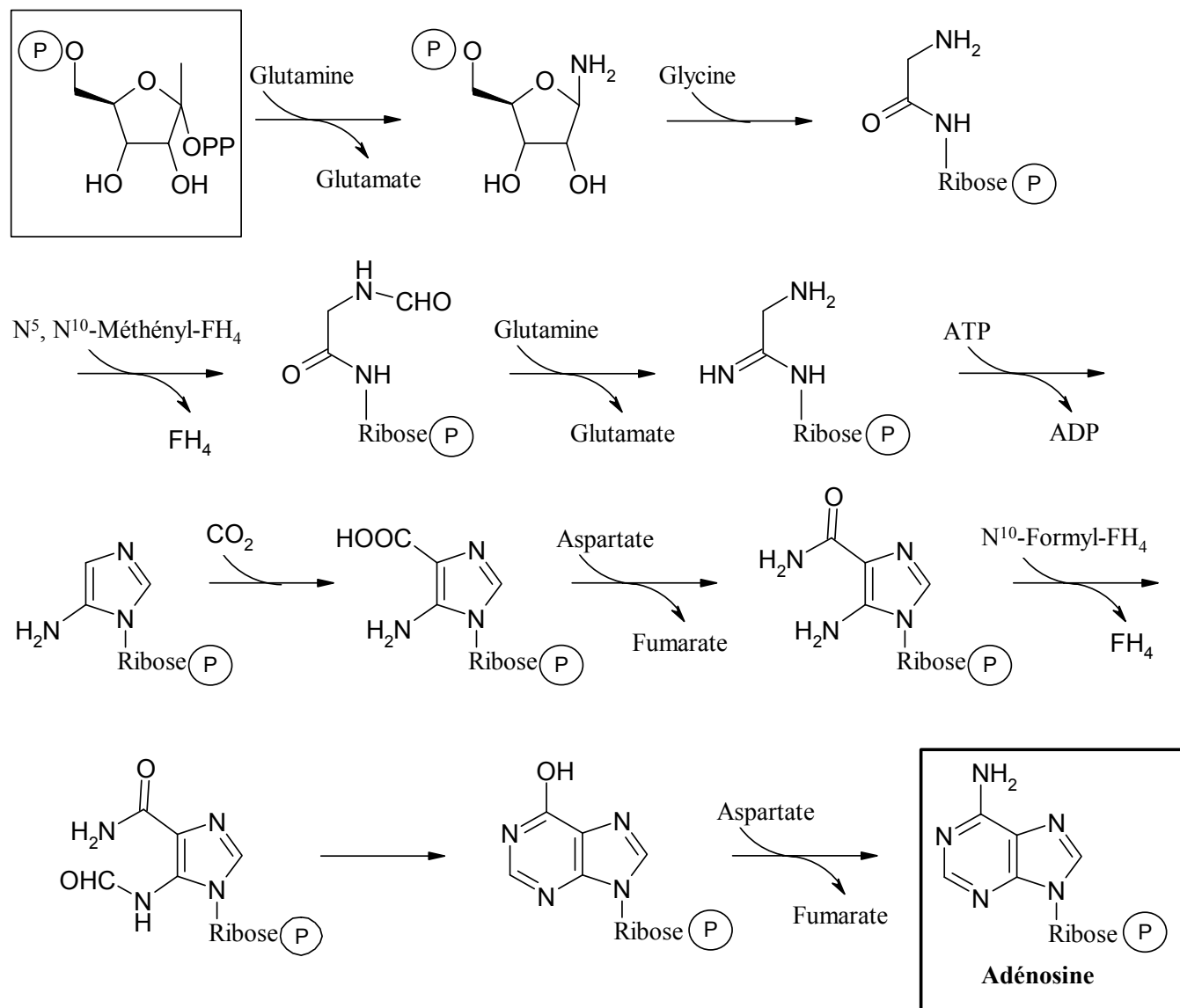


Figure I-4.7B : Biosynthèse de l'adénosine  
 FH4 = acide tétrahydrofolique

**Composé 11 : Acide p-aminobenzoïque**

L'acide p-aminobenzoïque provient de la voie de l'acide shikimique [170] via l'acide chorismique qui est un intermédiaire instable (figure I-4.8A).

Bibliographie

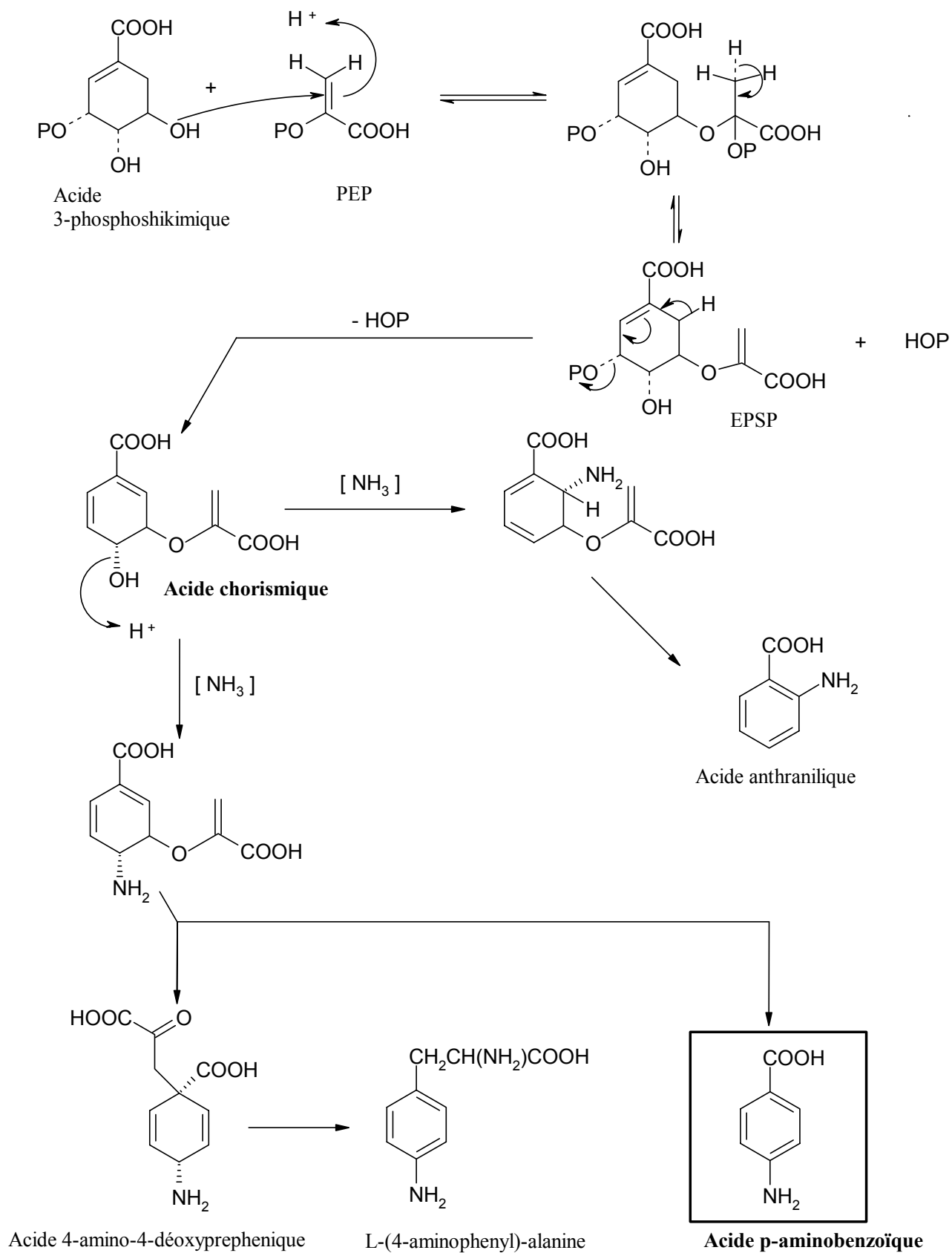


Figure I-4.8A : Biosynthèse de l'acide p-aminobenzoïque par la voie de l'acide shikimique [157]

## Bibliographie

La biosynthèse du composé **11** *via* le chorismate dans *E. coli* (figure I-4.8B) découle de trois enzymes [173,174] :

- PabA, la glutamine amidotransférase
- PabB, la 4-amino-4-déoxychorismate synthase
- PabC, la 4-amino-4-déoxychorismate lyase

L'enzyme PabA permet de libérer de l'ammoniaque provenant de la glutamine, donnant le glutamate. L'activité de la glutamine synthétase [110] est liée à la complexation des enzymes PabA et PabB, permettant le transfert d'une molécule de  $\text{NH}_3$  sur le chorismate. La PabC intervient seulement dans la dernière étape pour l'obtention du p-aminobenzoate.

Dans *Bacillus subtilis* la biosynthèse du composé **11** est due à l'enzyme PabC contenant un pyridoxal 5'-phosphate comme cofacteur (figure I-4.8C).

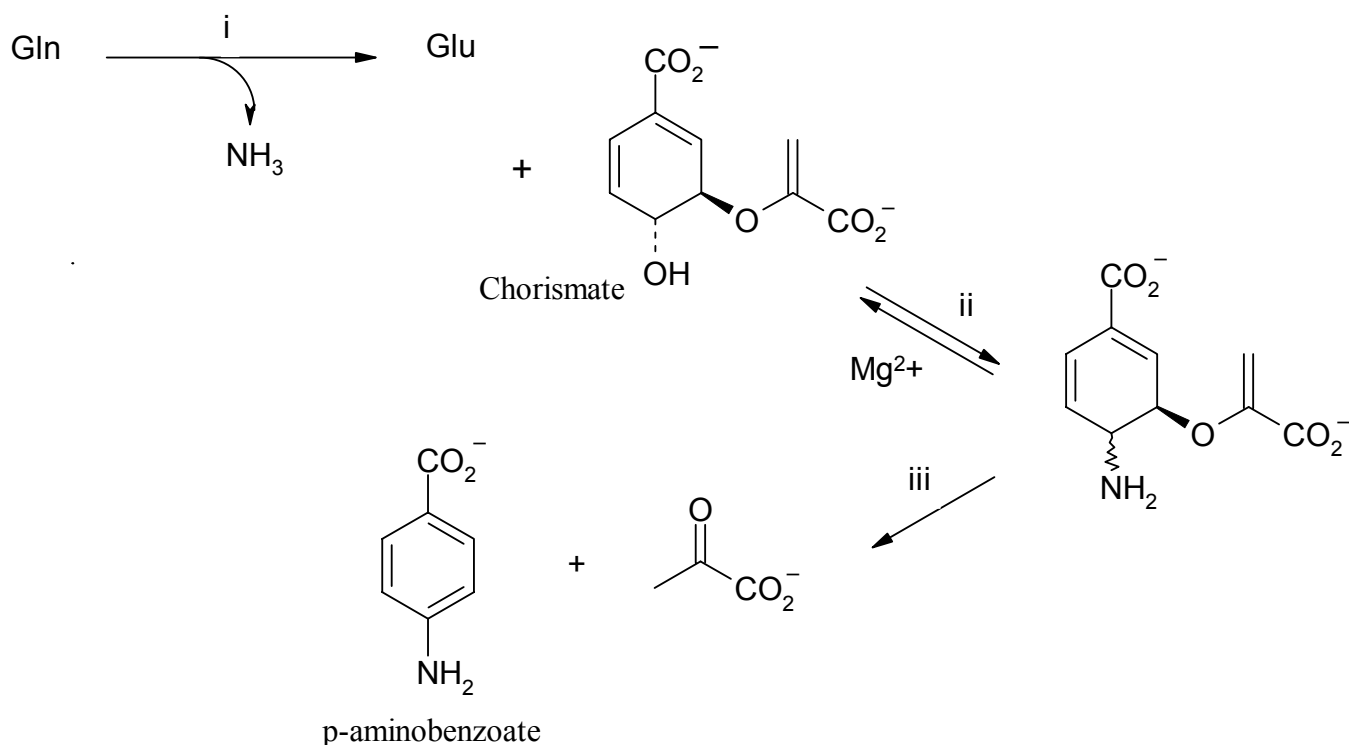


Figure I-4.8B : Biosynthèse du p-aminobenzoate avec les enzymes PabA (i), PabB (ii) et PabC (iii)  
Gln = glutamine, Glu = glutamate

## Bibliographie

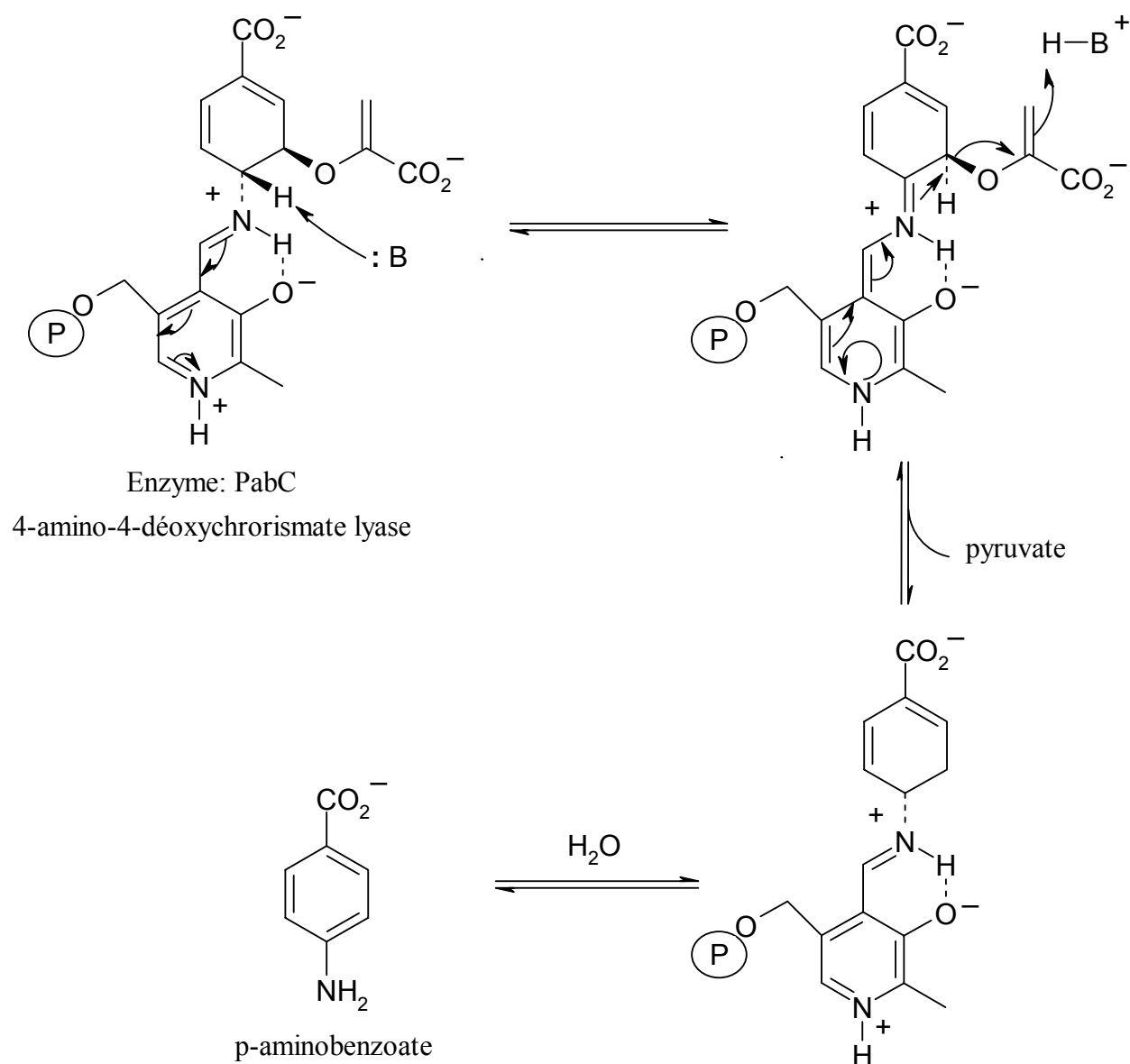


Figure I-4.8C : Biosynthèse du p-aminobenzoate avec l'enzyme PabC

Le composé **11** est un des précurseurs de la biosynthèse de l'agaritine [175] isolé de *Agaricus bisporus*, le champignon de Paris (figure I-4.8D). Une étude de toxicologie alimentaire a montré que l'agaritine, substance non dangereuse, se dégrade avec le temps en dérivés qui sont fortement cancérigènes. Il faut une semaine pour que la moitié de l'agaritine présente dans le champignon se décompose. Cette substance limite la formation de la catéchol-mélanine [176]. Elle attaque chimiquement les o-quinones rendant impossible la polymérisation radicalaire qui conduit à la mélanine.

Bibliographie

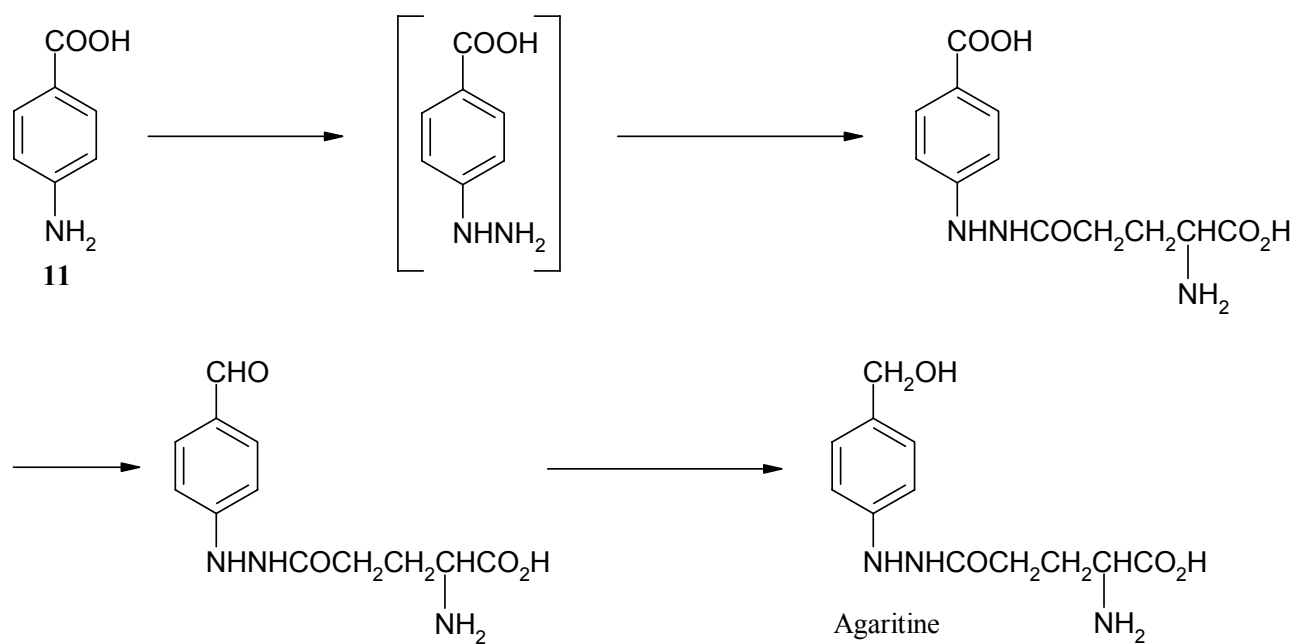


Figure I-4.8D : Biosynthèse de l'agaritine via l'acide p-aminobenzoïque [177]

Ce métabolite est également un précurseur de la candidine (figure I-4.8E), étude effectuée dans *Streptomyces griseus*.

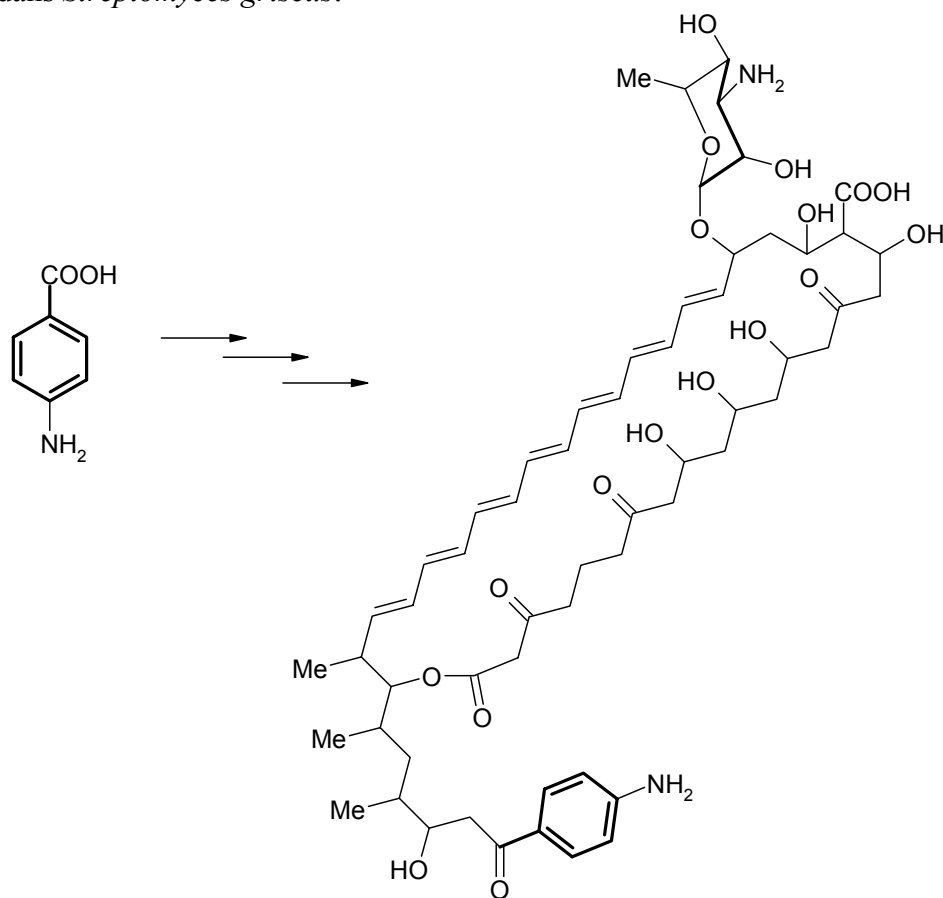


Figure I-4.8E : Biosynthèse de la candidicine [178]

La candidicine est un antibiotique naturel isolé de *S. griseus*. Elle possède aussi des propriétés antifongiques envers les espèces *Candida*.

**Composé 12 : Acide 2,3-dihydroxybenzoïque**

En 1968, d'une souche mutante de *Streptomyces rimosus* [179,180,181] a été isolé l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque comme dérivé biosynthétique de l'acide shikimique *via* l'acide chorismique (figure I-4.9A).

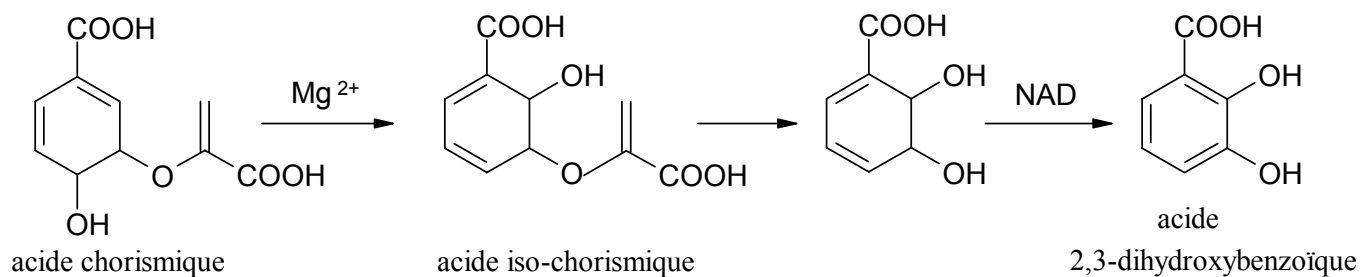


Figure I-4.9A : Biosynthèse du composé 12

Le composé 12 est le précurseur de l'enterochéline qui forme un complexe avec le fer III permettant de le transporter à l'intérieur des cellules [115] (figure I-4.9B). L'enterochéline est un cycle trimère de la 2,3-dihydroxy-N-benzoyl-L-serine (DBS). Ce composé a été isolé et caractérisé d'une culture mutante de *E. coli* [182] et d'une culture de *S. typhimurium* en 1970.

