

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL

FACULTE DES SCIENCES

ISOLEMENT ET CARACTERISATION
DE L'EUTYPINE ET D'AUTRES
METABOLITES SECONDAIRES
D'*Eutypa lata* (Pers. : Fr.) Tul.,
PARASITE DE LA VIGNE

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

Pascal de Angelis

CHIMISTE DIPLOME DE L'UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL POUR
L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR ES SCIENCES

INSTITUT DE CHIMIE DE
L'UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL

SEPTEMBRE 1990

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Isolement et caractérisation de l'Eutypine
et d'autres métabolites secondaires d'Eutypa
Lata (Pers. : Fr.) Tul., parasite de la
vigne

de Monsieur Pascal de Angelis

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

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

MM. les professeurs R. Tabacchi,

A. Jacot-Guillarmod et J. Fallot (Toulouse)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 31 janvier 1991

Le doyen :



Cl. Mermod

A mes parents

A mon amie

Remerciements

Le présent travail a été effectué d'Octobre 1986 à Juillet 1990 dans les Laboratoires de Chimie Organique Analytique de l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel, sous la direction de Monsieur le Professeur Raffaele Tabacchi auquel j'exprime ma profonde gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée, ses précieux conseils et pour la grande liberté qu'il m'a laissée au cours de ce travail.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail : Messieurs les Professeurs A. Jacot-Guillarmod et J. Fallot.

Je remercie particulièrement le Dr. G. Tsoupras pour l'aide précieuse et les discussions qu'il m'a apportées tout au long de ce travail ainsi que pour l'enregistrement des spectres MS.

Je tiens à remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail:

- Dr. S. Claude pour l'enregistrement des spectres de RMN et IR;
- Th. Zessiger pour l'enregistrement des spectres de MS;
- Dr. J. Gordon pour la participation au chapitre V.
- R. Pezet pour la préparation de certains milieux de culture;
- ENSAT-Toulouse pour la préparation des milieux de culture, pour l'exécution des tests biologiques et pour l'envoi du matériel végétal sain et malade;
- ZYMA S.A. (Nyon) pour avoir permis les mesures sur les produits radio-actifs;
- Les apprenties qui ont contribué de façon non négligeable à ce travail durant leur stage de laborantine;
- Le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique pour m'avoir accordé une bourse;
- L'Etat de Neuchâtel pour m'avoir confié un poste d'assistant.

Neuchâtel, août 1990

TABLE DES MATIERES

	page
<u>1. INTRODUCTION</u>	1
1. AVANT-PROPOS	1
1.1. Aperçu historique	1
1.2. Situation actuelle	1
1.3. Les toxines	6
1.4. Biosynthèse	8
2. ETAT DE LA RECHERCHE	11
2.1. Etude antérieure	11
2.2. Composés trouvés	11
3. BUT DU TRAVAIL	14
<u>II. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES COMPOSES</u>	15
1. MATERIEL DE DEPART	15
1.1. Culture sur milieu solide	15
1.2. Culture en milieu liquide	15
2. ESSAIS PRELIMINAIRES	16
2.1. Isolement des produits	18
2.2. Identification des produits isolés	18
2.3. Discussion	20
3. MILIEUX DE CULTURE TOXIQUES	22
3.1. Isolement des composés	23
3.2. Identification des composés	23
3.2.1. Identification de <u>A</u>	24
3.2.2. Identification de <u>B</u>	27
3.2.3. Identification de <u>C</u>	28
3.2.4. Identification de <u>D</u>	30
3.2.5. Identification de <u>E</u>	34
3.2.6. Identification de <u>F</u>	34
3.2.7. Identification de <u>G</u>	35
3.2.8. Identification de <u>H</u>	37
3.2.9. Identification de <u>I.1</u> et <u>I.2</u>	39
3.2.10. Identification de <u>J</u>	40
3.2.11. Identification de <u>K</u>	41
3.2.12. Identification de <u>L.1</u> à <u>L.3</u>	43
3.2.13. Identification de <u>M</u>	47
3.2.14. Identification de <u>N.1</u> à <u>N.5</u>	48
3.2.15. Identification de <u>O.1</u> à <u>O.3</u>	51
3.2.16. Identification de <u>P</u>	58
4. DETERMINATION DE L'ACTIVITE TOXIQUE	60
4.1. Activité toxique de produits isolés dans <u>ML₁</u>	60
4.2. Activité toxique du milieu <u>FA₁</u>	61
4.3. Discussion	62

5. ETUDE DU MYCELIUM	64
6. CARACTERISTIQUE DU PRODUIT LE PLUS PHYTOTOXIQUE	66
6.1. Cyclisation de <u>A</u>	66
6.2. Recherche rapide de <u>A</u>	68
7. AUTRES MILIEUX DE CULTURE EXAMINES	70
7.1 Milieu de culture toxique No 660	70
7.1.1. Identification de <u>R</u>	70
7.2. Milieu de culture toxique F ₁	72
7.2.1. Identification de <u>S</u>	72
8. UTILISATION D'UN DETECTEUR A BARETTE DE DIODES (DAD)	74
8.1. Présentation de l'unité complète	74
8.2. Avantage d'un détecteur à barette de diodes	74
8.3. Applications	75
8.4. Résultats obtenus	77
8.4.1. Dosage qualitatif	78
8.4.2. Dosage quantitatif	81
9. SYNTHESSES	82
9.1. Introduction	82
9.2. Synthèse de l'hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène (<u>C</u>)	82
9.3. Synthèse de l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromène (<u>N.5</u>)	84
9.4. Synthèse de la diméthyl-2,2 chromanone-4 (<u>N.1</u>)	85
9.5. Synthèse de l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromanone-4 (<u>N.2.1</u>)	86
9.6. Synthèse de l'hydroxy-7 diméthyl-2,2 chromanone-4 (<u>N.2.2</u>)	86
9.7. Synthèse du dihydroxy-5,7 diméthyl-2,2 chromanone-4 et synthèse du dihydroxy-6,7 diméthyl-2,2 chromanone-4	86
9.8. Synthèse du dihydroxy-7,8 diméthyl-2,2 chromanone-4	86
9.9. Synthèse de la chloro-6 diméthyl-2,2, chromanone-4 (<u>N.4.1</u>) Synthèse de la chloro-7 diméthyl-2,2, chromanone-4 (<u>N.4.2</u>)	87
III. <u>ETUDE DU MATERIEL VEGETAL DE VIGNE</u>	88
1. INTRODUCTION	88
2. ETUDE DU BOIS	89
2.1. Extraction	89
2.2. Fractionnement	90
2.3. Analyse des fractions du bois malade	91
2.4. Identification des composés isolés dans le bois malade	93
2.4.1. Identification de <u>U</u>	93
2.4.2. Identification de <u>V</u>	94
2.4.3. Identification de <u>W.1</u> à <u>W.4</u>	97
2.4.4. Identification de <u>X</u>	99
2.4.5. Identification de <u>Y.1</u> à <u>Y.2</u>	101
2.4.6. Identification de <u>Y.3.</u>	102
2.4.7. Identification de <u>Y.4.</u>	102
2.4.8. Identification de <u>Y.5.</u>	103
2.4.9. Identification de <u>Y.6</u> à <u>Y.8</u>	104
2.4.10. Identification de <u>Z</u>	105
2.5. Analyse des fractions du bois sain	106

3. ETUDE DES TIGES	107
3.1. Matériel de départ	107
3.2. Extraction	107
3.3. Séparation	109
3.4. Analyse des fractions	109
4. ETUDE DES FEUILLES	110
4.1. Matériel de départ	110
4.2. Analyse	110
5. ETUDE DES INFLORESCENCES	112
5.1. Matériel de départ	112
5.2. Analyse	112
6. DISCUSSION	113
IV. <u>MARQUAGE RADIO-ACTIF</u>	114
1. INTRODUCTION	114
2. PRESENTATION DE LA TECHNIQUE DE MESURE	115
2.1. Détection de la radiation	115
2.2. Détection de la radioactivité pour HPLC	117
2.3. Qualité d'un système de détection	118
2.4. Enregistrement	118
3. OBJECTIF	119
4. MECANISME D'INSERTION	122
5. PROTOCOLE DU MARQUAGE RADIO-ACTIF	124
5.1. Choix du marqueur	124
5.2. Inoculation et incorporation	125
5.3. Isolement des produits	125
6. DISCUSSION	129
V. <u>CONCLUSION GENERALE</u>	131
1. RESUME DES RESULTATS	131
1.1. Milieu de culture <i>Eutypa lata</i>	131
1.2. Matériel végétal	140
1.3. Voie biosynthétique	145
2. CONCLUSION ET PERSPECTIVE	146

VI. <u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	147
1. PURIFICATION ET PREPARATION DE L'AMBERLITE XAD-7	147
2. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)	147
3. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE	147
4.1. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PRESSION (HPLC)	148
4.2. CHROMATOGRAPHIE HPLC AVEC DETECTEUR A BARETTE DE DIODES	148
5. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	148
6. ANALYSE INSTRUMENTALE	149
6.1. RMN	149
6.2. MS	149
6.3. IR	149
6.4. $[\alpha]_D$	149
7. DERIVE SILYLE	150
8. OXYDATION DE DOUBLE LIAISON TERMINALE	150
9.1. SPECTRE UV/VIS	150
9.2. DOSAGE QUANTITATIF A L'AIDE DU DAD	150
10. SYNTHESSES	155
10.1. Synthèse de l'hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène (C)	155
10.1.1. Synthèse du diméthyl-2,2 dihydro-3,4 2H benzopyrane-1 carboxylate-6 de méthyle	155
10.1.2. Synthèse du diméthyl-2,2 2H benzopyrane-1 carboxylate de méthyle	156
10.1.3. Synthèse de l'hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène	156
10.2. Synthèse du diméthyl-2,2 chroménol-6 (N.5)	158
10.2.1. Synthèse du méthoxy-6 diméthyl-2,2 dihydro-3,4 2H benzopyrane	158
10.2.2. Synthèse du méthoxy-6 diméthyl-2,2 2H benzopyrane	158
10.2.3. Synthèse de l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromène	158
10.3. Synthèse de l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.2.1)	159
10.4. Synthèse de la chloro-6 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.4.1)	160
10.4.1. Synthèse de l'acétate de chloro-4 phényle	160
10.4.2. Synthèse de la chloro-5 hydroxy-2 acétophénone	160
10.4.3. Synthèse de la chloro-6 diméthyl-2,2 chromanone-4	161
10.5. Synthèse de la chloro-7 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.4.2)	162
11. DETECTION RADIOACTIVE	164
VII. <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	165

I. INTRODUCTION

1. AVANT-PROPOS

1.1. Aperçu historique [1-3]

Depuis quelques années, on observe dans les vignobles de Suisse romande, de France et de Californie un dépérissement important et une mort rapide de ceps en production. Des isolements effectués à partir du bois malade provenant de ces ceps morts ou mourants ont révélé la présence de plusieurs champignons, dont le plus fréquemment isolé est *Eutypa armeniacae*. Ce champignon fut isolé en 1933 sur l'abricotier par SAMUEL et il fut reconnu en Suisse pour la première fois en 1971.

Depuis quelque temps, qu'il soit issu de la vigne ou de l'abricotier, il est nommé *Eutypa lata* et le nom d'*Eutypa armeniacae* a été abandonné. La forme parfaite de ce champignon est un Ascomycète qui appartient à l'ordre des Sphaeriales, famille des Valvacées.

Géographiquement, ce champignon a été observé pour la première fois en Californie par CARTER et MOLLER sur du bois mort de vigne et s'est ensuite étendu sur toutes les régions du globe. Dès 1976, on le trouve aux USA, au Canada, en Grèce, en France et également en Suisse romande.

Le dépérissement qui atteint les ceps de vigne en Australie et en Amérique du Nord est nommé par CARTER "dying arm disease" (maladie du bras mort); celle-ci prendra l'appellation d'Eutypiose en français.

1.2. Situation actuelle [2-4]

Aujourd'hui l'Eutypiose s'est répandue aux quatre coins du monde. Elle a été identifiée en Australie, en Afrique du Sud, en Californie, au Mexique, ainsi qu'en Europe (Espagne, Bulgarie, Grèce, Italie). En France, ce sont surtout les vignobles charentais et bordelais qui sont affectés (Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon et Ugni-Blanc).

En Charentes, la maladie parasite aujourd'hui 34% des pieds de vigne; dans le Médoc, la variété Cabernet-Sauvignon (80% des vignes) est particulièrement sensible à ce champignon. En Suisse, l'Eutypiose est répandue dans tous les vignobles des cantons romands; elle n'est pas constatée dans le Sud des Alpes (Tessin, vallées méridionales des Grisons) et il n'y a aucune information concernant sa présence en Suisse alémanique. Elle affecte les cépages de Chasselas, Gamay et Pinot Noir.

L'Eutypiose est un grave dépérissement provoqué par ce champignon qui pénètre par les blessures de taille et se développe ensuite dans les bois de ceps. Par son développement lent et ses attaques dispersées, la maladie passe souvent inaperçue au départ mais son évolution n'en est pas moins inexorable sur beaucoup de cépages sensibles.

En ce qui concerne les symptômes, on observe un rabougrissement de la végétation. Les pousses, issues d'un bras infecté, ont une croissance ralentie et présentent des entre-nœuds très courts, mais toujours réguliers. Plus petites que la normale, les feuilles sont d'un vert pâle et souvent déformées avec des nécroses marginales pouvant se généraliser à l'ensemble du limbe. Les inflorescences, si elles ne se dessèchent pas avant la floraison, présentent un port dressé puis subissent en général une forte coulure. Des coupes dans un tronc ou dans un bras malade montrent une ou plusieurs nécroses profondes développées chacune à partir d'une blessure, le plus souvent une plaie de taille; cette nécrose très dure permet de différencier cette maladie avec l'Esca, autre forme de dépérissement de la vigne.

Toutes ces manifestations s'aggravent d'année en année et la mort d'un bras ou de la souche intervient généralement au bout de 3 à 5 ans.

La progression de la maladie semble assez rapide; elle provoque des pertes de récolte dans des proportions importantes, d'où des pertes de rentabilité des vignes.

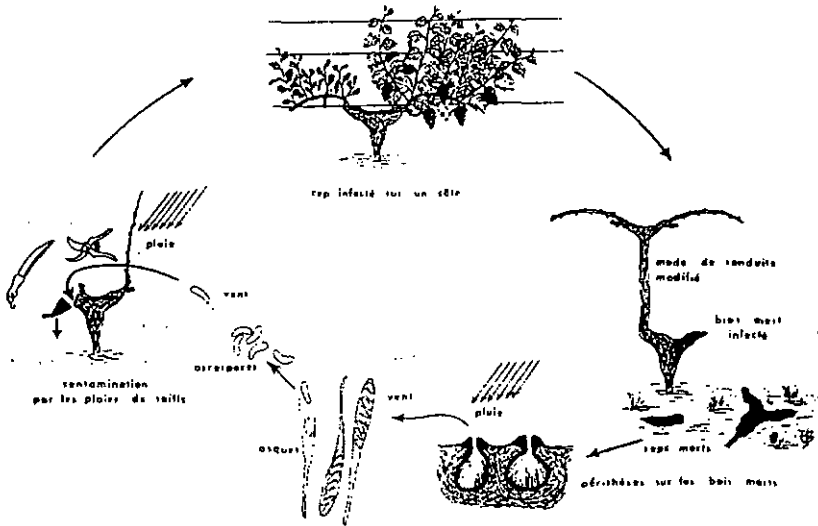


Fig. 1 : cycle biologique d'*Eutypa lata* [5]

Les périthèces présents sur les ceps morts constituent, pendant plusieurs années la source des contaminations; les ascospores sont libérées du périthèce pendant et juste après les chutes de pluie et sont répandues par le vent parfois sur de longues distances; arrivées sur les blessures de taille, les spores pénètrent dans le bois; ensuite le champignon se développe et infecte le cep; c'est le seul moyen connu de dispersion et d'infection actuellement. L'apparition des symptômes est capricieuse et semble dépendre des conditions climatiques; ils apparaissent 4 à 5 ans après la contamination.

Le cycle du dépérissement causé par *Eutypa lata* peut se résumer par la séquence des événements suivants:

- Infection du bois mort → Production des périthèces du champignon dans du vieux bois mort → Production des spores au printemps, en été et en automne → Diffusion des spores lors des périodes humides → Dépôt des spores sur blessure affectant le "vieux bois" par les spores → Germination des spores dans les cellules du bois → Formation d'une zone malade → Infection du "vieux bois" →

Pour le moment il n'existe aucun moyen de lutte directe contre l'Eutypiose. Seules des mesures préventives sont envisageables.

- diminuer les sources de la maladie; avant chaque campagne de taille, il est impératif de brûler les tas de souches conservés à proximité des vignobles ainsi que les ceps, cornes et moignons morts présents dans les vignes;
- réduire les risques de contamination en évitant les excès de vigueur qui semblent accroître la sensibilité, notamment sur jeunes vignes. Au moment de la taille, il est vivement conseillé de rendre l'opération la moins mutilante possible en diminuant le nombre et la dimension des blessures et en intervenant par temps sec et calme.

Ainsi, seules les mesures prophylactiques limitent les dégâts et permettent de conserver les vignes: un effort d'information est réalisé pour rappeler aux viticulteurs les principales mesures à prendre :

- réaliser les plaies de taille les moins grosses possible;
- cicatriser les plaies de taille, au moins les plus importantes;
- tailler le plus tard possible les cépages sensibles (mars);
- enlever et brûler les bois morts;
- éventuellement recéper à temps les parcelles qui paraissent atteintes.

Ensuite des interventions chimiques sur les cépages sensibles. Il convient de protéger les plaies aussitôt la taille effectuée par application d'une bouillie à base d'un benzimidazole (bénomyl), à la dose de 12,5 g/l ou aujourd'hui à base d'ATEMICEP, association de carbendazime et cyproconazole).

Aucun moyen curatif n'est actuellement envisageable sur les vignes malades. Un traitement chimique ne peut pas être efficace pour le moment, à cause de la longue durée de latence de la maladie. Si de nombreuses matières actives sont efficaces contre le mycélium en culture *in vitro*, la difficulté réside dans la mise au point de produits à pénétration rapide tout en préservant les vaisseaux à l'intérieur du bois. Actuellement quelques molécules fournies par des firmes sont à l'étude; l'espoir d'aboutir d'ici quelques années existe avec une assez forte probabilité. On est pour l'instant assez démuné devant la progression insidieuse et régulière de cette maladie.

Une méthode de lutte contre l'Eutypiose consiste à rechercher des plants résistants à cette maladie. Depuis plus de 20 ans, on sélectionne sur le terrain (en France surtout) les plants qui apparaissent plus performants et on les multiplie pour obtenir des clones, c'est-à-dire des ensembles d'individus génétiquement semblables, dont la culture est généralisée. Si cette méthode a démontré une certaine efficacité, elle présente l'inconvénient d'appauvrir le patrimoine viticole en réduisant la variabilité de la vigne. Les mutations naturelles étant rares, on ne sélectionne que peu de plants intéressants.

En France, le Ministère de la Recherche et de la Technologie a édicté un programme intitulé "Amélioration de la vigne par les voies de la biotechnologie végétale"; l'objectif est de rechercher des somaclones de Cabernet-Sauvignon résistants ou tolérants à l'Eutypiose et ayant conservé les caractères essentiels de la variété. [6]

L'utilisation de variétés résistantes est le moyen le moins cher, le plus facile, le plus sûr et le plus efficace pour contrôler les maladies des plantes. La culture de variétés résistantes élimine les coûts dûs aux méthodes de contrôle (sprays) et évite la contamination de l'environnement avec des produits toxiques.

Afin d'augmenter l'efficacité de la sélection, l'équipe du Professeur J. Fallot de Toulouse cultive en laboratoire des anthères (parties de la fleur qui renferme le pollen) de Cabernet-Sauvignon sur un milieu dont la composition conduit à la formation de tissus indifférenciés (ou cals); puis le changement du milieu de culture induit la différenciation d'embryons diploïdes à partir de ces cals et la régénération de la plante entière. Dans cette technique appelée "embryogénèse somatique", on régénère une plante entière à partir de cellules non sexuelles, ou cellules somatiques. Les clones ainsi obtenus sont des "somaclones".

Lors de ces cultures *in vitro* de somaclones, les chercheurs créent de nouveaux types génétiques, par variation spontanée incluant la mutagenèse spontanée (la culture *in vitro* induit des variants ou mutants cellulaires en nombre supérieur aux variants et mutants naturels), ou par variation dirigée (en présence d'un composé qui oriente celle-ci). Ces modifications génétiques permettent d'amplifier la variabilité des clones de vigne, tout en conservant intacts un certain nombre de caractères favorables.

Cependant, les qualités viticoles exigées des variétés cultivées ne devront pas être oubliées: croissance rapide, qualité des grappes, résistance aux facteurs climatiques et aux parasites, teneur en sucre et acidité convenable. etc... [7]

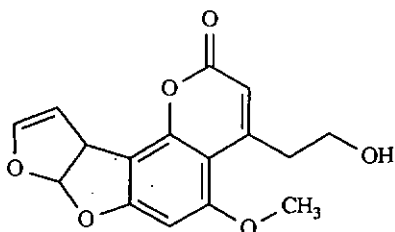
1.3. Les toxines [1][8]

Eutypa lata est ainsi impliqué comme cause du dépérissement de la vigne. Plusieurs observations de la symptomatologie de la maladie : le rabougrissement des rameaux - les nécroses foliaires et parfois leur dessèchement - la mort du cep bien avant la nécrose totale du bois et l'arrêt de la circulation de la sève - laissent supposer l'existence d'une toxine, véhiculée par la sève et agissant à distance. Comme les dégâts apparaissent sur les parties herbacées de la vigne où le champignon est absent, il doit bien agir par une toxine.

Les toxines semblent agir directement sur les protoplastes et interfèrent avec la perméabilité de ses membranes et avec ses fonctions; elles endommagent sérieusement ou tuent les cellules d'une plante. Un champignon peut produire des toxines dans des plantes infectées et également dans un milieu de culture. Les toxines sont des substances extrêmement nocives et sont efficaces à de très faibles concentrations. Elles blessent les cellules-hôtes en inactivant ou en inhibant les enzymes et interrompent par conséquent certaines réactions comme la photosynthèse, l'absorption de l'eau, la respiration ou affectent les processus de transcription et de traduction du DNA (RNA).

La science de la mycotoxicologie a débuté avec la découverte de l'aflatoxine au début des années 60. Depuis, l'intérêt et la recherche sur les mycotoxines en général se sont intensifiés; le résultat a été une prise de conscience du danger potentiel de ces métabolites secondaires pour la santé de l'homme et animale.

L'évaluation du rôle et de l'extension d'une mycotoxine requiert son isolement à partir d'une culture de champignons prélevée sur du matériel suspect.



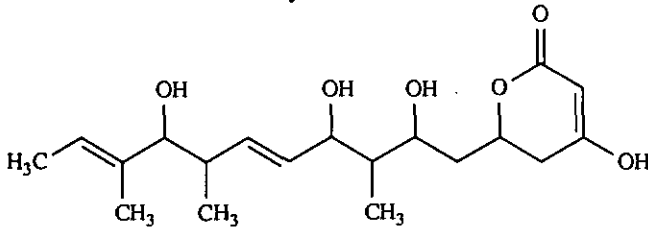
Aflatoxine B3 (Parasiticol)

Les mycotoxines représentent une large diversité d'espèces chimiques; il est ainsi possible de les regrouper en 21 groupes sur la base de leurs relations chimiques.

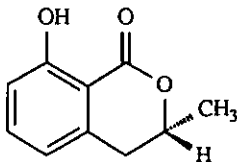
Elles ne proviennent que de 3 groupes d'unités de base biogénétiques : les polyketides, l'isopentenylpyrophosphate, les acides aminés.

La plupart des produits issus des champignons sont des "métabolites secondaires", ainsi appelés car ils ne jouent aucun rôle dans le métabolisme des organismes qui les ont produits. Ce sont des produits non-nutritionnels qui contrôlent les autres espèces dans l'environnement et qui jouent un rôle important dans la coévolution et la coexistence; ils règlent les phénomènes extérieurs où l'organisme est concerné.

Par exemple, *Alternaria citri* produit plusieurs toxines qui endommagent spécifiquement les citronniers. La toxine principale, qui possède la structure suivante, est biologiquement active. [9]



Septoria nodorum, le champignon responsable de la septoriose du Blé, produit en culture un ensemble de toxines comme la melleïne, puissant inhibiteur de la germination et de la croissance. [10]



Melleine (Ochracine)

1.4. Biosynthèse [11]

Dans un milieu de culture où un champignon a produit des phytotoxines, il n'est pas rare de trouver plusieurs dérivés de la toxine. Ces composés que l'on peut classer selon l'origine biosynthétique, sont dérivés à partir de trois voies biosynthétiques.

Le métabolisme primaire d'un organisme est la somme d'une série de réactions chimiques catalysées par des enzymes qui lui fournissent de l'énergie, des intermédiaires et des macromolécules comme les protéines et l'ADN. Les métabolites secondaires sont dérivés de ces intermédiaires, souvent par des processus reliés à ceux conduisant aux métabolites primaires.

La principale source de carbone et d'énergie pour la plupart des organismes hétérotrophes est le glucose. Sa dégradation commence par une conversion en un triose, soit par la voie de Embden-Meyerhof ou par le cycle des pentoses-phosphates. La première voie donne un tétrose qui peut réagir avec le phosphoénolpyruvate pour donner l'acide shikimique, un intermédiaire pour les acides aminés aromatiques et aussi pour beaucoup de métabolites secondaires.

Une autre voie, à partir du triose est la conversion en pyruvate, puis en acétyl-coenzyme-A qui est l'intermédiaire le plus important dans le métabolisme secondaire des champignons. Une carboxylation de l'acétyl-CoA donne le malonyl-CoA, puis une condensation d'acétyl-CoA avec plusieurs molécules de malonyl-CoA conduit soit aux polyketides, les plus nombreux métabolites secondaires des champignons ou aux acides gras qui à leur tour conduisent aussi à des métabolites secondaires. Alternativement, une condensation de trois molécules d'acétyl-CoA donne l'acide mévalonique, l'intermédiaire clé pour la biosynthèse des terpènes et des stéroïdes.

Finalement, par condensation de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate, on entre dans le cycle de l'acide tricarboxylique, qui sert non seulement à l'oxydation complète du glucose, mais aussi en tant que source de squelettes carbonés de plusieurs acides aminés et d'autres métabolites secondaires.

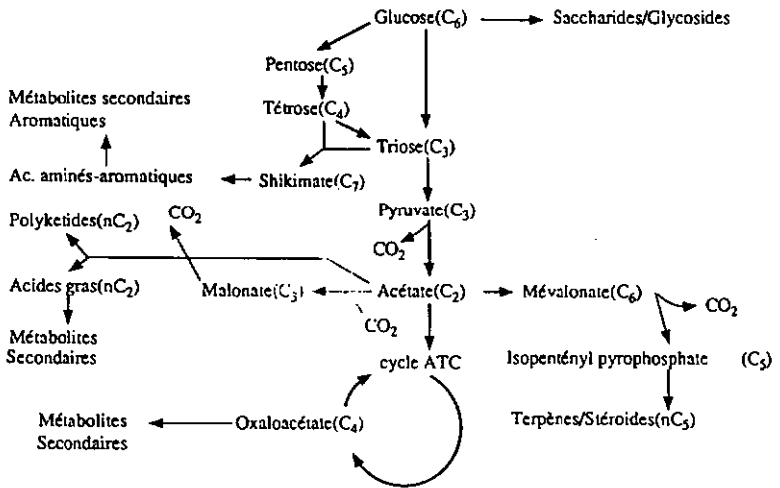


Fig. 2 : voies biosynthétiques des métabolites secondaires.