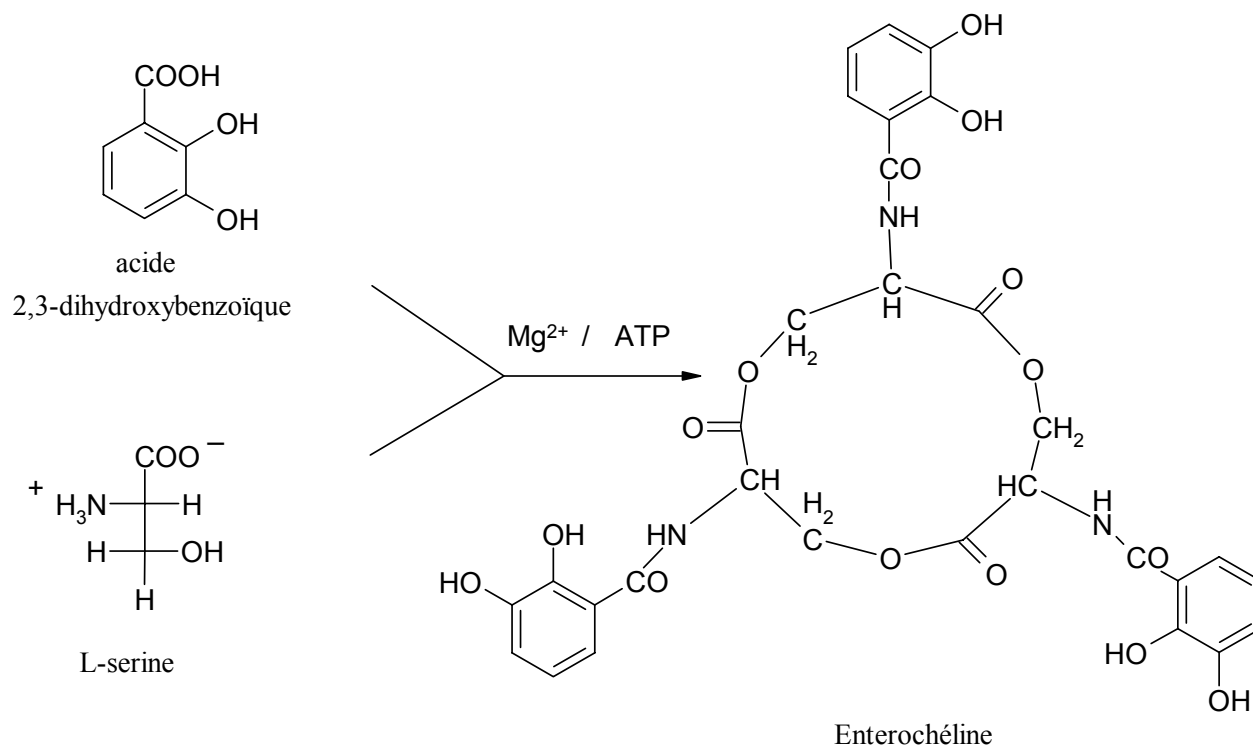


Figure I-4.9B : Biosynthèse de l'enterochéline

Ayer [86] suggère que l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque complexe le fer III donnant ainsi la couleur bleue qui se développe sur les pins malades (figure I-4.9C).

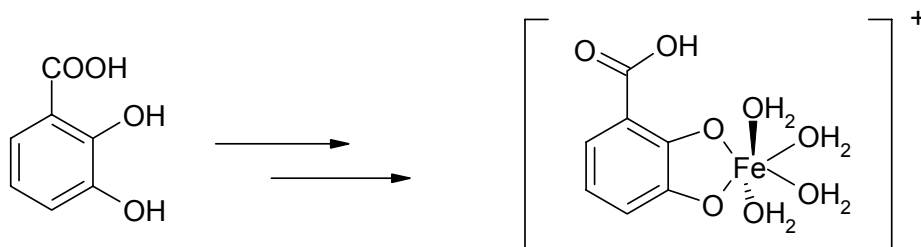


Figure I-4.9C : Complexe bleu de fer

Ce métabolite est également produit par biosynthèse à partir du tryptophane dans *Claviceps paspali* (figure I-4.9D).

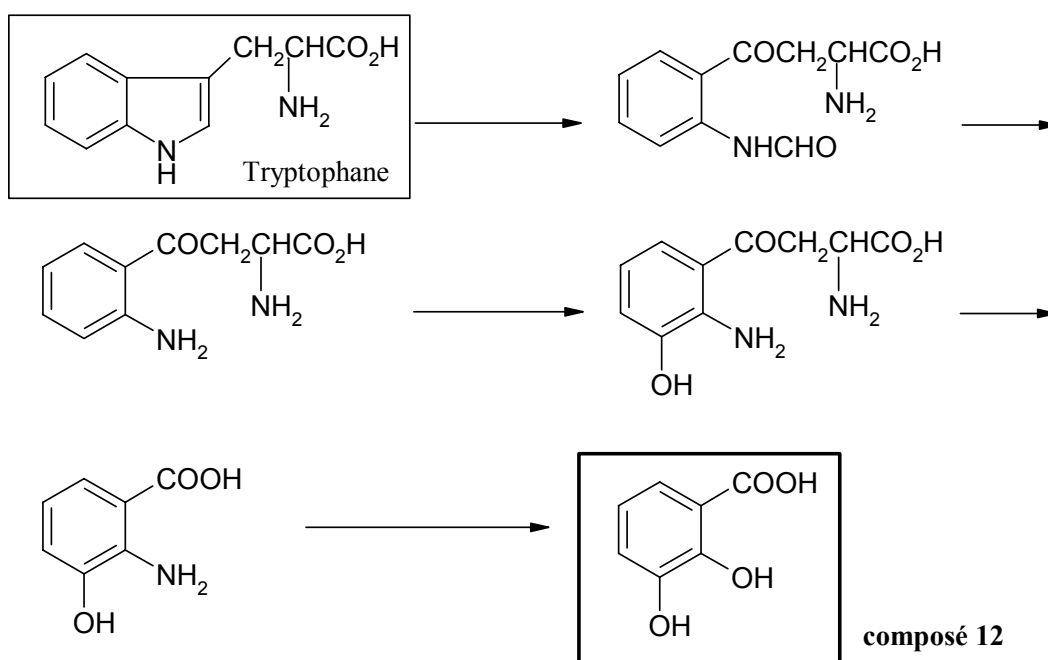


Figure I-4.9D : Biosynthèse du composé 12 *via* le tryptophane

En 1978, une étude dans *Aspergillus sojae* [183] a permis de déceler la présence du composé 12 dans la biosynthèse du catéchol à partir de la tyrosine (figure I-4.9E).

## Bibliographie

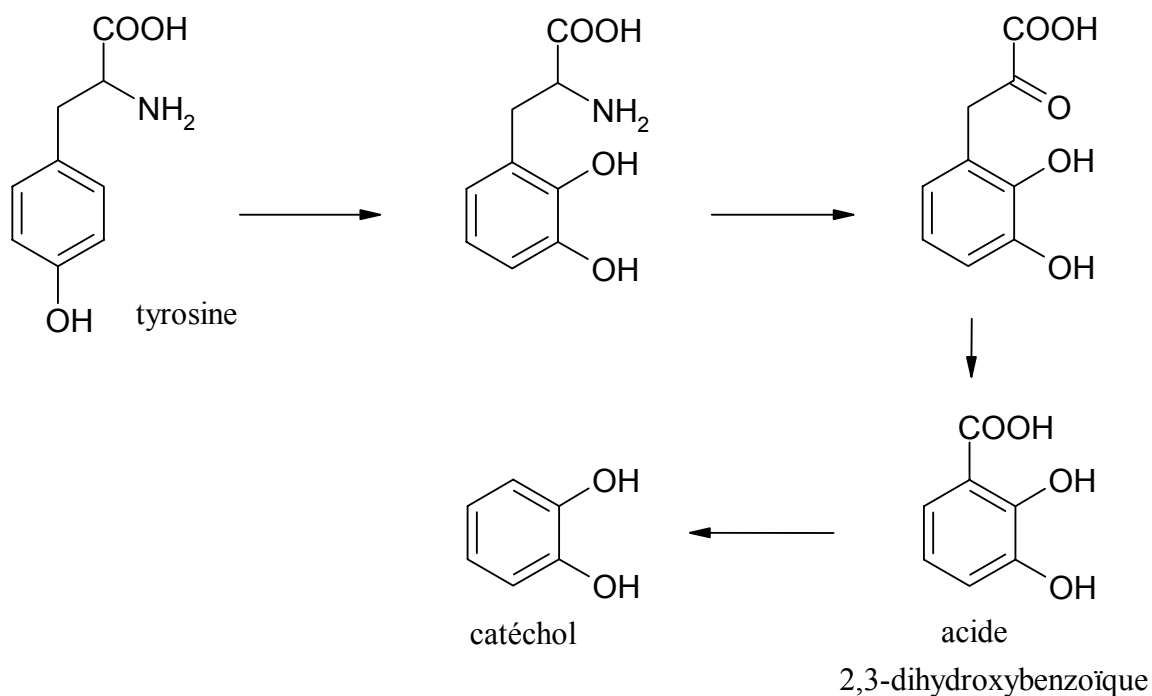


Figure I-4.9E : Biosynthèse du composé 12 *via* la tyrosine

Le catabolisme de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque [184] donne l'acide 3-Oxo-hexanedioïque et l'acide 2,5-Dioxo-hexahydro-furo{3,2-b}furan-3-carboxylique (figure I-4.9F).

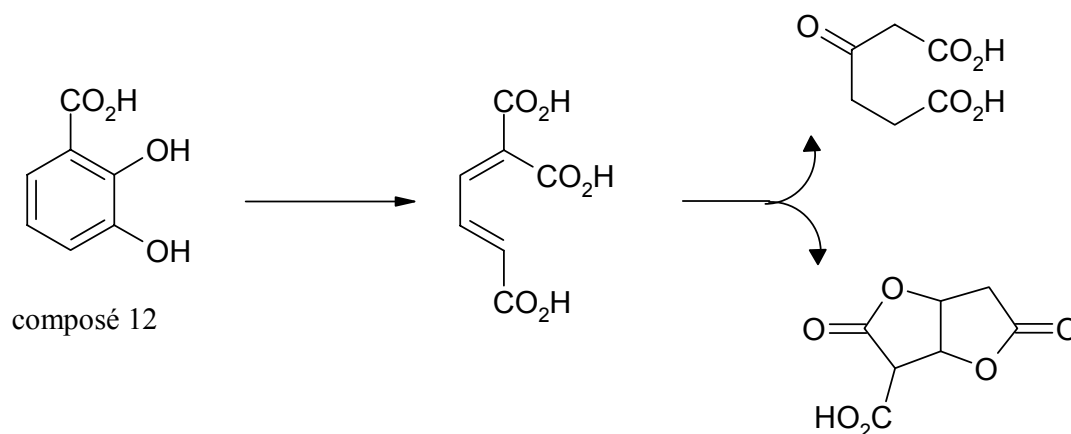


Figure I-4.9F : Catabolisme de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque

## **Composé 13 : Tryptophole**

Le tryptophole [173] (figure I-4.10) est issu du tryptophane [110] qui est un aminoacide essentiel synthétisé par les plantes et les micro-organismes. L'acide 2-aminobenzoïque et l'acide chorismique sont les précurseurs de la biosynthèse du tryptophane.

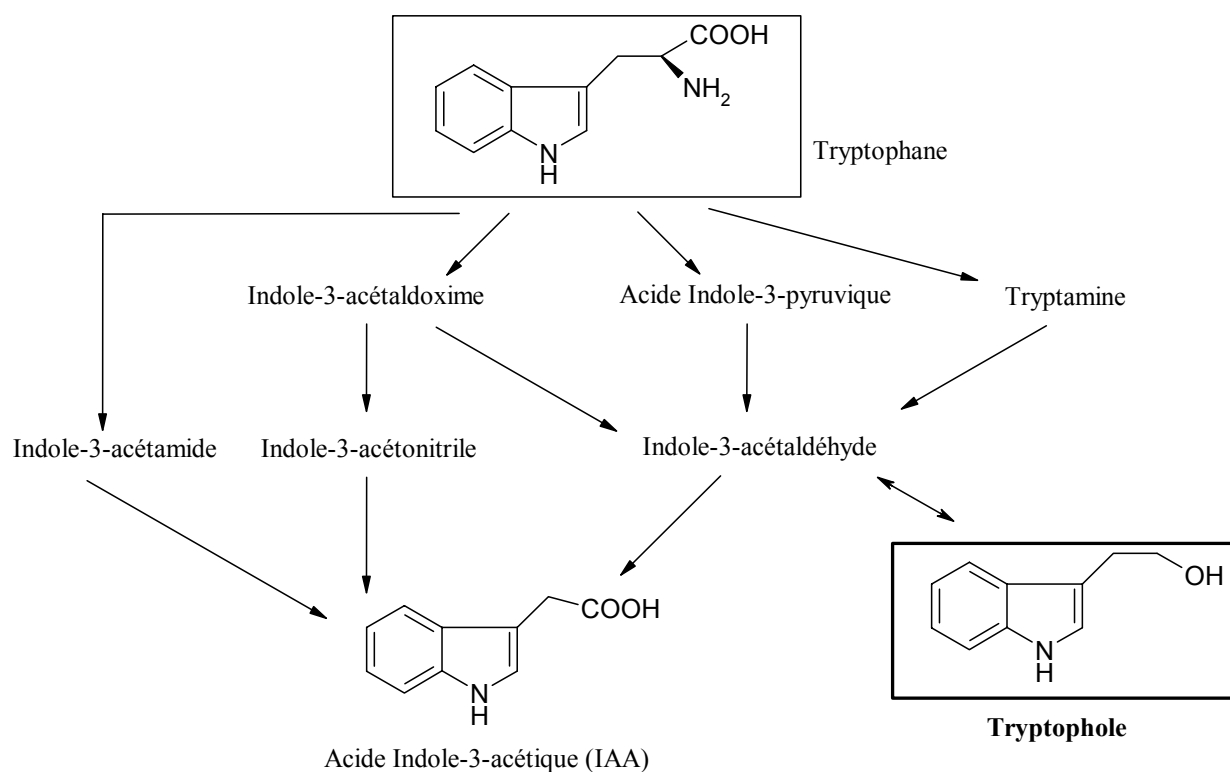


Figure I-4.10 : Biosynthèse du Tryptophole

**Composé 14 : Acide D(+)-3-Phényl-lactique**

L'acide phényl-lactique dans l'espèce *Candida* est obtenu à partir de la phénylalanine, suivi de la réduction de l'acide phényl-pyruvique [185] (figure I-4.11A). Une étude dans le milieu de culture de *Polyorus hispidus* [186] a montré, grâce au marquage au <sup>14</sup>C sur le troisième carbone, qu'au onzième jour, 20 % de la phénylalanine est convertie en acide phényl-lactique et en acide phényl-pyruvique. Dans *Aspergillus niger* les métabolites para-hydroxylés ont été isolés, et empruntent la même voie de biosynthèse. Il est reconnu comme un régulateur de la croissance des plantes, isolé dans la levure rouge de *Sporobolomyces roseus*, *Torula rosea*, *Rhodotorula glutinis*, *R. minuta* et *R. mucilaginosa* [177].

Bibliographie

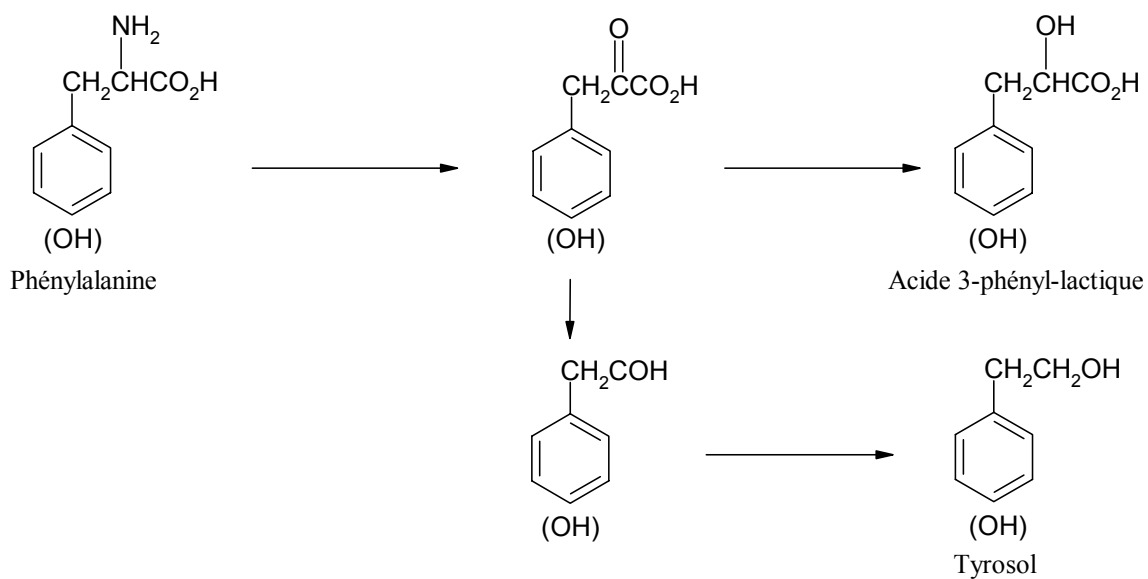


Figure I-4.11A : Biosynthèse de l'acide 3-phényl-lactique

(OH) = même voie de biosynthèse pour les para-hydroxylés

Le composé **14** contribue à la biosynthèse du catéchol et de l'acide 2,5-dihydroxyphenylacétique *via* la phénylalanine dans *Aspergillus sojae* [126] (figure I-4.11B).



Bibliographie

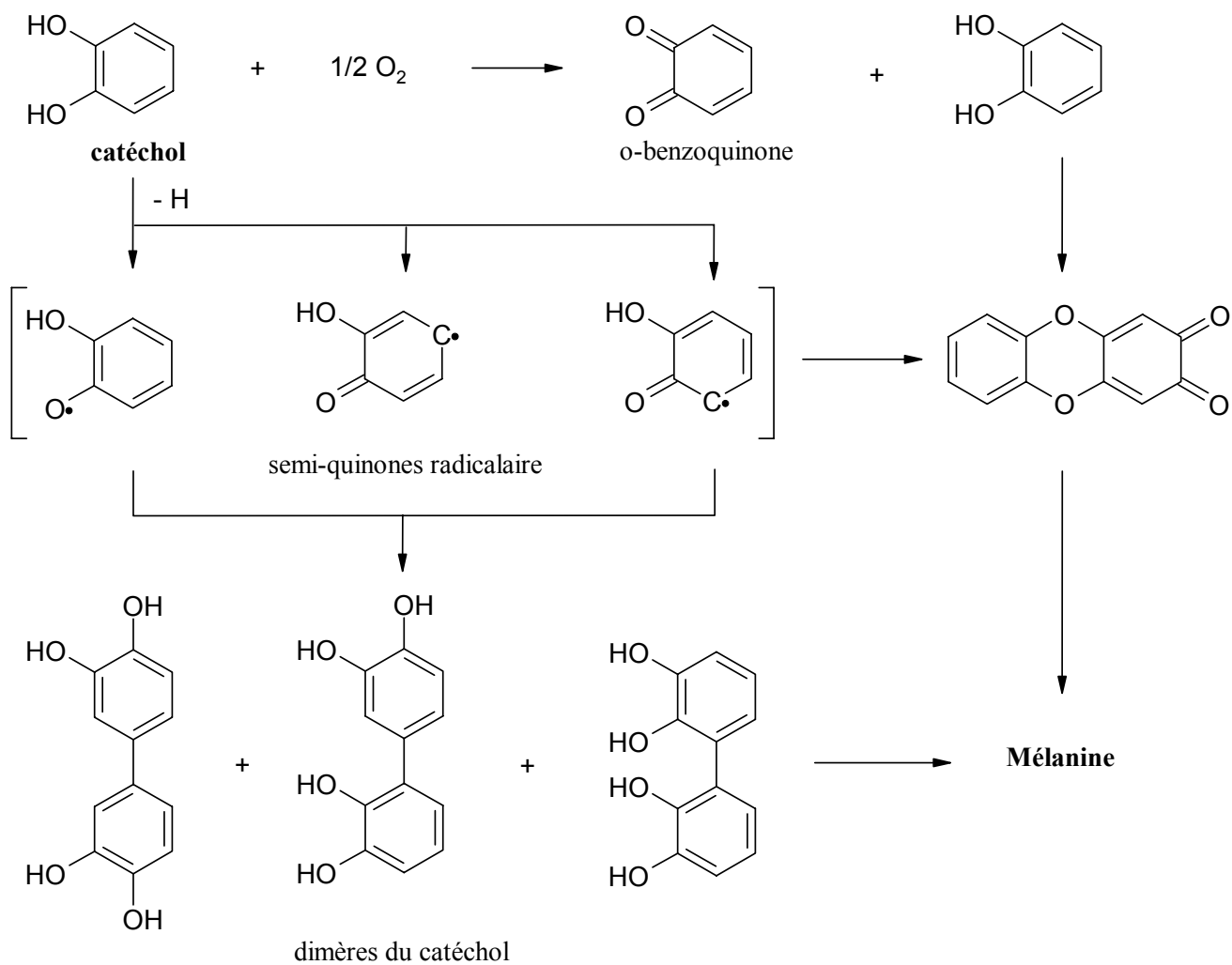


Figure I-4.11C : Biosynthèse de la catéchol-mélanine

**Composé 15 : Cis 1(2H) 3,4-dihydro-3, 4, 6, 8-tétrahydroxynaphtalénone**

Le composé **15** provient, par une série de réactions de réduction, de la flavioline [187] qui est un métabolite de la biosynthèse de la mélanine (figure I-4.12).

## Bibliographie

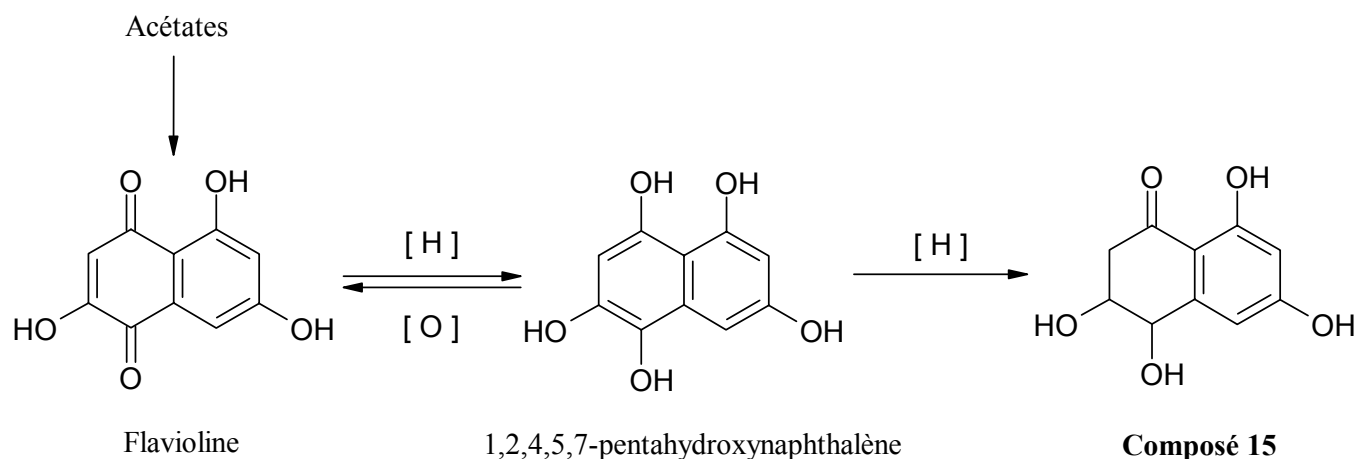


Figure I-4.12 : Biosynthèse du composé 15 *via* la flavioline

### **Composé 16 : 1(2H) 3,4-Dihydro-3,6,8-trihydroxynaphthalénone**

La scytalone **16** [177] est un des deux intermédiaires principaux de la mélanine [188] (figure I-4.13A). L'étude de ce précurseur a été effectuée dans plusieurs agents pathogènes : en 1976 *Verticillium dahliae* [189], en 1977 *Alternaria* [190], en 1979 *Thielaviopsis basicola* [191], en 1981 *Phialophora lagerbergii* [192,193], en 1983 *Colletotrichum lagenarium* [194] et en 1984 *Wangiella dermatitidis* [195]. Le second précurseur est la vermelone [196].