En plus des voies biosynthétiques qui forment la base de la classification des métabolites, il y a trois processus biochimiques qui modifient les produits ou les voies principales:

- par oxydation et réduction, surtout dans la chaîne respiratoire;
- par méthylation biologique, où le groupe méthyle de la méthionine est transféré;
- par halogénéation; quelques métabolites secondaires des champignons contiennent des atomes de chlore.

Il est possible d'étudier la biosynthèse des métabolites secondaires à l'aide de précurseurs marqués. On peut par exemple incorporer des petites unités, comme l'acétate ou le mévalonate, où le carbone-14 est utilisé comme atome marqueur. Il est essentiel d'établir que le produit est radiochimiquement pur et que les dégradations chimiques utilisées pour localiser les atomes radioactifs dans le produit sont suffisamment sélectives.

2. ETAT DE LA RECHERCHE

2.1. Etude antérieure

RENAUD [14] a entrepris une étude de la composition chimique du milieu de culture d'*Eutypa lata*. Il a tenté différentes méthodes d'extraction et de séparation par chromatographie sans cependant pouvoir donner une méthode universelle et reproductible permettant l'obtention d'une toxine. L'échec des diverses tentatives de séparation a suggéré qu'il pouvait s'agir d'un phénomène de synergie.

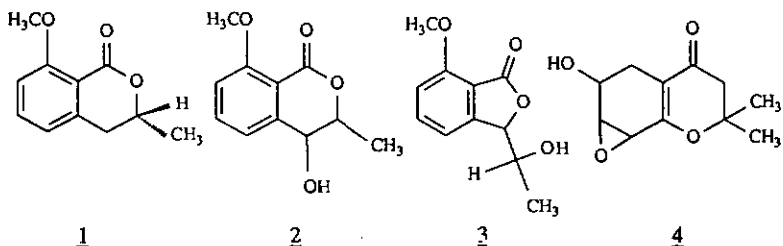
TEY-RULH [15] a étudié au cours de sa thèse des métabolites toxiques *secrétés in vitro* par *Eutypa lata*.

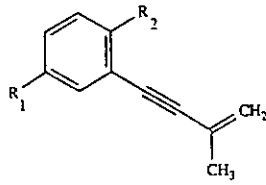
2.2. Composés trouvés

Les métabolites secondaires suivants ont été isolés et identifiés.

Les tests d'activité biologique des produits purs effectués sur tomates ont montré que:

- les composés 5, 7, 10 et les stéroïdes 11 à 15 étaient phytotoxiques;
- les composés 6 et 8 étaient peu phytotoxiques;
- les composés 1, 2, 3, 4 et 9 étaient non phytotoxiques.





R₂:

R₁:

5

-OCH₃

-CH₂OH

6

-OH

-CH₂OH

7

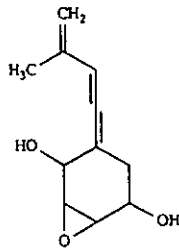
-OH

-CHO

8

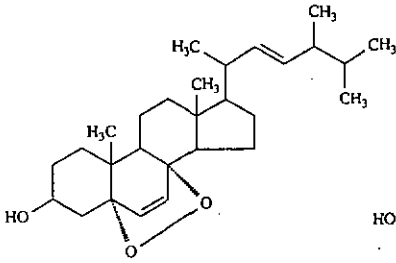
-OCH₃

-CHO

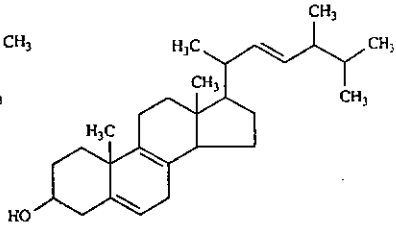


9

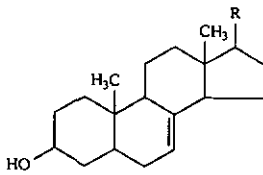
Les stéroïdes suivants, présents en trace, ont été caractérisés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS):



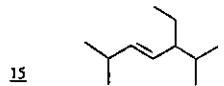
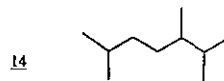
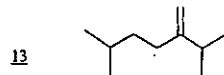
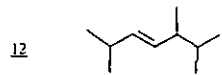
10



11



R :



3. BUT DU TRAVAIL

- Le but principal de notre travail est d'isoler et identifier le composé le plus phytotoxique responsable de l'Eutypiose. Une séparation du milieu de culture en différentes fractions et un contrôle de l'activité toxique à l'aide de tests biologiques devront permettre de mettre en évidence une ou des toxines. Une méthode universelle et reproductible permettant d'affirmer la présence de cette toxine dans un milieu quelconque devra être mise au point. Nous voulons étudier d'autres métabolites majeurs et aussi mineurs présents dans le milieu de culture d'*Eutypa lata*.

- Nous voulons savoir si la toxine est présente dans les différentes parties végétales composant un cep de vigne malade et comparer avec un échantillon sain. Pour cela, nous allons rechercher la toxine et d'autres composés apparentés dans le bois, les feuilles, les tiges et les inflorescences saines et malades.

- Afin de confirmer l'origine et la voie biosynthétique de la phytotoxine, nous allons procéder à un marquage radio-actif d'un milieu de culture. Le but est de corréler l'origine des composés isolés avec les structures proposées.

II. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES COMPOSES

I. MATERIEL DE DEPART

Le milieu de culture d'*Eutypa lata* constitue le matériel de base. Le champignon, isolé sur du matériel infecté de vigne, en particulier à partir de fragments de bois infecté, provient de différentes régions de Suisse et du Sud-Ouest de la France.

1.1. Culture sur milieu solide [1]

Le champignon est cultivé dans une boîte de Pétri (diamètre 9 cm) sur milieu P.D.A. (Potato dextrose agar); les différentes souches utilisées sont repiquées toutes les 2-3 semaines suivant leur croissance, lorsque toute la surface de la boîte a été colonisée.

1.2. Culture en milieu liquide

La composition du milieu pour la culture d'*Eutypa lata* comprend :

- Solution A :

KH_2PO_4	: 5	g	D(+)-Glucose anh.	: 50	g
NaCl	: 2,5	g	D(+)-Maltose anh.	: 25	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,5	g	D(+)-Saccharose	: 25	g
FeCl_3	: 0,42	g			
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 5	g			
KNO_3	: 25	g	H_2O	: 5	l

- Solution B (oligo-éléments) :

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 27	mg	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 6,2	mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 4,4	mg	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$: 4	mg
H_3BO_3	: 2	mg	H_2O	: 200	ml

5 ml de solution B sont introduits dans 5000 ml de solution A; le pH de la solution finale est ajusté à 5,50 au moyen d'une solution NaOH 0,1 N. La solution est répartie équitablement dans 24 erlenmeyers de 500 ml; ils sont ensuite fermés avec du coton hydrophobe pour permettre l'échange de gaz et empêcher toute spore ou bactérie éventuelle provenant de l'atmosphère de venir contaminer les solutions; ils sont recouverts finalement avec une feuille d'aluminium afin que le coton reste stérile après auto-clavage.

Les conditions d'auto-clavage sont : 25 minutes sous une pression de 1 atm à 120°C.

Après refroidissement, sous courant d'air stérile, on inocule chaque erlenmeyer par 4-8 morceaux de P.D.A. de 3 mm de diamètre en croissance dans un milieu solide. On recouvre seulement avec le coton et les solutions sont agitées à température ambiante et lumière naturelle (140 rev/min - 16h de jour + 8h de nuit).

2. ESSAIS PRELIMINAIRES

La Station fédérale de Changins nous a fourni le premier milieu de culture liquide où le mycélium a été séparé par centrifugation et filtration. Nous disposons de 1,2 l d'une solution brune de pH = 10.

GARDNER [9] mentionne l'isolement et l'identification de plusieurs toxines qui attaquent les citrioniers. Le milieu de culture a été filtré et acidifié à pH = 3,6 avec CH₃COOH et les toxines adsorbées sur Amberlite XAD-7 ou Florisil.

Les résines Amberlite XAD sont des adsorbants synthétiques; XAD-7 est un polymère d'esters acryliques qui a l'avantage de retenir de grandes quantités de composés organiques dans l'eau; la désorption se fait par utilisation de solutions-tampons à différents pH ou par un solvant organique. [12]

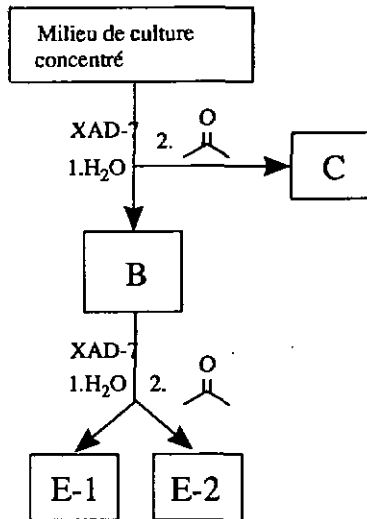
Après préparation et introduction par voie humide de 50 g de résine XAD-7, le milieu de culture, ramené à un volume de 60 ml, est introduit sur une colonne (40 x 1.5 cm). En éluant avec de l'eau bidistillée, nous avons obtenu:

- une fraction basique non retenue (B) et
- une fraction (C) décrochée par de l'acétone.

La fraction (B) a ensuite été acidifiée jusqu'à $\text{pH} \approx 3$ avec HCl 2 N, réintroduite sur XAD-7 nouvellement préparée, éluée avec de l'eau.

Lors du décrochage avec l'acétone, nous avons obtenu 2 bandes distinctes correspondant aux fractions (E-1) et (E-2).

Schéma de fractionnement sur XAD-7 :



2.1. Isolement des produits

Après concentration, les fractions (C), (E-1) et (E-2) ont été purifiées par HPLC à l'échelle préparative sur colonne RP-18. Comme éluant, nous avons utilisé le gradient 30-100% MeOH dans l'eau en 25 min, à un débit de 2 ml/min. La fraction obtenue est concentrée et extraite au chloroforme. Après évaporation du solvant sous courant d'azote, nous avons obtenu quelques milligrammes de cristaux incolores qui ont été soumis à l'analyse.

Les fractions (E-1) et (E-2) sont également purifiées par HPLC en éluant avec le système isochratique MeOH-Eau 1:1. Après évaporation à sec, les deux produits obtenus ont été identifiés.

2.2. Identification des produits isolés

La comparaison des données spectroscopiques avec celles de la littérature [10] indique que les fractions (C) et (E-1) contiennent la (-)3R dihydro-3,4 méthoxy-8 méthyl-3 isocoumarine, communément appelée (-)3R O-Méthylmelléine. La (±) Melléine a été synthétisée par NARASIMHAN et BHIDE [13], référence qui a aussi servi de comparaison.

Analyses

- $R_f = 0.78$ ($\text{CHCl}_3\text{-CH}_2\text{COEt}$, 5:1)
- $[\alpha]_D^{20} = -222^\circ$ réf. [10] : $[\alpha]_D^{20} = -218 \pm 3^\circ$
- UV : $\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH}) = 246$ et 312 nm

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 1.48 (3H, d, $J = 6$ Hz, CH_3), 2.88 (2H, d, $J = 6$ Hz, CH_2), 3.95 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.57 (1H, m, $J = 6$ Hz, H(C-3)), 6.80 (1H, d, $J = 8$ Hz, H(C-5)), 6.92 (1H, d, $J = 8$ Hz, H(C-7)), 7.45 (1H, dd, $J = 8$ Hz, $J = 7.4$ Hz, H(C-6)).

MS (m/z, %): 192(M^+ 77), 174(18), 159(14), 148(66), 146(100), 131(51), 118(27), 105(30), 90(69), 77(25), 43(35).

IR (cm^{-1}): 2840 (νOCH_3), 1720 (νCOO), 1600 ($\nu\text{C}=\text{C}$).

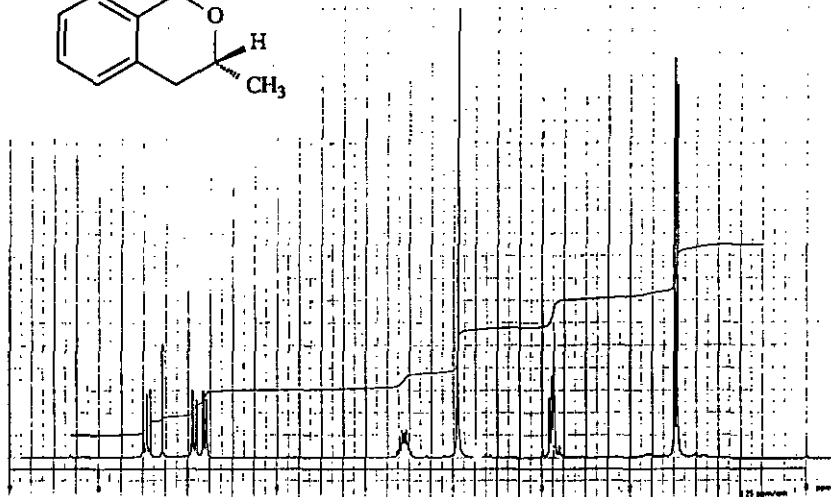
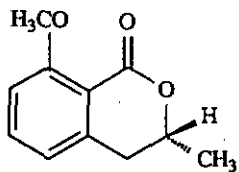


Fig. 3 : spectre ^1H -RMN de E.

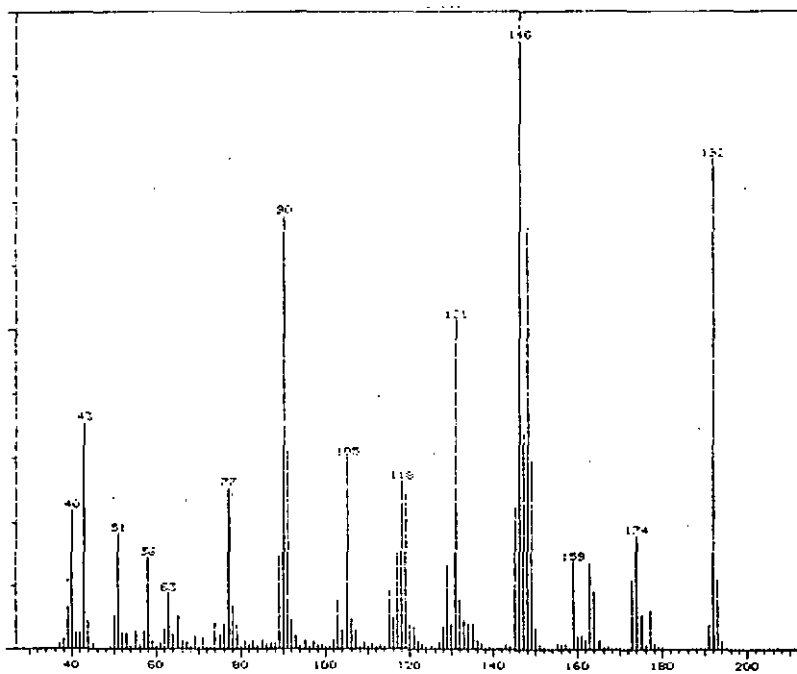


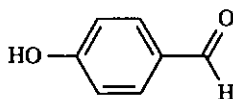
Fig. 4 : spectre MS de E.

Les données spectroscopiques de la fraction (E-2), correspondant à celle de la deuxième bande décrochée en milieu acide, montrent qu'il s'agit du p-hydroxybenzaldéhyde.

Analyse

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 2.90 (1H, large, OH), 6.98 (2H, d, $J = 8$ Hz, HAr), 7.83 (2H, d, $J = 8$ Hz, HAr), 9.87 (1H, s, CHO).

MS (m/z, I%): 122(M^+ 100), 121(74), 93(43), 76(11), 65(64), 43(30), 39(44).



2.3. Discussion

L'exemple ci-dessus est un cas où la souche est devenue trop vieille, si bien que le champignon a un métabolisme très réduit. Ceci est mis en évidence par la présence pratiquement seule de la melléine et l'absence totale des autres métabolites, comme ceux trouvés antérieurement dans le travail de RENAUD. [14]

Chaque fraction récoltée précédemment a été reprise en solution dans l'eau pour le test d'activité. Celui-ci consiste à plonger dans les solutions des plantules de tomate ayant poussé pendant 15 jours dans une serre à la lumière naturelle et préalablement coupées à la base de la tige. Chaque plantule de tomate mesure environ 10 cm de long, pèse entre 300 et 500 mg et doit posséder 2 feuilles et 2 cotylédons. Ces solutions sont contenues dans des piluliers de 2 ml et l'activité est observée après 4 heures d'incubation à la lumière naturelle et température ambiante. L'activité est déterminée par le flétrissement ainsi que par la perte de poids par référence à un témoin plongé dans de l'eau désionisée. Une solution de melléine à une concentration de 0,6 mg/ml est aussi testée.

L'activité est établie par la relation suivante :

$$\text{Activité [\%]} = - 100 (P_2 - P_1) / P_1$$

où P_1 est le poids de la tomate AVANT la culture

P_2 est le poids de la tomate APRES la culture.

Les valeurs obtenues comprises entre -2,7 et -4,2% pour les différentes solutions, montrent que la masse des plantules a augmenté et qu'il n'y avait ainsi aucune activité toxique dominante. De plus, nous n'avons observé aucun flétrissement des feuilles de tomates immergées. Ceci confirme donc que, dans ce cas, le champignon n'a pas produit de substances toxiques. La perte d'agressivité d'une souche se caractérise par la présence de quantités importantes de melléine.

Nous avons contrôlé au moyen du même test l'activité des fractions décrochées d'un autre milieu de culture fourni également par la Station fédérale de Changins à 3 pH différents (acide, neutre et basique); nous n'avons observé aucune activité particulière.

La présence du p-hydroxybenzaldéhyde, intermédiaire provenant de la voie de l'acide shikimique, permet d'indiquer que la biosynthèse reste bloquée à ce niveau.

3. MILIEUX DE CULTURE TOXIQUES

Nous avons reçu de l'ENSAT- Toulouse les 2 milieux de culture toxiques suivants:

- 3100 ml d'un milieu ML₁ qualifié "moyennement actif",
- 1130 ml d'un milieu FA₁ qualifié "fortement actif"

Après élimination du mycélium par filtration sur Büchner et concentration à un dixième du volume initial environ, nous avons entrepris une extraction liquide-liquide à l'éther après avoir ajusté le pH à 5,3 au moyen de NaOH 0,1 N. C'est cette valeur de pH qui permet d'obtenir un extrait brut très actif. La phase aqueuse et le mycélium sont conservés séparément à - 20°C tandis que la phase organique est séchée sur MgSO₄ anh. et concentrée à l'évaporateur rotatif.

La présence des sucres dans le milieu de culture rend l'extraction un peu difficile. Avant de concentrer le filtrat de départ, il est possible d'ajouter le même volume d'éthanol. Ceci permet d'éliminer une bonne partie des saccharides qui précipitent à froid; l'extraction à l'éther s'en trouve facilitée par une meilleure séparation entre les phases aqueuse et organique.

L'analyse du mélange brut par HPLC montre la complexité du mélange :

Colonne RP-18 (250x8 mm)
Débit : 2 ml/min
Gradient : 40-80% MeOH:Eau
 en 30 min, puis
 80-100% MeOH:Eau
 en 10 min, puis
 100% MeOH
 en 5 min.

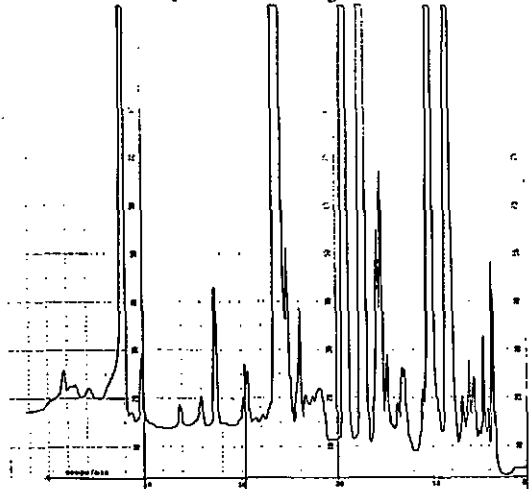


Fig. 5 : chromatogramme de l'extrait brut par HPLC.

3.1. Isolement des composés

750 mg d'extrait brut du milieu ML_1 dans 5,5 ml de dichlorométhane sont chromatographiés sur colonne de silice ($CH_2Cl_2/MeOH$ 10/0-9/1).

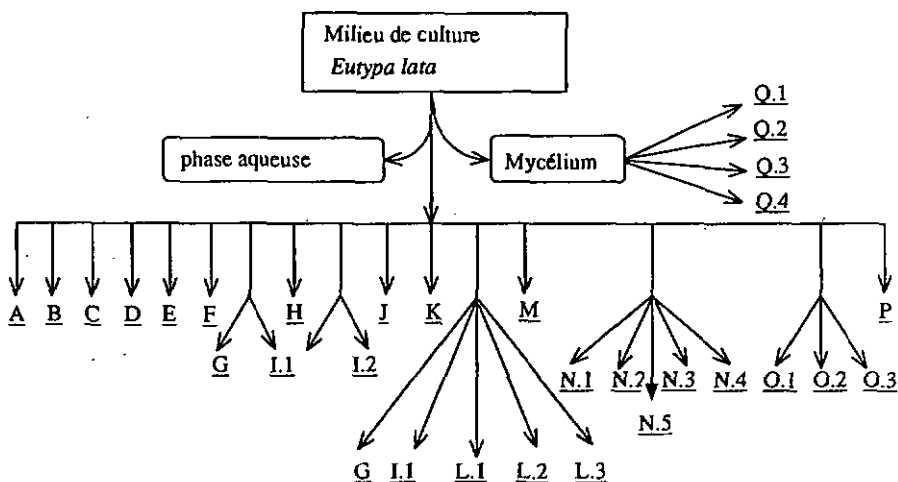
Les fractions obtenues sont collectées dans des tubes de 10 ml, analysées par CCM (CH_2Cl_2 -MeOH / 95:5) et regroupées dans certains cas.

La chromatographie liquide à haute performance à l'échelle semi-préparative sur RP-18 avec méthanol-eau comme phase mobile a été utilisée comme étape finale pour la purification des produits. La détection est réalisée grâce à un détecteur UV généralement à 254 nm.

La plupart de nos fractions ont été purifiées de cette manière tandis que d'autres ont été examinées directement par GC-MS.

3.2. Identification des composés

Fig. 6 : schéma de séparation des composés A à Q.4.



3.2.1. Identification de A

21 mg de ce produit ont été obtenus sous forme de cristaux blancs et présentent les propriétés suivantes :

- $R_f = 0.70$ dans CHCl_3 -AcOEt (5:1);
- $F = 72^\circ\text{C}$
- UV : $\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH}) = 263 \text{ nm}$
- FeCl_3 : test phénol positif (tâche bleue)
- H_2SO_4 10% - Vanilline : tâche violette
- 2,4-dinitrophénylhydrazine: test aldéhyde/cétone positif.

Dans le spectre ^1H -RMN, l'irradiation du doublet de doublets à 7.80 ppm transforme les doublets à 7.08 et 7.90 ppm en singulets. Le pic large à 6.33 ppm est échangeable dans D_2O .

Le produit est l'hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzaldéhyde.

Ce produit sera nommé "Eutypine" par la suite.

Analyse

^1H -RMN (CDCl_3): 2.03 (3H, dd, $J = 1.2 \text{ Hz}$, CH_3), 5.42 et 5.49 (2H, m, $=\text{CH}_2$), 6.33 (1H, large, OH), 7.08 (1H, d, $J = 10 \text{ Hz}$, ArH), 7.80 (1H, dd, $J = 10 \text{ Hz}$, $J = 1.2 \text{ Hz}$, ArH), 7.90 (1H, d, $J = 1.2 \text{ Hz}$, ArH), 9.88 (1H, s, CHO).

^{13}C -RMN (CDCl_3): 23.27 (CH_3 -C=C-), 80.56 (Ar-C=C-C=), 99.11 (Ar-C=C-C=), 110.92 (C-3), 115.56 (C-5), 123.96 (-C=CH₂), 125.93 (-C=CH₂), 130.28 (C-6), 131.96 (C-2), 134.31 (C-1), 161.35 (C-4), 189.95 (CHO).

MS (m/z, I%): 186(M⁺ 100), 185(96), 171(4), 157(55), 143(6), 128(60), 115(28), 102(15), 89(47), 77(36), 63(67), 51(32), 39(29).

IR (cm^{-1}): 1675 (νCO), 1140 (νOH).

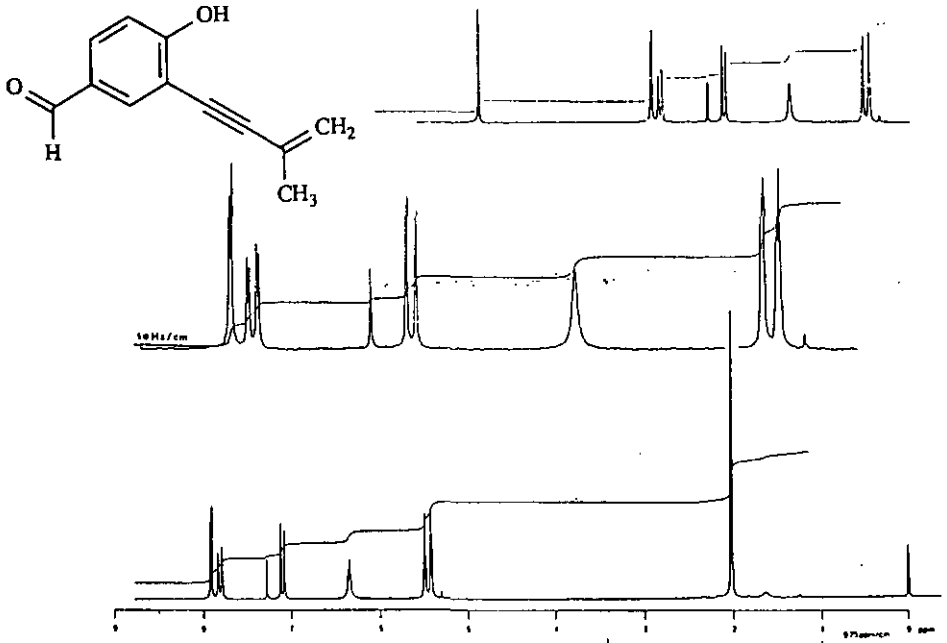
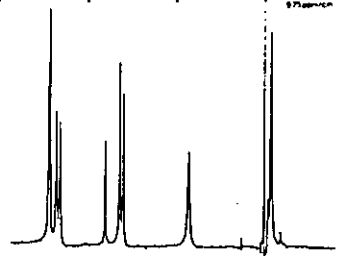
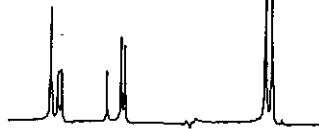


Fig. 7 : spectre $^1\text{H-RMN}$ de A.

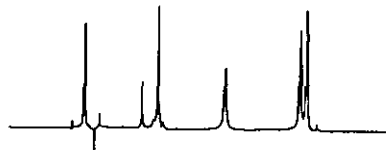
a) spectre non-découplé



b) échange dans D_2O



c) irradiation à 7.80 ppm



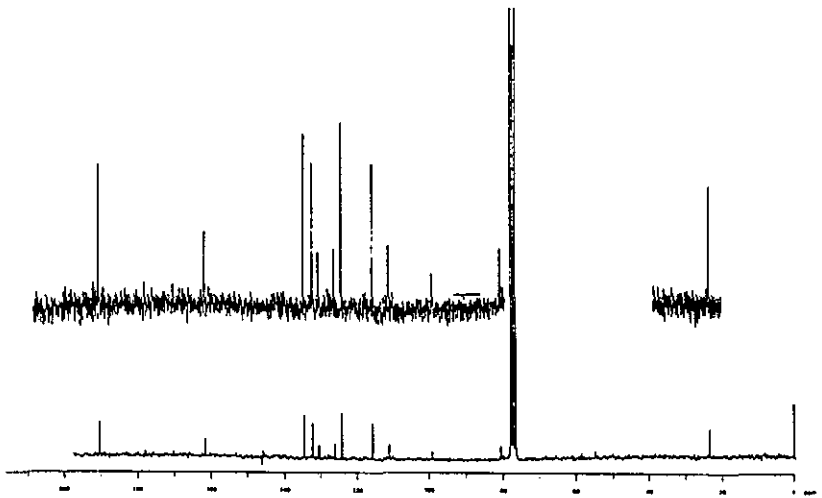


Fig. 8 : spectre ^{13}C -RMN de A.

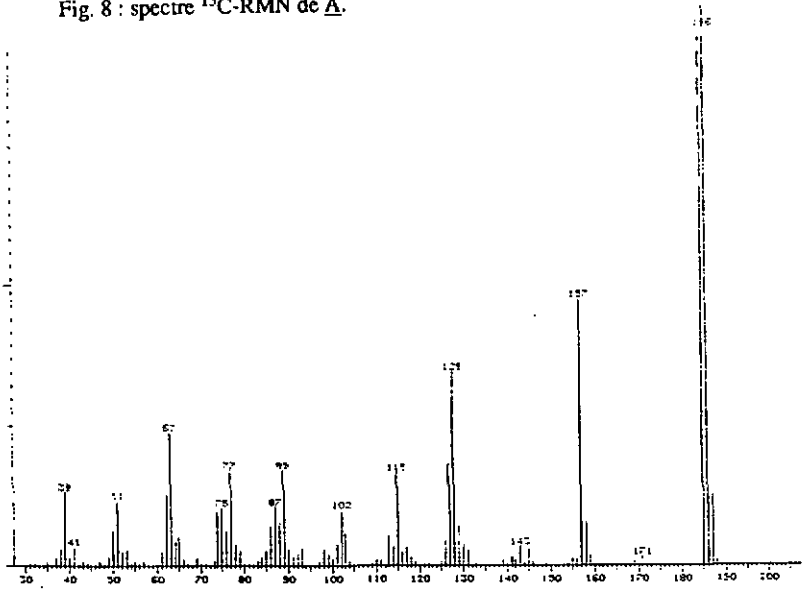


Fig. 9 : spectre MS de A.

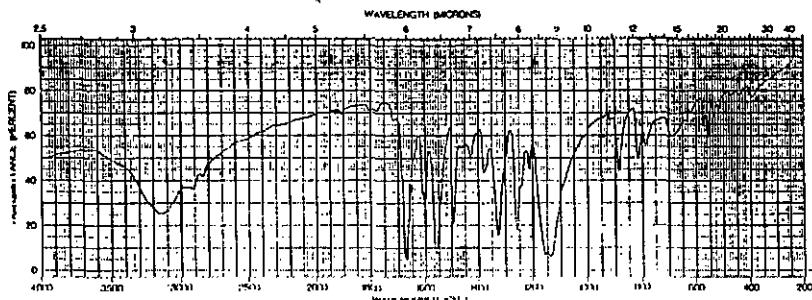


Fig. 10 : spectre IR de A.

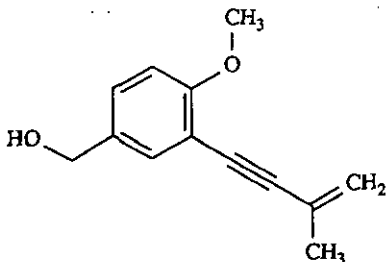
3.2.2. Identification de B

1 mg de ce produit a été isolé et a pu être soumis à l'analyse. Les valeurs, comparées avec [14], montrent qu'il s'agit de l'alcool méthyloxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzylique.

Analyse

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 2.00 (3H, dd, CH_3), 3.90 (3H, s, OCH_3), 4.60 (2H, s, CH_2), 5.32 et 5.44 (2H, dd, $=\text{CH}_2$), 6.86 (1H, d, ArH), 7.34 (1H, dd, ArH), 7.43 (1H, d, ArH).

MS (m/z, %): 202(M^+ 100), 185(11), 171(6), 161(22), 141(20), 128(48), 115(28), 91(19), 77(19).



3.2.3. Identification de C

15 mg de ce composé ont été isolés sous forme de cristaux jaunâtres.

- $R_f = 0.49$ (CHCl_3 -AcOEt / 5:1)

- Sur TLC, après avoir sprayé avec vaniline - solution éthanolique H_2SO_4 , une tâche de couleur vert caractéristique des chromènes apparaît. [16]

- UV : $\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH}) = 220, 264$ et 309 nm

Le spectre ^1H -RMN révèle la présence d'un cycle aromatique trisubstitué ($\delta = 6.81, 7.05$ et 7.11 ppm), la présence d'une double liaison (système AB $\delta = 5.80$ et 6.37 ppm), d'un singulet correspondant à un groupe $-\text{CH}_2$ ($\delta = 4.58$ ppm), d'une fonction alcool ($\delta = 1.74$ ppm) et d'un groupe diméthyl géminale en α d'un atome d'oxygène ($\delta = 1.43$ ppm). Nous pouvons comparer nos valeurs spectroscopiques avec celles du chromène décrit dans [17] où nous avons un groupe $-\text{CH}_2\text{OH}$ au lieu de $-\text{COOCH}_3$ dans notre cas. L'irradiation du proton à 7.05 ppm transforme le doublet de doublets à 7.12 ppm en un doublet. Les analyses, comparées avec la réf. [17] et avec un échantillon synthétique (c.f. 9.2.), montrent que le produit est l'hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène.

Analyse

^1H -RMN (CDCl_3): 1.43 (6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.74 (1H, large, OH), 4.58 (2H, s, CH_2), 5.80 (1H, d, $J_{\text{AB}} = 9$ Hz, CH=), 6.37 (1H, d, $J_{\text{AB}} = 9$ Hz, CH=), 6.81 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, ArH), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, ArH), 7.11 (1H, dd, $J = 7.5, J = 2.0$ Hz, ArH).

MS (m/z, %): $190(\text{M}^+ 16)$, $175(100)$, $158(10)$, $145(6)$, $128(4)$, $115(7)$, $91(3)$, $77(3)$.

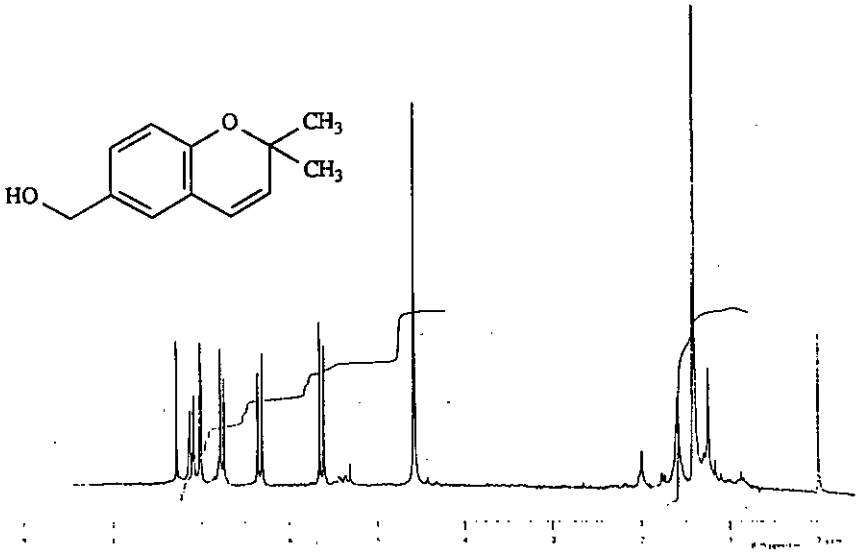


Fig. 11 : spectre ¹H-RMN de C.

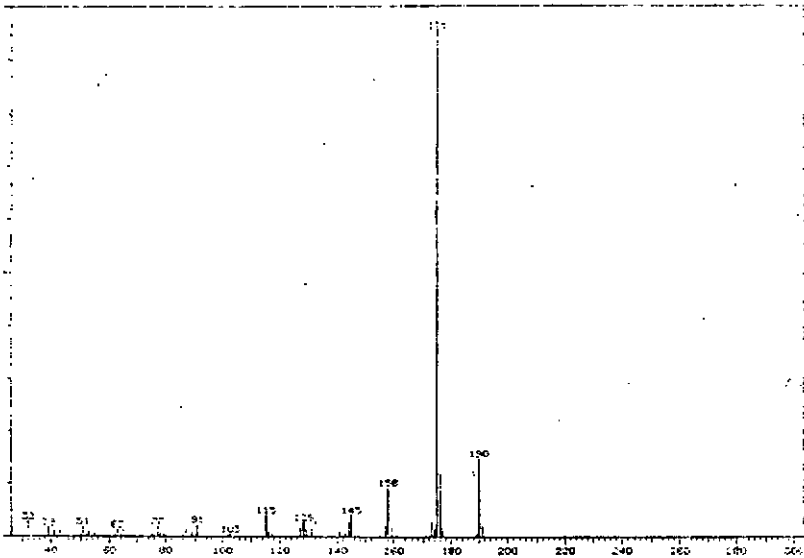


Fig. 12 : spectre MS de C.

3.2.4. Identification de D

15 mg de ce composé ont été isolés et soumis à l'analyse.

- $R_f = 0.55$ (CHCl_3 -AcOEt / 5:1)

- UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 210, 263, 273, 323 \text{ nm}$

- UV (AlCl_3 /MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 210, 263, 273, 323 \text{ nm}$

- UV (AlCl_3 /MeOH + HCl): $\lambda_{\text{max}} = 233, 264, 272, 318 \text{ nm}$

AlCl_3 est un réactif utilisé pour la détection de groupes dihydroxy en position ortho, particulièrement dans le cas des anthocyanines. La présence d'un tel groupe est mise en évidence par un déplacement hypsochromique d'environ 30-40 nm entre le spectre UV en présence de AlCl_3 comparé au spectre UV obtenu dans AlCl_3/HCl . [18]

Les valeurs obtenues montrent que, dans notre cas, les 2 groupes -OH ne sont pas en position ortho sur le cycle aromatique.

En $^1\text{H-RMN}$, l'irradiation du groupe méthyle à 2.00 ppm transforme les signaux multiplets à 5.36 et 5.43 ppm en doublets. L'échange avec D_2O permet de bien mettre en évidence la présence de deux groupes -OH par la disparition des signaux à 4.46 et 5.39 ppm. Le pic à 1.62 ppm correspond à la présence d'eau; il disparaît également lors de l'échange. Les analyses effectuées sur ce produit indiquent qu'il s'agit de l'hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 nyl-1)-2 phénol.

Analyse

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 2.00 (3H, dd, CH_3), 4.46 (1H, s, OH), 5.36 et 5.43 (2H, m, $=\text{CH}_2$), 5.39 (1H, s, OH), 6.81 (3H, m, $3 \times \text{ArH}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3): 23.52 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$ - $\text{C}=\text{C}$ -), 82.52 ($\text{Ar}-\text{C}=\underline{\text{C}}$ -), 98.28 ($\text{Ar}-\underline{\text{C}}=\text{C}=\text{C}$ -), 110.72 (C-3), 116.28 (C-5), 118.24 (C-6), 119.80 (C-2), 123.68 ($-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 126.96 ($-\underline{\text{C}}=\text{CH}_2$), 149.68 (C-1), 151.96 (C-4).

IR (cm^{-1}): 3280 (large, νOH), 2200 ($\nu\text{C}=\text{C}$).

MS (m/z , 1%): 174(M^+ 100), 159(17), 147(13), 131(20), 115(17), 103(8), 91(9), 77(10).

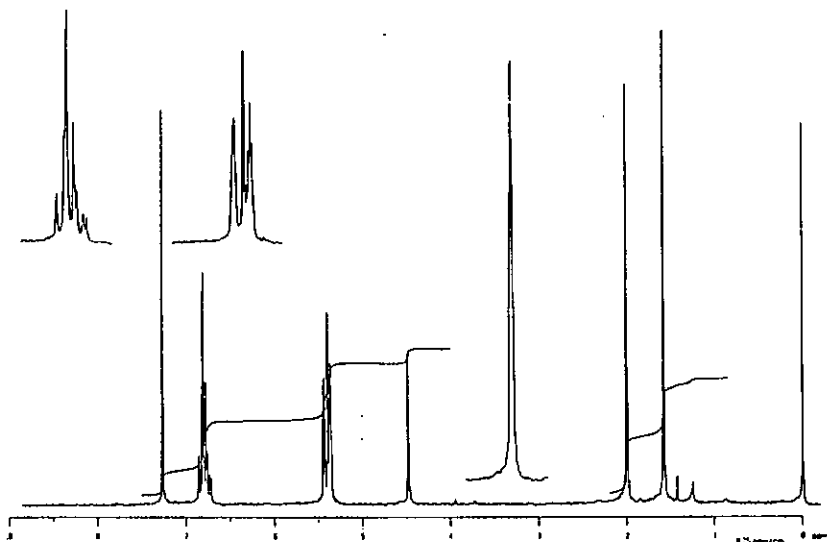
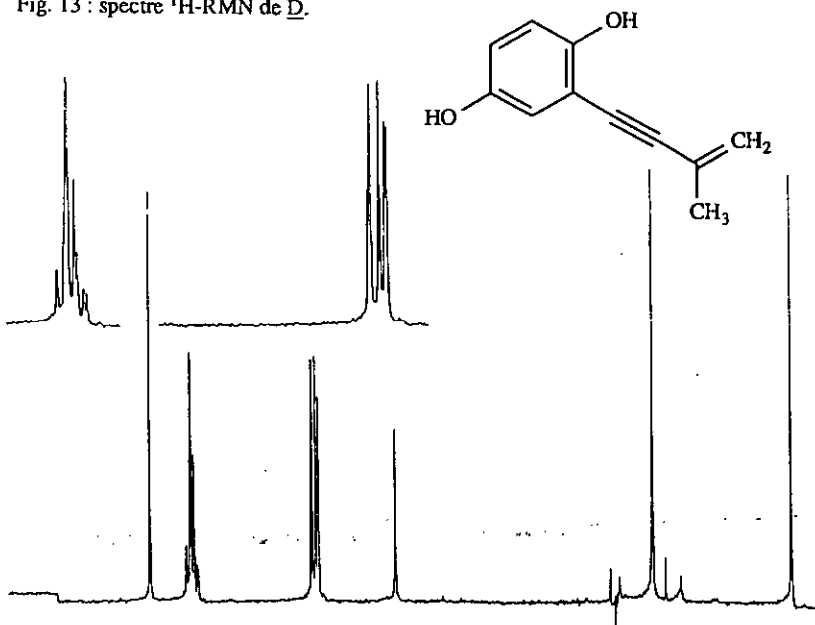


Fig. 13 : spectre ¹H-RMN de D.



a) irradiation à 2.00 ppm



b) échange dans D_2O

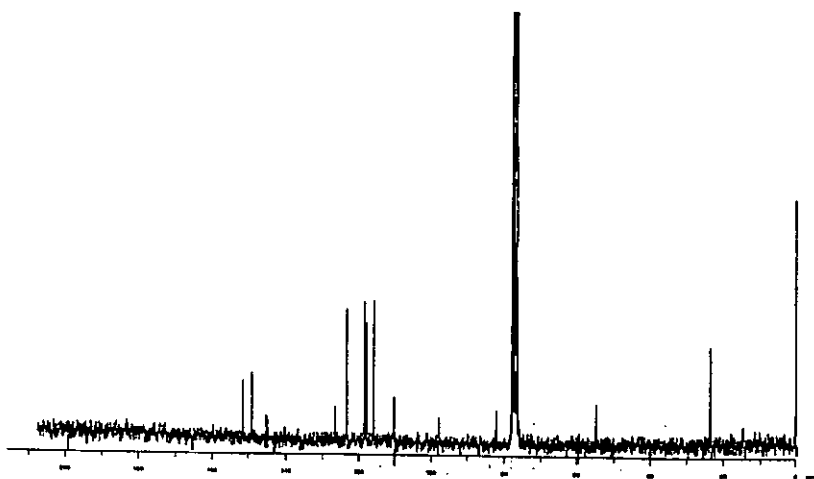


Fig. 14 : spectre ^{13}C -RMN de D.

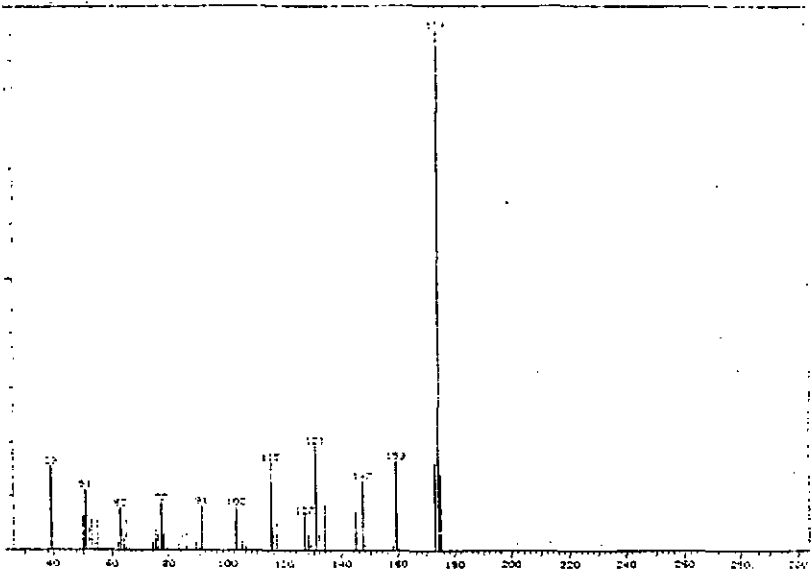


Fig. 15 : spectre MS de D.

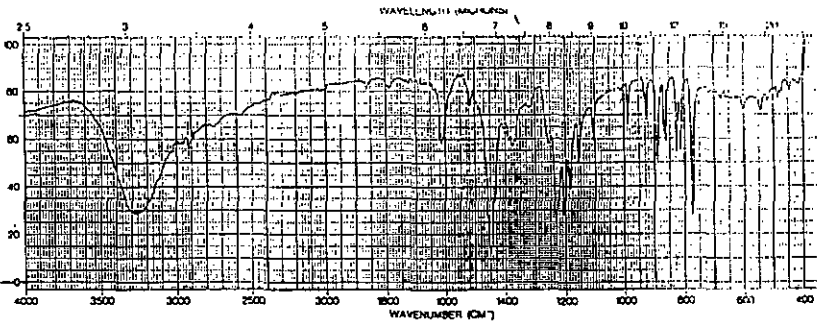


Fig. 16 : spectre IR de D.

3.2.5. Identification de E

Cette fraction se caractérise par la présence de méthoxy-8 melléine, le même produit identifié auparavant sous 2.2.

3.2.6. Identification de F

Le produit majoritaire de cette fraction (8 mg) a été isolé sous forme de cristaux jaunes à côté d'une trace de méthoxy-8 melléine (E).

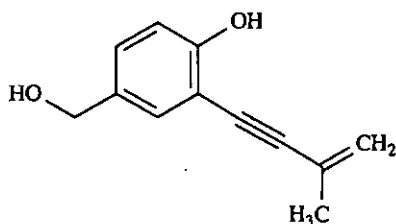
- $R_f = 0.32$ (CHCl_3 -AcOEt / 5:1)
- UV : λ_{max} (MeOH) = 213, 262, 274, 306 nm
- FeCl_3 : test phénol positif.

La comparaison des analyses avec [14] montre qu'il s'agit de l'alcool hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzylque.

Analyse

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 1.63 (1H, large, OH), 2.02 (3H, dd, CH_3), 4.58 (2H, s, CH_2), 5.37 et 5.44 (2H, m, $=\text{CH}_2$), 5.80 (1H, large, OH), 6.93 (1H, d, ArH), 7.25 (1H, dd, ArH), 7.36 (1H, d, ArH).

MS (m/z, 1%): 188(M^+ 100), 171(33), 159(18), 141(10), 131(30), 115(28), 103(5), 91(30), 77(12).



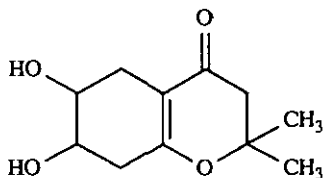
3.2.7. Identification de G

Le contenu de cette fraction a été examiné par GC-MS où nous trouvons comme produit majoritaire le composé I.1; à côté de ce pic se trouve un autre produit en trace G, dont nous avons pu enregistrer uniquement le spectre de masse.

Le produit G ne diffère que de 2 unités de poids moléculaire par rapport au produit I.1 ; son spectre de masse possède également un fragment à $m/z = 83$. La perte d'un groupe -OH (212-195), d'un groupe méthyle (212-197) suivie d'une molécule d'eau (197-179), indique que deux groupes hydroxyles sont en ortho l'un par rapport à l'autre.

Par analogie avec l'origine biosynthétique des autres produits trouvés dans le milieu, le produit est la dihydroxy-6,7 diméthyl-2,2 pentahydro-3,5,6,7,8 benzopyranone-4 (G).

GC-MS (m/z , 1%): 212(M^+ 55), 197(100), 179(18), 157(15), 137(8), 121(11), 95(12), 83(48), 55(27).



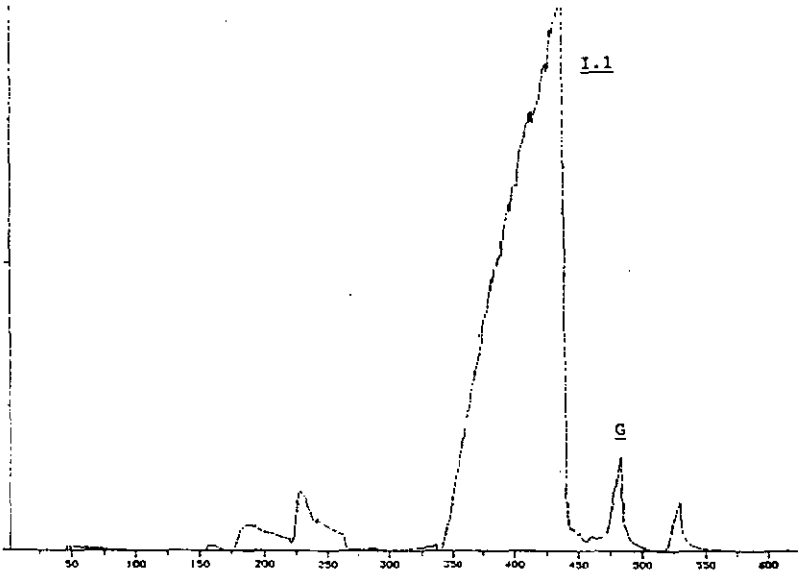


Fig. 17 : GC-MS de G (courant ionique total).

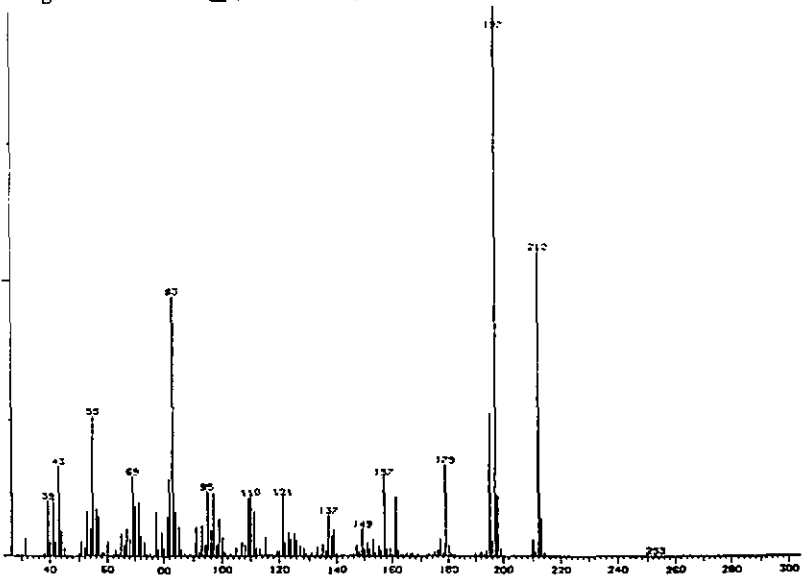


Fig. 18 : spectre MS de G.

3.2.8. Identification de H

2 mg de ce produit ont été isolés et soumis à l'analyse.

Le spectre de masse EI montre un seul pic représentatif à $m/z = 83$ et pas de pic moléculaire.

Le spectre de masse par ionisation chimique avec NH_3 a permis de déduire un poids moléculaire de 212.

Le produit est le crotonyl-4 époxy-1,2 cyclohexadiol-3,6.

Analyse

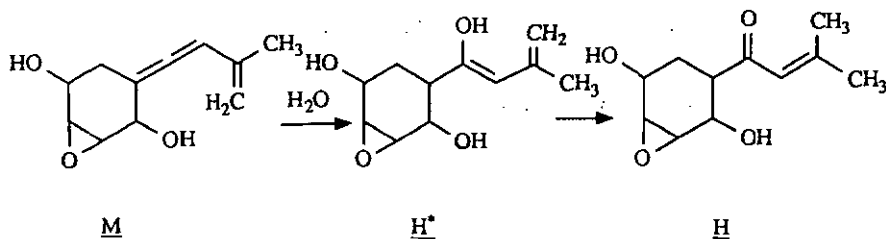
- UV : $\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH}) = 239 \text{ nm}$

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): 1.42 (1H, dd, H-(C-5)), 1.60 (1H, dt, H-(C-5)), 1.84 (3H, m, CH_3), 2.13 (3H, m, CH_3), 2.72 (1H, td, H-(C-2)), 3.11 (1H, m, H-(C-1)), 3.14 (1H, m, H-(C-4)), 4.09 (1H, m, H-(C-3)), 4.18 (1H, m, H-(C-6)), 6.22 (1H, m, $\text{CH}=\text{}$).

MS (m/z , I%): 212(M^+ 0), 83(100), 55(66), 39(28).