Bibliographie

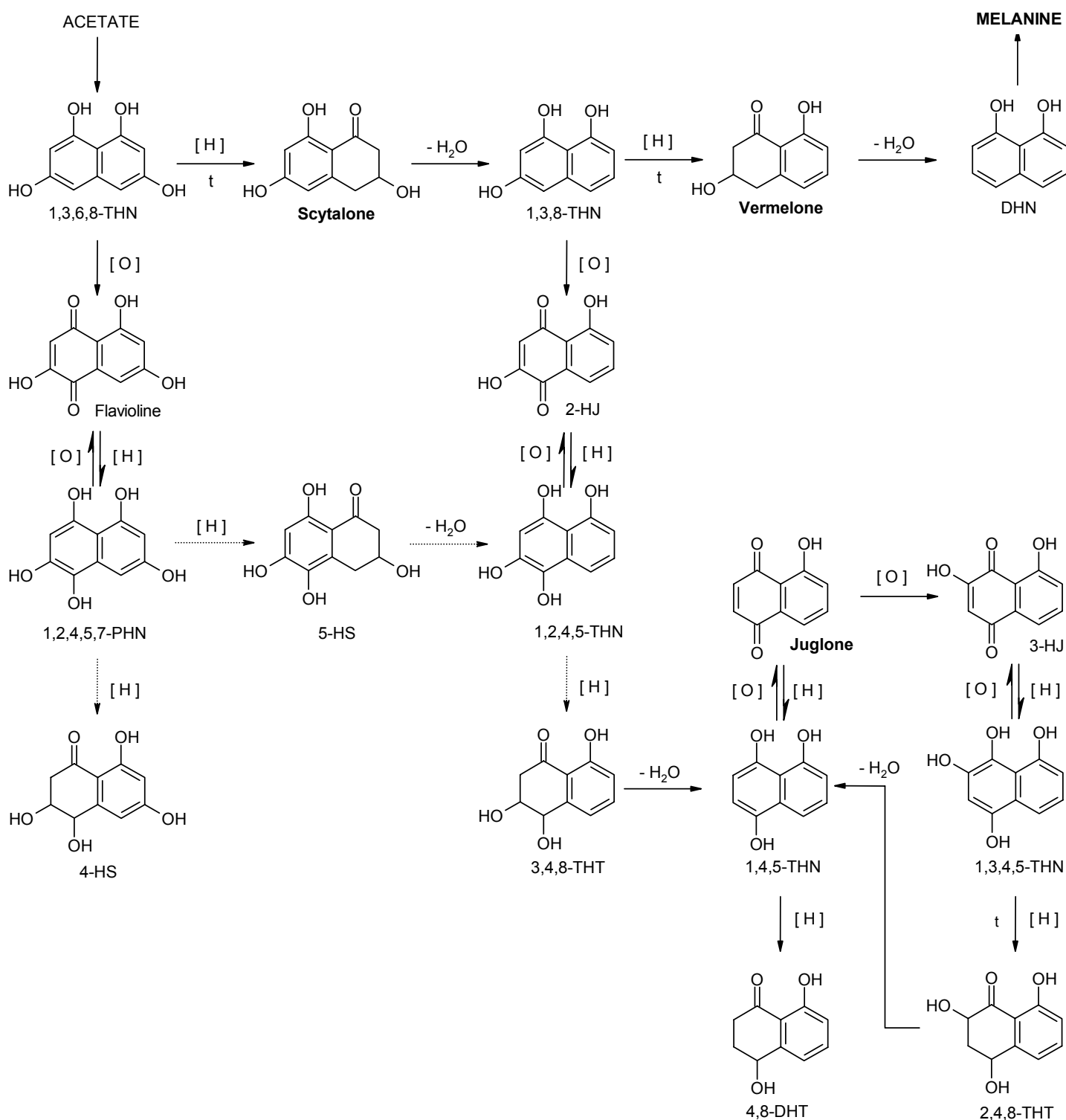


Figure I-4.13A : Schéma de la biosynthèse de la mélanine et des dérivés

[O] = oxydation, [H] = réduction, t = site d'inhibition par le tricyclazole

Afin de la différencier de la catéchol-mélanine, elle est nommée DHN-mélanine provenant de la 1,8-dihydroxynaphthalène (DHN) qui est son principal précurseur [197] (figure I-4.13B).

## Bibliographie

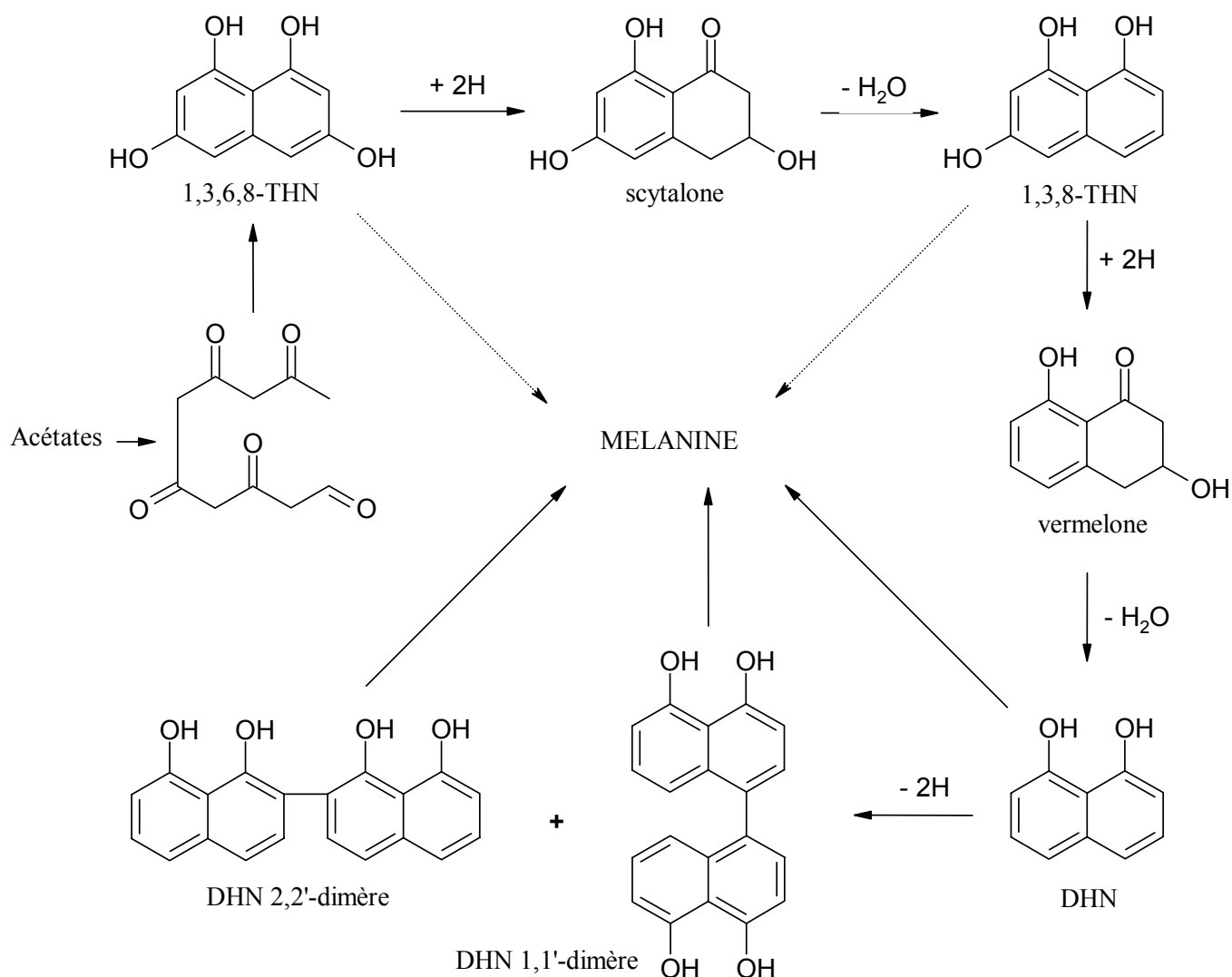


Figure I-4.13B : Précurseurs de la DHN-mélanine

La catéchol ou la DHN mélanine, sont des pigments noirs qui protègent le champignon contre la lumière UV, l'irradiation solaire et les températures extrêmes. Le degré de protection est proportionnel à la concentration de la mélanine [198] dans les cellules des spores.

Dans un type indigène de *V. dahliae*, la mélanine se présente sous forme de granules dans les parois cellulaires des microsclérotés et dans le réseau fibrillaire qui encapsule les parois [199]. Seuls les microsclérotés mutants traités avec la (+)-scytalone forment également des granules de mélanine et deviennent noirs. Le taux de grains maximal est atteint pour des cultures de cinq à huit jours. Les observations effectuées par Wheeler suggèrent que la scytalone est un intermédiaire naturel de la synthèse de la mélanine chez *V. dahliae*.

Les marquages isotopiques des acétates (1,2-<sup>13</sup>C) [136,200] démontrent que la scytalone dérive directement de la 1,3,6,8-Tétrahydroxynaphthalène (figure I-4.13C). Les deux arrangements des unités acétates pour la formation des cycles sont de probabilité égale.

## Bibliographie

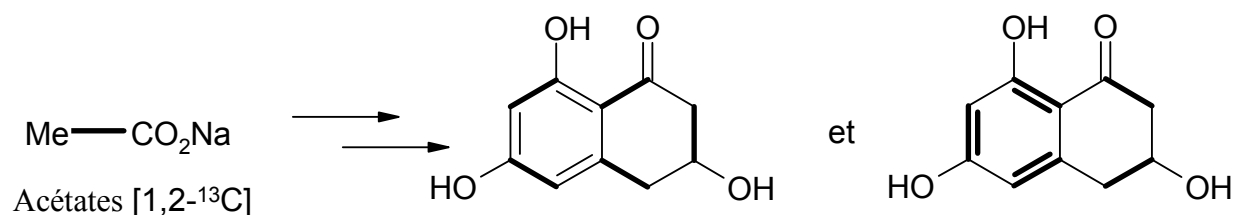


Figure I-4.13C : Marquage isotopique de la scytalone [177]

Wheeler a réalisé en 1983 sur vingt-six champignons différents [201] une étude sur la biosynthèse de la mélanine avec un inhibiteur, le tricyclazole [202,203] (5-méthyl-1,2,4-triazolo(3,4 b)-benzothiazole) (figure I-4.13D). Dix neuf ascomycètes et champignons imparfaits métabolisent la mélanine *via* la (+)-scytalone, la vermelone et la 1,8-dihydroxynaphthalène. Le tricyclazole bloque *in vivo* ce chemin biosynthétique. Nous observons alors une coloration du champignon et une accumulation des composés suivants : la 2-hydroxyjuglone (2-HJ) et la flavioline. Sept champignons, six basidiomycètes et un ascomycète (*Aspergillus niger*), ne métabolisent pas la mélanine et le tricyclazole n'a pas d'effet sur eux. Les basidiomycètes et de moindre importance les champignons imparfaits utilisent d'autres voies de biosynthèse.

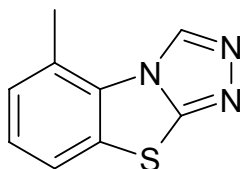


Figure I-4.13D : Structure du tricyclazole

Dans *Pyricularia oryzae*, des effets différents du tricyclazole ont été observés en fonction de sa concentration [204,205]. Avec une concentration de 0.01 à 1 µg.ml<sup>-1</sup> en tricyclazole, les métabolites prépondérants qui s'accumulent dans le milieu de culture sont la 2-hydroxyjuglone (2-HJ) et la flavioline (3,4,8-DTN). Au bout de cinq jours de culture, la quantité de ces deux composés est maximale puis décroît pour n'être à l'état de trace qu'à partir du dixième jour. Pour une concentration plus élevée (1 à 10 µg.ml<sup>-1</sup>), l'accumulation de 2-HJ et 3,4,8-DTN est moins importante indiquant la possibilité d'existence de nouvelles branches de biosynthèse.

## Coumarines

Deux coumarines [206,207] ont été identifiées en LC/MS<sup>n</sup> dans l'étude du matériel végétal, la scopolétine [208,209,210,211] et l'umbélliférone [212] (figure I-4.14A).



Figure I-4.14A : Structures des coumarines

## Bibliographie

Dans les plantes, les coumarines sont généralement produites par la voie de biosynthèse de l'acide shikimique *via* l'acide chorismique (figure I-4.14B). L'étape clé est la transformation de la phénylalanine en acide trans-cinnamique par action de l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase avec élimination d'une molécule de  $\text{NH}_3$ .

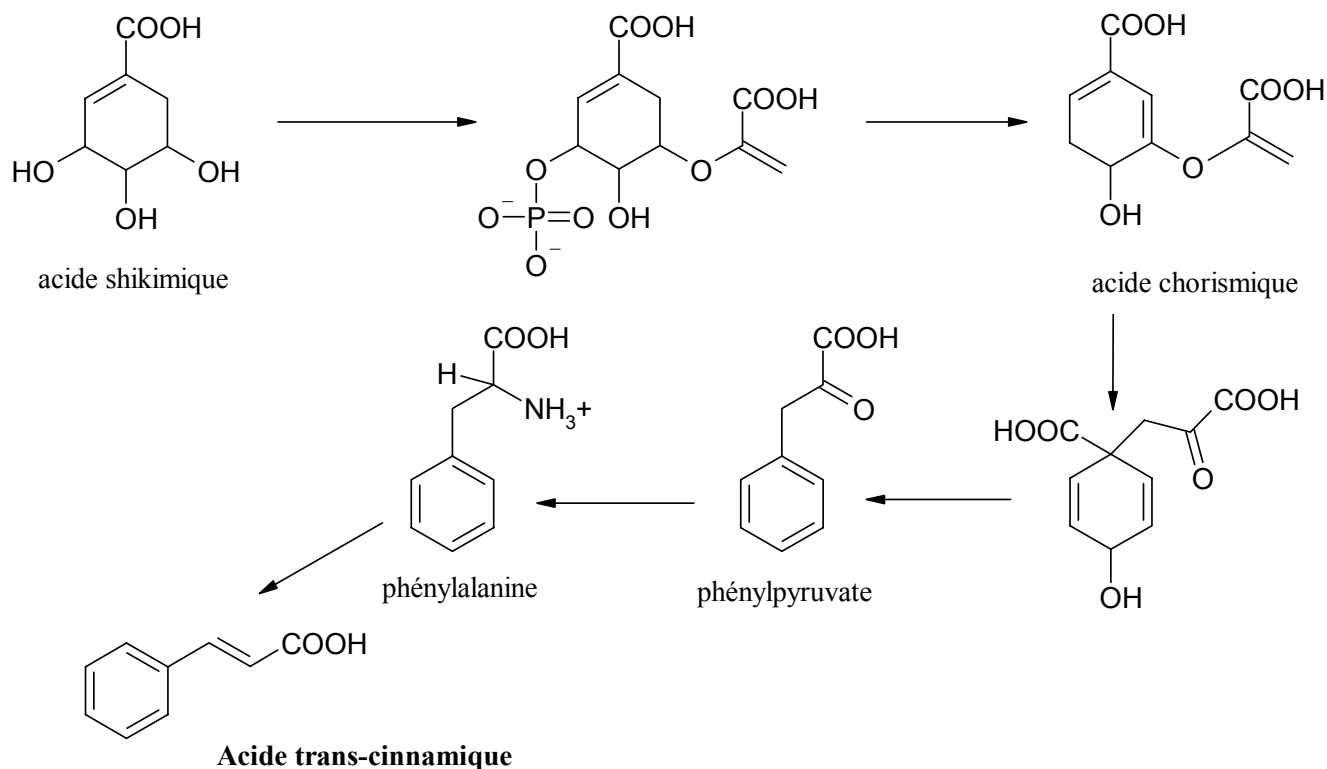


Figure I-4.14B : Biosynthèse de l'acide trans-cinnamique

Le groupe phosphoryle provenant de l'ATP est transféré sur l'acide shikimique par substitution nucléophile. L'élimination du phosphate donne l'acide chorismique. L'enzyme chorismate mutase catalyse le réarrangement de l'acide en préphénate, lui-même transformé en phénylpyruvate par une élimination 1-4. La phénylalanine est ensuite obtenue puis reconvertie en acide trans-cinnamique.

L'hydroxylation et la glucosylation de l'acide trans-cinnamique sont dues à des réactions catalysées par deux enzymes. L'isomérisation trans-cis se fait par irradiation UV, afin d'obtenir le cycle coumarine (figure I-4.14C).

Bibliographie

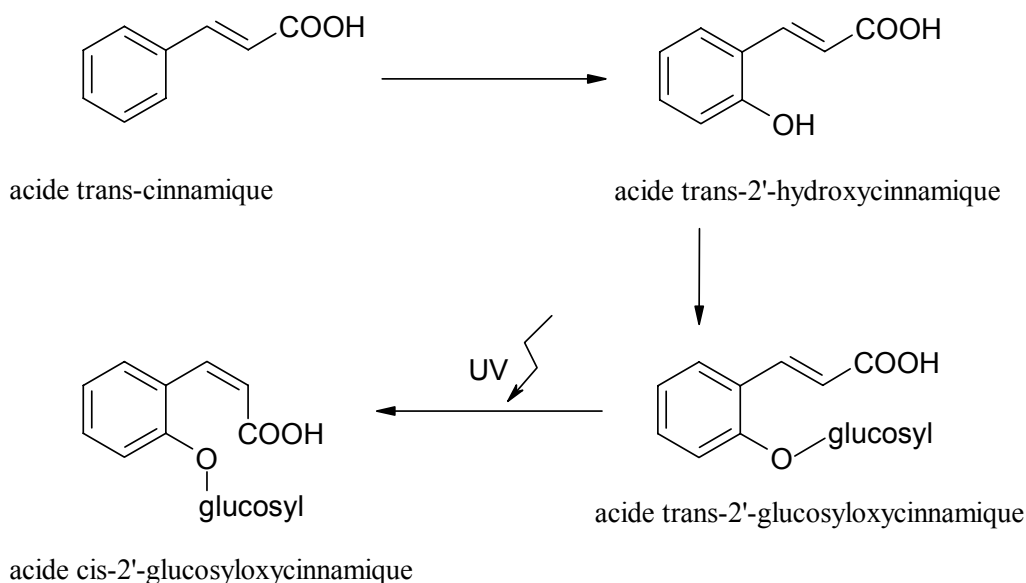


Figure I-4.14C : Isomérisation de l'acide cinnamique

L'umbelliférone et la scopolétine possèdent un hydroxyle en position 7, engendrant de ce fait une para-hydroxylation sur l'acide trans-cinnamique.

Dans une culture de *Hydrangea macrophylla*, deux molécules ont été identifiées : la skimmine et l'acide cis-2,4-di-β-D-glucosyloxycinnamique, composés intermédiaires prédominant dans la biosynthèse du composé **28**. Brown et al. ainsi que Austin et Meyers ont proposé une voie [213] (figure I-4.14D).

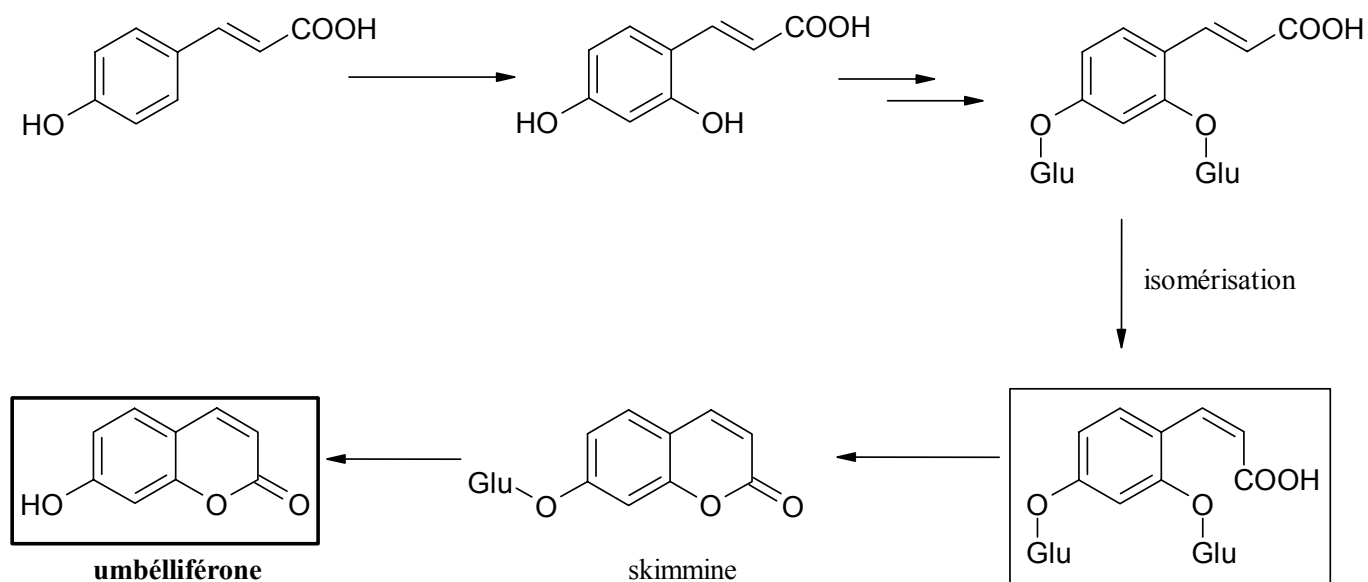


Figure I-4.14D : Biosynthèse de l'umbelliférone *via* la skimmine

Une autre voie de biosynthèse du composé **28** est proposée par une cyclisation oxydative *via* la spirolactone (figure I-4.14E). Ce modèle de réaction a été corroboré *in vivo* par marquage isotopique avec l'oxygène 18 [170].

## Bibliographie

Les mécanismes de l'o-hydroxylation et de la cyclisation oxydative sont très différents. Actuellement l'hypothèse majeure est l'existence dans les cellules des coumarines sous formes glucosées.

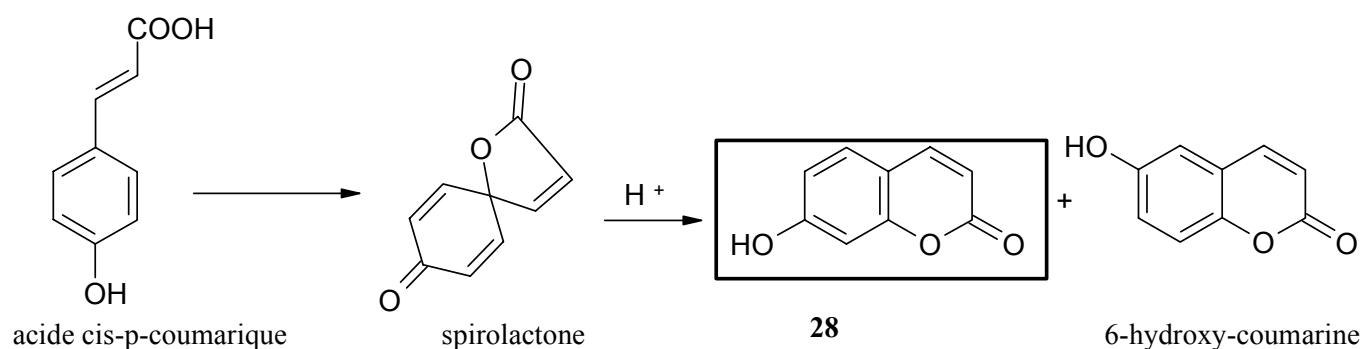


Figure I-4.14E : Biosynthèse de l'umbélliférone *via* la spirolactone

Le précurseur de la scopolétine est l'acide trans-p-hydroxycinnamique. Le schéma de biosynthèse du composé **29** est le même que celui du composé **28** *via* l'aesculetine comme intermédiaire [181] (figure I-4.14F).

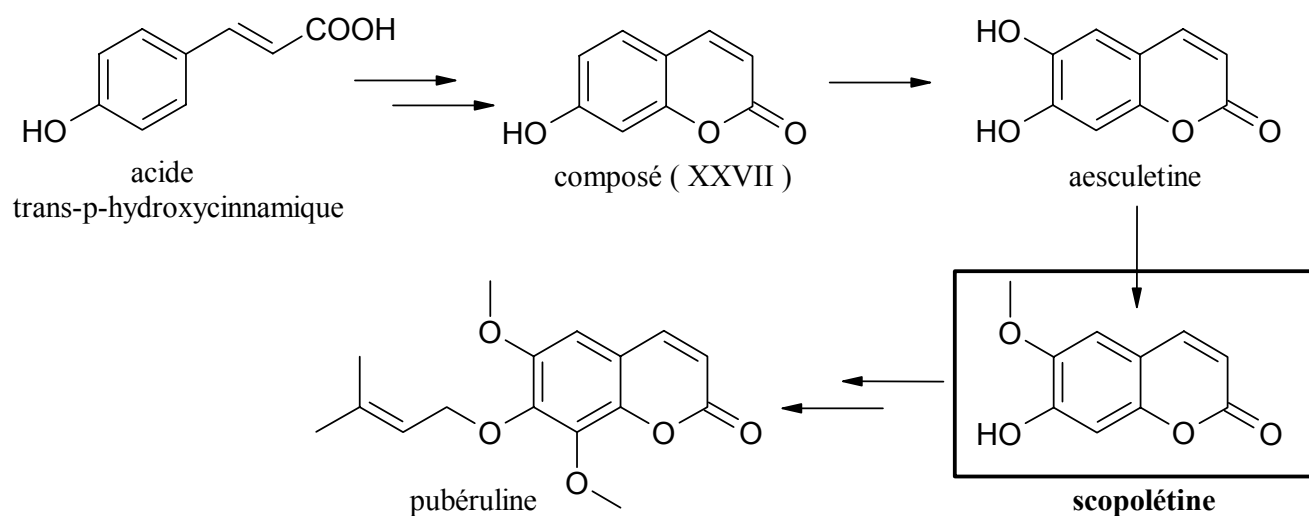


Figure I-4.14F : Biosynthèse de la scopolétine

## 4-Hydroxybenzaldéhyde

Le 4-hydroxybenzaldéhyde a été isolé dans les milieux de cultures de *Phycomyces blakesleanus* [214], de *Streptomyces rimosus* [179], d'*Ophiostoma crassivaginata* [127] et de *Ceratocystis clavigera*, *C. ips*, *C. huntii* [86], responsables de la maladie des taches bleues des pins. Il a été détecté dans un extrait de bois de *Urtica dioica* [215] et dans une herbe marine la *Posidonia oceanica* [216]. Ce composé provient également de *Phaeoacremonium chlamydosporum*, de *P. aleophilum* et de *Fomitiporia punctata*, champignons impliqués dans la maladie de l'esca (vigne) [217].

## Bibliographie

Ce composé est un inhibiteur de la tyrosinase [218], connu sous le nom de polyphénol oxydase (PPO), qui catalyse l'oxydation des substrats phénoliques en o-quinones lesquelles sont polymérisées en pigments de couleur marron, rouge ou noir. Il est également inhibiteur de la cyclique adénosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase, présent dans les rhizomes séchés de *Phragmites communis* [219].

Le précurseur de la biosynthèse du 4-hydroxybenzaldéhyde est l'acide shikimique, *via* l'acide 4-hydroxybenzoïque (figure I-4.15A). Avec les recherches de Doy et Gibson [220] en 1961, et de Iwasaki [221] en 1962, ils conclurent que l'accumulation des composés aromatiques passant par le chemin de biosynthèse de l'acide shikimique résulte de la déficience en azote du milieu.

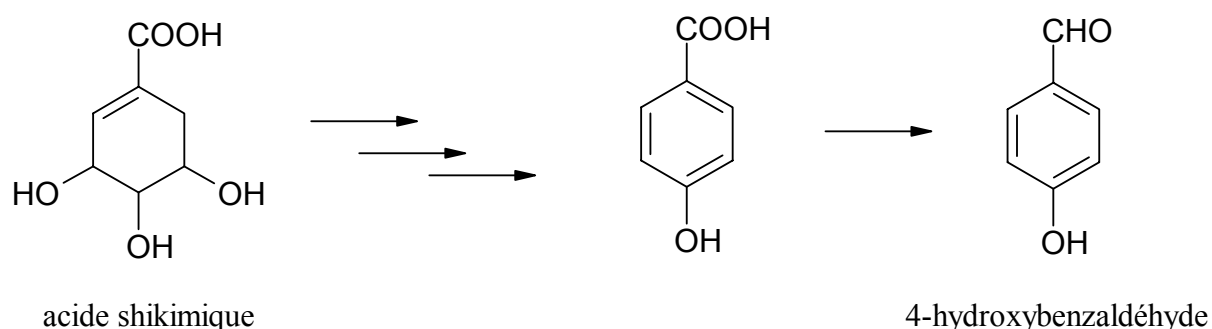


Figure I-4.15A : Biosynthèse du 4-hydroxybenzaldéhyde *via* l'acide shikimique

Rudney et Parson [222,223] déterminent que ce métabolite est un précurseur direct de l'ubiquinone (figure I-4.15B). Les travaux ont été effectués dans une culture anaérobie de bactérie de *Rhodospirillum rubrum*.

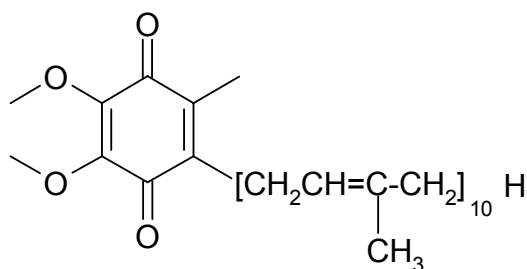


Figure I-4.15B : Structure de l'ubiquinone

L'ubiquinone ou coenzyme Q<sub>10</sub> a été découvert en 1957 par F. Crane. Ce composé est utilisé dans les traitements contre le cancer. La chaîne latérale lipophile permet à la molécule un ancrage dans la membrane interne des mitochondries.

D'après les expériences de Bohm dans *Impatiens balsamina* [224], le 4-hydroxybenzaldéhyde est un précurseur de la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone.

En 1991, Yazaki [225] a effectué une étude sur un extrait de cellules de *Lithospermum erythrorhizon*. En absence de NAD (nicotinamide adénine dinucléotide, accepteur d'électrons essentiel dans l'oxydation des molécules énergétiques) le 4-hydroxybenzaldéhyde est formé



Bibliographie

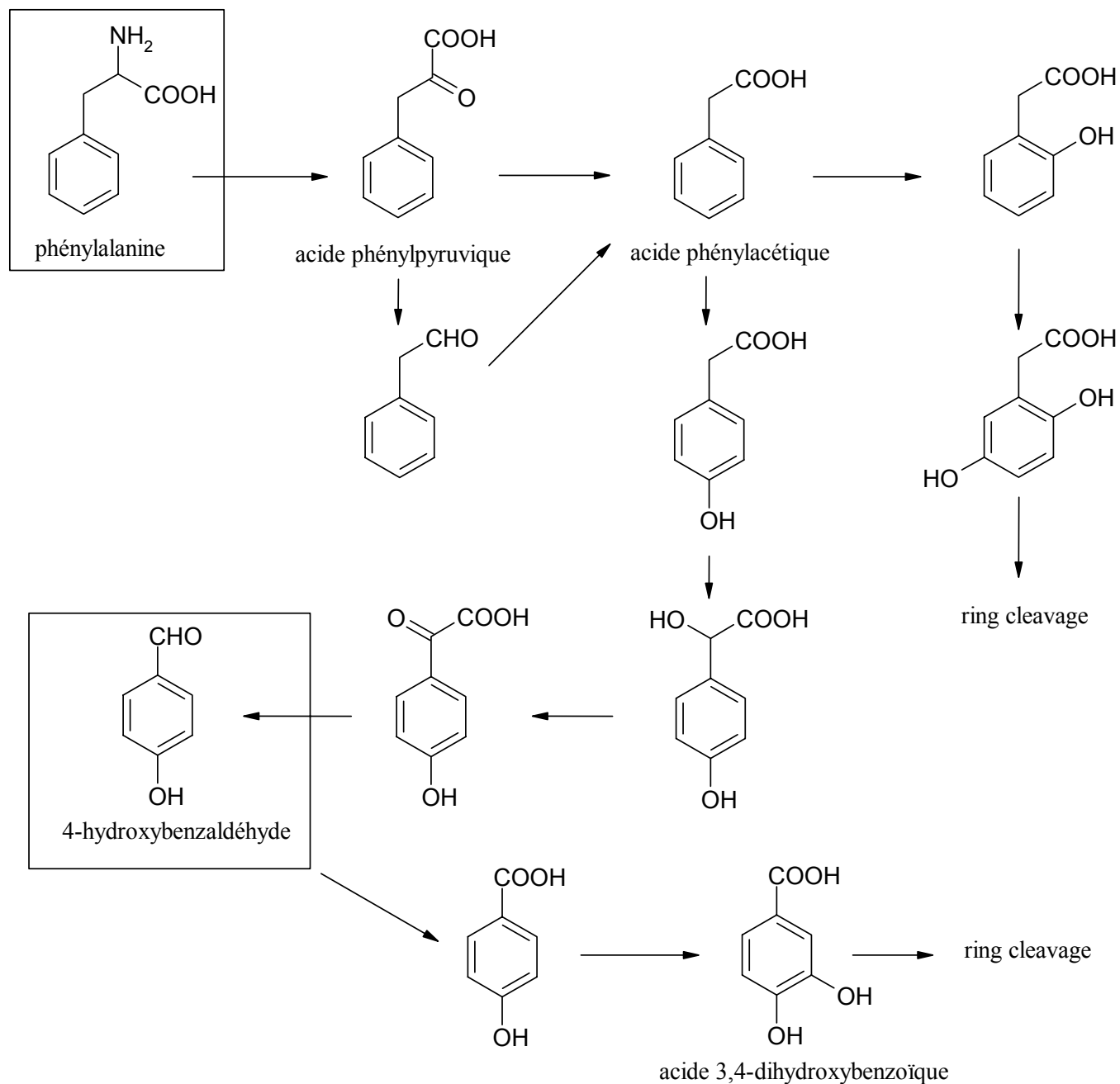


Figure I-4.15D : Catabolisme de la phénylalanine

La quatrième origine biosynthétique provient du catabolisme de la naringénine [227] (5,7,4'-trihydroxyflavanone), étude réalisée dans le soja et les pois cassés (figure I-4.15E). Le 4-hydroxybenzaldéhyde est obtenu après une succession de déshydratation et de décarboxylation à partir du cycle B de la flavanone.

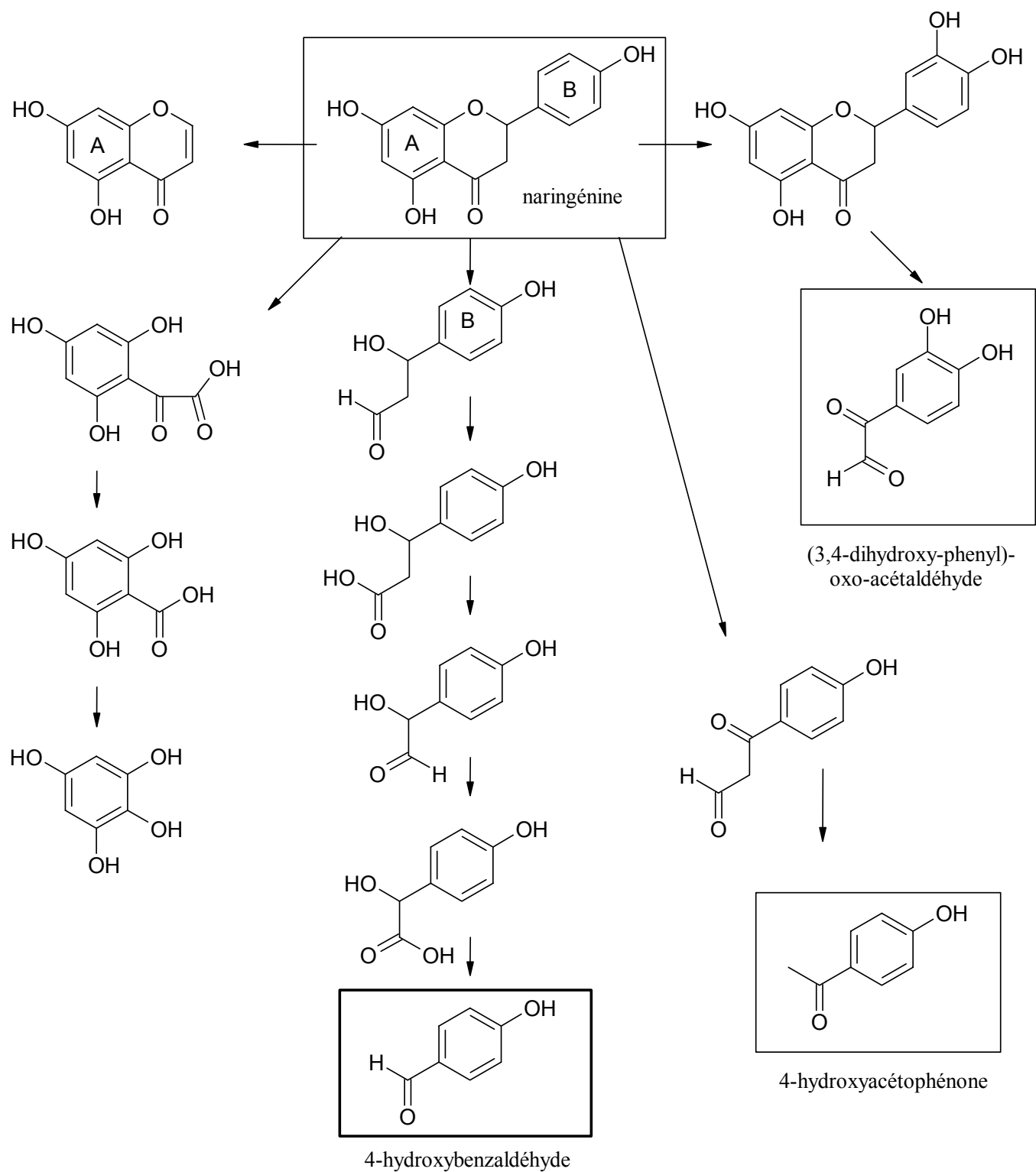


Figure I-4.15E : Catabolisme de la naringénine

***3,4-Dihydroxybenzaldéhyde ( Protocatéchaldéhyde )***

## Bibliographie

Le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde a été isolé dans l'écorce du bois de *Joannesia princeps* [228], dans une herbe marine la *Posidonia oceanica* [216], dans les parois des cellules de *Vitis vinifera* (vigne) [229], dans le froment (*Fagopyrum esculentum*) [230], et de *Cassia garrettiana* [231]. Il est le principal composé actif de *Polyporus umbellatus* [232], herbe utilisée pour le traitement de la repousse des cheveux. En 1996 il a été également identifié comme un composé antioxydant dans *Perilla frutescens* Britton var. *crispa* [233,234], utilisé au Japon comme plante médicinale.

### Schéma de biosynthèse proposé :

Le schéma de biosynthèse proposé ici pour la protocatéchualdéhyde est basé sur celui de dégradation de la naringénine (figure I-4.15 D).

La naringénine engendre la 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanone, qui par rupture du cycle B donne le (3,4-dihydroxy-phenyl)-oxo-acétaldéhyde. La décarboxylation de ce dernier peut être envisagée afin d'obtenir le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde (figure I-4.16).

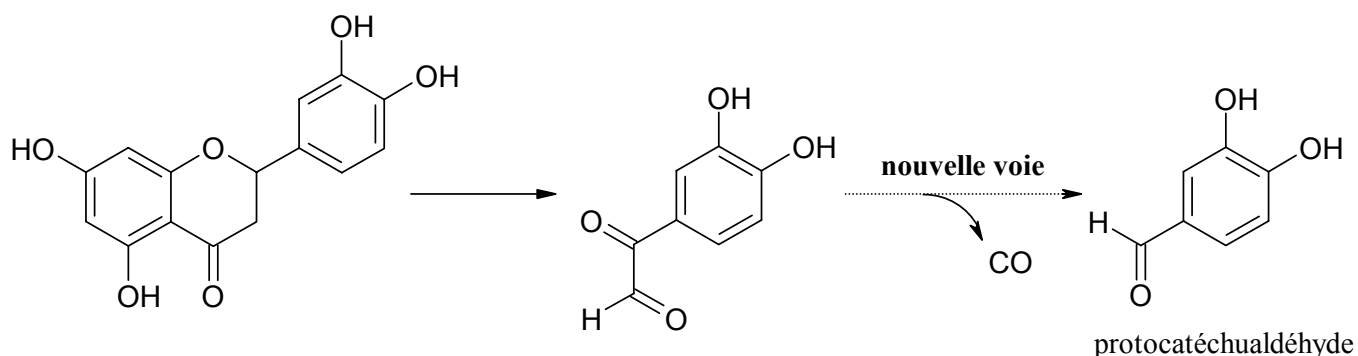


Figure I-4.16 : Schéma de biosynthèse du protocatéchualdéhyde

### **Composé 8: p-tolyl-éthanone**

La littérature ne nous a pas permis de déterminer le chemin de biosynthèse du p-tolyl-éthanone. L'hypothèse émise s'appuie sur la dégradation de la naringénine (figure I-4.15E). Le 4-hydroxyacétophénone est formé par le cycle B de la flavanone ayant un hydroxy en C(4'). Nous pouvons envisager l'existence du flavanone possédant un méthyle en position 4', donnant ainsi par dégradation le composé 8 (figure I-4.17A).

### Schéma de biosynthèse proposé :

## Bibliographie

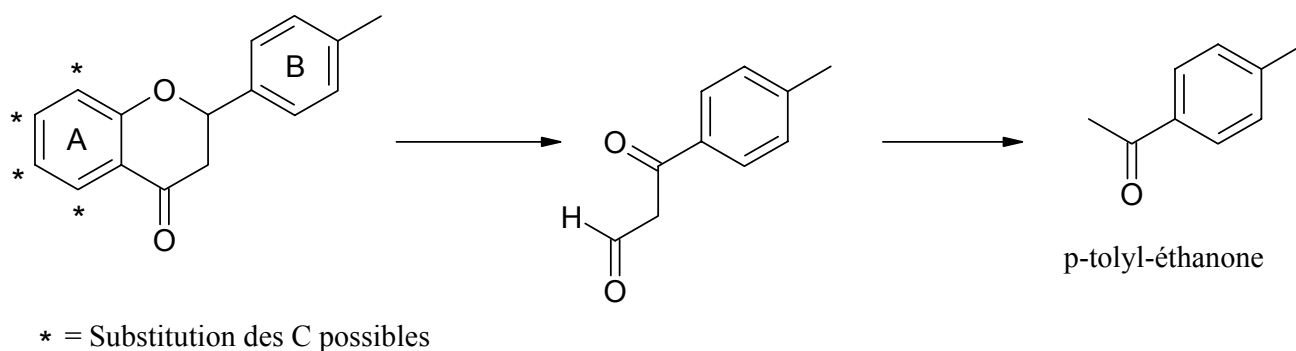


Figure I-4.17A : Schéma de biosynthèse du composé 8

En 1975, Cripps a proposé le schéma de dégradation de l'acétophénone [235] *via* le phénol (figure I-4.17B). Une voie identique peut être envisagée pour le composé 8, le 4-méthylacétophénone.

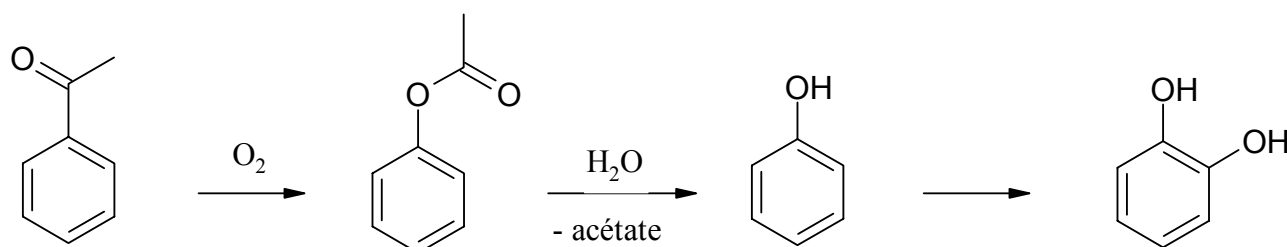


Figure I-4.17B : Schéma de dégradation de l'acétophénone

## 3-Hydroxyjuglone

Rettenmaier H. en 1983 a étudié la dégradation de la juglone [236] dans une culture de *Pseudomonas putida*. La conversion de la juglone en 3-hydroxyjuglone est l'étape rapide de la voie de biosynthèse. La dégradation lente de la 3-hydroxyjuglone conduit à l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque (figure I-4.18).

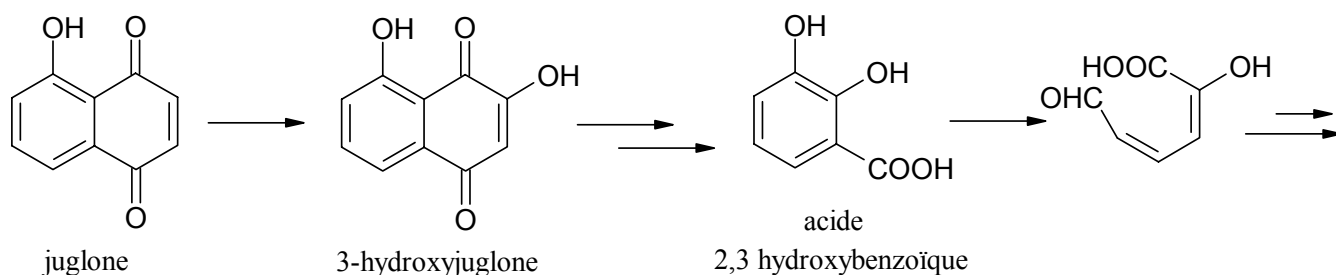


Figure I-4.18 : Dégradation de la juglone dans *P. putida*

## Bibliographie

La 3-hydroxyjuglone est un métabolite impliqué dans la biosynthèse de la mélanine (I-4.13 A). Elle dérive du 1,3,8-trihydroxynaphthalène et de la juglone.

### **2-Hydroxyjuglone**

La 2-hydroxyjuglone [187] intervient dans la biosynthèse de la mélanine (I-4.13A) après oxydation de la 1,3,8-trihydroxynaphthalène (1,3,8-THN).

Elle a été isolée de *Sphaeropsidales* sp. F-24'707 [237] et de *Leptosphaeria maculans* [238], après inhibition avec le tricyclazole du procédé de biosynthèse de la 1,8-dihydroxynaphthalène.

### **Acide 3,5-dihydroxybenzoïque**

L'acide orsélinique est le précurseur de l'acide gallique [157]. L'acide 3,5-dihydroxybenzoïque est un intermédiaire de la biosynthèse (figure I-4.20).