Origine biogénétique:

La structure de ce produit s'appuie sur son origine biogénétique. Suivant le schéma ci-dessous, le produit M subit une hydroxylation pour donner H*, un intermédiaire sous forme énol qui donne H sous la forme céto et qui subit une migration de la double liaison vinylique.



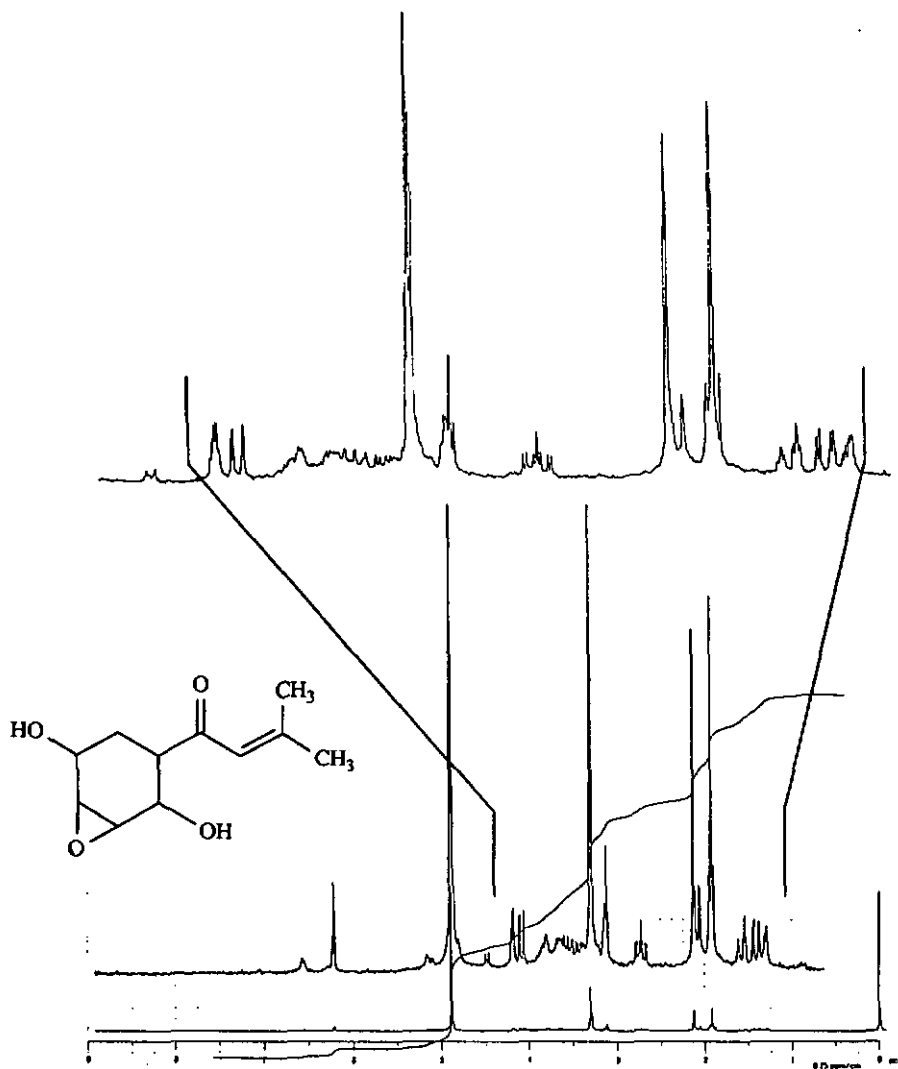
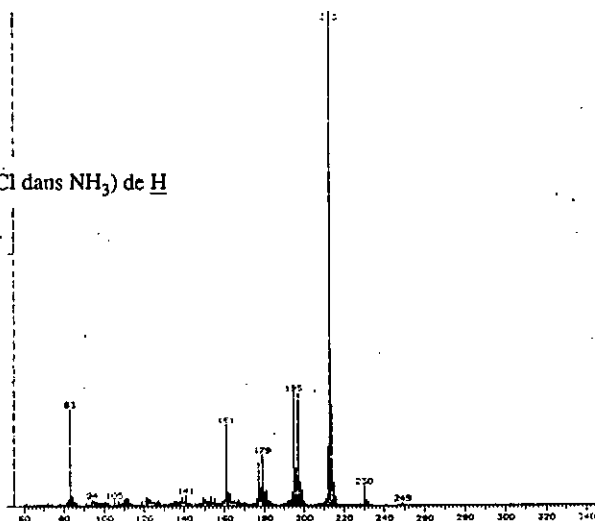


Fig. 19 : spectre $^1\text{H-RMN}$ de H.

Fig. 20 : spectre MS (CI dans NH₃) de H



3.2.9. Identification de 1.1 et 1.2

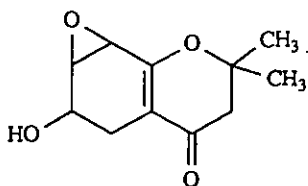
18 mg du produit 1.1 ont été isolés sous forme de cristaux jaunes.

- R_f = 0.54 (CHCl₃-MeOH / 95:5)

Par comparaison avec les valeurs de [14], ce produit est l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 tétrahydro-5,6,7,8 époxy-7,8 chromanone-4.

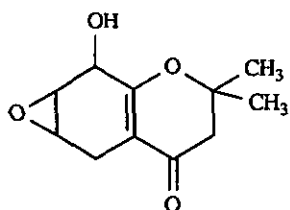
¹H-RMN (CD₃OD): 1.43 (3H, s, CH₃), 1.48 (3H, s, CH₃), 1.91 et 1.99 (1H, dd, J = 17 Hz, J = 4.5 Hz, J = 0 Hz, H(C-5)), 2.55 (2H, AB, J = 16 Hz, H(C-3)), 2.64 et 2.72 (1H, dt, J = 17 Hz, J = 1.9 Hz, J = 1.8 Hz, H(C-5)), 3.39 (1H, d, J = 2.5 Hz, H(C-8)), 3.59 (1H, m, H(C-7)), 4.42 (1H, m, H(C-6)).

MS (m/z, 1%): 210(M⁺ 37), 195(100), 177(8), 155(26), 149(13), 127(10), 109(8), 97(9), 83(14), 55(37).



hydroxy-6 diméthyl-2,2 tétrahydro-5,6,7,8
époxy-7,8 chromanone-4

Un isomère de 1.1 a été mis en évidence par TSOUPRAS [19]. Les 2 produits possèdent le même spectre de masse mais peuvent être différenciés par $^1\text{H-RMN}$ où les constantes de couplage ont servi à déterminer la stéréochimie. La structure proposée pour 1.2 est la suivante:

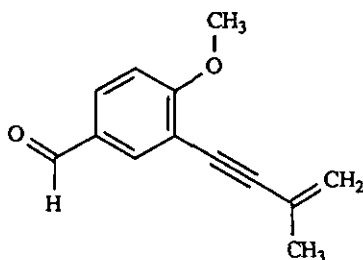


hydroxy-8 diméthyl-2,2 tétrahydro-5,6,7,8
époxy-6,7 chromanone-4

3.2.10. Identification de J

Nous avons observé la présence d'une faible quantité de ce produit dans le milieu. Par comparaison avec [14], nous déduisons qu'il s'agit du méthoxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzaldéhyde.

MS (m/z , I%): 200($M^+ 100$), 185(22), 171(6), 159(45), 141(10), 128(85), 115(12), 91(10), 77(13).



3.2.11. Identification de K

Dans le spectre $^1\text{H-RMN}$ nous constatons un faible couplage allylique entre le signal à 2.01 ppm et ceux à 5.43 et 5.55 ppm, ce qui correspond à la présence d'un groupe méthyl-vinyle terminal. Les signaux des protons aromatiques sont fortement déblindés, indiquant la présence d'un groupe attracteur d'électrons fixé sur le noyau. La comparaison de ce spectre avec les autres produits acétyléniques montre une grande similitude: un système aromatique trisubstitué en position 1,3,4 comprenant un groupe méthyl-vinyl-acétylénique caractéristique.

Dans le spectre de masse, le pic à $m/z = 201$ correspond à la perte du proton de la fonction carboxylique, le pic à $m/z = 187$ à la perte du $-\text{CH}_3$, le pic à $m/z = 185$ à la perte de $-\text{OH}$ et le pic à $m/z = 157$ à la perte de $-\text{COOH}$.

Sur la base de ces données, nous pouvons conclure qu'il s'agit de l'acide hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzoïque.

Analyse

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): 2.01 (3H, dd, CH_3), 5.43 et 5.55 (2H, m, $=\text{CH}_2$), 7.03 (1H, d, $J = 10$ Hz, ArH), 8.01 (1H, dd, $J = 10$ Hz, $J = 1.2$ Hz, ArH), 8.15 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, ArH).

MS (m/z , %): 202($\text{M}^+ 100$), 201(13), 187(10), 185(28), 157(18), 128(23), 115(16), 77(14).

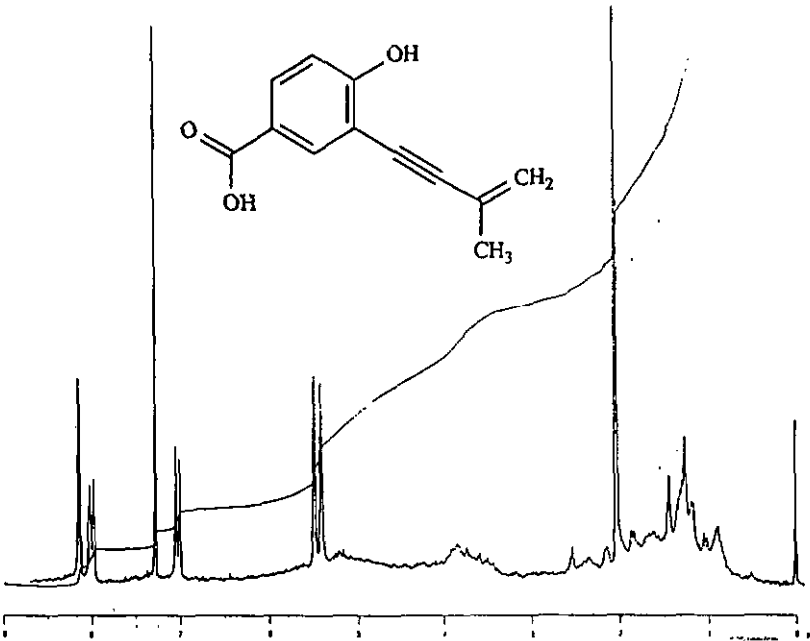


Fig. 21 : spectre ¹H-RMN de K.

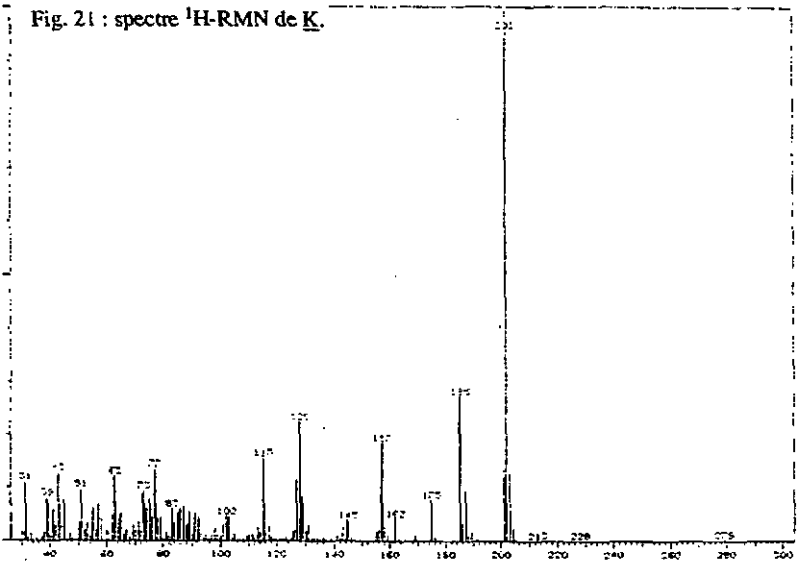


Fig. 22 : spectre MS de K.

3.2.12 Identification de L.1 à L.3

Cette fraction a été examinée par GC-MS où le pic majoritaire correspond au produit L.1 identifié précédemment.

Le produit dont le PM vaut 212 correspond au produit G obtenu sous 3.2.7.

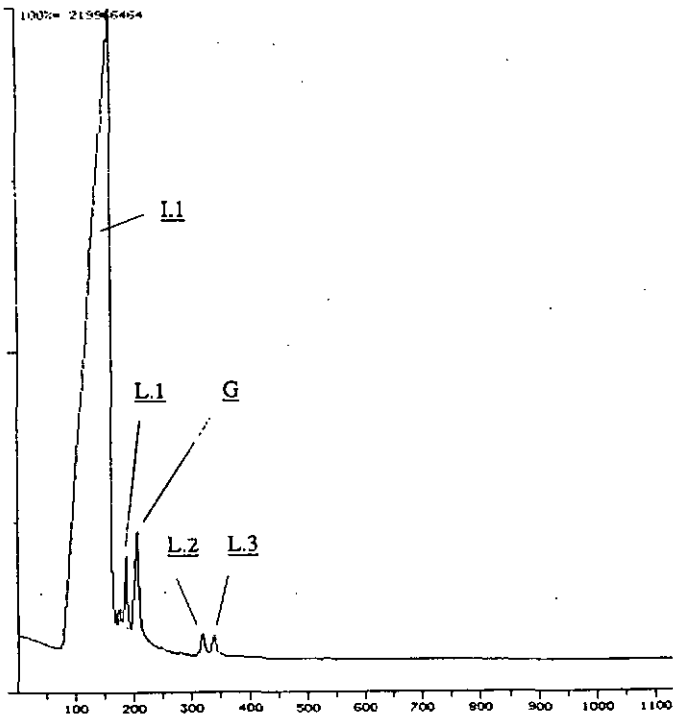
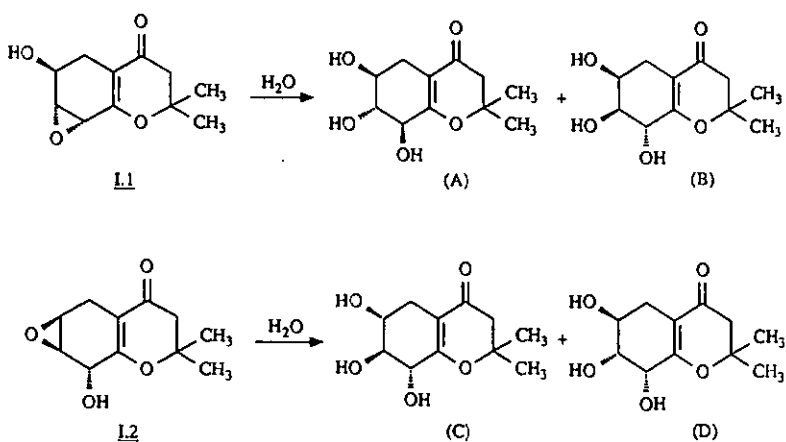


Fig. 23 : GC-MS de la fraction contenant L.1, L.2 et L.3.

Un produit L.1, de PM 228, est présent et peut être considéré comme produit d'hydrolyse issu de 1.1 ou de 1.2, d'où la position des trois groupes -OH en position 5,6,7, conduisant à 4 stéréoisomères possibles. Selon le mécanisme réactionnel de l'ouverture des époxydes, le produit 1.1 donne 2 isomères (A) et (B), tandis que le produit 1.2 donne les isomères (C) et (D); (A) et (C) sont énantiomères l'un l'autre.



Dans ce cas, il ne nous est pas possible de préciser quel stéréoisomère a été isolé compte tenu de la faible quantité de produit et l'impossibilité de réaliser d'autres analyses sur cette fraction.

GC-MS de 1.1(m/z, 1%): 228(M⁺ 13), 213(7), 190(26), 175(21), 147(8), 129(9), 85(24), 83(100), 57(19).

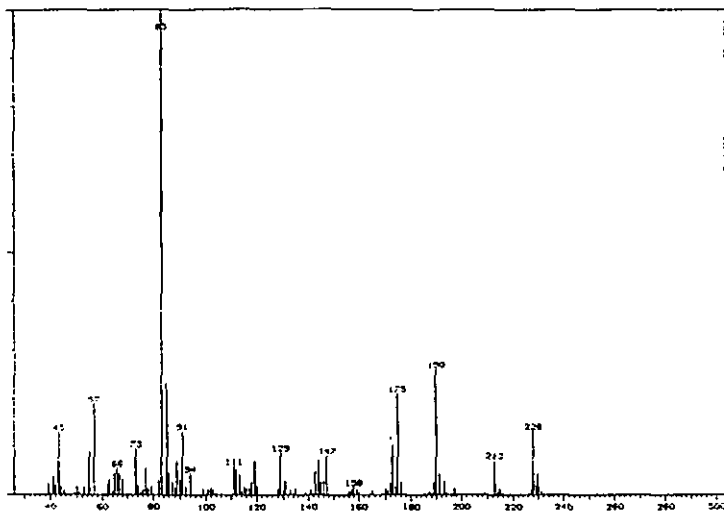
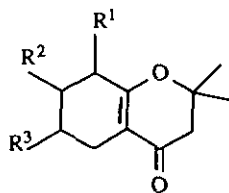


Fig. 24 : spectre MS de L.1.

2 autres produits en trace (L.2 et L.3), comportant un atome de chlore, ont été observés dans cette fraction. Ils doivent également avoir comme origine les produits L.1 et L.2 puis avoir subi une chloration. Il en résulte 3 isomères possibles, dont 2 se trouvent dans notre milieu. Il ne nous est à nouveau pas possible de préciser quels isomères ont été détectés ici, mais il n'y a aucun doute que 2 sont présents puisque nous observons des temps de rétention différents dans le chromatogramme.

GC-MS de L.2(m/z, 1%): 248(10), 246(M⁺ 33), 233(30), 231(100), 191(21), 137(14), 109(9), 83(39).

GC-MS de L.3(m/z, 1%): 248(9), 246(M⁺ 32), 233(24), 231(72), 191(18), 137(17), 109(34), 83(100).



R ¹	R ²	R ³
--	--	--
-OH	-OH	-Cl
-OH	-Cl	-OH
-Cl	-OH	-OH

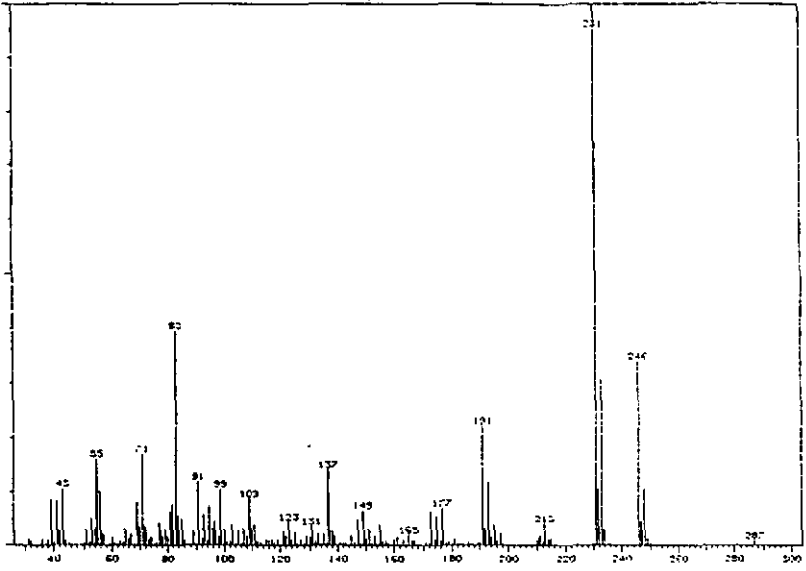


Fig. 25 : spectre MS de L.2

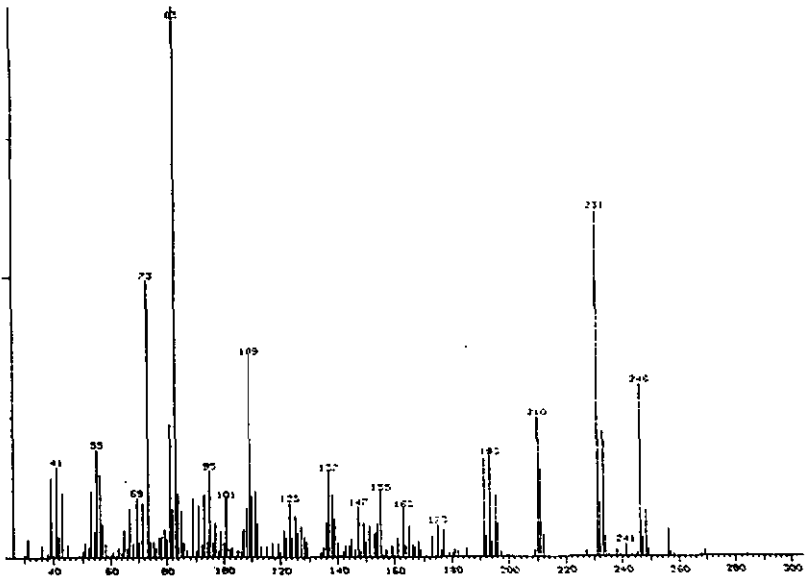


Fig. 26 : spectre MS de L.3

3.2.13. Identification de M

8 mg de ce produit ont été isolés sous forme d'aiguilles transparentes jaune-pâle.

- $R_f = 0.54$ (CHCl_3 -MeOH / 9:1)

- UV : λ_{max} (MeOH) = 219 nm

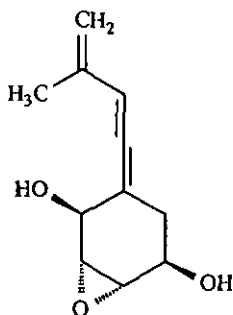
- $[\alpha]_D^{20} = +45.8^\circ$

Le produit, comparé avec la réf. [14] où il a fait l'objet d'une analyse aux rayons-X, est l'époxy-3,4 (méthyl-3 butadienylidène)-1 cyclohexanediol-2,5.

Analyse

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 1.75 (3H, dd, CH_3), 2.20 (2H, large, 2xOH), 2.42 (2H, m, CH_2), 3.32 (2H, m, H-(C-3) et H-(C-4)), 4.32 (1H, m, H-(C-5)), 4.56 (1H, s, H-(C-2)), 4.92 et 4.99 (2H, m, $=\text{CH}_2$), 6.18 (1H, m, $=\text{CH}$).

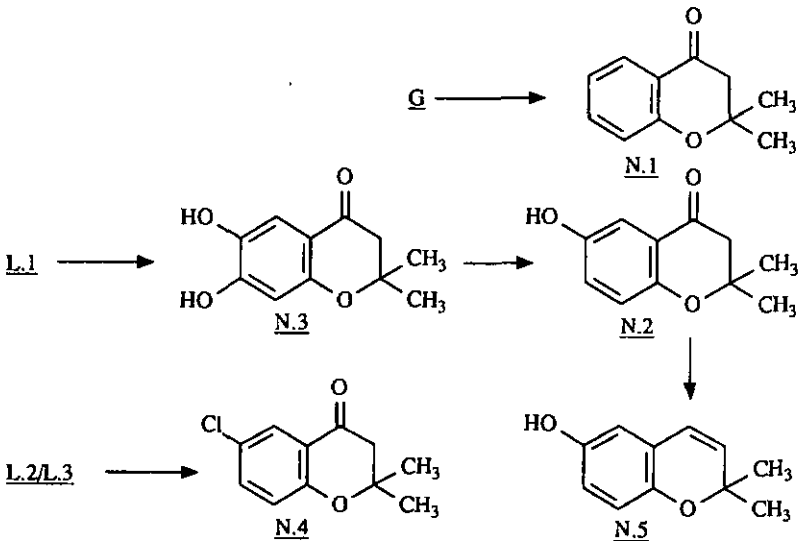
MS (m/z , %): 194(M^+ 22), 177(2), 161(3), 147(5), 105(16), 91(100), 77(60), 65(63), 39(84).



3.2.14. Identification de N.1 à N.5

Cette fraction a été analysée uniquement par GC-MS vu la faible quantité de produits. Elle contient quatre composés possédant le motif de base d'une chromanone-4 (N.1 à N.4) et un chromène (N.5), provenant probablement de la réduction de N.2.

Ces produits résulteraient d'une aromatisation avec élimination d'eau des produits dihydroxylé G, trihydroxylé L.1 et dihydroxylé-chlorés L.2 et L.3.



Chaque spectre de masse a été comparé avec un échantillon synthétique. Il s'en suit que:

- N.1 est la diméthyl-2,2 chromanone-4;
- N.2 est l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromanone-4;
- N.3 est la dihydroxy-6,7 diméthyl-2,2 chromanone-4;
- N.4 est la chloro-6 diméthyl-2,2 chromanone-4;
- N.5 est l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromène.

Le composé N.3 a été comparé à plusieurs isomères, où des différences apparaissent dans les spectres de masse, ce qui nous a conduit au choix de l'isomère dihydroxy-6,7. Pour N.2 et N.4 la position du chlore ou du groupe hydroxyle est déterminée par analogie biosynthétique avec les autres produits; les spectres de masse de la chloro-6 et de la chloro-7 diméthyl-2,2 chromanone-4 sont identiques.

Analyse

GC-MS de N.1(m/z, I%): 176(M⁺ 38), 161(100), 121(41), 120(40), 92(30), 56(12), 43(9).

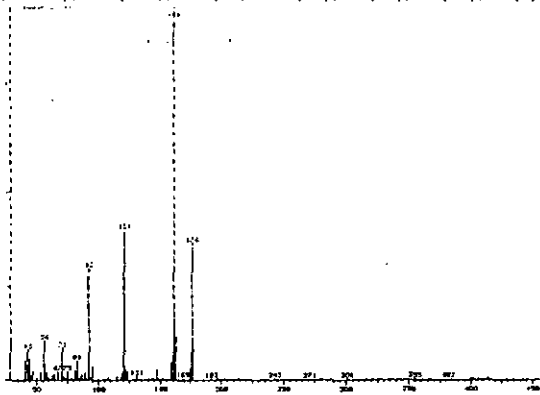


Fig. 27 : spectre MS de N.1.

GC-MS de N.2(m/z, I%): 192(M⁺ 41), 177(66), 137(59), 136(100), 108(23), 80(18), 55(17).

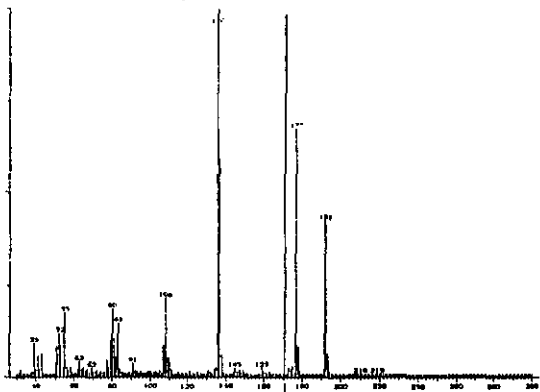


Fig. 28 : spectre MS de N.2.

GC-MS de N.3(m/z, 1%): 208(M⁺ 37), 193(42), 177(36), 153(52), 152(100), 137(18), 91(22), 45(63).