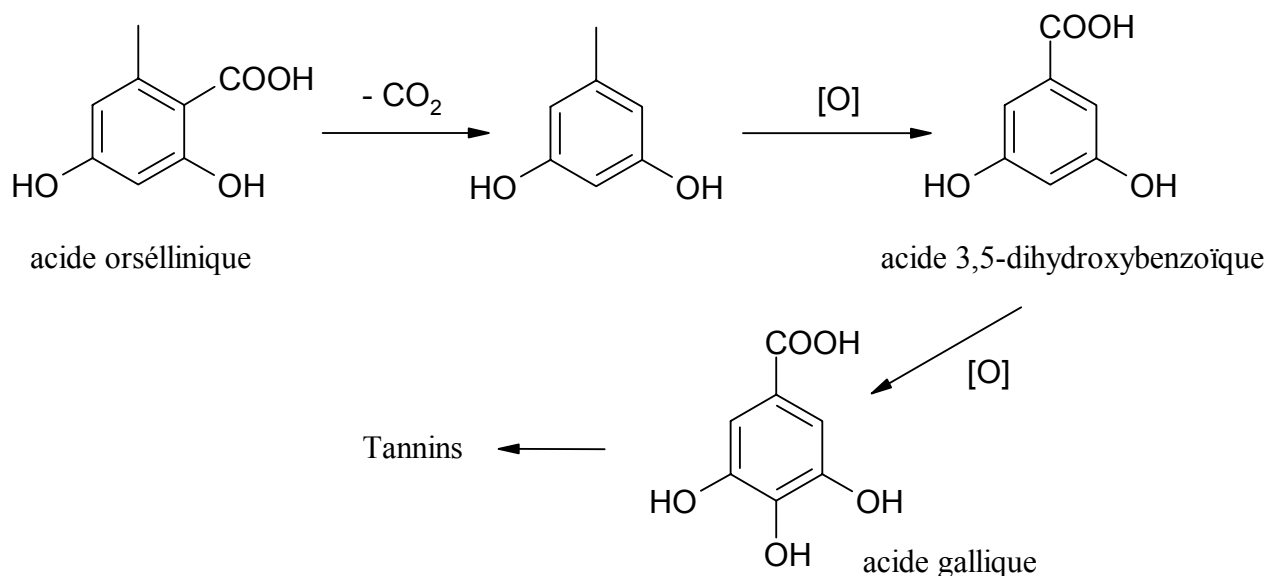


Figure I-4.20 : Biosynthèse de l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque

L'acide 3,5-dihydroxybenzoïque est un inhibiteur de la PTK (proteine tyrosine kinase). L'activité de cette protéine intervient dans la prolifération ou la différenciation cellulaire. Elle est associée à la propagation de certaines maladies comme le cancer, l'artériosclérose et le psoriasis [239].

## *Activité biologique des métabolites*

## Bibliographie

### **Tests biologiques**

#### ***Tests sur les plants de tomates***

Les métabolites isolés de *Graphium ulmi* n'ont pas été soumis aux tests sur les plants de tomates. La quantité des composés étant faible, nous avons choisi de les tester par une méthode qui s'approche le plus de la réalité c'est-à-dire sur des feuilles d'orme. D'autre part, certains métabolites comme la juglone sont toxiques vis à vis des tomates, par conséquent cela n'apporte aucun renseignement.

Seul l'extraction du milieu de culture à pH = 5 reproduit sur plants de tomates la symptomatologie de la maladie, nécrose de la tige et symptômes foliaires. Les recherches se sont portées essentiellement sur cet extrait brut.

#### ***Tests sur les feuilles d'orme***

Les tests sur carrées de feuilles d'orme sont faciles à mettre en œuvre et apportent de bonnes indications de la toxicité des produits mais ne peuvent être effectués qu'au printemps. Pour cette raison, tous les métabolites n'ont pu être analysés.

Les naphthalénones (**17, 18**) et les isocoumarines (**4, 5, 19**) n'ont aucun effet toxique sur les feuilles d'orme. A ce stade des résultats, ces cinq métabolites peuvent être considérés comme non toxiques et ne jouant qu'un rôle minime dans la graphiose.

L'acide p-aminobenzoïque **11**, l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque **12**, la juglone **6** et le tryptophole **13** occasionnent des nécroses ou des colorations brunes sur les feuilles, ceci à partir d'une concentration de 1 mg.mL<sup>-1</sup> ou de 100 µg.mL<sup>-1</sup> pour **12**. L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque s'avère être le composé le plus toxique puisque la surface de la feuille nécrosée est de 5 % au bout d'une heure et de 100 % pour 18 H. Les métabolites **11** et **6** engendrent une nécrose et des taches brunes sur la feuille pour une concentration de 1 mg.mL<sup>-1</sup>.

Deux modes d'action de ces composés sur les feuilles sont envisageables :

- la nécrose, sûrement due à l'obstruction et à la perte d'eau des vaisseaux
- les taches brunes, pouvant être causées également par d'autres produits métabolisés par **11** et **6** ou à la dégradation de ceux-ci.

Le tryptophole ne produisant aucune nécrose mais des changements de couleur de la feuille, nous ne pouvons conclure à une activité toxique potentielle.

#### ***Tests sur les cals d'orme***

Limités par la quantité de produit et le coût, seulement cinq métabolites ont été testés sur cals d'orme. Le choix s'est porté sur les quatre composés (**6, 11, 12, 13**) possédant une activité sur les feuilles d'orme, et sur l'acide D(+)-3-phényllactique.

La juglone apparaît être le métabolite le plus toxique des cinq testés puisqu'elle provoque une nécrose des cals au bout de 24 H, ceci même pour la concentration la plus faible (100 µM). Ce composé a été reconnu comme phytotoxique dans plusieurs agents pathogènes d'espèces de champignons différentes. Son origine biosynthétique est en partie due à la mélanine fongique.

## Bibliographie

L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque nécrose les cals après trois jours à des concentrations de 750 et 1000  $\mu\text{M}$ . A des concentrations plus faibles, il ne provoque aucun symptôme. L'activité toxique du métabolite **12** a lieu préférentiellement au niveau des feuilles de l'arbre alors que pour le bois il faut une accumulation de produit afin d'observer une nécrose. L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque est certainement produit au niveau des feuilles puis descend par les vaisseaux du xylème et s'accumule dans le tronc.

D'après les résultats, l'acide 4-aminobenzoïque montre une activité toxique vis à vis des cals. Pour une concentration de 750  $\mu\text{M}$ , une nécrose apparaît au bout du septième jour, alors qu'à 100  $\mu\text{M}$  un cal sur deux est vivant. Sa toxicité provient probablement de son accumulation dans les cellules. C'est également vrai pour le tryptophole et l'acide D(+)-3-phényllactique. Leur action sur les cals est par conséquent locale.

## Phytotoxicité

### *Nouveau produit naturel*

Le nouveau produit, 3-méthyl-3,5,8-trihydroxy-isochroman-1-one **1**, a été décelé dans l'extrait de bois malade. Qualitativement, il est présent sous forme de traces. La toxicité de ce métabolite est envisageable, sachant que l'activité n'est pas forcément proportionnelle à la concentration.

### *Composés toxiques*

La juglone **6** est une phytotoxine d'*Ophiostoma ulmi* puisqu'elle remplit les trois critères. En effet, elle a été isolée dans le milieu de culture fongique. Elle est présente dans le matériel végétal infecté et absente dans le sain et reproduit les symptômes de la maladie. La juglone provoque une très forte nécrose des cals d'orme (nécrose totale au bout de 24 H), et une nécrose plus faible pour les feuilles. Elle agit essentiellement au niveau des cellules du bois. Ses deux dérivés, la 2-hydroxyjuglone **22** et la 3-hydroxyjuglone **23** possèdent aussi une activité toxique reconnue.

L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque **12** est aussi une phytotoxine isolée dans le champignon et dans le bois malade. Il provient de trois précurseurs différents, l'acide chorismique, le tryptophane et la tyrosine. A partir de la tyrosine, il donne le catéchol qui est à l'origine de la catéchol mélanine fongique. La présence de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque provient aussi de la dégradation d'une autre phytotoxine, la juglone. Il induit une forte nécrose des cals et des feuilles. Il semble qu'il diffuse dans tout l'organisme végétal, remontant vers les feuilles par les vaisseaux du xylème.

La protocatéchualdéhyde **30** a été détectée uniquement dans le bois malade extrait à l'éther. Sa présence étant liée à celle de l'agent pathogène, ce métabolite est vraisemblablement une toxine.

## Bibliographie

### **Composés moyennement toxiques**

Le tryptophole **13** n'est pas décrit comme une substance toxique dans la littérature. Les expériences réalisées montrent qu'il est présent dans le matériel végétal infecté. Son rôle dans la maladie est différent des autres toxines. Il induit principalement les symptômes de brunissement des feuilles et non de nécrose. Son activité toxique est certainement due à son accumulation au niveau des feuilles. Une concentration élevée en composé est nécessaire pour provoquer des symptômes foliaires. Le tryptophole peut s'étendre dans la plante hôte par les vaisseaux du phloème. Il peut-être classé comme un métabolite faiblement toxique.

La scytalone **16** est une toxine avec une activité faible. Son oxydation donne lieu à des naphthoquinones qui s'avèrent être extrêmement toxiques pour l'orme. La scytalone a un rôle clé dans la maladie car c'est le métabolite le plus important dans la biosynthèse de la DHN mélanine fongique.

La trans-1(2H) 3,4-dihydro-3,4,6,8-tétrahydroxynaphthalénone **15**, la 2,4,8-trihydroxy-2,4-dihydro-2*H*-naphthalen-1-one **17** et la scopolétine **29** ont été retrouvées dans le matériel végétal infecté et sain. Malgré l'absence de tests de toxicité sauf pour 17, nous pouvons considérer que les naphthalénone sont faiblement toxiques vis à vis de l'orme. Elles induisent une nécrose seulement à des concentrations élevées, agissant localement sur la plante. La scopolétine peut être reconnue également comme une phytoalexine de la graphiose.

L'acide 4-aminobenzoïque **11** est présent uniquement dans le bois sain et la sève. Les tests biologiques montrent qu'il induit une nécrose sur les cals et sur les feuilles d'orme. L'activité toxique provient de l'accumulation locale du composé.

### **Composés non toxiques**

La présence des quatre composés, 6,8-dihydroxy-3-hydroxyméthyl-isochromen-1-one, 1(2H) 3,4-dihydro-3,4,8-trihydroxynaphthalénone, acide 3,5-dihydroxybenzoïque et 4-hydroxybenzaldéhyde, a été détectée dans le matériel végétal sain. Ces métabolites ne sont pas considérés comme des toxines.

### **Composés non détectés**

L'acide 2,4-dihydroxy-6-(2-oxo-propionyl)-benzoïque **7** n'a pas été détecté dans le matériel végétal. Soit il n'est pas présent *in vivo*, et donc sa formation *in vitro* est liée à la composition du milieu de culture fongique. Soit il est sous sa forme lactonisée. La recherche en LC-MS n'a pas été possible car nous ne possédons pas la molécule lactonisée comme référence (temps de rétention, spectre de masse). La quantité de substance étant inférieure au mg, elle n'a pu faire l'objet de tests. Sa toxicité éventuelle ne peut pas être établie avec les résultats actuels.

La présence du métabolite **2** (3-méthyl-4,6,8-trihydroxy-isochroman-1-one) n'a pas été décelée dans le matériel végétal. Deux hypothèses peuvent être émises. Il est en quantité trop faible pour permettre sa détection par un spectromètre de masse. La deuxième est qu'il se décompose rapidement à la lumière. Nous pouvons envisager que se sont plutôt ses produits de dégradation qui sont présents *in vivo*.

## Bibliographie

Les expériences en LC-ESI n'ont pas permis d'observer la présence du 4-méthylacétophénone dans les bois infecté et sain, la sève ou les feuilles. Il semble qu'il soit produit seulement dans le milieu de culture fongique. Une étude dans la sève malade et des feuilles présentant des symptômes foliaires permettrait de confirmer cette hypothèse.

### ***Isocoumarines***

La 6,8-dihydroxy-3-méthyl-isochromen-1-one **19** a été détectée dans le bois malade extrait à l'éther et la (+)-orthosporine **5** dans le bois malade et les feuilles saines. Par ailleurs, les tests effectués sur les feuilles d'orme ne présentent aucuns symptômes foliaires ou de nécrose. Dans la littérature, les isocoumarines sont dépeintes généralement comme des phytotoxines [89,92,93,240]. La (+)-orthosporine a été décrite comme une substance induisant des nécroses [95] sur le maïs et le soja mais au contraire aucuns symptômes sur le seigle. Ces deux composés n'apparaissent donc pas toxique pour l'orme. S'il y a toxicité envers la plante, elle est certainement très faible et agit localement par accumulation du composé dans l'organisme végétal. Nous pouvons avancer aussi l'hypothèse que les isocoumarines jouent un rôle de "co-métabolisme", intervenant dans la biosynthèse de composés plus toxiques. En effet, Kam et al. [241] proposent un mécanisme sur l'action de ce type de molécule, comme inhibiteur enzymatique provoquant l'ouverture de la lactone.

### **Activité biologique**

Des travaux dans les années 1950-1960 ont permis de mettre en évidence que l'accumulation de composés phénoliques dans les cellules de la plante était liée à l'infection de celle-ci. Les symptômes de l'infection sont généralement une nécrose locale, une croissance anormale, une décoloration vasculaire et un flétrissement. L'oxydation enzymatique des polyphénols aboutit à la mélanine fongique et à certains dérivés de biosynthèse hautement toxiques [242].

L'acide 3,5-dihydroxybenzoïque **25** peut influencer la prolifération ou la différenciation cellulaire par sa propriété d'inhiber la protéine tyrosine kinase.

### ***L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque***

Ayer et al. ont démontré que l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque **12** forme par chélation un complexe avec le fer III (figure I-9C), responsable en partie de la couleur bleue qui se développe sur les pins malade [86,243]. La présence *in vivo* de ce métabolite serait à l'origine de la coloration des zones infectées du bois de l'orme.

L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque donne également, par complexation avec la L-serine, l'enterochéline (figure I-9B) qui permet le transport du fer à l'intérieur des cellules. Dans le matériel végétal infecté, s'il est principalement sous forme de complexe acide-fer, il ne joue plus son rôle de précurseur de l'enterochéline. L'importante nécrose du matériel végétal induite par ce métabolite peut provenir du manque de fer dans les cellules.

### ***Le 4-hydroxybenzaldéhyde***

## Bibliographie

Le 4-hydroxybenzaldéhyde **26** a été testé sur des tiges de jeunes plants de pin. Il est capable d'inhiber faiblement la conductivité de l'eau [86]. Une étude réalisée sur *Vitis vinifera* démontre qu'un stress hydraulique provoque une réduction de croissance des jeunes pousses [244]. Il pourrait aussi contribuer à ce phénomène pour l'orme.

Ce composé est un inhibiteur de la polyphénole oxydase et de la cyclique adénosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. Cette dernière est impliquée dans la dégradation, par hydrolyse, de l'AMP cyclique [110], qui est un messenger intracellulaire. L'AMP cyclique permet d'activer un enzyme appelé protéine kinase A, qui a pour but de phosphoryler les résidus sérine et thréonine. Le 4-hydroxybenzaldéhyde peut avoir des conséquences non négligeables sur le métabolisme cellulaire. La polyphénole oxydase catalyse l'oxydation des composés phénoliques. Son inhibition par l'aldéhyde peut éviter la formation des o-quinones, qui sont à l'origine de la catéchol mélanine.

## **Les toxines**

La juglone **6** est une phytotoxine. Elle reproduit *in vivo* les symptômes de la graphiose par une nécrose rapide des calcs et des feuilles d'orme. Elle peut circuler dans l'arbre par l'intermédiaire de la sève brute dans l'aubier et de la sève élaborée située dans le liber. Les propriétés allélopathique de la juglone [160] lui permet de contaminer des arbres proches par les racines.

L'acide 2,3-dihydroxybenzoïque **12** est également une phytotoxine de la maladie. Nous pouvons envisager que la gommose et les symptômes foliaires sont dus à ces deux métabolites.

## **Les phytoalexines**

L'umbelliférone **28** (isolée de *C. fimbriata*) et la scopolétine **29** (isolée de *C. fimbriata* et *O. ulmi*) sont des phytoalexines. Elles ont un rôle de défense de la plante contre les infections des champignons [245]. Dès l'agression manifestée, les précurseurs (l'acide trans-p-hydroxycinnamique et l'acide cinnamique) présents dans la plante synthétisent une quantité plus importante de phytoalexines. Mais elles ne suffisent pas à bloquer la maladie. Première hypothèse, la quantité produite est encore faible ou le mécanisme de biosynthèse se déclenche trop tardivement. Deuxième hypothèse, à l'heure actuelle, l'agressivité des pathogènes (dus à des mutations) est telle qu'une aide extérieure s'avère nécessaire pour éliminer le champignon.

Le tryptophole **13** se trouve principalement dans le système vasculaire des plantes [120,122]. L'enzyme tryptophole oxydase permet la biosynthèse et la stabilité de la concentration de l'acide indole-3-acétique (IAA), connu pour réguler la croissance des plantes. Ces deux composés possèdent une activité antifongique, participant ainsi à la résistance de la plante contre la maladie. D'après les tests biologiques, le tryptophole induit une croissance des calcs. A partir d'une concentration de 750µM, il y a nécrose. Il semble agir comme une substance toxique lorsque la quantité présente dans les vaisseaux n'est plus régulée ou trop importante. Les taches brunes sur les feuilles sont probablement la conséquence de l'accumulation du composé.

## Bibliographie

L'acide D(+)-3-phényllactique **14** est aussi un composé antifongique. Les tests indiquent une croissance des cals puis une nécrose. L'acide montre une activité identique au tryptophole vis à vis de l'orme. Nous pouvons parler de "pseudo-toxicité".

## ***Mélanines fongiques***

L'acide 3-phényllactique et l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque sont des intermédiaires de la catéchol mélanine et la scytalone celle de la DHN mélanine. *In vivo*, ces métabolites offrent au champignon une protection contre la lumière UV et les hautes températures.

La scytalone est un composé faiblement toxique, qui est produit et converti en mélanine par les microslérotés et non par les conidies ou les hyphes [246].

La scytalone et la vermelone sont les précurseurs de la DHN mélanine fongique. Le tricyclazole bloque leur voie de biosynthèse, dans le but d'affaiblir le champignon en le rendant plus sensible à l'irradiation UV. La conséquence est l'accumulation de composés comme la juglone, la 2-hydroxyjuglone et la 3-hydroxyjuglone qui sont des métabolites hautement toxiques. Le tricyclazole ne semble pas être la solution contre l'agent pathogène.

L'accumulation locale de l'acide 4-aminobenzoïque dans le matériel végétal provoque un effet toxique. Il est le précurseur de l'agaritine, substance qui limite la formation de la catéchol mélanine [176]. L'acide est présent dans le bois sain et la sève saine. Nous pouvons envisager qu'il induit une défense de la plante contre le catéchol *via* l'agaritine.

## ***Métabolites de C. fimbriata sp. platani***

Les isocoumarines **4** et **20**, isolées uniquement dans le matériel végétal infecté, sont issues de la voie des polycétides, déjà discutées dans le paragraphe I-4.2.

La biosynthèse des deux phytoalexines, la scopolétine et l'umbélliférone, ont été également étudiée dans la partie I-4.14.

## *Discussion commune : 2-hydroxyjuglone et 3-hydroxyjuglone*

Les naphthoquinones (2-hydroxyjuglone, 3-hydroxyjuglone) peuvent former des adduits avec les fonctions amines ou thiols des protéines [247,248]. Ces métabolites proviennent de l'oxydation de la 1,3,8-trihydroxynaphthalène. Le mécanisme de formation a lieu avec l'arginine, l'asparagine, la glutamine, la histidine, la lysine, le méthionine et le tryptophane (figure III-1). La cystéine, malgré sa fonction -SH, ne peut pas intervenir dans le mécanisme puisqu'elle forme des ponts disulfures.

## Bibliographie

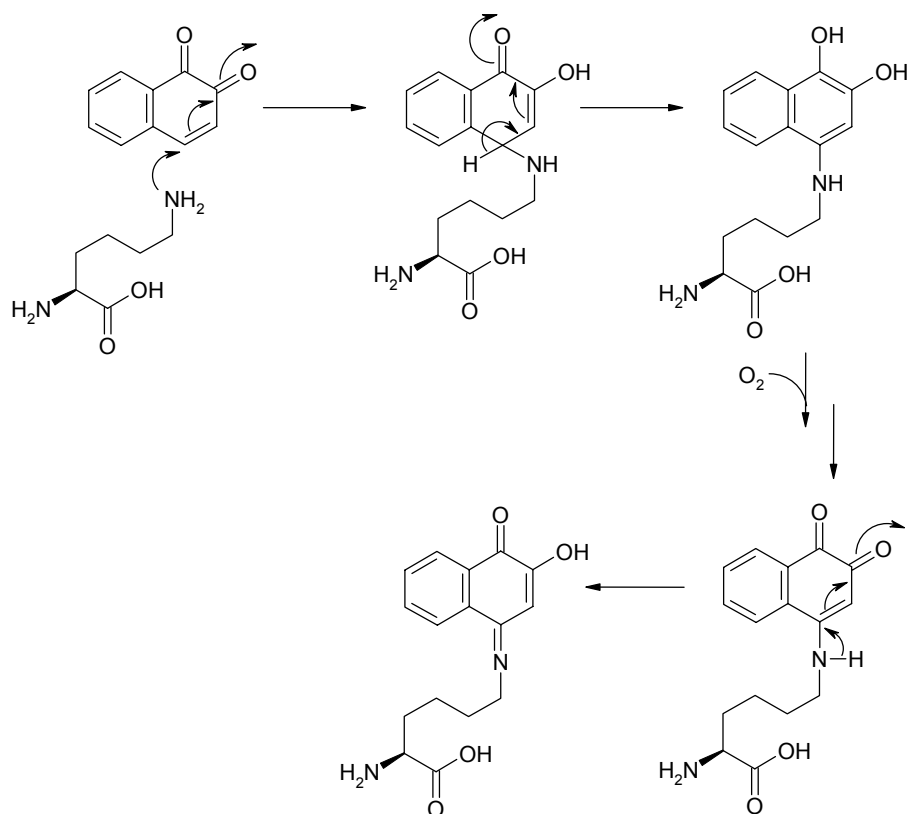


Figure III-1 : Adduit de la lysine sur une naphthalène 1-2 dione

La fimbriatane de *Ceratocystis fimbriata* et la cerato-ulmine, protéine impliquée dans la maladie de l'orme, leurs toxicités vis à vis de l'hôte sont ainsi reliée aux naphthoquinones, métabolites qui eux-mêmes présentent une activité toxique. Nous pouvons envisager des adduits avec les fonctions amines ou amides de tous les acides aminés.

Deux hypothèses sont envisageables :

➤ La toxicité que l'on attribue à la protéine, serait due aux naphthoquinones qui lui sont liées chimiquement. La protéine pourrait servir aussi de "transporteur" à travers les cellules. La paroi des cellules végétales est rigide, et restreint l'échange des molécules entre les cellules et leur environnement [249]. Ces molécules doivent être de petite taille et hydrosolubles. Les cellules communiquent entre elles par des canaux cytoplasmiques appelés plasmodesmes. Pour ne citer qu'un exemple, dans le cas du virus de la mosaïque du tabac, c'est une protéine qui permet le transport du virus, par l'intermédiaire des plasmodesmes, d'une cellule à l'autre.

➤ La toxicité de la protéine serait en principe indépendante de la présence des quinones. Cependant leur coexistence conclurait à une synergie ayant pour résultats une augmentation de la toxicité.

### Bibliographie

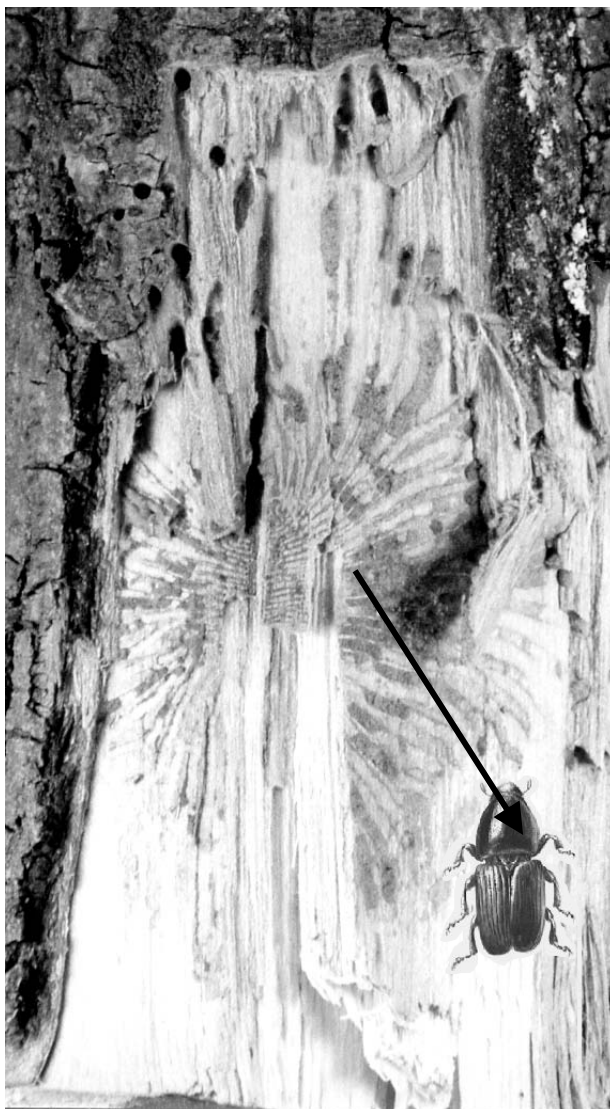
D'après les dernières études réalisées par Scala et al., la cerato-platanine, deuxième protéine de *C. fimbriata* sp. *platani*, induirait une augmentation de la production de phytoalexines après infection de l'arbre par le champignon.