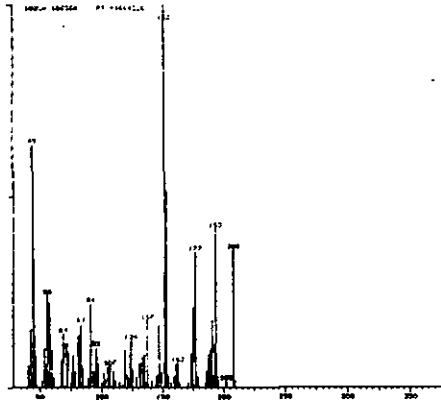


Fig. 29 : spectre MS de N.3.

GC-MS de N.4(m/z, 1%): 212(13), 210(M⁺ 36), 197(36), 195(100), 154(44), 126(12), 56(24), 43(17).

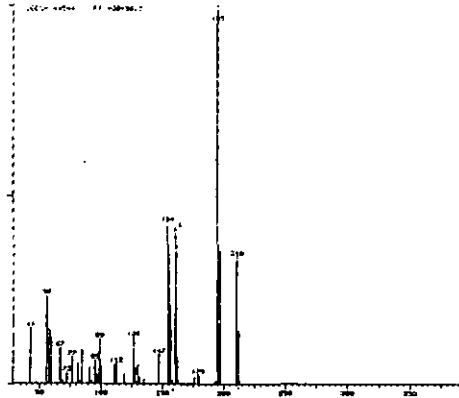


Fig. 30 : spectre MS de N.4.

GC-MS de N.5(m/z, 1%): 176(M⁺ 31), 161(100), 145(7), 121(10), 89(15).

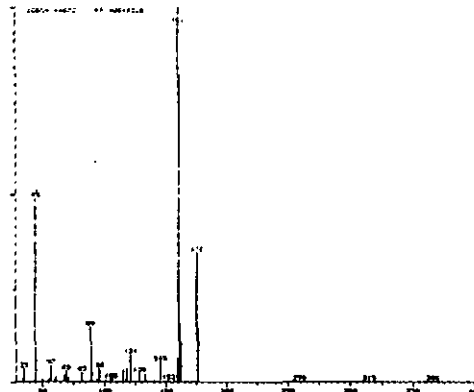


Fig. 31 : spectre MS de N.5.

3.2.15. Identification de O.1 à O.3

Cette fraction contient 3 produits O.1, O.2 et O.3 en très faible quantité. Ils apparaissent comme des produits d'hydroxylation du groupe vinyle terminal des composés K, A et F respectivement. Dans le spectre $^1\text{H-RMN}$, aucun changement n'est observé dans la région des protons aromatiques où les signaux présentent toujours l'allure d'un spectre du type ABX. En revanche, un singulet correspondant à un groupe $-\text{CH}_2\text{OH}$ supplémentaire fixé sur le carbone tertiaire apparaît vers 3.60 ppm dans tous les cas, tandis que le signal du méthyle est blindé de 2 à 1.5 ppm environ par suite de l'absence du groupe vinyle terminal.

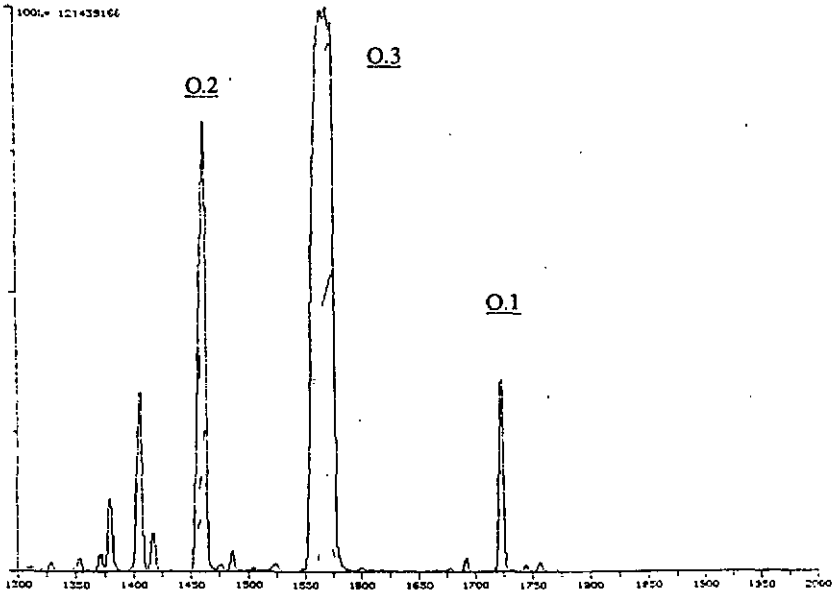


Fig. 32 : GC-MS de la fraction contenant O.1, O.2 et O.3:

- Identification de O.1

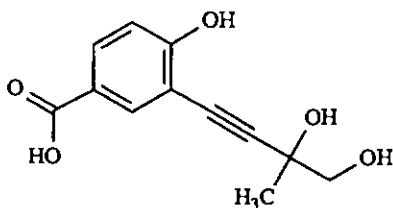
D'après le spectre de masse du dérivé triméthylsilylé, on déduit que le poids moléculaire du produit est de 236. Dans la fragmentation, la perte de 15 (524-509) correspond au départ du groupe $-CH_3$, la perte de 103 (524-421) au groupe CH_2-OTMS , la perte de 132 (421 à 289) au départ simultané des groupes $-CH_3$ et $CO-OTMS$. Le produit isolé est l'acide hydroxy-4 (dihydroxy-3,4 méthyl-3 butynyl-1)-3 benzoïque.

Les valeurs du spectre 1H -RMN (non représenté ici) ont été observées dans un mélange avec le produit O.3.

Analyse

1H -RMN (CD_3OD): 1.50 (3H, s, CH_3), 3.60 (2H, s, CH_2), 6.77 (1H, d, ArH), 7.85 (1H, dd, ArH), 7.95 (1H, d, ArH).

MS (m/z, I%): 524(M^+ 7), 509(16), 422(37), 421(100), 289(43), 147(39), 73(68).



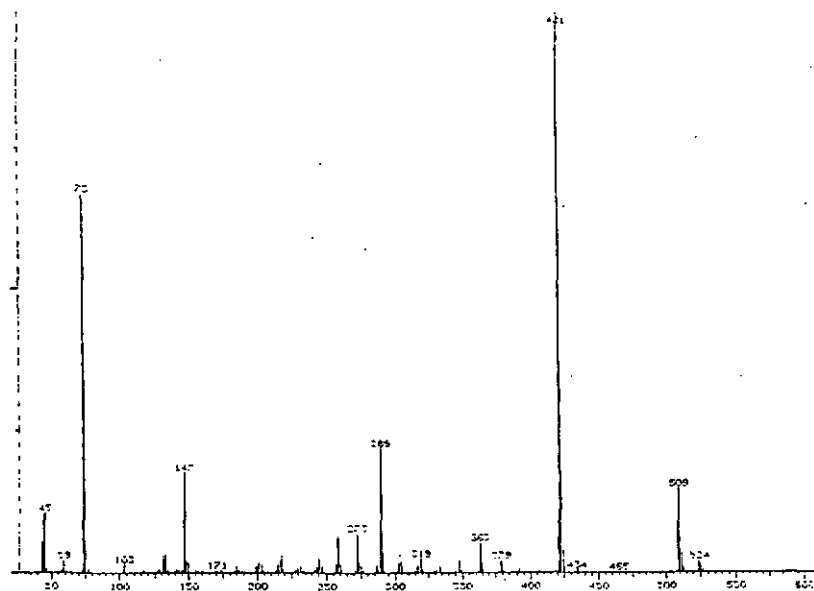


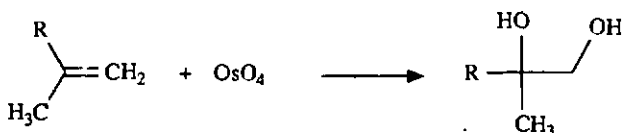
Fig. 33 : spectre MS de O.1(triméthylsilylé).

- Identification de O.2

Les valeurs de $^1\text{H-RMN}$ sont déduites du spectre ci-joint qui contient à la fois les signaux du produit O.2 (minoritaire) et de O.3 (majoritaire). Les pics relatifs à O.2 sont indiqués par des flèches.

Le spectre de masse a été obtenu pour le dérivé triméthylsilylé. En tenant compte que 3 TMS réagissent sur les fonctions alcool, nous déduisons un poids moléculaire de 220. Dans la fragmentation, nous avons une perte de 103 (436-333) correspondant au départ de $\text{CH}_2\text{-OTMS}$.

En traitant 2 mg du produit A avec OsO_4 dans l'éther, nous avons hydroxylé la double liaison terminale obtenant un diol qui, après dérivatisation avec TMS, donne le même spectre de masse que le produit O.2 dérivé avec TMS également.



Le produit est bien l'hydroxy-4 (dihydroxy-3,4 méthyl-3 butynyl-1)-3 benzaldéhyde.

Analyse

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD): 1.51 (1H, s, CH_3), 3.60 (2H, s, CH_2), 6.88(1H, d, ArH), 7.72 (1H, dd, ArH), 7.82 (1H, d, ArH), 9.86 (1H, s, CHO).

MS (m/z, 1%): 436(M^+ 3), 421(10), 333(100), 291(50), 147(22), 73(87), 45(18).

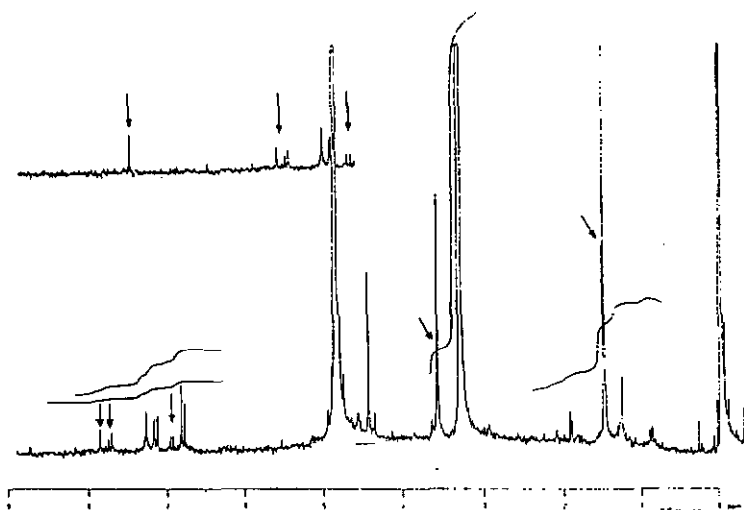


Fig. 34 : spectre $^1\text{H-RMN}$ de O.2 (l) contenant O.3.

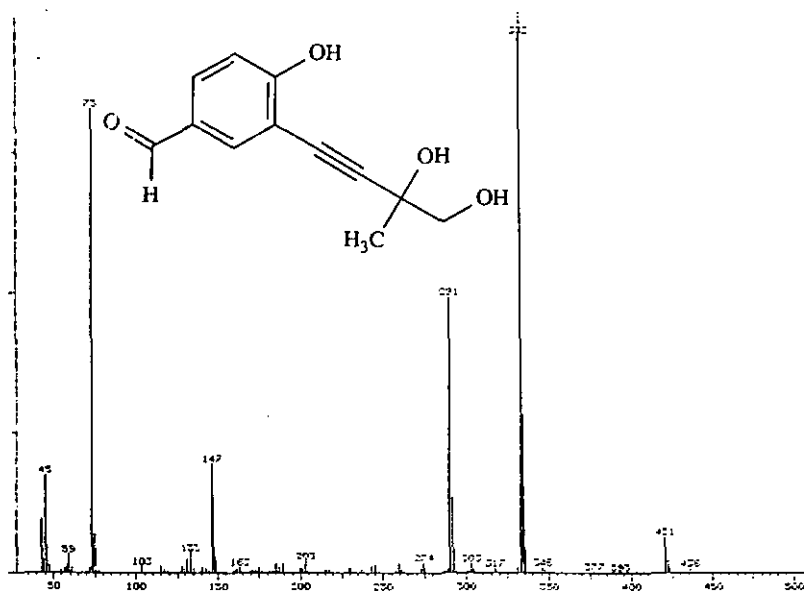


Fig. 35 : spectre MS de O.2(triméthylsilylé).

- Identification de O.3

Nous avons enregistré le spectre de masse du produit par ionisation chimique ainsi que le spectre du dérivé triméthylsilylé par EI. De ces spectres nous déduisons un poids moléculaire de 222. Les constantes de couplage relatives aux protons aromatiques données ici, sont également valables pour les produits O.1 et O.2.

Le produit est l'alcool hydroxy-4 (dihydroxy-3,4 méthyl-3 butynyl-1)-3 benzylique.

Analyse

¹H-RMN (CD₃OD): 1.50 (3H, s, CH₃), 3.60 (2H, s, CH₂), 4.45 (2H, s, CH₂), 6.80 (1H, d, J = 10 Hz, ArH), 7.12 (1H, dd, J = 10 Hz, J = 1.5 Hz, ArH), 7.30 (1H, d, J = 1.5 Hz, ArH).

MS (m/z, I%): 510(M⁺ 1), 495(3), 407(100), 275(30), 259(10), 203(7), 187(5), 147(18), 73(60).

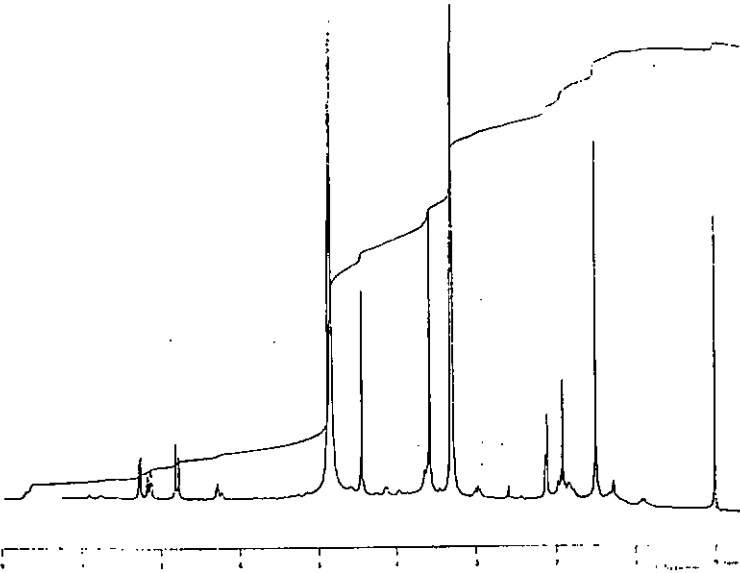


Fig. 36 : spectre ¹H-RMN de Q.3.

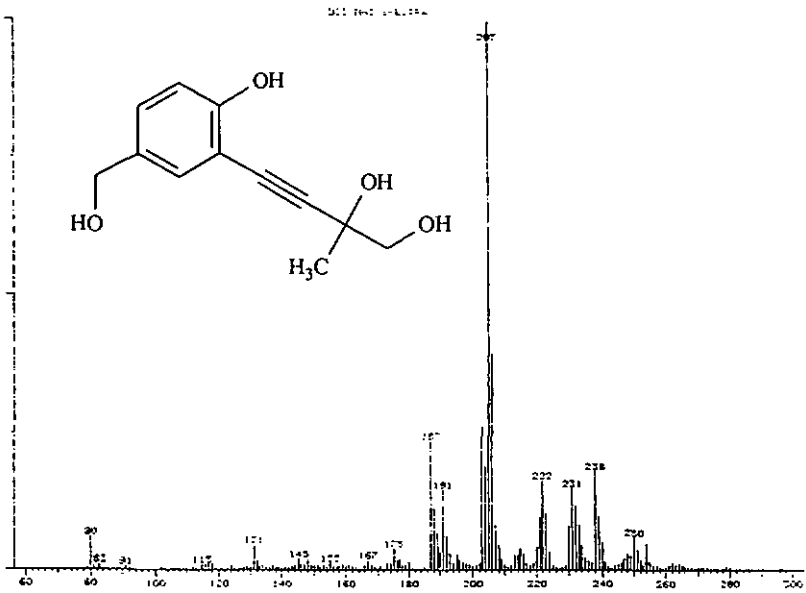


Fig. 37 : spectre MS (CI dans NH₃) de Q.3.

3.2.16. Identification de P

2 mg environ de ce produit ont été isolés et pu être soumis à l'analyse.

- $R_f = 0.51$ (CH_2Cl_2 -MeOH / 5:1)

- UV : λ_{max} (MeOH) = 213, 242, 250, 298 nm

En ^1H -RMN l'irradiation du signal à 1,48 ppm transforme le quadruplet à 4,71 ppm en un singulet; ceci montre bien que le groupe méthyle est couplé à un groupe -CH.

Les pics marqués (*) sont dûs à des impuretés.

Les résultats d'analyse, comparés avec ceux d'un échantillon synthétique, montrent qu'il s'agit de l'alcool hydroxy-4 (hydroxy-3 méthyl-3 propynyl-1)-3 benzylique.

Analyse

^1H -RMN (CD_3OD): 1.48 (3H, d, CH_3), 4.45 (2H, s, CH_2), 4.73 (1H, q, CH), 6.80 (1H, d, $J = 10$ Hz, ArH), 7.15 (1H, dd, $J = 10$ Hz, $J = 1.5$ Hz, ArH), 7.26 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, ArH).

MS (m/z, %): 192(M^+ 50), 177(100), 175(25), 161(7), 147(5), 131(4), 91(42), 77(20), 63(18), 51(13), 43(21).

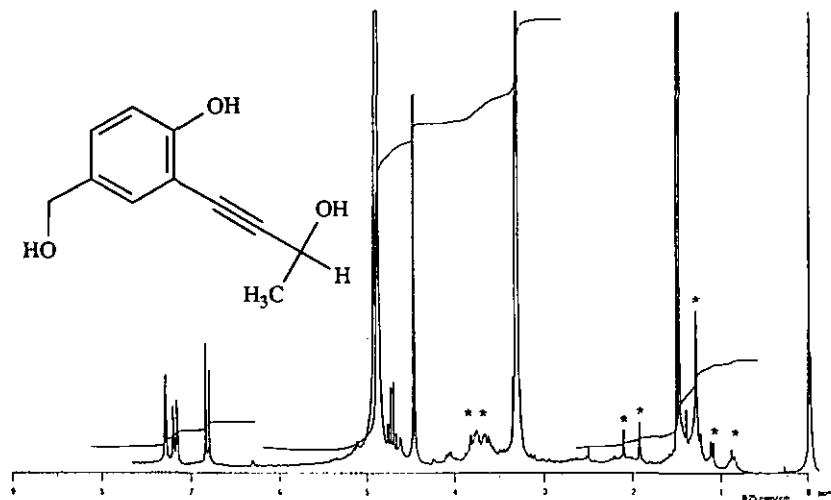


Fig. 38 : spectre ¹H-RMN de P.

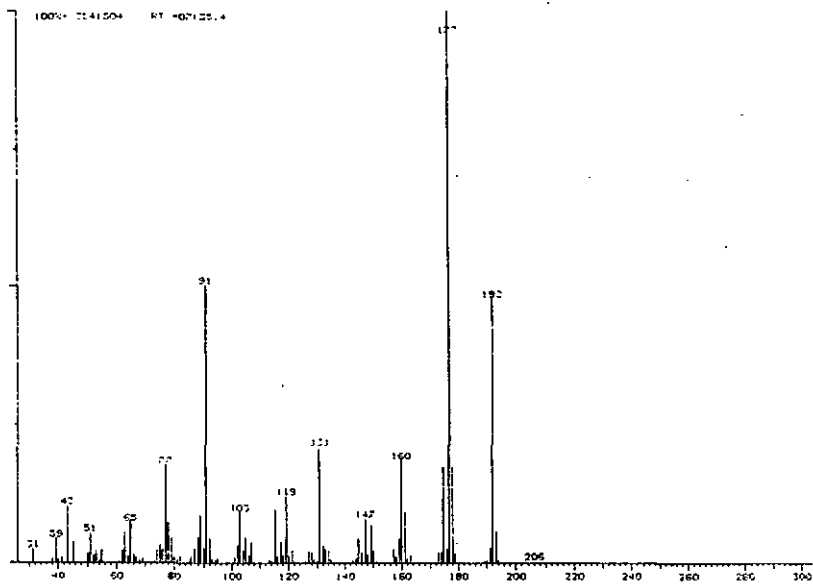


Fig. 39 : spectre MS de P.

4. DETERMINATION DE L'ACTIVITE TOXIQUE

La progression d'*Eutypa lata* est très lente dans les ceps de vigne après son inoculation *in vivo* (environ 3-5 ans); si la nature travaille lentement, au laboratoire il est nécessaire d'obtenir des résultats assez rapidement. Ainsi, des tests rapides permettant de contrôler les effets toxiques du champignon, des milieux de culture, des fractions séparées et enfin des substances isolées ont été mis au point. Les tests suivants ont été développés :

- des plantules de tomates ayant deux feuilles et deux cotylédons sont plongées dans les solutions à tester pendant 4 h à température ambiante; on observe le flétrissement et on quantifie la perte de poids;
- des protoplastes isolés de feuilles de vigne de culture *in vitro* sont mis en présence des solutions toxiques à analyser pendant 20 heures; on compte ensuite la survie des protoplastes;
- test sur feuilles excisées de vitroplants où une note comprise entre 0 (pas toxique) et 7 (très toxique) est attribuée au cours de 3 répétitions effectuées à une semaine d'intervalle pour quantifier le degré de nécrose. [20]

4.1. Activité toxique de produits isolés dans ML₁

Nous avons envoyé à l'ENSAT (Toulouse) quelques milligrammes des produits A, C, D et F afin d'évaluer la toxicité de ceux-ci.

Ces 4 molécules ont été testées sur feuilles de vitroplants. Etant peu solubles dans l'eau, il a fallu ajouter un peu de méthanol ou d'acétone à 1% maximum. Le produit A apparaît nettement comme étant le plus toxique. Nous constatons aussi que la molécule A perd une partie de sa toxicité au cours du temps, tandis que les notes pour les autres sont négligeables.

<u>produit</u>	<u>note</u> (à 1 semaine d'intervalle)				
<u>A</u>	4,7	-	1,6	-	0,6
<u>C</u>	0,2	-	0,2	-	0,2
<u>D</u>	0,2	-	0,1	-	0,1
<u>F</u>	0	-	0,2	-	0,2

4.2. Activité toxique du milieu FA₁

Le milieu de culture FA₁ a été utilisé principalement pour la recherche de fractions toxiques. 250 µl du milieu FA₁ ont été chromatographiés par HPLC sur colonne RP-18 semi-préparative en utilisant un débit de 2 ml/min avec un gradient de 40 à 80% MeOH dans l'eau pendant 30 minutes, puis 80-100% pendant 10 minutes. 18 fractions sont collectées et soumises au test d'activité sur tomate. Toutes indiquent une valeur d'environ - 3% à l'exception des fractions N° 12 (+ 3.13%) et N° 13 (+ 8.25%) où il y a une perte de poids.

Parallèlement, le test sur protoplastes effectué à Toulouse a montré que seule la fraction N° 12 se dégage nettement des autres; aucune autre fraction ne provoque une note supérieure à 0,5. Testée également sur vitroplants, la fraction N° 12 présente une note de 3,6.

Lors du même test, la note pour la phase aqueuse de FA₁ vaut 1,5 et celle pour la phase étherée vaut 6,2.

Après connaissance des résultats des différents tests indiqués ci-dessus sur les 18 fractions, nous avons isolé le contenu des fractions N° 12 et 13. Les données spectroscopiques (¹H-RMN et MS) montrent qu'il s'agit du produit A.

Afin de confirmer la toxicité de A, nous avons chromatographié une partie de FA₁ sur colonne de silice comme décrit sous II.3., analysé les fractions et réalisé le bioessai sur "feuilles excisées".

Plusieurs fractions ont été obtenues dans lesquelles nous avons observés:

- une activité très élevée dans la fraction contenant A;
- une activité moyenne dans les fractions avant et après A;
- une activité très faible pour toutes les autres fractions, en particulier celles renfermant C, E, F et I.1.

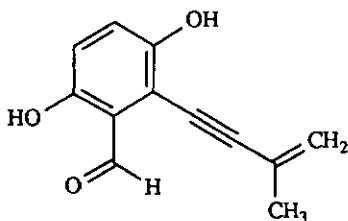
L'activité toxique du milieu de culture est donc localisée au niveau de l'Eutypine (A).

4.3. Discussion

La toxicité d'une souche semble donc dépendre de la présence de l'Eutypine accompagnée par d'autres molécules ayant la structure méthyl- vinyl-acétylénique. On se rappellera, que lors des essais préliminaires, nous avons isolé la O-Méthylmelléine, un composé phytotoxique pour le blé mais ne montrant pas de toxicité dans nos tests. La perte d'agressivité du champignon se traduit donc par la présence de quantités importantes de melléine.

L'Eutypine, le composé le plus actif à tous les tests, possède une structure idéale pour pouvoir se placer entre des membranes et bloquer des centres actifs; elle comporte deux extrémités polaires ou facilement polarisables, séparées par un espasseur apolaire.

Notre toxine présente les mêmes groupes fonctionnels que la frustulosine, une fonction phénol, une fonction aldéhyde et une chaîne isopentèn-3 yne. Ce métabolite secondaire présente lui une forte activité antibiotique vis-à-vis de bactéries diverses. [8]



Frustulosine

En ce qui concerne l'étiologie de la maladie, nous pouvons nous demander si le composé toxique, sous sa forme purifiée, produirait au moins quelques caractéristiques et symptômes de la maladie comme s'il était introduit à de la vigne saine à des concentrations qui seraient celles attendues dans l'hôte malade. Des tests en cours à Toulouse permettent d'affirmer que c'est bien le cas. Il a été observé par microscopie électronique que des feuilles de vigne malade montraient des cellules différentes par rapport à des cellules provenant de feuilles saines. En particulier, on a observé des chloroplastes hypertrophiés et des grains d'amidon énormes. Ces mêmes effets ont été retrouvés lors du test feuilles avec l'Eutypine en solution. (I. Philippe - communication orale).

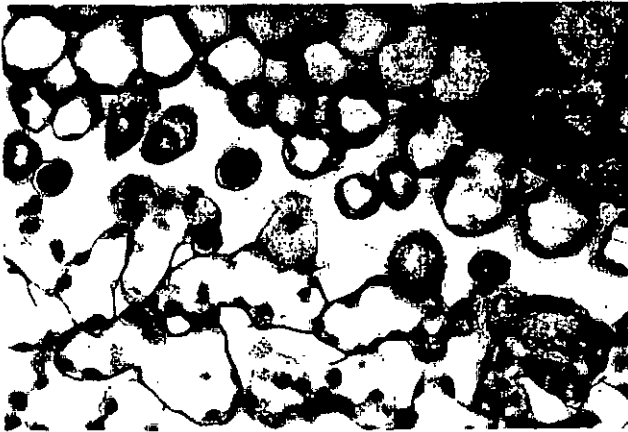


Fig. 40 : effet de l'Eutypine.

Effet de l'Eutypine sur les cellules d'une feuille de vitroplant de *Vitis vinifera*, cultivée 4 heures en présence de la toxine. [21]

En haut: les cellules sont intactes avec des chloroplastes bien disposés à la périphérie cellulaire.

En bas: les cellules sont intoxiquées; les chloroplastes sont hypertrophiés et dispersés dans toute la cellule.

5. ETUDE DU MYCELIUM

Conservés à - 20°C après filtration des milieux de culture ML₁ et FA₁, les mycéliums ont été extraits successivement dans 2 portions de 300 ml de CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-MeOH (1:1), MeOH, MeOH-H₂O (1:1). Les filtrats sont réunis, concentrés puis extraits à nouveau à l'éther. 440 mg d'extrait brut dissouts dans 2,5 ml de ligroïne sont chromatographiés sur colonne de silice (l=45 cm, d=3.8 cm) en éluant initialement avec la ligroïne, puis en augmentant progressivement la polarité avec l'éther.

Plusieurs fractions ont été récoltées dans lesquelles nous avons trouvé un triglycéride, le composé F ainsi que la O-méthylmelléine en trace.

Une fraction, dans laquelle se trouvent des composés de nature stéroïdique, a été analysée par GC-MS. Les valeurs obtenues ont été comparées avec les références [22-23].

MS Q.1(m/z, I%): 394(M⁺ 10), 376(12), 361(4), 269(4), 252(33), 251(100), 235(20), 223(15), 209(45), 195(33), 165(30), 141(21), 81(37), 69(85).

Les valeurs analytiques indiquent que Q.1 est l'ergostatetraène-5,7,9(11),22 3β-ol.

MS Q.2(m/z, I%): 396(M⁺ 30), 378(3), 363(33), 337(18), 271(8), 253(23), 237(10), 211(27), 197(21), 157(31), 143(36), 119(17), 105(29), 91(28), 81(27), 69(58), 55(68), 43(100).

Nous identifions Q.2 comme étant l'ergostatriène-5,7,22 3β-ol, appelé aussi simplement ergostérol.

MS Q.3(m/z, I%): 398(M⁺ 11), 383(7), 355(3), 300(9), 273(18), 271(55), 255(29), 253(13), 229(13), 213(15), 199(10), 159(19), 147(24), 145(22), 119(24), 105(44), 91(48), 81(64), 69(53), 55(68), 43(100).

Nous identifions Q.3 comme étant l'ergostadiène-7,22 3β-ol.

MS Q.4(m/z, I%): 398(M⁺ 6), 383(9), 314(17), 299(9), 272(26), 271(100), 255(13).

Nous identifions Q.4 comme étant l'ergostadiène-7,24(28) 3β-ol.

Remarque [24]

Il n'est pas étonnant de trouver des stérols dans le mycélium. Ces produits maintiennent la croissance et participent au développement chez les plantes et les champignons en agissant comme constituants de membrane et probablement aussi comme hormones. Il est reconnu que dans la plupart des champignons, le stérol majeur est, du point de vue de la distribution et de la quantité, l'ergostérol; celui-ci avait été aussi trouvé par Renaud [14].

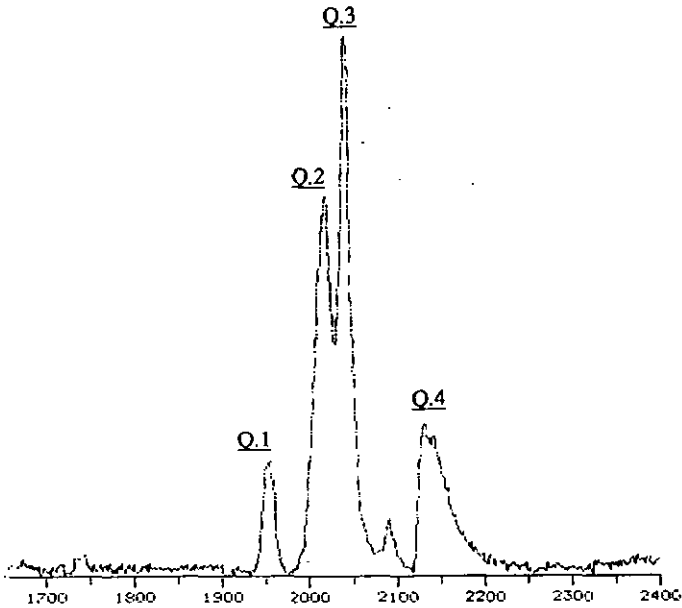


Fig. 41 : GC de la fraction contenant les stérols Q.1 à Q.4.

6. CARACTERISTIQUES DU PRODUIT LE PLUS PHYTOTOXIQUE

6.1. Cyclisation de A

Une chromatographie en phase gazeuse du produit A sur colonne capillaire OV-73, 12 m, 120-250°C à 3°C/min montre curieusement 2 pics.

De même, un échantillon initialement pur, montre après plusieurs semaines, l'apparition d'une deuxième tache sur CCM.

Analysés par GC-MS, les 2 produits donnent le même spectre de masse; il s'agit donc de 2 isomères.

Nous avons voulu connaître la structure du deuxième produit. En analysant par GC-MS sous les mêmes conditions le produit I, où la fonction -OH est remplacée par un groupe -OMe, le chromatogramme obtenu ne présente qu'un seul pic et ne montre pas de doublet.

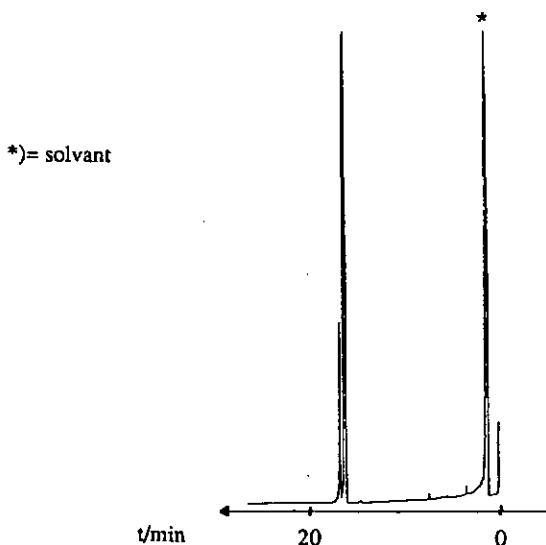
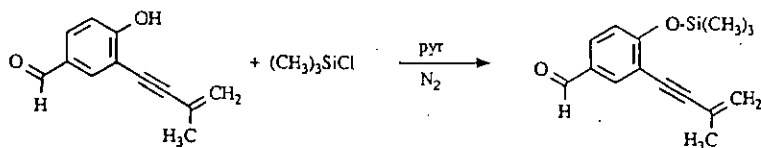


Fig. 42 : GC de A :

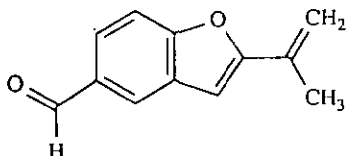
En traitant 1 mg de A avec TMCS dans la pyridine sous azote, nous obtenons un dérivé où la fonction -OH est bloquée. L'analyse par GC-MS de ce produit montre un seul pic de PM = 258.



Ces différentes constatations mènent à penser à une cyclisation qui pourrait avoir lieu entre la fonction -OH du cycle aromatique et la triple liaison. Cette réaction aurait lieu à long terme lorsque l'échantillon est conservé dans le dichlorométhane contenant des traces de HCl, lorsqu'il est exposé à la lumière ou encore à la chaleur (GC-MS).

ZESSIGER [25] a réalisé la synthèse de cette structure cyclisée et ses données analytiques sont en accord avec les nôtres.

L'isomère cyclique de l'Eutypine serait le formyl-5 isopropényl-2 benzofurane A^c.



6.2. Recherche rapide de A

Il est sans doute parfois intéressant de mettre en évidence rapidement la présence de l'Eutypine dans un milieu de culture.

Une première possibilité consiste à injecter le mélange brut après extraction à l'éther dans un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS) et à rechercher le produit dont le PM vaut 186. La complexité du mélange rend cette mise en évidence parfois laborieuse surtout si la quantité du produit recherché est faible par rapport à d'autres qui se trouvent en quantité supérieure dans le mélange. Afin d'éliminer un bon nombre de produits gênants, il est possible de procéder à une extraction à l'aide de carbonate de sodium 10% avant la GC-MS; cette sélection permet de n'introduire que les phénols (après régénération avec HCl 5 N et nouvelle extraction à l'éther). Même dans ce cas, bien que l'Eutypine soit détectée, le spectre final n'apparaît jamais très propre. Le courant total d'ionisation reste très complexe et ne permet pas de distinguer des pics spécifiques dans la région d'éluion de l'Eutypine. La présence du pic à M-1 ($m/z=185$) très intense à côté du pic moléculaire laisse en revanche présumer la présence de l'Eutypine.

Pratiquement, ce procédé a pu être réalisé à partir de 1,1 l d'un milieu de culture toxique FA₃ ainsi que sur 2,8 l du milieu E_{at}. Nous y avons décelé la présence d'Eutypine malgré la proximité d'autres pics adjacents.

Ci-dessous, l'image supérieure représente le chromatogramme gazeux du milieu où chaque pic correspond au moins à un produit. L'appareil étant réglé pour la recherche d'un fragment à $m/z = 186$, nous observons dans l'image inférieure la présence du pic correspondant à l'Eutypine.

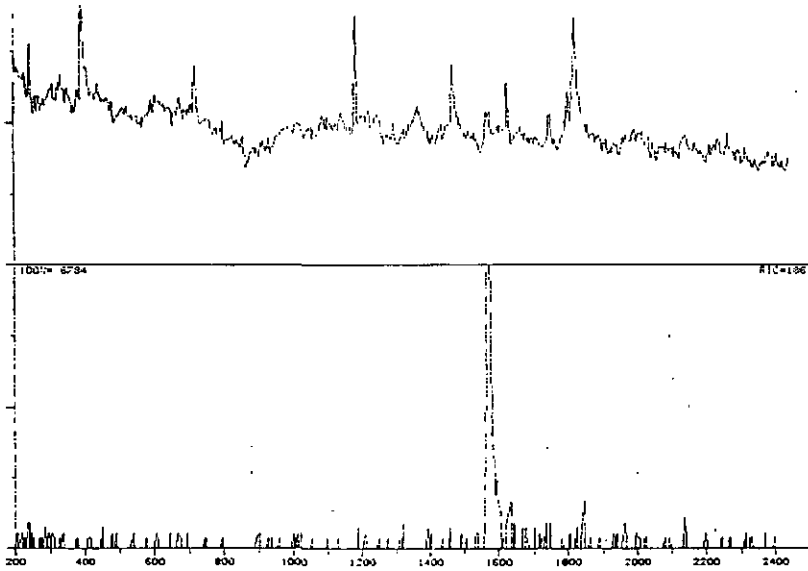


Fig. 43 : recherche de l'Eutypine par GC-MS.

Nous sommes donc en mesure d'affirmer dans des temps relativement courts, dès réception d'un milieu de culture, si l'Eutypine est présente ou pas.

7. AUTRES MILIEUX DE CULTURE EXAMINES

Nous ne décrivons en détail que les produits nouvellement isolés et identifiés par rapport à ceux déjà trouvés dans le milieu ML₁.

7.1. Milieu de culture toxique N° 660

Nous avons entrepris le "screening" à fond du milieu 660.

Les produits suivants ont été retrouvés :

A, B, C, E, F, H, I.1, M, N.2 et N.4

7.1.1. Identification de R

Environ 2 µg de ce produit ont été isolés et soumis à l'analyse.

Le spectre ¹H-RMN montre un multiplet à 2.15 ppm suggérant un couplage avec un groupe =CH₂ analogue à celui des produits acétyléniques. En revanche, les signaux correspondants aux protons vinyliques apparaissent assez écartés (5.23 et 5.84 ppm) par rapport à ceux des composés acétyléniques. Ceci suggère un environnement assez différent pour ces 2 protons. Légèrement recouverts par CDCl₃ mais bien visibles lors de l'enregistrement dans CD₃OD, 3 signaux présentant un spectre de type ABX, apparaissent dans la région des aromatiques vers 7.4 ppm. Un singulet à 6.68 ppm, supplémentaire par rapport aux produits acétyléniques, indique un proton aromatique isolé. Lors de l'échange dans D₂O, nous observons la présence d'une fonction hydroxyle à 4.65 ppm. Les pics marqués (*) sont dûs à des impuretés.

Le spectre de masse, dont le pic moléculaire est à m/z = 188, est très semblable au produit F. Tous les fragments sont identiques à ceux du produit F.

Les données spectroscopiques ont été comparées avec un échantillon synthétique [25] et nous permettent d'identifier ce produit comme étant la forme cyclisée de F, la cyclisation ayant eu lieu par le même mécanisme que pour l'Eutypine.

Ce composé est l'hydroxyméthyl-5 isopropényl-2 benzofurane.

Analyse

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 2.15 (3H, m, CH_3), 4.65 (1H, s, OH), 4.80 (2H, s, CH_2OH), 5.23 et 5.84 (2H, m, $=\text{CH}_2$), 6.68 (1H, s, $=\text{CH}$), 7.32 (1H, dd, ArH), 7.50 (1H, d, ArH), 7.60 (1H, d, ArH).

MS (m/z, 1%): 188(M^+ 100), 171(40), 159(20), 145(7), 131(28), 115(19), 91(30), 77(12), 63(13), 51(15).

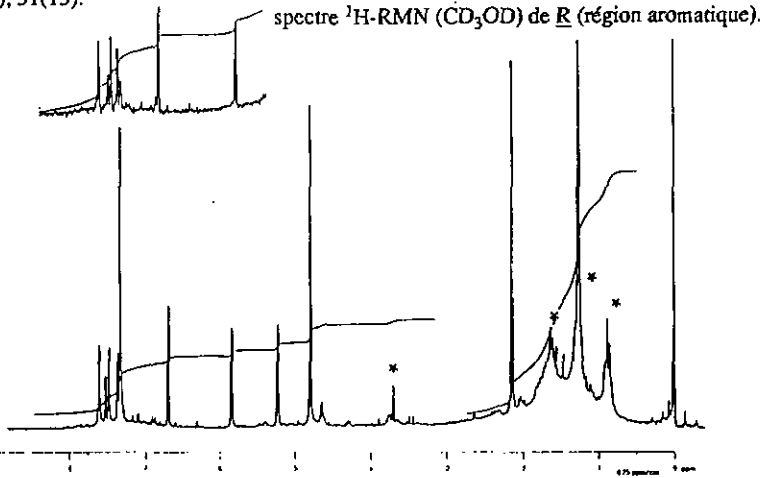


Fig. 44 : spectre $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) de R.

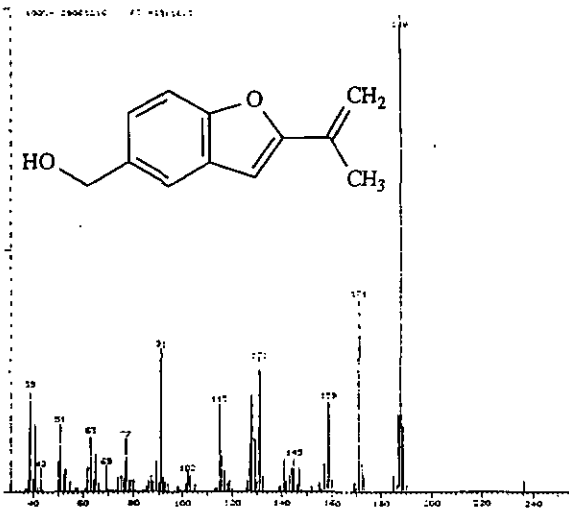


Fig. 45 : spectre MS de R.

7.2. Milieu de culture toxique F₁

2,2 l de filtrat actif, dont la toxicité est évaluée à 5/7, ont été étudiés. Après procédé habituel, la recherche de l'Eutypine a été entreprise. La quantité de celle-ci était assez importante pour pouvoir la détecter sur CCM et la comparer à un témoin.

Les produits A, C, D et F constituaient la majeure partie des composés trouvés dans ce milieu. 1 nouveau composé a été isolé et identifié.

7.2.1. Identification de S

Le spectre ¹H-RMN montre une très grande similitude avec celui du produit isolé sous 7.1.1. Dans ce cas, il n'y a pas de signal correspondant à un groupe -CH₂ tandis que tous les autres signaux se retrouvent. Les pics marqués (*) sont dûs à des impuretés.

L'irradiation du doublet de doublets à 6.79 transforme les 2 doublets à 6.97 et 7.34 ppm chacun en doublet.

Le spectre de masse, réalisé par impact électronique, dévoile difficilement le poids moléculaire à m/z = 174; il a été mis en évidence par ionisation chimique dans l'ammoniac sans ambiguïté à cette même valeur.

Les données analytiques comparées avec un échantillon synthétique [25] montrent qu'il s'agit d'un benzofurane substitué; le produit est en fait le composé D qui a cyclisé.

Ce composé est l'hydroxy-5 isopropényl-2 benzofurane.

Analyse

¹H-RMN (CDCl₃): 2.12 (3H, m, CH₃), 4.61 (1H, large, OH), 5.18 et 5.78 (2H, m, =CH₂), 6.57 (1H, s, =CH), 6.79 (1H, dd, ArH), 6.97 (1H, d, ArH), 7.34 (1H, d, ArH).

MS (m/z, I%): 174(M⁺9), 159(4), 131(6), 115(10), 97(15), 83(24), 69(44), 57(88), 43(100).

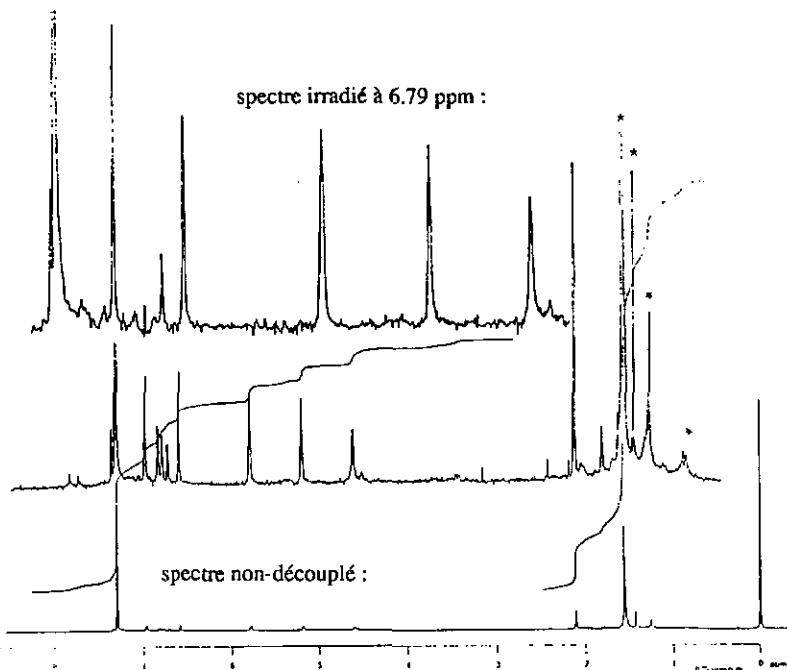


Fig. 45 : spectre $^1\text{H-RMN}$ de S.

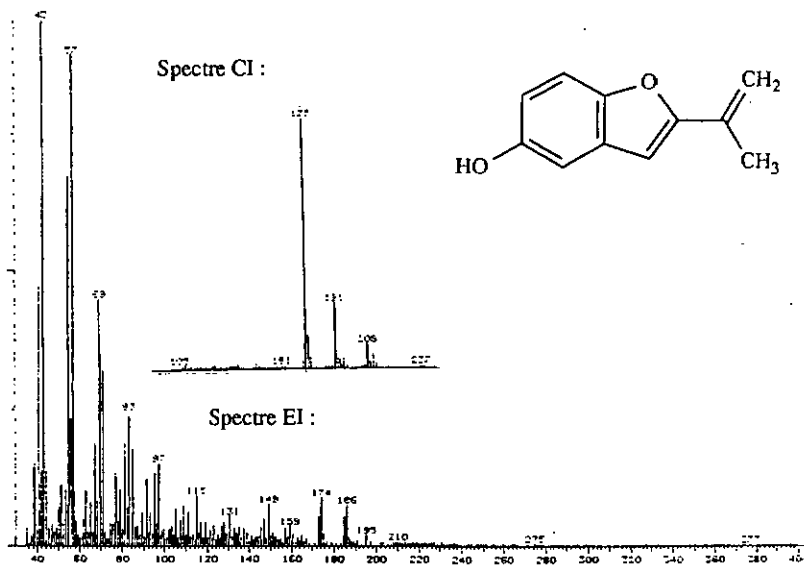


Fig. 46 : spectre MS de S.

8. UTILISATION D'UN DETECTEUR A BARETTE DE DIODES (DAD)

8.1. Présentation de l'unité complète

L'unité complète utilisée comprend :

- un détecteur à barette de diodes (diode-array detector *DAD*) connecté à la sortie d'un chromatographe HPLC;
- un ordinateur qui contrôle les autres unités du système et opère le programme;
- un driver comprenant un disque dur où les programmes des opérations sont stockés et un disque flexible;
- un écran vidéo sur lequel on peut voir les chromatogrammes, les spectres UV/VIS, les paramètres, les résultats, etc.

8.2. Avantages d'un détecteur à barette de diodes [26]

Par rapport à un spectrophotomètre conventionnel, un instrument à barette de diodes acquiert les données spectrales simultanément sans déplacement de parties mécaniques. Le bénéfice le plus évident pour l'utilisateur est la vitesse.

Parmi les avantages d'un détecteur à barette de diodes, on citera :

- l'acquisition rapide des données spectrales : un spectre entier de 190 à 820 nm peut être acquis en un dixième de seconde;
- la mesure à plusieurs longueurs d'onde simultanément;
- la reproductibilité excellente par une conservation précise des longueurs d'onde de mesure même à long terme;
- la large portée dynamique par une durée du temps d'intégration très courte, une amélioration du rapport signal/bruit et de la sensibilité;
- la possibilité d'effectuer des mesures statistiques (par élimination des mauvais points dûs au passage d'une bulle d'air par exemple);
- la simplicité mécanique qui en fait un appareil simple à opérer;
- la haute sensibilité permet d'effectuer des dosages quantitatifs avec des concentrations de l'ordre de quelques nanogrammes par microlitre.

8.3. Applications

Un chromatographe HPLC muni d'une colonne analytique couplé à un détecteur à barette de diodes constitue l'appareillage. Il permet d'analyser des produits purs et des mélanges complexes. Des analyses qualitatives, quantitatives et des mesures cinétiques peuvent être réalisées. Lors de l'enregistrement des données on peut définir jusqu'à 8 signaux comprenant la longueur d'onde de détection et la largeur de bande respective pour chacun. Le chromatogramme enregistré permet d'obtenir plusieurs résultats:

- Lors de l'analyse, on obtient simultanément une représentation de l'absorption en fonction du temps (chromatogramme) et de l'absorption en fonction de la longueur d'onde (spectre).

- Un intégrateur calcule l'aire des pics à partir d'une ligne de base qu'il imagine. Pour chaque signal intégré, on obtient le numéro du pic, le temps de rétention, sa largeur, son aire relative ainsi que le temps de rétention au début et à la fin du pic.

- Pour chaque pic, il est possible de montrer le spectre UV/VIS sur un domaine choisi. La longueur d'onde optimale (λ_{\max}) pour la détection de chaque composé peut être sélectionnée.

- La pureté de chaque produit peut être déterminée.

- Il est possible de chercher dans la librairie les spectres obtenus lors d'une analyse et d'effectuer des comparaisons. On peut donc identifier tous les pics d'un chromatogramme automatiquement. Tous les paramètres utilisés ont été recherchés; le nom et la pureté sont comparés; les pics identifiés sont nommés; les pics non-identifiés sont marqués par un point d'interrogation (?) et les pics impurs sont marqués avec un astérisque (*). En fait, avant que l'ordinateur cherche le spectre d'un pic dans la librairie, une comparaison du spectre de la montée du pic et de la descente est faite. Si la comparaison des deux spectres est bonne, alors les deux spectres sont comparés avec la librairie séparément.

- On peut dessiner une représentation pseudo-isométrique à 3 dimensions; celle-ci peut être vue dans la meilleure perspective :

- Le **RATIOGRAMME** proprement dit avec $\lambda = f(t)$. Il normalise d'abord chaque spectre dans un fichier de valeurs à la valeur d'absorption maximale et ensuite montre des points d'égale absorption dans la même couleur. Les absorptions fortes sont indiquées par la couleur "rouge" tandis que les absorptions faibles sont montrées par du "bleu". Si un pic est pur, il montre une série de bandes parallèles et la couleur de ces bandes est la même sur tout le temps d'élution du pic. Si un pic est impur, la couleur change d'un bout à l'autre du pic.

- L'**ISOGRAMME** montre aussi $\lambda = f(t)$ et les couleurs représentent l'absorption. Il montre simplement des points d'égale absorption dans la même couleur, en contraste par rapport au ratiogramme.

Il est possible de montrer le **RATIOGRAMME** et l'**ISOGRAMME** dans 3 dimensions:

- **ISOGRAMME** : on voit les signaux choisis en fonction de λ et A est montrée;

- **RATIOGRAMME** : on voit les rapports des signaux choisis en fonction de λ et A est montrée.

On peut faire tourner la représentation à 3-D selon le plan λt d'un angle α désiré.

8.4. Résultats obtenus

Nous avons enregistré le spectre UV/VIS et le temps de rétention de quelques produits purs isolés à partir des milieux de culture d'*Eutypa lata*. Dans chaque cas, nous avons stocké ces valeurs dans la librairie.

(colonne RP-18 , 250 x 4.6 mm ; 40-60% en 10 min, 60-90% en 30 min, 90-100% MeOH-Eau en 5 min, à 1 ml/min).

Les mesures ont été effectuées avec les produits suivants :

- Eutypine (A)
- hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène (C)
- hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-2 phénol (D)
- méthoxy-8 melléine (E)
- alcool hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzylique (F)
- acide hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzoïque (K)
- époxy-3,4 (méthyl-3 butadiénylidène)-1 cyclohexanediol-2,5 (M)
- diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.1)
- hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.2.1)
- hydroxy-7 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.2.2)
- dihydroxy-6,7 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.3)
- chloro-6 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.4.1)
- chloro-7 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.4.2)
- alcool hydroxy-4 (hydroxy-3 méthyl-3 propynyl-1)-3 benzylique (P)
- hydroxyméthyl-5 isopropènyl-2 benzofurane (R)

Les spectres UV/VIS et les temps de rétention sont donnés dans la partie expérimentale.

8.4.1. Dosage qualitatif

Nous avons utilisé le milieu EI-1 pour la recherche de l'Eutypine au moyen du DAD. Le programme d'élution est le même pour les produits purs et pour le mélange brut; ceci permet une reconnaissance des produits non seulement par le spectre UV/VIS mais aussi par le temps de rétention. La reconnaissance exige une certaine pureté pour chaque pic du chromatogramme, valeur fixée à >95% et une bonne reproductibilité des mesures (marge pour les temps de rétention fixée à $\pm 2,5\%$).

Dans le chromatogramme ci-dessous, le nom des produits reconnus s'inscrit au dessus des pics. Les longueurs d'onde de détection sont : 254 nm \pm 20 nm et 360 nm \pm 20 nm.