## *CHAPITRE VIII :*

### *CONCLUSIONS et PERSPEC*

### *TIVES*

## Bibliographie



*Galleries des scolytes*

### *VII. L'orme*

L'analyse du milieu de culture d'*O. ulmi*, agent pathogène de l'orme, a permis l'isolement de seize métabolites (figure IA) dont **1**, qui est un nouveau produit naturel. Le composé **2** n'a jamais été isolé à ce jour dans les espèces *Ophiostoma* et *Ceratocystis*.

Bibliographie

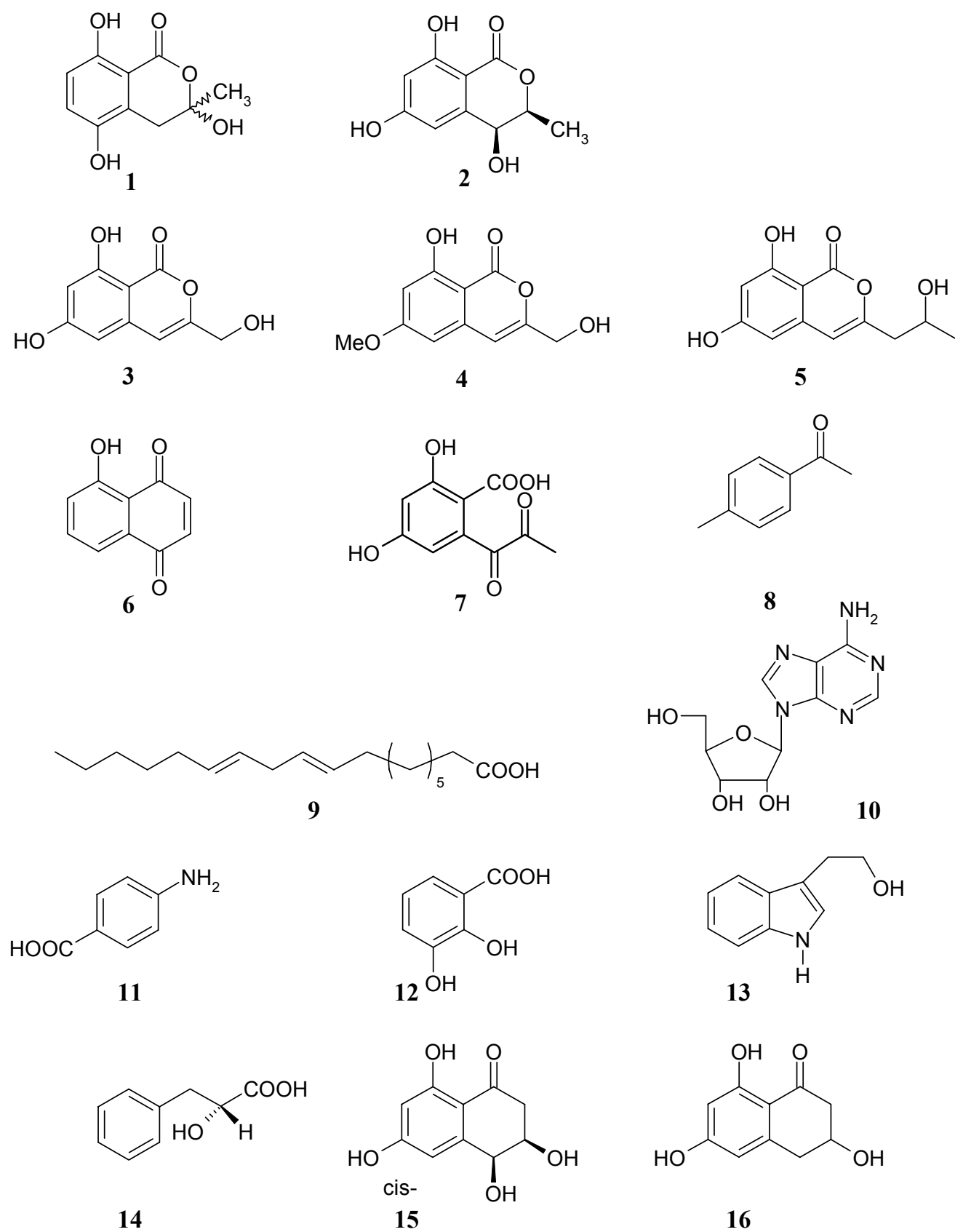


Figure IA : Métabolites fongiques d'*O. ulmi*

## Bibliographie

Lors des expériences sur le matériel végétal en LC-ESI-MS, dix métabolites non isolés dans le milieu fongique ont été mise en évidence dans le bois, les feuilles et la sève (figure IB).

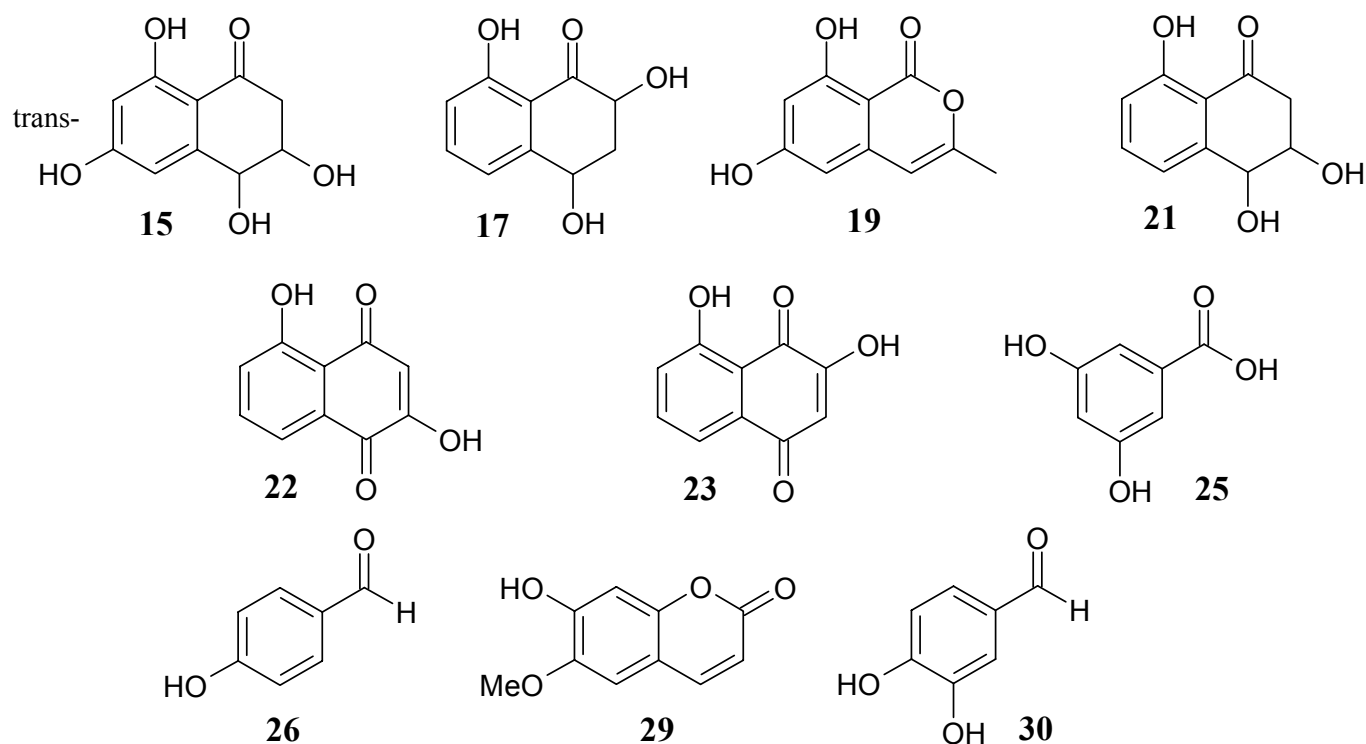


Figure IB : Métabolites identifiés dans le matériel végétal

Des tests biologiques sur neuf de ces métabolites (**4**, **5**, **6**, **11**, **12**, **13**, **14**, **17**, **19**) ont été effectués afin d'évaluer leur toxicité vis à vis de l'orme. Les composés **4**, **5**, **17**, **19** n'ont pas d'effets toxiques. La juglone **6** et l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque **12** sont les métabolites les plus toxiques. Ils induisent une nécrose rapide et importante des cals et des feuilles d'orme. L'acide 4-aminobenzoïque **11**, le tryptophole **13** et l'acide D(+)-3-phényllactique **14** possèdent également une activité toxique.

La recherche en LC-ESI-MS a permis d'établir la présence de treize métabolites dans le bois malade : la juglone **6**, la 2-hydroxyjuglone **22**, la 3-hydroxyjuglone **23**, la scytalone **16**, le tryptophole **13**, la protocatéchalaldéhyde **30**, la 6,8-dihydroxy-3-méthyl-isochroman-1-one **19**, l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque **12**, le nouveau produit naturel **1** (3-méthyl-3,5,8-trihydroxy-isochroman-1-one), les naphthalénones **17** et **15**, la scopolétine **29**, l'isocoumarine **5**. Les quatre derniers composés sont aussi présents dans le matériel végétal sain.

L'injection des composés, possédant une activité toxique, dans des jeunes pousses d'orme pourrait permettre d'évaluer les effets qu'ils produisent sur la plante hôte.

Avec ces résultats et ceux fournis par la bibliographie, nous pouvons conclure que la scopolétine est une phytoalexine de l'orme.

## Bibliographie

L'acide 2,4-dihydroxy-6-(2-oxo-propionyl)-benzoïque **7** n'a pas été détecté dans les végétaux. Le composé peut-être présent sous sa forme lactone. Il faudrait soit extraire plus de produits, soit synthétiser les deux formes, afin d'étudier *in vivo* sous quelle structure le composé **7** est présent.

L'acide D(+)-3-phényllactique **14**, le 3-méthyl-4,6,8-trihydroxy-isochroman-1-one **2**, et le 8-hydroxy-3-hydroxyméthyl-6-méthoxy-isochromen-1-one **4**, n'ont pas été détectés dans les bois malades et sains, dans la sève et les feuilles saines. Les métabolites sont présents seulement dans le milieu de culture fongique, par conséquent ils n'interviennent pas directement dans le développement de la graphiose. Ces résultats doivent être confirmés en effectuant des recherches supplémentaires sur la sève infectée et sur des feuilles présentant des symptômes foliaires.

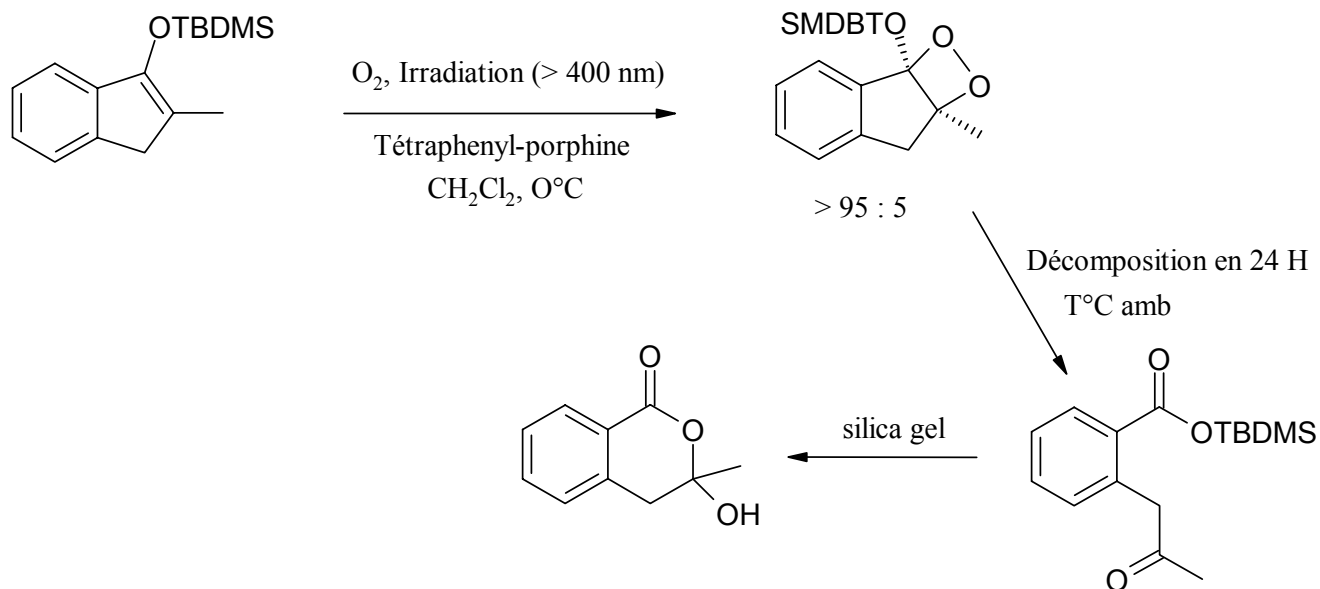
Le métabolite **2** se dégrade rapidement. Il serait judicieux de le synthétiser et d'étudier *in vitro* et *in vivo* les composés provenant de la dégradation du métabolite.

La 3-méthyl-3,5,8-trihydroxy-isochroman-1-one **1** est une nouvelle molécule. Il serait intéressant de la synthétiser afin de confirmer la structure et de déterminer sa configuration absolue. Puisqu'elle a été détectée uniquement dans le bois malade, l'obtention d'une quantité de produit plus importante permettrait également d'évaluer sa toxicité par des tests biologiques.

La principale difficulté de la rétro-synthèse est la présence des groupements méthyle et hydroxyle sur le même carbone en C(3).

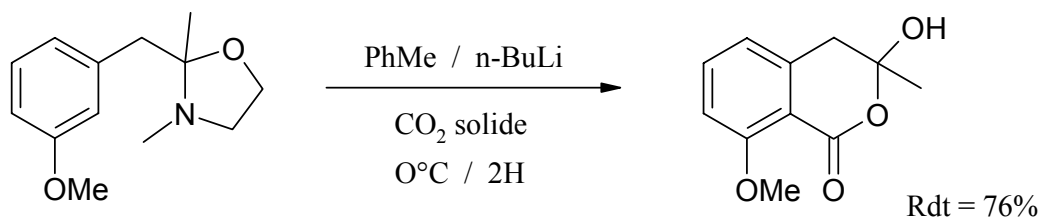
Deux voies sont proposées :

➤ Einaga et al. [250,251]



➤ Napolitano et al. [252,253]

## Bibliographie



Le 4-hydroxybenzaldéhyde **26** diminue la conductivité de l'eau. Une étude *in vivo* pourrait être réalisée sur le système vasculaire de l'orme, afin de mieux comprendre son rôle dans le développement de la maladie.

Dans le but d'analyser l'influence de l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque **25** sur la prolifération ou la différenciation cellulaire, des tests biologiques sur des protoplastes pourraient faire l'objet d'une étude.

## VIII. Le platane

En ce qui concerne les recherches effectuées sur le platane infecté artificiellement par *Ceratocystis fimbriata* sp. *platani*, deux isocoumarines ont été retrouvées : 8-hydroxy-3-hydroxyméthyl-6-méthoxy-isochromen-1-one et 8-hydroxy-6-méthoxy-3-méthyl isochromen-1-one. Nous pouvons conclure à leur toxicité vis à vis de l'hôte. La symptomatologie de ces métabolites sur l'arbre pourrait être confirmée en effectuant des tests sur des cals de platane ou des protoplastes.

La 2-hydroxyjuglone et la 3-hydroxyjuglone, provenant de l'oxydation de certaines naphthalénones, sont aussi des toxines pour le platane. Des résultats supplémentaires pourraient être obtenus en effectuant des recherches sur de la sève d'un arbre infectée et sur des feuilles présentant des symptômes foliaires, indiquant ainsi localement leur action sur le platane. Des tests biologiques évalueraient plus précisément la toxicité de ces deux métabolites.

L'umbelliférone et la scopolétine sont deux phytoalexines du platane, déjà bien connues dans la littérature pour leurs propriétés.

Les recherches en LC-ESI-MS n'ont pas permis d'identifier beaucoup de composés dans le matériel végétal du platane. Il faudrait également étendre l'étude sur la sève (malade et saine) et sur les feuilles présentant ou non des symptômes foliaires.

## IX. Comparaison des deux espèces

Nous retrouvons une similitude des structures des métabolites issues du milieu de culture fongique et de leurs toxicités respectives, dans les deux espèces de champignons voisins. Ceci nous amène à penser qu'il ne s'agit pas des toxines clés intervenant dans les différentes maladies. Elles ont certes un rôle important, mais des recherches doivent être

## Bibliographie

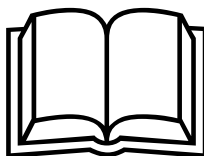
poursuivies afin de comprendre la fonction qu'elles occupent dans le développement de la maladie.

*Ophiostoma ulmi* n'est présent que sur l'orme et est son seul agent pathogène. Il doit produire certainement des métabolites qui lui sont propres. Nous avons pu isoler quelques-uns de ces métabolites : la 3-méthyl-3,5,8-trihydroxy-isochroman-1-one **1**, le 3-méthyl-4,6,8-trihydroxy-isochroman-1-one **2**, et la protocatéchualdéhyde **30**.

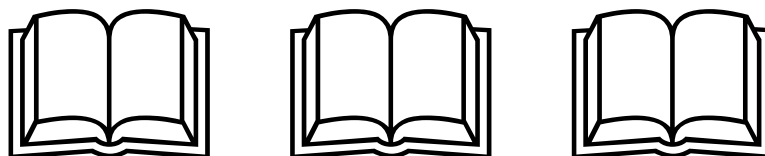
La présence de la mélanine fongique génère plusieurs métabolites communs dans les deux champignons : la scytalone, la 1 (2H) 3,4-dihydro-3,4,6,8-tétrahydroxynaphtalénone et la 2,4,8-trihydroxy-2,4-dihydro-2*H*-naphthalen-1-one, ainsi que les produits d'oxydation la 2-hydroxyjuglone et la 3-hydroxyjuglone.

La scopolétine et l'umbélliférone sont des phytoalexines souvent identifiées en présence de *Ceratocystis*. L'existence d'autres composés particuliers aux espèces est envisageable. Une étude plus approfondie et l'isolement de nouveaux métabolites pourraient déboucher sur une solution d'éradication de l'agent pathogène.

Les protéines isolées de *C. fimbriata* sp. *platani* et *O. ulmi* ont des séquences d'acides aminés identiques. Elles reproduisent également *in vivo* les symptômes de la maladie, et forment des adduits avec les naphthoquinones. Des recherches en biogénétique, sur différentes espèces de plantes naturelles ou clonées, permettraient peut-être d'établir un lien commun dans le séquençage des protéines et du rôle dans le développement de la maladie.



*CHAPITRE IX:*  
*BIBLIOGRAPHIE*



## Bibliographie

- [1] Pontoppidan,A.; Larvor,Y. *L'Orme*, **1995**.
- [2] Pinon,J.; Feugey,L. La graphiose de l'orme: une maladie dévastatrice à causes bien identifiées. *Revue Forestière Française* **1994**, *46*, 422-430.
- [3] Karnosky,D.F. Dutch Elm Disease: a review of the history, environmental implications, control, and research needs. *Environmental Conservation* **1979**, *6*, 311-323.
- [4] Gibbs,J.N.; Heybroek,H.M.; Holmes,F.W. Aggressive strain of *Ceratocystis ulmi* in Britain. *Nature* **1972**, *236*, 121-122.
- [5] Diez,J.; Gil,L. Effects of *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi* culture filtrates on elm cultures from genotypes with different susceptibility to Dutch Elm Disease. *Eur.J.For.Path.* **1998**, *28*, 399-407.
- [6] Jeng,R.S.; Hubbes,M. Identification of aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocystis ulmi* by polyacrylamide gradient gel electrophoresis of intramycelial proteins. *Mycotaxon* **1983**, *17*, 445-455.
- [7] Brasier,C.M. Low genetic diversity of the *Ophiostoma novo-ulmi* population in North America. *Mycologia* **1996**, *88*, 951-964.
- [8] Tegli,S.; Comparini,C.; Giannetti,C.; Scala,A. Effect of temperature on growth and cerato-ulmi production of *Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi*. *Mycol.Res.* **1994**, *98*, 408-412.
- [9] Brasier,C.M. Comparison of pathogenicity and cultural characteristics in the ean and nan aggressive subgroups of *Ophiostoma ulmi*. *Trans.Br.mycol.Soc.* **1986**, *87*, 1-13.
- [10] Brasier,C.M.; Kirk,S.A.; Pipe,N.D.; Buck,K.W. Rare interspecific hybrids in natural populations of the Dutch Elm Disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. *Mycol.Res.* **1998**, *102*, 45-57.
- [11] Brasier,C.M. New Horizons in Dutch Elm Disease Control. *Report on Forest Research, Forestry Commission Edinburgh, U.K.* **1996**, 20-28.

## Bibliographie

- [12] Brasier,C.M.; Mehrotra,M.D. *Ophiostoma himal-ulmi* sp. nov., a new species of Dutch Elm Disease fungus endemic to the Himalayas. *Mycol.Res.* **1995**, *99*, 205-215.
- [13] Smalley,E.B.; Guries,R.P. Breeding elms for resistance to Dutch Elm Disease. *Annu.Rev.Phytopathol.* **1993**, *31*, 325-352.
- [14] Gibbs,J.N.; Brasier,C.M.; McNabb,H.S.; Heybroek,H.M. Further studies on pathogenicity in *Ceratocystis ulmi*. *Eur.J.For.Path.* **1975**, *5*, 161-174.
- [15] Crane,J.L.; Schoknecht,J.D. Conidiogenesis in *Ceratocystis ulmi*, *Ceratocystis piceae*, and *Graphium penicillioides*. *Amer.J.Bot.* **1973**, *60* , 346-354.
- [16] Seifert,K.A.; Okada,G. *Graphium* anamorphs of *Ophiostoma* species and similar anamorphs of other Ascomycetes. In *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology, and pathogenicity*; Wingfield,M.J.; Seifert,K.A.; Webber,J.F., Eds.; *The American Phytopathological Society: St. Paul*, **1993**.
- [17] Buisman,C. *Ceratostomella ulmi*, de geslachtelijke Vorm van *Graphium ulmi* schwarz. *Nederlandsche Plantenziektenkundige (Phytopathologisch) Vereeniging* **1932**, 1-5.
- [18] Melin,E.; Nannfeldt,J.A. Researches into the blueing of ground wood-pulp. In *Sven. Skogsvarvsfoeren Tidskr.*; Stockolm, **1934**.
- [19] Moreau,C. Coexistence des formes *Thielaviopsis* et *Graphium* chez une souche de *Ceratocystis major* (van Beyma) nov. comb. *Revue de Mycologie, Supplément Colonial* **1952**, *17*, 17-25.
- [20] Hunt,J. Taxonomy of the genus *Ceratocystis*. *Lloydia* **1956**, *19*, 1-58.
- [21] Weijman,A.C.M.; de Hoog,G.S. On the subdivision of the genus *Ceratocystis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **1975**, *41*, 353-360.
- [22] Agrios,G.N. *Plant pathology*, third ed.; Academic Press,Inc.: New York, **1988**.
- [23] *Compendium of Elm Disease*, The American Phytopathological Society: St.Paul, **1981**.
- [24] Coulson,R.N. Population dynamics of bark beetles. *Ann.Rev.Entomol.* **1979**, *24*, 417-447.
- [25] Rudinsky,J.A. Ecology of *Scolytidae*. *Ann.Rev.Entomol.* **1962**, *7*, 327-348.
- [26] Holmes,F.W. Bark beetles, *Ceratocystis ulmi* and Dutch Elm Disease. In *Vectors of plant pathogens*; Harris,K.F.; Maramorosch,K., Eds.; New-York, **1980**.
- [27] Webber,J.F.; Hedger,J.N. Comparison of interactions between *Ceratocystis ulmi* and elm bark saprobes in vitro and in vivo. *Trans.Br.mycol.Soc.* **1986**, *86*, 93-101.
- [28] Gibbs,J.N. Dutch elm disease (*Ceratocystis ulmi*). *Forestry Commission Leaflet* **1971**, *19*, 2-11.