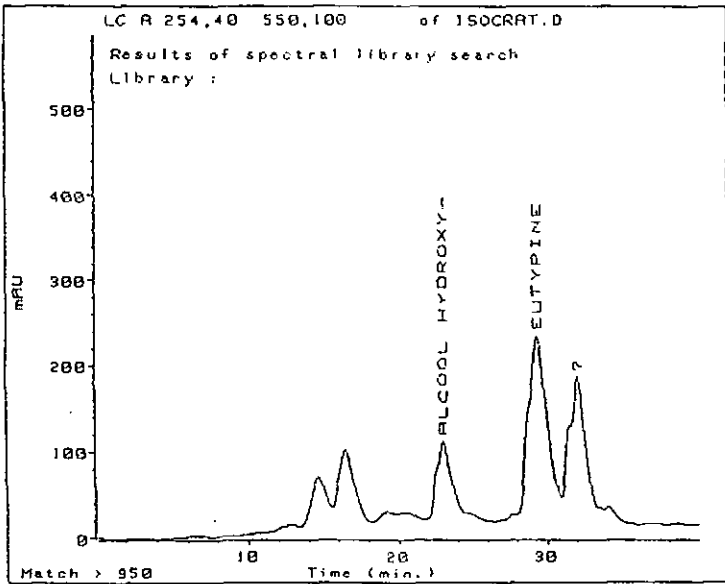
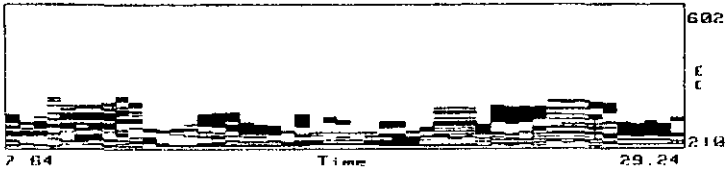


Fig. 47 : recherche de l'Eutypine au moyen du DAD.

Le RATIOGRAMME à 2-D ci-dessous montre l'échelle des longueurs d'onde en ordonnée en fonction du temps en abscisse. Les zones foncées (rouge en réalité) montre les longueurs d'onde où les produits absorbent fortement, tandis que les zones claires (bleu-violet en réalité) correspondent à des absorptions faibles.



Le RATIOGRAMME suivant, enregistré entre 0 et 29.24 min sur un domaine de 210 à 375 nm montre d'une manière tridimensionnelle le contenu du même milieu de culture.

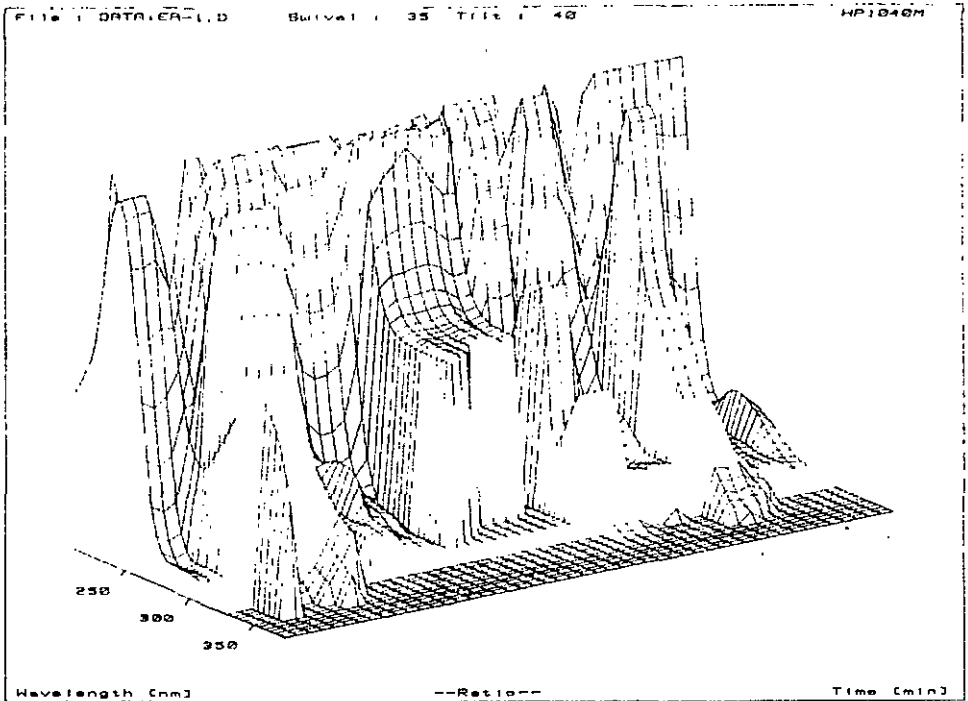
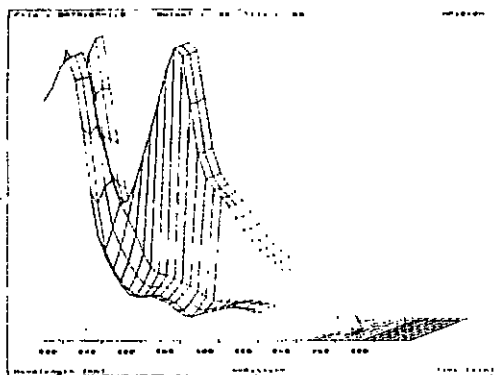


Fig. 48 : ratiogramme de l'extrait du milieu de culture EA-1.

On reconnaît bien l'Eutypine dans le ratiogramme, après avoir fait pivoter et incliner la représentation précédente et calculer sur un domaine de temps plus étroit (17.75-24.00 min).

Fig. 49 : vue partielle du ratiogramme du milieu EA-1.



L'ISOGRAMME qui suit, représentant la forme logarithmique du ratiogramme précédent, permet encore de mieux discerner le contenu du mélange.

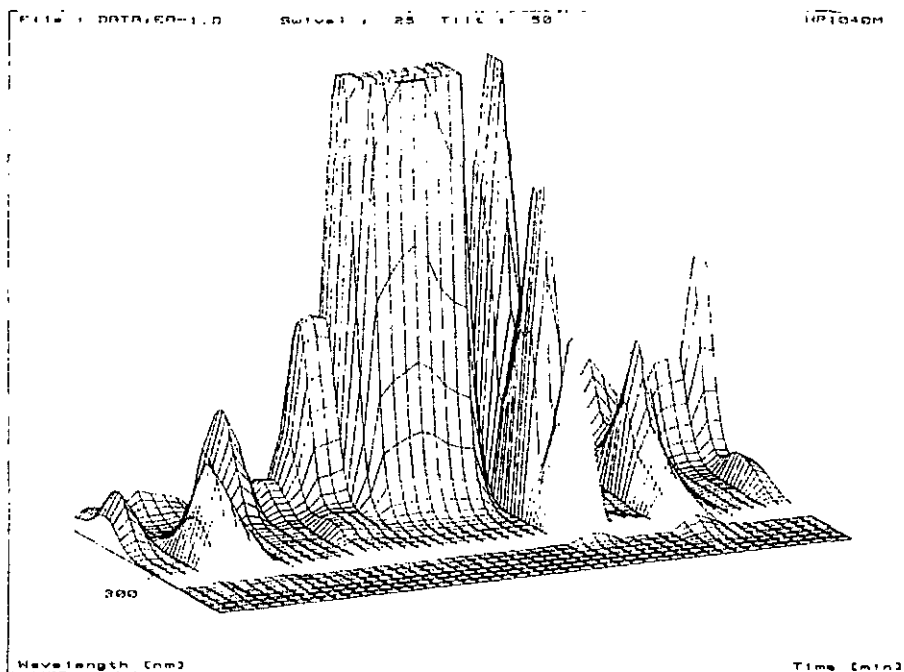


Fig. 50 : isogramme de l'extrait du milieu de culture EA-1.

8.4.2. Dosage quantitatif

L'appareil permet également de doser des substances, par exemple avec la méthode de l'étalon interne ou de l'étalon externe.

Nous avons dosé l'Eutypine contenue dans le milieu de culture Ea-1 en utilisant le p-hydroxy-benzaldéhyde comme étalon interne. Le choix de ce dernier est tel que son temps de rétention ne coïncide pas avec un autre produit du mélange dans les conditions de séparation fixées initialement.

La table de calibration donnée ci-dessous montre les temps de rétention de l'étalon interne (ISTD) et de l'Eutypine, les quantités des produits (Amt) et les aires des pics correspondantes.

Ret Time	Pk#	Signal	Descr	Amt ng/u)	Lvl	Area	Pk-Type	Partial Name
15.025	1	R 254	40 550 100	5364	1	34047	ISTD	P-OH-BENZALD.
				5364	2	42678		
29.511	2	R 254	40 550 100	498.0	2	10599		EUTYPINE
				2389	1	52917		

L'ordinateur calcule et dessine la meilleure droite d'étalonnage en tenant compte du point origine.

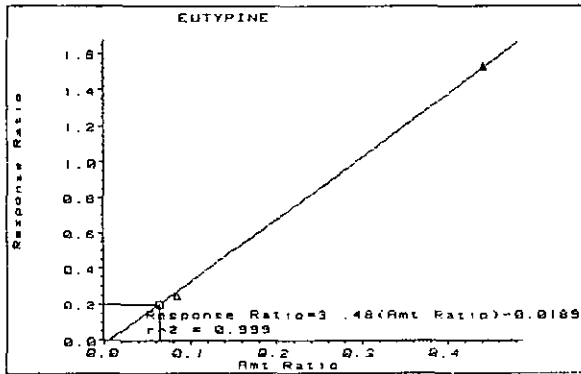


Fig. 51 : courbe d'étalonnage pour le dosage de l'Eutypine.

Dans le mélange brut contenant une quantité connue d'étalon interne, l'ordinateur "reconnait" par le temps de rétention et le spectre UV/VIS, la présence de l'étalon et de l'Eutypine.

Il calcule en retour la quantité d'Eutypine présente dans ce milieu de culture.

La quantité d'Eutypine trouvée dans ce milieu est de 340 ng/ μ l, ce qui correspond, compte tenu des dilutions, à 1,36 mg/l.

9. SYNTHESES

9.1. Introduction

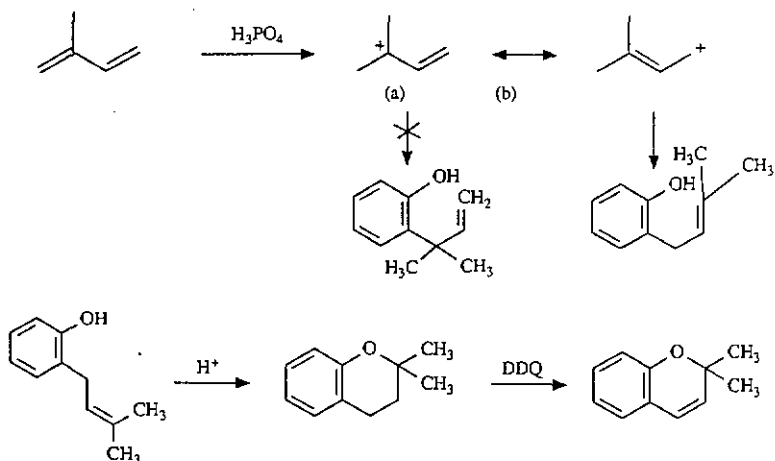
Dans le but de confirmer et vérifier la structure de certains de nos produits isolés dans le milieu de culture d'*Eutypa lata*, nous avons entrepris quelques synthèses. Nous nous sommes intéressés aux molécules de type chromanone et chromène précédemment isolées sous 3.2.3 (produit C) et 3.2.14 (produits N.1 à N.5). Les synthèses des produits C, N.4.1 et N.4.2 sont nouvelles.

Nous avons opté de préférence pour des voies efficaces, permettant d'obtenir le produit désiré en un minimum d'étapes sans trop nous préoccuper du rendement et d'optimiser la méthode.

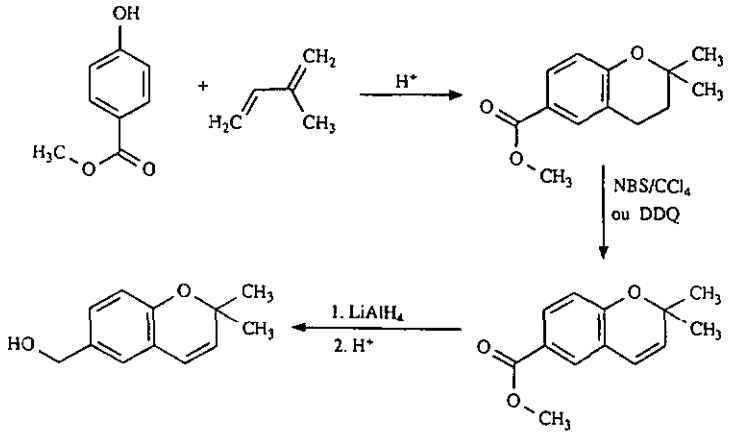
Les modes opératoires des nouvelles synthèses sont donnés dans la partie expérimentale au chapitre VI.

9.2. Synthèse de l'hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène (C)

D'après [27], la première étape consiste à condenser un phénol approprié avec le méthyl-2 butadiène-1,3 (isoprène) en présence de quantités catalytiques d'acide orthophosphorique à 30-35°C. La méthode a l'avantage de n'introduire qu'une unité isoprénique et conduit à la formation exclusive d'un diméthyl-2,2 chromane. Cette condensation peut être considérée du point de vue chimique comme équivalente à la voie biogénétique. Après protonation de l'isoprène, le cation mesomère (a) ou (b) peut alkyler le phénol. Pour des raisons thermodynamiques c'est le produit issu de (b) qui se forme préférentiellement. L'allyl-phénol intermédiaire, sous condition catalytique acide, cyclise et donne le chromane. Ce dernier est déhydrogéné avec DDQ pour donner le diméthyl-2,2 chromène correspondant. [28-29]

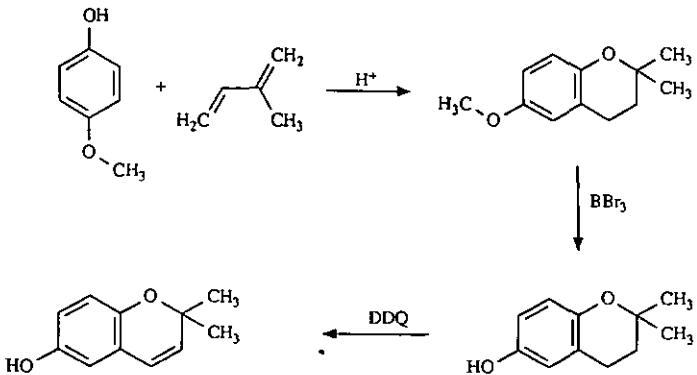


Dans un premier essai nous avons utilisé l'alcool hydroxy-4 benzylique comme produit de départ; le groupe $-\text{CH}_2\text{OH}$ semble empêcher la cyclisation et le rendement reste très faible. Nous avons ainsi jugé souhaitable de débiter la synthèse avec un phénol possédant déjà une fonction sur la bonne position pour éviter par la suite tout problème d'orientation lors de l'acylation [30]. Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser l'hydroxy-4 benzoate de méthyle qui, par condensation avec l'isoprène en présence d'acide orthophosphorique, donne le diméthyl-2,2 dihydro-3,4 2H benzopyrane-1 carboxylate-6 de méthyle. Celui-ci est déhydrogéné, soit à l'aide de DDQ, soit avec NBS en présence de peroxyde de benzoyle pour donner le diméthyl-2,2 2H benzopyrane-1 carboxylate-6 de méthyle. Finalement, la fonction ester est réduite par LiAlH_4 , ce qui donne l'hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène.

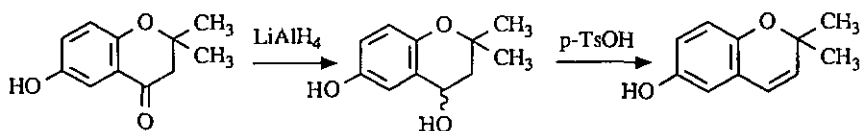


9.3. Synthèse de l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromène (N.5)

On utilise l'hydroxy-4 anisole comme phénol de départ; l'un des groupes hydroxy est ainsi protégé. La synthèse a été réalisée selon le schéma ci-dessous:

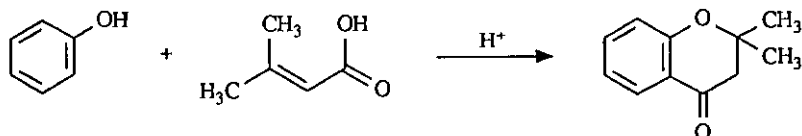


A partir de l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromanone-4 obtenue sous 9.5, nous avons synthétisé l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromène selon [31] car la méthode précédente ne donne que très peu de produit cyclisé lors de la première étape.

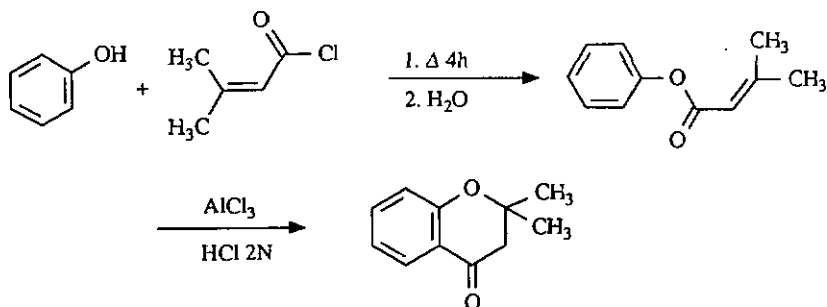


9.4. Synthèse de la diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.1)

La voie la plus utilisée pour obtenir une chromanone-4 est la réaction entre un phénol et un acide insaturé en présence d'acide polyphosphorique $H(PO_3H)_xOH$. Cette approche convient bien pour les chromanones-4 substituées en C-2. [32-34]

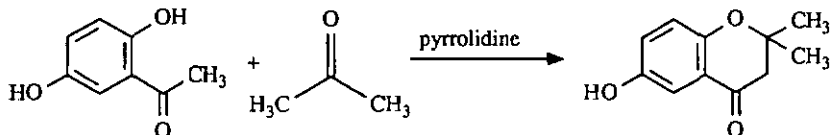


Nous avons également obtenu de bons résultats en utilisant un phénol et un chlorure d'acide insaturé en présence de chlorure d'aluminium. [33]



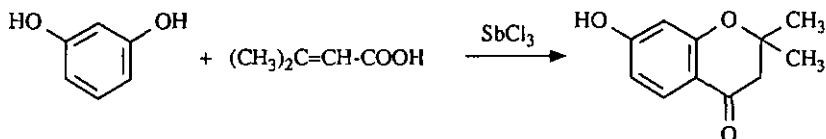
9.5. Synthèse de l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.2.1)

Préparé par analogie à la réf. [35], selon le schéma ci-dessous. Ce produit est ensuite utilisé pour obtenir l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromène.



9.6. Synthèse de l'hydroxy-7 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.2.2)

Par analogie à la réf. [36], selon le schéma ci-dessous.

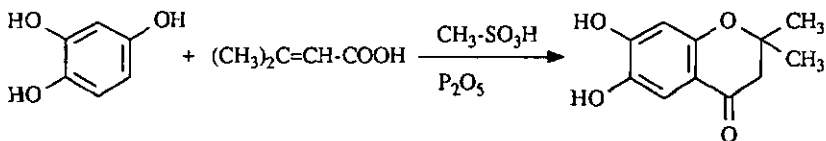


9.7. Synthèse du dihydroxy-5,7 diméthyl-2,2 chromanone-4
Synthèse du dihydroxy-6,7 diméthyl-2,2 chromanone-4

Ces synthèses ont lieu selon [37], en utilisant le trihydroxy-benzène correspondant qui est condensé avec le chlorure de l'acide diméthyl-2,2 acrylique en présence de AlCl_3 .

9.8. Synthèse du dihydroxy-7,8 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.3)

La synthèse de ce produit a été réalisée selon [37].

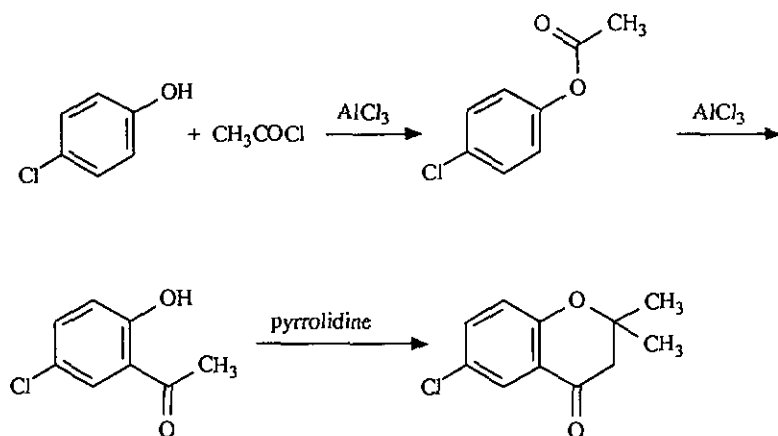


9.9. Synthèse de la chloro-6 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.4.1) et

Synthèse de la chloro-7 diméthyl-2,2 chromanone-4 (N.4.2).

L'utilisation de la méthode décrite sous 9.4. ne se prête pas dans ce cas; nous n'avons obtenu que du produit sous forme non cyclisée, que ce soit avec l'acide ou le chlorure d'acide insaturé, avec ou sans catalyseur.

Par analogie à [38-39], le p-chloro-phénol forme l'ester correspondant en présence du chlorure d'acétyle; ensuite par un réarrangement de Fries en présence de $AlCl_3$ comme catalyseur, nous obtenons l'hydroxy-2 chloro-5 acétophénone. Ce dernier se condense avec l'acétone en présence de pyrrolidine pour donner la chloro-6 diméthyl-2,2 chromanone-4.



Par le même procédé, en partant avec le m-chloro-phénol, nous avons également synthétisé la chloro-7 diméthyl-2,2 chromanone-4.

III. ETUDE DU MATERIEL VEGETAL DE VIGNE

I. INTRODUCTION

Des nécroses sectorielles de couleur foncée et de consistance dure dans le bois (fig. 52), des rameaux fortement rabougris, des inflorescences desséchées, des feuilles bronzées, où les limbes sont déformés (fig. 53), tel est l'aspect du matériel végétal atteint par l'Eutypiose.

Après avoir isolé et identifié la toxine dans le milieu de culture d'*Eutypa lata*, nous avons tenté de mettre en évidence sa présence dans le matériel végétal malade récolté directement sur le terrain. Nous avons donc analysé séparément du bois, des tiges, des feuilles et des inflorescences malades et comparé avec le matériel sain correspondant.



Fig. 52 : coupe transversale d'un tronc de cep atteint d'Eutypiose (photo FALLOT). [40]



Fig. 5.3 : partie supérieure d'un cep de vigne atteint d'Eutypiose (photo PEZET). [41]

2. ETUDE DU BOIS

2.1. Extraction

6 kg de ceps de vigne malade - *Vitis vinifera* cv. *Mauzac* - ont été débarrassés de leur écorce et découpés en lamelles fines à l'aide d'une scie électrique tout en récoltant la sciure résultante. Sciure et lamelles de ce bois malade ont été extraits dans l'éther au moyen d'un Soxhlet pendant 48 heures. Une analyse par CCM indique la présence de grandes quantités d'acides gras qui sont précipités par addition de 200 ml d'éthanol à l'extrait. La solution est conservée une nuit à -15°C et filtrée à froid à travers un verre fritté. Le filtrat concentré est chromatographié sur colonne de silice en éluant avec CH_2Cl_2 au début et en augmentant progressivement la polarité jusqu'à 10 % de MeOH. Le même procédé a été appliqué à partir de 2 kg de bois sain.

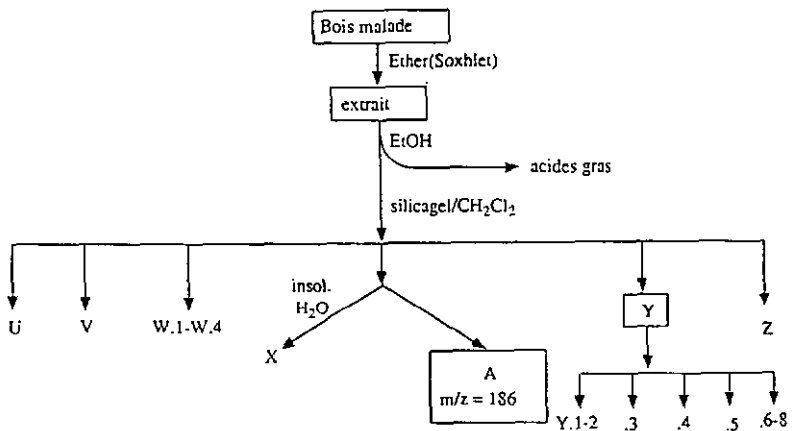
2.2. Fractionnement

Le but principal étant de détecter l'Eutypine, nous nous sommes intéressés en premier lieu aux fractions dont le R_f est situé à $\mp 0,1 R_f$ par rapport à la toxine sur CCM; (éluant : dichlorométhane, $R_f(\text{Eutypine}) = 0,56$). Ceci permet de sélectionner les fractions susceptibles de contenir l'Eutypine et de faciliter la recherche lors de l'analyse par GC-MS. On élimine ainsi tous les produits gênants et trop nombreux se trouvant dans l'extrait.

Nous avons adopté la même méthode en ce qui concerne le bois sain.

Le protocole de recherche de l'Eutypine a été répété 2 fois afin de confirmer le résultat.

Le schéma de fractionnement pour le bois malade (2e recherche) est donné ci-dessous:



2.3. Analyse des fractions du bois malade

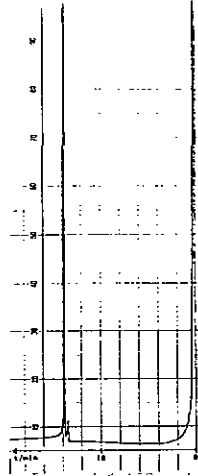
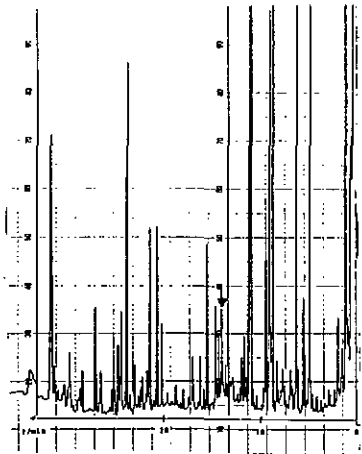
Il s'agit de savoir si l'Eutypine est présente dans du bois atteint par l'Eutypiose:

- Une analyse par chromatographie en phase gazeuse d'une des fractions montre la présence d'un produit possédant le même temps de rétention que l'Eutypine.

Conditions pour la GC: 120°C pendant 3 min, 4°C/min jusqu'à 200°C.

Fig. 54 : Chromatogramme GC:
mélange brut:

Fig. 55 : chromatogramme GC:
Eutypine pure:



- La recherche et la mise en évidence de l'Eutypine a lieu en injectant la fraction suspecte dans le chromatographe en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse (GC-MS). L'ion sélectionné à $m/z = 186$ étant celui qui correspond au pic moléculaire de l'Eutypine. L'appareil cherche parmi tous les ions, ceux qui satisfont cette condition; lorsque celle-ci est remplie, un pic correspondant à un produit du chromatogramme (en-haut) apparaît au même endroit sur l'échelle en abscisse (en-bas). Le spectre de masse du produit repéré est reproduit et comparé avec celui de l'échantillon pur.