## Bibliographie

- [29] Brasier,C.M. The population biology of Dutch Elm Disease: its principal features and some implications for other host-pathogen systems. *Advances in Plant Pathology* **1986**, 5, 53-118.
- [30] Millar,J.G.; Zhao,C.-H.; Lanier,G.N.; O'Callaghan,D.P.; Griggs,M.; West,J.R.; Silverstein,R.M. Components of moribund american elm trees as attractants to elm bark beetles, *Hylurgopinus rufipes* and *Scolytus multistriatus*. *Journal of Chemical Ecology* **1986**, 12, 583-608.
- [31] Blight,M.M.; Henderson,N.C.; Wadhams,L.J. Field response of elm bark beetles to baits containing 4-methyl-3-heptanone. *Naturwissenschaften* **1982**, 69, 554-555.
- [32] Blight,M.M.; Mellon,F.A.; Wadhams,L.J.; Wenham,M.J. Volatiles associated with *Scolytus scolytus* beetles on english elm. *Experientia* **1977**, 33, 845-847.
- [33] Svihra,P.; Koehler,C.S. Attack and development of *Scolytus multistriatus* in small-diameter elm branches. *Environmental Entomology* **1982**, 11, 594-597.
- [34] Barger,J.H.; Cuthberg,R.A.; Roberto,N.H. Assessment of three pre-cold storage preparations on the feeding response of *Scolytus multistriatus* and the degradation of dicrotophos. *Journal of Economic Entomology* **1971**, 64, 621-625.
- [35] Barger,J.H.; Cuthberg,R.A.; Cannon ,W.N. Numbers of *Scolytus multistriatus* (Coleoptera: Scolytidae) caught on multilure-baited sticky traps increase with methoxychlor. *Journal of Economic Entomology* **1984**, 77, 1251-1252.
- [36] Lanier,G.N. Fungicides for Dutch Elm Disease: comparative evaluation of commercial products. *Journal of Arboriculture* **1987**, 13, 189-195.
- [37] Lanier,G.N. Therapy for Dutch Elm Disease. *Journal of Arboriculture* **1988**, 14, 229-232.
- [38] Lanier,G.N. Trap trees for control of Dutch Elm Disease. *Journal of Arboriculture* **1989**, 15, 106-111.
- [39] Lanier,G.N.; Jones,A.H. Trap trees for elm bark beetles, Augmentation with pheromone baits and chlopyrifos. *Journal of Chemical Ecology* **1985**, 11, 12-20.
- [40] Lanier,G.N.; Silverstein,R.M.; Peacock,J.W. Attractant pheromone of the european elm bark beetle (*Scolytus multistriatus*): isolation, identification, synthesis, and utilization studies. In *Perspectives in forest entomology*; Anderson,J.F.; Kaya,H.K., Eds.; Academic Press: New-York, **1976**.
- [41] Bovey,R.W. *Response of selected woody plants in the United States to herbicides*, U.S.Government Printing Office: Washington, **1977**.
- [42] Thomson,W.T. *Agricultural chemicals-book II herbicides*, Thomson publications: Fresno, **1979**.
- [43] Claydon,N.; Grove,J.F.; Hosken,M. Phenolic metabolites of *Ceratocystis ulmi*. *Phytochem.* **1974**, 13, 2567-2571.

## Bibliographie

- [44] Claydon,N.; Elgersma,D.M.; Grove,J.F. The phytotoxicity of some phenolic metabolic products of *Ophiostoma ulmi* to *Ulmus sp.* *Neth.J.Pl.Path.* **1980**, *86*, 229-237.
- [45] Dimond,A.E. Symptoms of Dutch Elm Disease reproduced by toxins of *Graphium ulmi* in culture. *Phytopathology* **1947**, *37*, 7.
- [46] Salemink,C.A.; Rebel,H.; Kerling,L.C.P.; Tchernoff,V. Phytotoxin isolated from liquid cultures of *Ceratocystis ulmi*. *Science* **1965**, *149*, 202-203.
- [47] Rebel,H. Phytotoxins of *Ceratocystis ulmi*. University of Utrecht, **1969**.
- [48] Strobel,G.; van Alfen,N.; Hapner,K.D.; McNeil,M.; Albersheim,P. Some phytotoxic glycopeptides from *Ceratocystis ulmi*, the Dutch Elm Disease pathogen. *Biochimica et Biophysica Acta* **1978**, *538*, 60-75.
- [49] van Alfen,N.; Turner,N.C. Influence of a *Ceratocystis ulmi* toxin on water relations of elm (*Ulmus americana*). *Plant Physiol.* **1975**, *55*, 312-316.
- [50] Nordin,J.H.; Strobel,G. Structural and immunochemical studies on the phytotoxic peptidorhamnomannan of *Ceratocystis ulmi*. *Plant Physiol.* **1981**, *67*, 1208-1213.
- [51] Scheffer,R.J.; Liem,J.I.; Elgersma,D.M. Production in vitro of phytotoxic compounds by non-aggressive and aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*, the Dutch Elm Disease pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1987**, *30*, 321-335.
- [52] Takai,S.; Richards,W.C. Cerato-ulmi, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*: isolation and some properties of cerato-ulmin from the culture of *C. ulmi*. *Phytopath.Z.* **1978**, *91*, 129-146.
- [53] Scala,A.; Tegli,S.; Comparini,C.; Mittenpergher,L.; Scala,F.; Del Sorbo,G. Influence of fungal inoculum on cerato-ulmin production; purification of cerato-ulmin and detection in elm sucker cuttings. *Petria* **1994**, *4*, 57-67.
- [54] Takai,S.; Richards,W.C.; Hiratsuka,Y.; Stevenson,K.J. Cerato-ulmin, a semipathotoxin of *Ceratocystis ulmi*. *Recognition and Specificity in Plant Host-Parasite Interactions* **1979**, 147-151.
- [55] Richards,W.C.; Takai,S. Characterization of the toxicity of cerato-ulmin, the toxin of Dutch Elm Disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* **1984**, *6*, 291-298.
- [56] Takai,S.; Richards,W.C. Evidence for the involvement of cerato-ulmin, the *Ceratocystis ulmi* toxin, in the development of Dutch Elm Disease. *Physiological Plant Pathology* **1983**, *23*, 275-280.
- [57] Richards,W.C.; Takai,S. Production of cerato-ulmin in white elm following artificial inoculation with *Ceratocystis ulmi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1988**, *33*, 279-285.
- [58] Scala,A.; Pattuelli,M.; Coppola,L.; Guastini,M.; Tegli,S.; Del Sorbo,G.; Mittenpergher,L.; Scala,F. Dutch Elm Disease progression and quantitative determination of cerato-ulmin in leaves, stems and branches of elms inoculated with

## Bibliographie

- Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1997**, *50*, 349-360.
- [59] Takai,S.; Hiratsuka,Y. Scanning electron microscope observations of internal symptoms of white elm following *Ceratocystis ulmi* infection and cerato-ulmin treatment. *Can.J.Bot.* **1984**, *62*, 1365-1371.
- [60] Takai,S. Relationship of the production of the toxin, cerato-ulmin, to synnemata formation, pathogenicity, mycelial habit, and growth of *Ceratocystis ulmi* isolates. *Can.J.Bot.* **1980**, *58*, 658-662.
- [61] Tegli,S.; Scala,A. Isolation and characterization of non cerato-ulmin producing laboratory induced mutants of *Ophiostoma novo-ulmi*. *Mycol.Res.* **1996**, *100*, 661-668.
- [62] Russo,P.S.; Blum,F.D.; Ipsen,J.D.; Abul-Hajj,Y.J.; Miller,W.G. The solubility and surface activity of the *Ceratocystis ulmi* toxin cerato-ulmin. *Physiological Plant Pathology* **1981**, *19*, 113-126.
- [63] Stevenson,K.J.; Slater,J.A.; Takai,S. Cerato-ulmin-a wilting toxin of Dutch Elm Disease fungus. *Phytochem.* **1979**, *18*, 235-238.
- [64] Takai,S. Cerato-ulmin, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*: cultural factors affecting cerato-ulmin production by the fungus. *Phytopath.Z.* **1978**, *91*, 147-158.
- [65] Temple,B.; Horgen,P.A.; Bernier,L.; Hintz,W.E. Cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the causal agents of Dutch Elm Disease, is a parasitic fitness factor. *Fungal genetics and Biology* **1997**, *22*, 39-53.
- [66] Temple,B.; Horgen,P.A. Biological roles for cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the elm pathogens, *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. *Mycologia* **2000**, *92*, 1-9.
- [67] Richards,W.C.; Takai,S. Novel technique for isolating microstructures present in shake cultures of the fungus *Ceratocystis ulmi*. *Applied Microbiology* **1973**, *26*, 443-444.
- [68] Takai,S. Pathogenicity and cerato-ulmin production in *Ceratocystis ulmi*. *Nature* **1974**, *252*, 124-126.
- [69] Takai,S.; Richards,W.C.; Davies,Y.P.; Hiratsuka,Y.; Krywienczyk,J. Evidence for the presence of the toxin cerato-ulmin in the synnema head fluid of *Ceratocystis ulmi*. *Can.J.Bot.* **1980**, *58*, 669-675.
- [70] Scala,F.; Bertelli,E.; Coppola,L.; Del Sorbo,G.; Tegli,S.; Scala,A. Comparative determination of cerato-ulmin on cell surface and in mycelial extracts of pathogenic and non-pathogenic *Ophiostoma* species. *Mycol.Res.* **1997**, *101*, 829-834.
- [71] *Electrospray ionization mass spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc.: New-York, **1997**.
- [72] Kebarle,P.; Tang,L. From ions in solution to ions in the gas phase. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 972-986.

## Bibliographie

- [73] De Hoffmann,E.; Charette,J.; Stoobant,V. *Spectrométrie de masse*, Masson: Paris, **1994**.
- [74] Devys,M.; Barbier,M.; Bousquet,J.-F.; Kollmann,A. Isolation of the (-)-(3R)-5-hydroxymellein from the fungus *Septoria nodorum*. *Phytochem.* **1994**, *35*, 825-826.
- [75] Devys,M.; Bousquet,J.-F.; Kollmann,A.; Barbier,M. Dihydroisocoumarines et acide mycophénolique du milieu de culture du champignon phytopatogène *Septoria nodorum*. *Phytochem.* **1980**, *19*, 2221-2222.
- [76] Anh,N.H.; Ripperger,H.; Porzel,A.; Sung,T.V.; Adam,G. Tetralones from *Ancistrocladus cochinchinensis*. *Phytochem.* **1997**, *44*, 549-551.
- [77] Justesen,U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. *J.Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 169-178.
- [78] Assante,G.; Locci,R.; Camarda,L.; Merlini,L.; Nasini,G. Scening of the genus *cercospora* for secondary metabolites. *Phytochem.* **1977**, *16*, 243-247.
- [79] Avantaggiato,G.; Solfrizzo,M.; Tosi,L.; Zizzerini,A.; Fanizzi,F.P.; ViscontiA. Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by *Phomopsis helianthi*. *Nat.Toxins* **1999**, *7*, 119-127.
- [80] McLafferty,F.W. *Interpretation of mass spectra*, Third Edition ed.; University Science Book: Mill Valley, California, **1980**.
- [81] Budzikiewicz,H.; Djerassi,C.; Williams,D.H. *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry*, Holden-day Inc.: San Francisco, London, Amsterdam, **1964**.
- [82] Porter,Q.N. *Mass spectrometry of heterocyclic compounds*, second edition ed.; John Wiley and Sons: USA, **1985**.
- [83] Budzikiewicz,H.; Djerassi,C.; Williams,D.H. *Mass spectrometry of organic compounds*, Holden-Day Inc.: San Francisco, London, Amsterdam, **1967**.
- [84] McGraw,G.W.; Hemingway,R.W. 6,8-dihydroxymethylisocoumarin, and other phenolic metabolites of *Ceratocystis minor*. *Phytochem.* **1977**, *16*, 1315-1316.
- [85] Hemingway,R.W.; McGraw,G.W.; Barras,S.J. Polyphenols in *Ceratocystis minor* infected *Pinus taeda*: fungal metabolites, phloem and xylem phenols. *J.Agric.Food Chem.* **1977**, *25*, 717-722.
- [86] Ayer,W.A.; Browne,L.M.; Feng,M.-C.; Orszanska,H.; Saeedi-Ghomi,H. The chemistry of the blue stain fungi. Part 1. Some metabolites of *Ceratocystis* species associated with mountain pine beetle infected Iodgepole pine. *Can.J.Chem.* **1986**, *64*, 904-909.
- [87] Kumagai,H.; Amemiya,M.; Naganawa,H.; Sawa,T.; Ishizuka,M.; Takeuchi,T. Biosynthesis of antitumor antibiotic, cytogenin. *The Journal of Antibiotics* **1994**, *47*, 440-447.

## Bibliographie

- [88] Gremaud,G.; Tabacchi,R. Relationship between the fungus *Ceratocystis fimbriata coffea* and the canker disease of the coffee tree. *Phytochem.* **1996**, *42*, 1547-1549.
- [89] Burki,N. Isolement et identification de métabolites secondaires de *Ceratocystis fimbriata* sp. *Platani*, agent pathogène du platane. Université de Neuchâtel, **1996**.
- [90] Nicolet-Dit-Félix,B. Isolement et identification de métabolites secondaires de deux souches du champignon *Stagonospora* sp., agent pathogène du liseron des haies (*Calystegia sepium*) et du liseron des champs (*Convolvulus arvensis*). Université de Neuchâtel, **1999**.
- [91] Wang,H.; Wu,Y.; Zhao,Z. Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J.Mass Spectrom.* **2001**, *36*, 58-70.
- [92] Hallock,Y.F.; Clardy,J.; Kenfield,D.S.; Strobel,G. De-O-methyldiaportin, a phytotoxin from *Drechslera siccans* . *Phytochem.* **1988**, *21*, 3123-3125.
- [93] Ichihara,A.; Hshimoto,M.; Hirai,T.; Takeda,I.; Sasamura,Y.; Sakamura,S.; Sato,R.; Tajimi,A. Structure, synthesis, and stereochemistry of (+)-Orthosporin, a phytotoxic metabolite of *Rhynchosporium Orthosporum*. *Chemistry Letters* **1989**, 1495-1498.
- [94] Sviridov,S.I. Secondary metabolites of *Pyricularia oryzae*. *Chemistry of Natural Compounds* **1991**, *27*, 410-413.
- [95] Harris,J.P.; Mantle,P.G. Biosynthesis of diaporthin and orthosporin by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochem.* **2001**, *57*, 165-169.
- [96] Aynehchi,Y.; Dehpour,A.R.; Mahmoodian,M. Juglone: the echtiotoxic principle of *Pterocarya fraxinifolia*. *Phytochem.* **1973**, *12*, 3001-3002.
- [97] Moir,M.; Thomson,R.H. Naphthaquinones in *Lomatia* species. *Phytochem.* **1973**, *12*, 1351-1353.
- [98] Binder,R.G.; Benson,M.E.; Flath,R.A. Eight 1,4-naphthoquinones from *Juglans*. *Phytochem.* **1989**, *28*, 2799-2801.
- [99] Gupta,S.R.; Ravindranath,B.; Seshadri,T.R. Juglandaceae. Polyphenols of *Juglans nigra*. *Phytochem.* **1972**, *11*, 2634-2636.
- [100] Fujimoto,Y.; Yokoyama,E.; Takahashi,T.; Uzawa,J.; Morooka,N.; Tsunoda,H.; Tatsuno,T. Studies on the metabolites of *Penicillium diversum* var. *aureum*. *Chem.Pharm.Bull.* **1986**, *34*, 1497-1500.
- [101] Andersen,B. Consistent production of phenolic compounds by *Penicillium brevicompactum* for chemataxonomic characterization. *Antonie van Leeuwenhoek* **1991**, *60*, 115-123.
- [102] Oxford,A.E.; Raistrick,H. LXXXV. Studies in the biochemistry of micro-organisms. XXX. The molecular constitution of the metabolic products of *Penicillium brevicompactum* dierckx and related species. *Biochem.* **1933**, *27*, 634-653.

## Bibliographie

- [103] Clutterbuck, P.W.; Oxford, A.E.; Raistrick, H.; Smith, G. CLXXI. Studies in the biochemistry of micro-organisms. XXIV. The metabolic products of the *Penicillium brevi-compactum* series. *Biochem.* **1932**, *26*, 1441-1458.
- [104] Naves, Y.-R. Etudes sur les matières végétales volatiles. Cétones des huiles essentielles de cabreuva (*Myrocarpus frondosus* et *M. fastigiatus* Allem.) et de bois de rose (*Aniba rosaedora* Ducke). *Helv.Chim.Acta* **1948**, *31*, 44-49.
- [105] Kaburaki, Y.; Shigematsu, H.; Yamashita, Y.; Kusakabe, H. Studies on composition of tobacco smoke. Volatile compounds from the neutral fraction of tobacco smoke condensates. *Agr.Biol.Chem.* **1971**, *35*, 1741-1750.
- [106] Banthorpe, D.V.; Duprey, R.J.H.; Hassan, M.; Janes, J.F.; Modawi, B.M. Chemistry of the sudanese flora. Essential oils of some *Cymbopogon* species. *Planta medica* **1976**, *29*, 10-19.
- [107] Dalpé, Y.; Neumann, P. L'induction chez *Ceratocystis* de fructifications de types Graphium et Leptographium par des acides gras insaturés. *Can.J.Bot.* **1977**, *55*, 2159-2167.
- [108] Dalpé, Y.; Montant, C. L'effet d'acides gras saturés et insaturés sur la croissance et la fructification de quelques espèces du genre *Ceratocystis*. *Can.J.Bot.* **1980**, *58*, 2543-2548.
- [109] Gopalakrishnan, N.; Kaimal, T.N.B.; Lakshminarayana, G. Fatty acid in *Hibiscus esculentus* tissues during growth. *Phytochem.* **1982**, *21*, 565-568.
- [110] Stryer, L. *La Biochimie*, 4<sup>e</sup> édition ed.; Flammarion: Paris, **1997**.
- [111] *The Vitamins, Chemistry, Physiology, Pathology*, Academic Press, Inc.: New York, **1954**.
- [112] Arcamone, F.; Chain, E.B.; Ferretti, A.; Pennella, P. Formation of 2,3-dihydroxybenzoic acid in fermentation liquors during the submerged culture production of lysergic acid  $\alpha$ -hydroxyethylamide by *claviceps paspali* Stevens and Hall. *Nature* **1961**, *192*, 552-553.
- [113] Corbin, J.L.; Bulen, W.A. The isolation and identification of 2,3-dihydroxybenzoic acid and 2-N,6-N-di-(2,3-dihydroxybenzoyl)-L-lysine formed by iron-deficient *Azotobacter vinelandii*. *Biochem.* **1969**, *8*, 757-762.
- [114] Packter, N.M.; Collins, J.S. Effect of inhibitors of protein synthesis on the formation of phenols derived from acetate and shikimic acid in *Aspergillus fumigatus*. *Eur.J.Biochem.* **1974**, *42*, 291-302.
- [115] Rosenberg, H.; Young, I.G.; Byers, B.R. *Microbial iron metabolism, a comprehensive treatise*, Academic Press: New York and London, **1974**.
- [116] Brown, A.E.; Sharma, H.S.S. A possible role for ferrous complexes in fungal disease suppression: glume blotch and net blotch of cereals. *Phytopath.Z.* **1985**, *113*, 178-188.

## Bibliographie

- [117] Swinburne, T.R. Iron and iron chelating agents as factors in germination, infection and aggression of fungal pathogens. In *Microbial ecology of the Phylloplane*; Blakeman, J.P., Ed.; London a. o. Academic Press: London, **1981**.
- [118] Hayashi, K.; Suzuki, K.; Kawaguchi, M.; Nakajima, T.; Suzuki, T.; Numata, M.; Nakamura, T. Isolation of an antioxidant from *Penicillium roquefortii* IFO 5956. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, *59*, 319-320.
- [119] Lattanzio, V.; De Cicco, V.; Di Venere, D.; Lima, G.; Salerno, M. Antifungal activity of phenolics against fungi commonly encountered during storage. *Ital. J. Food Sci.* **1994**, *1*, 23-30.
- [120] Lacan, G.; Magnus, V.; Simaga, S.; Iskric, S.; Hall, P.J. Metabolism of tryptophol in higher and lower plants. *Plant Physiol.* **1985**, *78*, 447-454.
- [121] Furakawa, T.; Koga, J.; Adachi, T.; Kishi, K.; Syono, K. Efficient conversion of L-tryptophan to indole-3-acetic acid and/or tryptophol by some species of *Rhizoctonia*. *Plant Cell Physiol.* **1996**, *37*, 899-905.
- [122] Yue, Q.; Miller, C.J.; White, J.F.; Richardson, M.D. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4687-4692.
- [123] Erdogan, I.; Sener, B.; Higa, T. Tryptophol, a plant auxin isolated from the marine sponge *Ircinia spinulosa*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2000**, *28*, 793-794.
- [124] Soledade, M.; Pedras, C.; Okanga, F.I. Metabolism of analogs of the phytoalexin brassinin by plant pathogenic fungi. *Can. J. Chem.* **2000**, *78*, 338-346.
- [125] Hudson, A.T.; Campbell, I.M.; Bentley, R. Biosynthesis of 6-methylsalicylic acid by *Mycobacterium phlei*. *Biochem.* **1970**, *9*, 3988-3992.
- [126] Yuasa, K.; Ishizuka, K.; Kaburaki, S.; Sakasai, T. Metabolism of phenylalanine in *Aspergillus sojae*. *Agr. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 2199-2206.
- [127] Ayer, W.A.; Trifonov, L.S. Phenolic and polyketide metabolites of the aspen blue stain fungus *Ophiostoma crassivaginata*. *Phytochem.* **1995**, *38*, 371-372.
- [128] Lavermicocca, P.; Valerio, F.; Evidente, A.; Lazzaroni, S.; Corsetti, A.; Gobbetti, M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 4084-4090.
- [129] Iwasaki, S.; Muro, H.; Sasaki, K.; Nosoe, S.; Okuda, S. Isolation of phytotoxic substances produced by *Pyricularia oryzae* cavara. *Tett. Lett.* **1973**, *37*, 3537-3542.
- [130] Aldridge, D.C.; Davies, A.B.; Jackson, M.R.; Turner, W.B. Pentaketide metabolites of the fungus *Phialophora lagerbergii*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1974**, 1540-1541.
- [131] Ten, L.N.; Stepanichenko, N.N.; Shevtsova, V.M.; Mukhamedzhanov, S.Z.; Kas'yanenko, A.G.; Otroshchenko, O.S. Metabolites of the pathogenic fungus *Verticillium dahliae*. IX. Pentaketides of mutants and their role in the biosynthesis of melanin. *Chemistry of Natural Compounds* **1980**, 298-302.

## Bibliographie

- [132] Findlay, J.A.; Kwan, D. Scytalone (3,6,8-trihydroxytetralone), a metabolite from a *Scytalidium* species. *Can.J.Chem.* **1973**, *51*, 1617-1619.
- [133] Findlay, J.A.; Kwan, D. Metabolites from a *Scytalidium* Species. *Can.J.Chem.* **1973**, *51*, 3299-3301.
- [134] Ten, L.N.; Tyshchenko, A.A.; Stepanichenko, N.N.; Gusakova, S.D.; Mukhamedzhanov, S.Z.; Otroshchenko, O.S.; Kas'yanenko, A.G. Metabolites of the pathogenic fungus *Verticillium dahliae*. VI. Pentaketide metabolites and neutral lipids of virulent and avirulent strains. *Chemistry of Natural Compounds* **1978**, 524-527.
- [135] Jiao, Y.; Yoshihara, T.; Akimoto, M.; Ichihara, A. Two phenolic compounds from *Valsa ambiens*. *Biosci.Biotech.Biochem.* **1994**, *58*, 784-785.
- [136] Sankawa, U.; Shimada, H.; Sato, T.; Kinoshita, T.; Yamasaki, K. Biosynthesis of scytalone. *Chem.Pharm.Bull.* **1981**, *29*, 3536-3542.
- [137] Viviani, F.; Gaudry, M.; Marquet, A. Melanin biosynthesis: a study of polyphenol deoxygenation. *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1* **1990**, 1255-1259.
- [138] Tabacchi, R.; Fkyerat, A.; Poliart, C.; Dubin, G.-M. Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathol.Mediterr.* **2000**, *39*, 156-161.
- [139] Park, S.H.; Stierle, A.A.; Strobel, G. Metabolism of maculosin, a host-specific phytotoxin produced by *Alternaria alternata* on spotted knapweed (*Centaurea maculosa*). *Phytochem.* **1994**, *35*, 101-106.
- [140] Sugawara, F.; Strobel, G.; Fisher, L.; Vanduyne, G.; Clardy, J. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1985**, *82*, 8291-8294.
- [141] Chevaugnon, J. *Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halstead. *Revue de Mycologie, Supplément Colonial* **1957**, *22*, 45-60.
- [142] Webster, R.K.; Butler, E.E. A morphological and biological concept of the species *Ceratocystis fimbriata*. *Can.J.Bot.* **1967**, *45*, 1457-1467.
- [143] Vigouroux, A. Les maladies du platane, avec référence particulière au chancre coloré; situation actuelle en France. *EPPO Bulletin* **1986**, *16*, 527-532.
- [144] Vigouroux, A. *Ceratocystis fimbriata* (Ell. & Halsted) f. sp. *platani* (Walter). *EPPO Bulletin* **1986**, *16*, 21-24.
- [145] Walter, J.M. Canker stain of planetrees. *Circular* **1946**, *742*, 1-11.
- [146] Walter, J.M.; Rex, E.G.; Schreiber, R. The rate of progress and destructiveness of canker stain of planetrees. *Phytopathology* **1952**, *42*, 236-239.
- [147] Zalasky, H. Process of *Ceratocystis fimbriata* infection in Aspen. *Can.J.Bot.* **1965**, *43*, 1157-1162.
- [148] Ferrari, J.P.; Pichenot, M. The canker stain disease of plane tree in Marseilles and in the south of France. *Eur.J.For.Path.* **1976**, *6*, 18-25.

## Bibliographie

- [149] DeAngelis, J.D.; Hodges, J.D.; Nenek, T.E. Phenolic metabolites of *Ceratocystis minor* from laboratory cultures and their effects on transpiration in loblolly pine seedlings. *Can.J.Bot.* **1986**, *64*, 151-155.
- [150] Stoessl, A. 8-hydroxy-6-methoxy-3-methylisocoumarin and other metabolites of *Ceratocystis fimbriata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1969**, *35*, 186-192.
- [151] Ake, S.; Darbon, H.; Grillet, L.; Lambert, C. Fimbriatan, a protein from *Ceratocystis fimbriata*. *Phytochem.* **1992**, *31*, 1199-1202.
- [152] Pazzagli, L.; Cappugi, G.; Manao, G.; Camaci, G.; Santini, A.; Scala, A. Purification, characterization, and amino acid sequence of Cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *J.Biol.Chem.* **1999**, *274*, 24959-24964.
- [153] El Modafar, C.; Fleuriet, A.; Vigouroux, A.; Clerivet, A. Le chancre coloré du platane études préliminaires des réactions de l'hôte au *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *ANPP-Troisième conférence internationale sur les maladies des plantes Bordeaux-3*, 4, 5, décembre 1991 **1991**, 149-157.
- [154] El Modafar, C.; Clerivet, A.; Fleuriet, A.; Macheix, J.J. Inoculation of *Platanus acerifolia* with *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* induces scopoletin and umbelliferone accumulation. *Phytochem.* **1993**, *34*, 1271-1276.
- [155] Alami, I.; Mari, S.; Clériveret, A. A glycoprotein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* triggers phytoalexin synthesis in *platanus x acerifolia* cell-suspension cultures. *Phytochem.* **1998**, *48*, 771-776.
- [156] Turner, W.B. *Fungal Metabolites*, Academic Press Inc.: London, **1971**.
- [157] Torssell, K.B.G. *Natural product chemistry. A mechanistic, biosynthetic and ecological approach*, Swedish Pharmaceutical Press: Stockholm, **1997**.
- [158] Holker, J.S.E.; Young, K. Biosynthesis of metabolites of *Periconia macrospinoso* from [1-<sup>13</sup>C]-, [2-<sup>13</sup>C]-, and [1,2-<sup>13</sup>C]-acetate. *J.C.S.Chem.Comm.* **1975**, 525-527.
- [159] Brereton, R.G.; Garson, M.J.; Staunton, J. Biosynthesis of fungal metabolites: asperlactone and relationship to other metabolites of *Aspergillus melleus*. *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1* **1984**, 1027-1033.
- [160] Soderquist, C.J. Juglone and allelopathy. *Journal of Chemical Education* **1973**, *50*, 782-783.
- [161] Massey, A.B. Antagonism of the walnuts (*Juglans nigra* l. and *J. cinerea* l.) in certain plant associations. *Phytopathology* **1925**, *15*, 773-784.
- [162] Bode, H.R. Beiträge zur Kenntnis allelopathischer Erscheinungen bei einigen Juglandaceen. *Planta* **1958**, *51*, 440-480.
- [163] Daghish, C. The isolation and identification of a hydrojuglone glycoside occurring in the walnut. *Biochem.* **1950**, *47*, 452-457.

## Bibliographie

- [164] Dansette,P.; Azerad,R. A new intermediate in naphthoquinone and menaquinone biosynthesis. *Biochemical and Biophysical research Communications* **1970**, *40*, 1090-1095.
- [165] Simantiras,M.; Leistner,E. Formation of o-succinylbenzoic acid from iso-chorismic acid in protein extracts from anthraquinone-producing plant cell suspension cultures. *Phytochem.* **1989**, *28*, 1381-1382.
- [166] Leistner,E.; Zenk,M.H. Zur Biogenese von 5-Hydroxy-1,4-naphthochinon (Juglon) in *Juglans regia* L. *Zeitschrift für Naturforschung* **1968**, *23*, 259-269.
- [167] Müller,W.-U.; Leistner,E. 1,4-naphthoquinone, an intermediate in juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) biosynthesis. *Phytochem.* **1976**, *15*, 407-410.
- [168] Müller,W.-U.; Leistner,E. Metabolic relation between naphthalene derivatives in *Juglans*. *Phytochem.* **1978**, *17*, 1735-1738.
- [169] Scharf,K.-H.; Zenk,M.H.; Onderka,D.K.; Carroll,M.; Floss,H.G. Stereochemistry of hydrogen elimination from C-6 of shikimate in naphthoquinone biosynthesis. *Chem.Comm.* **1971**, 576-577.
- [170] Torrsell,K.B.G. *Natural product chemistry, a mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism*, John Wiley & sons limited: New-York, **1983**.
- [171] Stierle,A.A.; Upadhyay,R.; Hershenhorn,J.; Strobel,G.; Molina,G. The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia* **1991**, *47*, 853-859.
- [172] Wheeler,M.H.; Stipanovic,R.D. Melanin biosynthesis and the metabolism of flaviolin and 2-hydroxyjuglone in *Wangiella dermatitidis*. *Arch Microbiol* **1985**, *142*, 234-241.
- [173] Dewick,P.M. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports* **1994**, 173-203.
- [174] Teng,C.-Y.; Ganem,B.; Doktor,S.Z.; Nichols,B.P.; Bhatnagar,R.K.; Vining,L.C. Total synthesis of 4-amino-4-deoxychorismic acid: a key intermediate in the biosynthesis of p-aminobenzoic acid and L-(p-aminophenyl)alanine. *J.Am.Chem.Soc.* **1985**, *107*, 5008-5009.
- [175] Baumgartner,D.; Hoesch,L.; Rast,D.M. The biogenesis of  $\beta$ -N-( $\gamma$ -glutamyl)-4-hydroxymethylphenylhydrazine (agaritine) in *agaricus bisporus*. *Phytochem.* **1998**, *49*, 465-474.
- [176] Espin,J.C.; Jolivet,S.; Overeem,A.; Wichers,H.J. Agaritine from *Agaricus bisporus* is capable of preventing melanin formation. *Phytochem.* **1999**, *50*, 555-563.
- [177] Turner,W.B.; Aldridge,D.C. *Fungal Metabolites II*, Academic Press Inc. Ltd: London, **1983**.
- [178] Haslam,E. *Metabolites and metabolism*, Oxford University Press: New-York, **1985**.

## Bibliographie

- [179] Catlin,E.R.; Hassall,C.H.; Pratt,B.C. Biosynthesis of phenols. XIV. Isolation of some shikimic acid-derived metabolites from mutant strains of *Streptomyces rimosus* unable to produce oxytetracycline. *Biochimica et Biophysica Acta* **1968**, *156* , 109-118.
- [180] Gibson,F.; Pittard,J. Pathways of biosynthesis of aromatic amino acids and vitamins and their control in microorganisms. *Bacteriological Reviews* **1968**, *32*, 465-492.
- [181] *Recent advances in phytochemistry*, Plenum Press: New-York, London, **1986**.
- [182] O'Brien,I.G.; Gibson,F. The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1970**, *215*, 393-402.
- [183] Yuasa,K.; Ishizuka,M.; Sakasai,T. Metabolism of L-Tyrosine in *Aspergillus sojiae*. *Agr.Biol.Chem.* **1978**, *42*, 167-169.
- [184] *Biochemistry of plant phenolics*, Plenum Press: New-York, **1979**.
- [185] Gopalakrishna,Y.; Narayanan,T.K.; Ramananda Rao,G. Biosynthesis of  $\beta$ -phenethyl alcohol in *Candida guilliermondii*. *Biochemical and Biophysical research Communications* **1976**, *69*, 417-423.
- [186] Perrin,P.W.; Towers,G.H.N. Metabolism of aromatic acids by *Polyporus hispidus*. *Phytochem.* **1973**, *12*, 583-587.
- [187] Stipanovic,R.D.; Wheeler,M.H. Accumulation of 3,3'-biflaviolin, a melanin shunt product, by tricyclazole-treated *Thielaviopsis basicola*. *Pesticide Biochemistry and physiology* **1980**, *13*, 198-201.
- [188] Bell,A.A.; Wheeler,M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann.Rev.Phytopathol.* **1986**, *24*, 411-451.
- [189] Bell,A.A.; Stipanovic,R.D.; Puhalla,J.E. Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*. *Tetrahedron* **1976**, *32* , 1353-1356.
- [190] Pridham,J.B.; Woodhead,S. The biosynthesis of melanin in *Alternaria*. *Phytochem.* **1977**, *16*, 903-906.
- [191] Wheeler,M.H.; Stipanovic,R.D. Melanin biosynthesis in *Thielaviopsis basicola*. *Experimental Mycology* **1979**, *3*, 340-350.
- [192] Ichinose,K.; Kiyono,J.; Ebizuka,Y.; Sankawa,U. Post-aromatic deoxygenation in polyketide biosynthesis: reduction of aromatic rings in the biosyntheses of fungal melanin and anthraquinone. *Chem.Pharm.Bull.* **1993**, *41*, 2015-2021.
- [193] Bycroft,B.W.; Cashyap,M.M.; Leung,T.K. A biomimetic synthesis of ( $\pm$ )-scytalone (3,6,8-trihydroxytetralone). *J.C.S.Chem.Comm.* **1974**, 443-444.
- [194] Kubo,Y.; Suzuki,K.; Furusawa,I.; Yamamoto,M. Scytalone as a natural intermediate of melanin biosynthesis in appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *Experimental Mycology* **1983**, *7*, 208-215.

## Bibliographie

- [195] Geis,P.A.; Wheeler,M.H.; Szaniszló,P.J. Pentaketide metabolites of melanin synthesis in the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. *Arch Microbiol* **1984**, *137*, 324-328.
- [196] Stipanovic,R.D.; Bell,A.A. Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*. 3. Identification of (-)-3,4-dihydro-3,8-dihydroxy-1(2H)-naphthalenone [(-)-Vermelone] as a precursor to the melanin. *J.Org.Chem.* **1976**, *41*, 2468-2469.
- [197] Wheeler,M.H.; Tolmsoff,W.J.; Bell,A.A.; Mollenhauer,H.H. Ultrastructural and chemical distinction of melanins formed by *Verticillium dahliae* from (+)-scylatone, 1,8-dihydroxynaphthalene, catechol, and L-3,4-dihydroxyphenylalanine. *Can.J.Microbiol.* **1978**, *24*, 289-297.
- [198] Swan,G.A. Structure, chemistry, and biosynthesis of the melanins. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* **2001**, *31*, 521-582.
- [199] Wheeler,M.H.; Tolmsoff,W.J. Ultrastructure of melanin formation in *Verticillium dahliae* with (+)-scylatone as a biosynthetic intermediate. *Can.J.Microbiol.* **1976**, *22*, 702-711.
- [200] Sankawa,U.; Shimada,H.; Sato,T.; Kinoshita,T. Biosynthesis of scytalone. *Tett.Lett.* **1977**, *5*, 483-486.
- [201] Wheeler,M.H. Comparisons of fungal melanin biosynthesis in *Ascomycetous*, *imperfect* and *Basidiomycetous fungi*. *Trans.Br.mycol.Soc.* **1983**, *81*, 29-36.
- [202] Wheeler,M.H. Melanin biosynthesis in *Verticillium dahliae*: dehydration and reduction reactions in cell-free homogenates. *Experimental Mycology* **1982**, *6*, 171-179.
- [203] Sisler,H.D.; Woloshuk,C.P.; Wolkow,P.M. Studies on the mode of action of tricyclazole and related compounds. *Systemische Fungizide und antifungale Verbindungen* **1983**, 171-176.
- [204] Woloshuk,C.P.; Sisler,H.D.; Tokousbalides,M.C.; Dutky,S.R. Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants. *Pesticide Biochemistry and physiology* **1980**, *14*, 256-264.
- [205] Froyd,J.D.; Paget,C.J.; Guse,L.R.; Dreikorn,B.A.; Pafford,J.L. Tricyclazole: a new systemic fungicide for control of *Pyricularia oryzae* on rice. *Phytopathology* **1976**, *66*, 1135-1139.
- [206] *Coumarins. Biology, applications and mode of action*, John Wiley & Sons: New-York, **1997**.
- [207] *The natural coumarins*, John Wiley & Son Ltd: New-York, **1982**.
- [208] Kemp,M.S.; Burden,R.S. Phytoalexins and stress metabolites in the sapwood of trees. *Phytochem.* **1986**, *25*, 1261-1269.
- [209] Baumert,A.; Mock,H.-P.; Schmidt,J.; Herbers,K.; Sonnewald,U.; Strack,D. Patterns of phenylpropanoids in non-inoculated and potato virus Y-inoculated leaves of

## Bibliographie

- transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase. *Phytochem.* **2001**, *56*, 535-541.
- [210] Maier, W.; Schmidt, J.; Nimtz, M.; Wray, V.; Strack, D. Secondary products in mycorrhizal roots of tobacco and tomato. *Phytochem.* **2000**, *54*, 473-479.
- [211] Cabello-Hurtado, F.; Durst, F.; Jorrián, J.V.; Werck-Reichhart, D. Coumarins in *Helianthus tuberosus*: characterization, induced accumulation and biosynthesis. *Phytochem.* **1998**, *49*, 1029-1036.
- [212] Afek, U.; Orenstein, J.; Carmeli, S.; Rodov, V.; Bar Joseph, M. Umbelliferone, a phytoalexin associated with resistance of immature Marsh gapefruit to *Penicillium digitatum*. *Phytochem.* **1999**, *50*, 1129-1132.
- [213] *Biosynthesis of aromatic compounds*, Pergamon Press: London, **1966**.
- [214] Barrero, A.; Oltra, J.E.; Poyatos, J.A. Acidic metabolites from *Phycomyces blakesleeanus*. *Phytochem.* **1996**, *42*, 1427-1433.
- [215] Kraus, R.; Spiteller, G. Phenolic compounds from roots of *Urtica dioica*. *Phytochem.* **1990**, *29*, 1653-1659.
- [216] Agostini, S.; Desjobert, J.-M.; Pergent, G. Distribution of phenolic compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Phytochem.* **1998**, *48*, 611-617.
- [217] Poliart, C. Isolement et caractérisation de métabolites secondaires issus de champignons impliqués dans la maladie de l'esca. Université de Neuchâtel, **2000**.
- [218] Kubo, I.; Kinst-Hori, I. Tyrosinase inhibitors from cumin. *J.Agric.Food Chem.* **1998**, *46*, 5338-5341.
- [219] Nikaido, T.; Sung, Y.-I.; Ohmoto, T.; Sankawa, U. Inhibitors of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in *Phyllostachys nigra* Munro var. *hemonis* Stapf. and *Phragmites communis* Trin., and inhibition by related compounds. *Chem.Pharm.Bull.* **1984**, *32*, 578-584.
- [220] Doy, C.H.; Gibson, F. The formation of 4-hydroxyphenylpyruvic acid and phenylpyruvic acid by tryptophan auxotrophs and wild-type *Aerobacter Aerogenes* considered in relation to the general aromatic pathway. *Biochim.Biophys.Acta* **1961**, *50*, 495-505.
- [221] Iwasaki, Y.; Iwasaki, H.; Gest, H. Extracellular accumulation of aromatic compounds by a photosynthetic bacterium. *Biochim.Biophys.Acta* **1962**, *60*, 44-50.
- [222] Rudney, H.; Parson, W.W. The conversion of p-hydroxybenzaldehyde to the benzoquinone ring of ubiquinone in *Rhodospirillum rubrum*. *J.Biol.Chem.* **1963**, *238*, 3137-3138.
- [223] Parson, W.W.; Rudney, H. The biosynthesis of ubiquinone and rholoquinone from p-hydroxybenzoate and p-hydroxybenzaldehyde in *Rhodospirillum rubrum*. *J.Biol.Chem.* **1965**, *240*, 1855-1863.

## Bibliographie

- [224] Bohm, B.A. Naphthoquinone biosynthesis in higher plants. *Biochemical and Biophysical research Communications* **1967**, *26*, 621-624.
- [225] Yazaki, K.; Heide, L.; Tabata, M. Formation of p-hydroxybenzoic acid from p-coumaric acid by cell free extract of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Phytochem.* **1991**, *30*, 2233-2236.
- [226] Kishore, G.; Sugumaran, M.; Vaidyanathan, C.S. Metabolism of DL-(±)-phenylalanine by *Aspergillus niger*. *Journal of Bacteriology* **1976**, *128*, 182-191.
- [227] *The biochemistry of plants*, Academic Press: London, **1981**.
- [228] Achenbach, H.; Benirschke, G. Joannesialactone and other compounds from *Joannesia princeps*. *Phytochem.* **1997**, *45*, 149-157.
- [229] Weber, B.; Hoesch, L.; Rast, D.M. Protocatechualdehyde and other phenols as cell wall components of grapevine leaves. *Phytochem.* **1995**, *40*, 433-437.
- [230] Watanabe, M.; Ohshita, Y.; Tsushida, T. Antioxidant compounds from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) hulls. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1039-1044.
- [231] Hata, K.; Baba, K.; Kosawa, M. Chemical studies on the heartwood of *Cassia garrettiana* Craib. II. Nonanthraquinonic constituents. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 984-989.
- [232] Inaoka, Y.; Shakuya, A.; Fukasawa, H.; Ishida, H.; Nukaya, H.; Tsuji, K.; Okada, M.; Fukushima, M.; Kosuge, T. Studies on active substances in herbs used for hair treatment. I. Effects of herb extracts on hair growth and isolation of an active substance from *Polyporus umbellatus* F. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 530-533.
- [233] Tada, M.; Matsumoto, R.; Yamaguchi, H.; Chiba, K. Novel antioxidants isolated from *Perilla frutescens* Britton var. *crispa* (Thumb.). *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 1093-1095.
- [234] Fujita, T.; Terato, K.; Nakayama, M. Two jasmonoid glucosides and a phenylvaleric acid glucoside from *Perilla frutescens*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 732-735.
- [235] *Biosynthesis and biodegradation of wood components*, Academic Press, Inc.: New-York, **1985**.
- [236] Rettenmaier, H.; Kupas, U.; Lingens, F. Degradation of juglone by *Pseudomonas putida* J 1. *FEMS Microbiology Letters* **1983**, *19*, 193-195.
- [237] Bode, H.R.; Zeeck, A. Sphaerolone and dihydrosphaerolone, two bisnaphthyl-pigments from the fungus *Sphaeropsidales* sp. F-24'707. *Phytochem.* **2000**, *54*, 597-601.
- [238] Dahiya, J.S.; Rimmer, S.R. Accumulation of flaviolin, 4-hydroxyscylatone and 2-hydroxyjuglone in tricyclazole-treated cultures of *Leptosphaeria maculans*. *Phytochem.* **1988**, *27*, 3481-3482.
- [239] Alvi, K.A.; Nair, B.; Gallo, C.; Baker, D. Screening of microbial extracts for tyrosine kinase inhibitors. *The Journal of Antibiotics* **1997**, *50*, 264-266.

## Bibliographie

- [240] Gremaud,G. Isolement et identification de métabolites secondaires de *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea*, champignon parasite du cafeier. Université de Neuchâtel, **1994**.
- [241] Kam,C.-M.; Fujikawa,K.; Powers,J.C. Mecanism-based isocoumarin inhibitors for trypsin and blood coagulation serine protease: new anticoagulants. *Biochem.* **1988**, *27*, 2547-2557.
- [242] *Biochemistry of phenolic compounds*, Academic Press: London, **1964**.
- [243] Ayer,W.A.; Attha-Poku,S.K.; Browne,L.M.; Orszanska,H. The chemistry of the blue stain fungi. Part 3. Some metabolites of *Ceratocystis minor* (Hedgcock) Hunt. *Can.J.Chem.* **1987**, *65*, 765-769.
- [244] Lovisollo,C.; Schubert,A. Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in *Vitis vinifera* L. *Journal of Experimental Botany* **1998**, *49*, 693-700.
- [245] Soledade,M.; Pedras,C.; Okanga,F.I.; Zaharia,I.L.; Khan,A.Q. Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochem.* **2000**, *53*, 161-176.
- [246] Bell,A.A.; Puhalla,J.E.; Tolmsoff,W.J.; Stipanovic,R.D. Use of mutants to establish (+)-scylatone as an intermediate in melanin biosynthesis by *Verticillium dahliae*. *Can.J.Microbiol.* **1976**, *22*, 787-799.
- [247] Tsuruda,L.S.; Lamé,M.W.; Jones,A.D. Formation of epoxide and quinone protein adducts in B6C3F1 mice treated with naphthalene, sulfate conjugate of 1,4-dihydroxynaphthalene and 1,4-naphthoquinone. *Arch Toxicol* **1995**, *69*, 362-367.
- [248] Murty, V.; Penning, T.M. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ortho-quinone conjugate chemistry: kinetics of thiol addition to PAH ortho-quinones and structures of thioether adducts of naphthalene-1,2-dione. *Chem.-Biol.Interactions* **1992**, *84*, 169-188.
- [249] Alberts,B.; Bray,D.; Lewis,J.; Raff,M.; Roberts,K.; Watson,J.D. Caractères distinctifs des cellules végétales. In *Biologie moléculaire de la cellule*; Médecine-Science Flammarion: Paris, **1986**.
- [250] Einaga,H.; Nojima,M.; Abe,M. Photooxygenation (O<sub>2</sub>) of silyl enol ether from indan-1-ones: competitive formation of tricyclic 3-siloxy-1,2-dioxetane and  $\alpha$ -silylperoxy ketone. *J.Chem.Soc.Perkin Trans. I* **1999**, 2507-2512.
- [251] Dayan,S.; Almog,J.; Khodzhaev,O.; Rozen,S. A nouvel synthesis of indandiones using the HOF·CH<sub>3</sub>CN complex. *J.Org.Chem.* **1998**, *63*, 2752-2754.
- [252] Napolitano,E.; Morsani,M.; Fiaschi,R. Lithiation of the benzene ring in the presence of *orto*-alkyl substituents bearing one or two heteroatoms on the  $\beta$ -carbon. A convenient synthesis of mellein and kigelin. *Gazzetta Chimica Italiana* **1991**, *121*, 249-255.
- [253] Murphy,W.S.; Wattanasin,S. Intramolecular alkylation of phenols. Part4. Base-catalysed cyclisation of phenolic enones. Scope and limitations. *J.Chem.Soc.Perkin Trans. I* **1980**, 1555-1566.