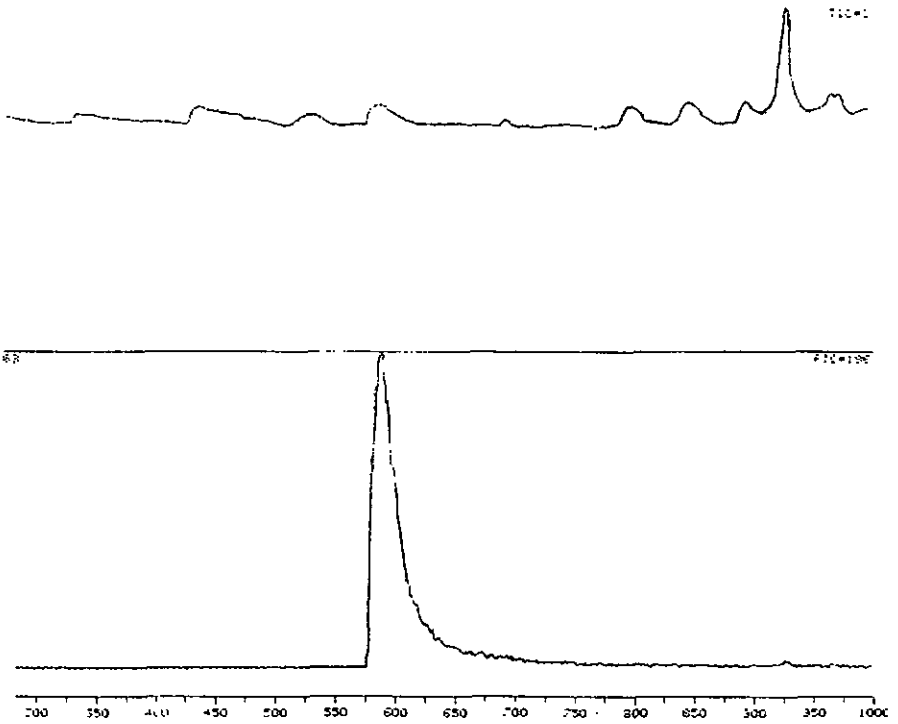


Fig. 56 : chromatogramme de la fraction suspecte.

Dans notre cas, nous observons donc bien la présence d'un produit à $m/z = 186$ dont le spectre de masse montre qu'il s'agit d'Eutypine. Dans cette fraction nous n'avons trouvé aucun autre produit de la série acétylénique; la présence d'une hydroxy chromanone-4 a été par contre reconnue par la recherche du ion à $m/z = 192$; son spectre est identique à celui du produit trouvé auparavant dans le milieu de culture.

Dans le but de mieux caractériser ce bois de vigne et de retrouver quelques composés précédemment isolés, nous nous sommes aussi intéressés aux autres fractions.

2.4. Identification des composés isolés dans le bois malade

La plupart des produits décrits ci-dessous ont pu être identifiés par comparaison avec la littérature, principalement [23] et [42]. La reconnaissance des principaux fragments ainsi que le mécanisme dont ils sont issus sont caractéristiques pour l'appartenance à une classe de composés. La localisation de groupes fonctionnels peut être déterminée à partir des fragmentations. Avec l'aide quelquefois d'une mesure analytique supplémentaire, la spectrométrie de masse est ici une méthode analytique puissante qui permet d'élucider des structures avec des quantités très faibles de matériel.

2.4.1. Identification de U

L'allure du spectre $^1\text{H-RMN}$ de cette fraction montre qu'il s'agit d'un triglycéride ne présentant aucun intérêt dans le contexte de nos recherches.

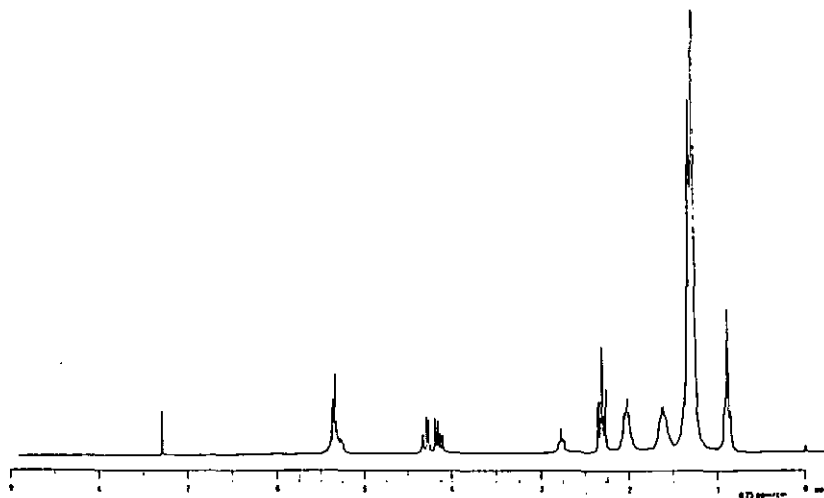


Fig. 57 : spectre $^1\text{H-RMN}$ de U.

2.4.2. Identification de V

2 mg de ce produit ont été isolés sous forme de cristaux blancs après purification par HPLC sur RP-18 (gradient MeOH-Eau 40-100% en 40 min).

Par CCM (FeCl₃/MeOH) on met en évidence la présence d'une fonction phénolique (tâche bleu-grise).

Dans le spectre ¹H-RMN, 3 protons (domaine 2.60-3.05 ppm) forment un système ABX où l'hydrogène X (domaine 4.60-4.80 ppm), est un multiplet complexe. Il possède des constantes de couplage vicinale de 6 Hz avec le groupe méthyle, de 16 Hz avec le proton axial et de 4 Hz avec le proton équatorial. Par calcul de la partie AB l'hydrogène axial par rapport au groupe méthyle est situé à 2.98 ppm ($J_{ax,eq} = 16$ Hz, $J_{eq,eq} = 4$ Hz) et l'hydrogène équatorial par rapport au groupe méthyle est situé à 2.73 ppm ($J_{ax,eq} = 16$ Hz, $J_{ax,ax} = 10$ Hz). L'irradiation du proton à 4.73 ppm transforme les 2 doublets de doublet du spectre ABX en un système AB à 4 lignes et le doublet à 1.57 ppm en un singulet. Nous retrouvons ici les mêmes caractéristiques que pour la O-méthylmelléine décrite sous II.2.2., où le carbone en position 3 est asymétrique, mais où la partie aromatique est différente. Dans ce cas, 2 protons donnant lieu à un spectre AB indique un noyau aromatique tétrasubstitué: un groupe hydroxyle fixé en position 8 et un groupe méthyle en 5.

Par le spectre de masse obtenu par ionisation chimique positive (ammoniac), nous confirmons le poids moléculaire comme étant 192.

Nous pouvons écarter la structure de l'hydroxy-8 diméthyl-3,5 chromanone-4 ainsi que tout autre isomère de formule brute C₁₁H₁₂O₃ car les déplacements chimiques des protons de la partie -CH₂-CH-CH₃ ainsi que les couplages seraient différents.

Les méthyl-3 dihydro-3,4 isocoumarines peuvent être distinguées des méthyl-2 chromanones en MS. Par rupture retro-Diels-Alder, les isocoumarines perdent une molécule d'acétaldéhyde, tandis que les chromanones perdent une molécule de propène. La perte de 42 unités de masse conduit au pic majoritaire, souvent au pic de base, pour les chromanones; dans notre cas, il y a perte de 44 à partir du pic moléculaire.

La comparaison de nos analyses avec la littérature [43] montre qu'il s'agit de l'hydroxy-8 diméthyl-3,5 isochromanone-1 ou méthyl-5 melléine. DE ALVARENGA [44] mentionne l'isolement de plusieurs dihydroisocoumarines et de phthalides dans le bois de 12 espèces d'arbres infectés par des champignons durant leur stockage.

La synthèse est décrite par NARASIMHAN [45].

Analyse

$^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3)$: 1.57 (3H, d, $J = 6$ Hz, Me-3), 2.22 (3H, m, Me-5), 2.73 (1H, dd, $J = 16$ Hz, $J = 10$ Hz, $\text{H}_{\text{ax}}-4$), 2.98 (1H, dd, $J = 16$ Hz, $J = 4$ Hz, $\text{H}_{\text{eq}}-4$), 4.73 (1H, m, H-3), 6.84 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-7), 7.25 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-6), 11.01 (1H, s, ArOH).

MS (m/z , 1%): 192(M^+ 98), 174(45), 163(30), 148(61), 131(34), 120(100), 91(96), 77(49), 65(53).

MS ((Cl-NH_3) , m/z , 1%): 210(23), 194(11), 193(100), 192(9), 174(3), 163(2), 148(4), 120(2).

IR (cm^{-1}): 3430 (νOH), 1665 (νCOO).

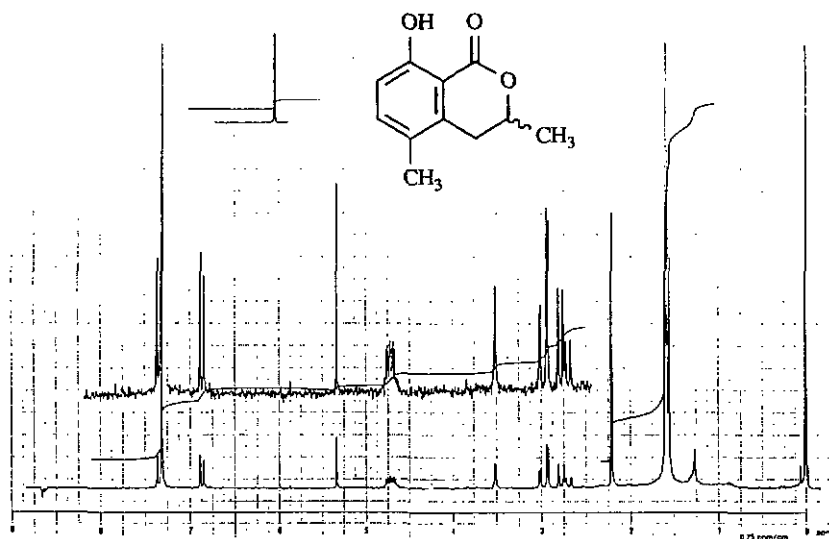


Fig. 58 : spectre $^1\text{H-RMN}$ de V.

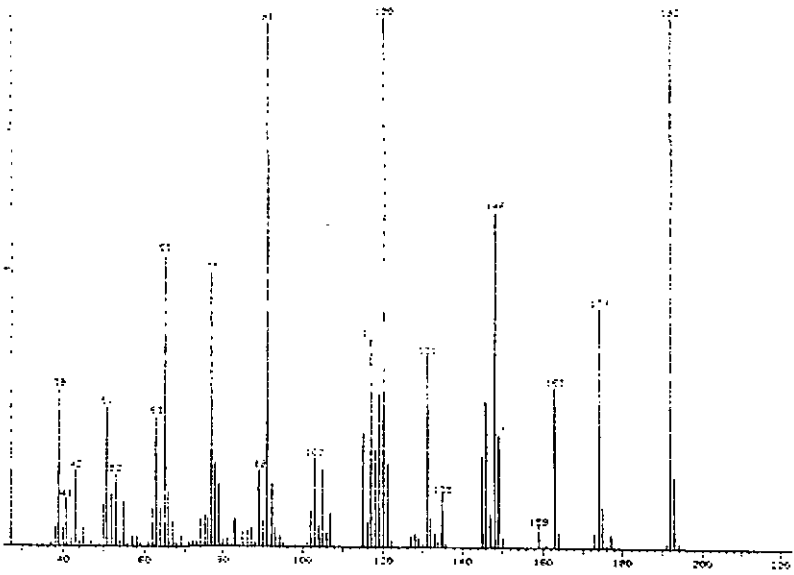


Fig. 59 : spectre MS de V.

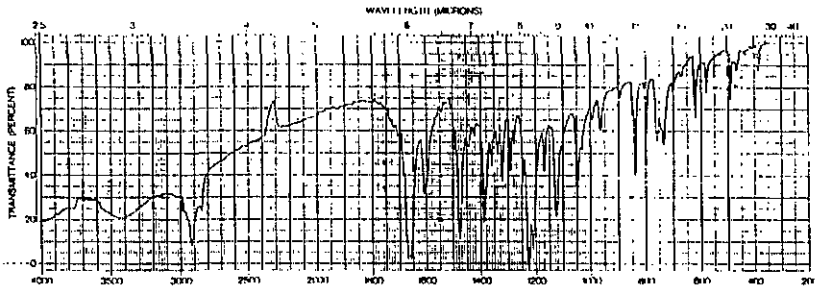


Fig. 60 : spectre IR de V.

2.4.3. Analyse de W.1 à W.4

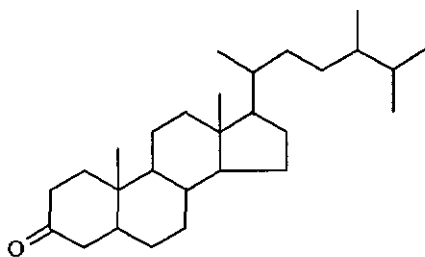
Compte tenu de la faible quantité des produits contenus dans cette fraction, nous avons procédé à une analyse par GC-MS. Les 4 autres produits, comparés avec [23] sont de nature stéroïdique.

Analyse

- GC-MS (m/z, 1%): 400(M⁺ 71), 385(12), 247(4), 232(49), 231(100), 217(34), 163(17), 123(27).

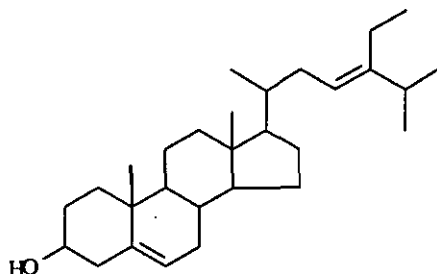
Le pic de base à m/z = 231 est caractéristique des 5 α -cholestanones [46]. L'absence du pic à m/z = 330 indique que nous avons un isomère 5 α . [47]

Le produit est la 24 α -méthyl 5 α -cholestanone-3 ou ergostanone-3 (W.1).



- GC-MS (m/z, 1%): 412(M⁺ 22), 397(5), 369(11), 351(4), 314(4), 300(12), 271(23), 255(15), 215(5), 81(62), 55(100).

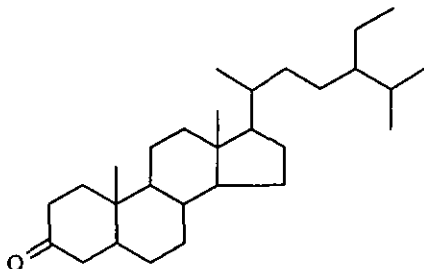
Il s'agit du stigmastadiène-5,23 3β-ol (W.2).



- GC-MS (m/z, 1%): 414(M⁺ 60), 399(5), 232(51), 231(100), 217(45), 163(22), 123(25).

L'absence du pic à [M-70]⁺ suggère qu'il s'agit de l'épimère 5α. Les autres pics montrent qu'il s'agit d'une 24-éthyl cholestanone. [46]

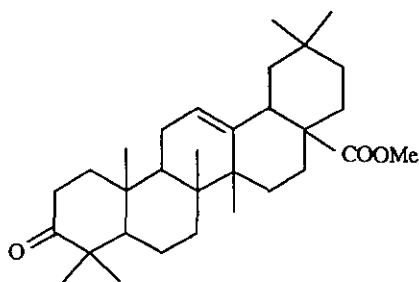
Le produit est la 24α-éthyl 5α-cholestanone-3 ou stigmastanone-3 (W.3).



- GC-MS (m/z , 1%): 468(M^+ 15), 409(5), 408(5), 263(6), 262(32), 249(10), 203(100), 202(21), 189(32), 133(25).

Le fragment à $m/z = 262$ provient d'une réaction rétro-Diels-Alder dans le cycle C, celui-ci perdant ensuite la fonction COOMe fixée sur le C-17 pour donner le pic à $m/z=203$. A son tour, ce fragment se décompose au niveau du cycle E par perte de 70 unités de masse et conduit au pic à $m/z = 133$. Un fragment à $m/z = 189$ contenant les cycles A et B est caractéristique des triterpènes pentacycliques saturés.

Le produit, comparé avec [48], est l'oléanoate de méthyle (W.4).



2.4.4. Identification de X

30 mg de ce produit ont été isolés sous forme d'aiguilles blanches dont le point de fusion est de 205°C.

Ce produit est invisible en UV à 254 et 360 nm, mais il est révélé par H₂SO₄ 10% sous forme d'une tache violet-brune.

- $[\alpha]_D^{20} = +25,2^\circ$ [CHCl₃] $c = 0,9$.

Les analyses enregistrées avec notre produit et comparées avec [49] montrent qu'il s'agit du β -lupénol.

Le choix de l'isomère β est déterminé par plusieurs facteurs, dont la rotation optique, le point de fusion, la bande IR à 1035 cm⁻¹.

En MS, les pics intenses à $m/z = 189$, 203 et 207 indiquent la présence du squelette de base du lupane. [50]

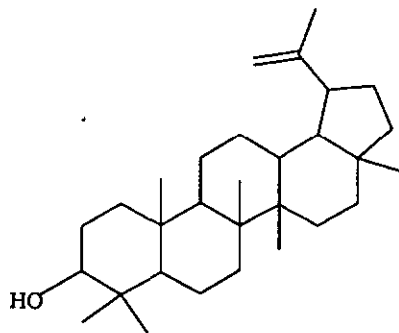
Analyse

$^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3)$: 0.76 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(23)$), 0.79 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(28)$), 0.83 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(24)$), 0.95 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(25)$), 0.97 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(27)$), 1.03 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(26)$), 1.57 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(29)$), 1.68 (2H, m, $-\text{CH}_2$), 2.38 (1H, dt, H_{20}), 3.18 (1H, m, $\text{H-3}\alpha$), 4.58 et 4.72 (2H, d, $=\text{CH}_2$).

MS (m/z , 1%): 426(M^+ 27), 411(13), 218(36), 207(52), 203(31), 189(60).
(pour les fragments les plus représentatifs)

IR (cm^{-1}): 3330 (νOH), 2980 ($\nu\text{-CH}_2$ et $\nu\text{-CH}_3$), 1635 ($\nu\text{C}=\text{C}$), 1035 (νOH).

Le produit est le lupène-20(29) 3β -ol ou lupérol (X).



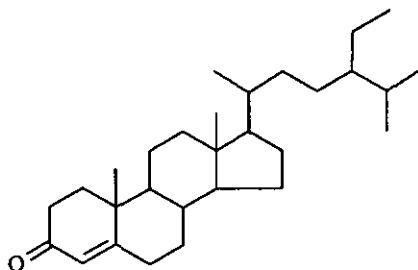
2.4.5. Analyse de Y.1 à Y.2

Cette fraction est analysée par GC-MS et les spectres comparés avec [23, 51-52].

Analyse

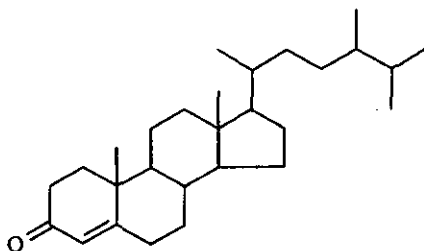
- GC-MS (m/z, %): 412(M⁺ 5), 397(2), 370(2), 289(4), 229(26), 147(17), 135(18), 124(100).

Le produit est le stigmastène-4 one-3 (Y.1).



- GC-MS (m/z, %): 398(M⁺ 7), 271(7), 229(25), 147(33), 135(30), 124(100), 109(50).

Le produit est l'ergostène-4 one-3 (Y.2).



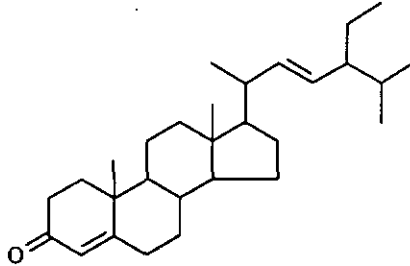
2.4.6. Analyse de Y.3

Analyse

GC-MS (m/z, 1%): 410(M⁺ 10), 367(4), 298(11), 271(20), 269(23), 255(8), 245(18), 229(7), 147(16), 123(18), 105(23), 55(100).

Cette fragmentation est caractéristique d'une stérone avec deux double-liaisons en position 4 et 22. [46]

Le produit est la 24 α -éthyl 5 α -cholestadiène-4,22 one-3 ou stigmastadiène-4,22 one-3 (Y.3).

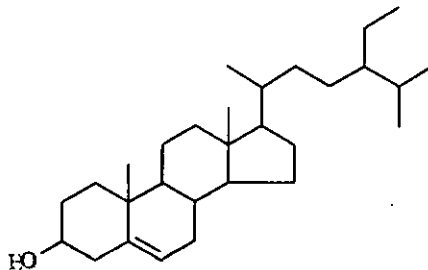


2.4.7. Analyse de Y.4

Analyse

- GC-MS (m/z, 1%): 414(M⁺ 26), 396(17), 382(7), 354(4), 329(13), 303(21), 273(36), 255(58), 231(50), 213(100), 199(40), 159(84), 145(88), 81(97), 57(94).

Le produit est le stigmastène-5 ol-3 (Y.4).



2.4.8. Analyse de Y.5

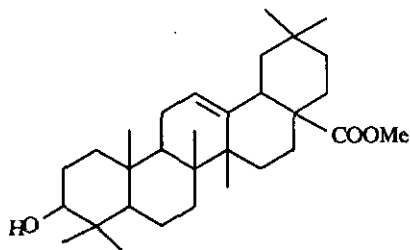
Cette fraction renferme un produit de poids moléculaire 470 dont les fragments caractéristiques de transposition Diels-Alder donnent des pics à $m/z = 262$ et 203 . La comparaison avec [53-54] montre que notre spectre est plus proche du produit dont le fragment à $m/z = 262$ a une intensité de base de 49%.

Les déplacements chimiques en $^1\text{H-RMN}$ confirment qu'il s'agit bien de l'oléanolate de méthyle et non pas de l'ursolate de méthyle.

Analyse

$^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3)$: 0.72 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(26)$), 0.78 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(24)$), 0.88 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(29)$), 0.90 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(30)$), 0.92 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(25)$), 0.99 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(23)$), 1.13 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(27)$), 2.83 (1H, dd, H_{18}), 3.23 (1H, m, H_3), 3.62 (3H, s, $\text{H}_3\text{-COOC}(28)$), 5.30 (1H, m, $\text{H-C}(12)$).

MS (m/z , I%): 470(M^+ 3), 452 (2), 410(2), 262(57), 203(100), 189(22), 133(25).

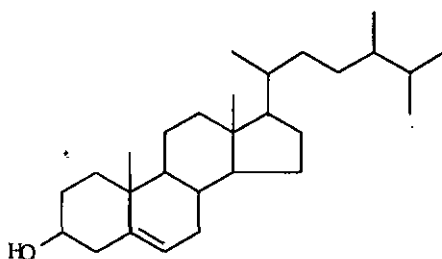


2.4.9. Identification de Y.6 à Y.8

Analyse

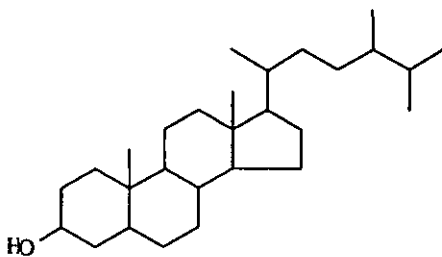
- GC-MS (m/z, 1%): 400(M⁺ 76), 385(18), 382(35), 367(24), 315(46), 289(24), 273(26), 255(28), 231(25), 213(43), 145(42), 107(67), 95(68), 43(100).

Le produit est l'ergostène-5 ol-3 (Y.6).



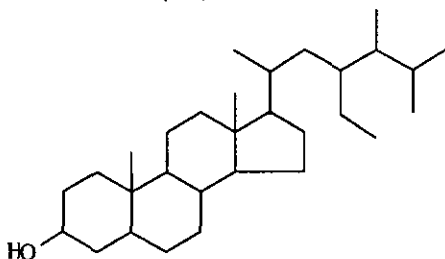
- GC-MS (m/z, 1%): 402(M⁺ 34), 387(26), 384(4), 369(5), 315(20), 289(17), 273(12), 255(15), 234(35), 215(75), 145(26), 107(69), 95(96), 43(100).

Le produit est l'epiergostanol (Y.7).



- GC-MS (m/z, I%): 416(M⁺ 67), 401(42), 383(16), 290(17), 234(57), 233(82), 215(100), 107(57), 95(69), 55(80).

Le produit est l'éthyl-23 cholestanol-3 (Y.8).



2.4.10. Identification de Z

35 mg de ce produit qui cristallise sous forme d'aiguilles blanches ont été isolés et soumis à l'analyse.

Le point de fusion est de 250°C; le produit est invisible en UV mais apparaît sous forme d'une tache rouge-brune sur CCM révélé avec H₂SO₄.

Dans le spectre ¹H-RMN, par rapport au lupérol (X), le groupe méthyle en position 28 est remplacé par un groupe CH₂OH où les protons méthyléniques donnent lieu à un spectre AB.

Dans le spectre de masse, les pics intenses à m/z = 189 et 207 indiquent le motif du lupane comme squelette de base. [50]

Les valeurs trouvées pour ce produit confirment qu'il s'agit du lupéne-20(29) diol-3,28 ou bétuline. [55-56]

Ce produit, dont le précurseur est le lupérol, a la particularité de se trouver abondamment répandu dans les écorces de certains arbres. [57]

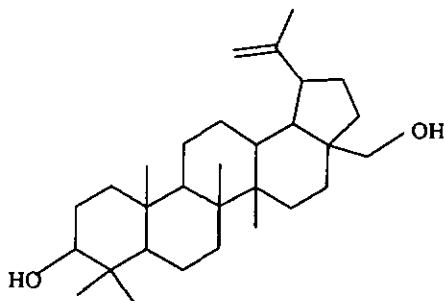
Avec la plus vieille référence datant de 1788, la bétuline constitue une des premières substances naturelles isolées à partir des plantes. Ce produit est essentiellement extrait à partir des écorces des arbres, en particulier les poiriers. On lui connaît plusieurs applications comme l'utilisation en tant que stabilisateur pour la cellulose, l'emploi dans la fabrication de résines et cosmétiques, l'utilisation en tant qu'antiseptique en médecine et d'autres encore. [58]

Analyse

$^1\text{H-RMN}(\text{CDCl}_3)$: 0.76 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(23)$), 0.83 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(24)$), 0.97 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(25)$), 0.98 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(27)$), 1.03 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(26)$), 1.68 (3H, s, $\text{H}_3\text{-C}(29)$), 2.38 (1H, m, H_{20}), 3.21 (1H, dd, $J = 12.6$ Hz, $\text{H-3}\alpha$), 3.35 et 3.83 (2H, d, $J = 10.5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 4.62 et 4.72 (2H, m, $=\text{CH}_2$).

MS (m/z, I%): 442($\text{M}^+ 4$), 424(2), 411(8), 385(3), 288(5), 257(5), 220(10), 207(50), 189(85).
(pour les fragments les plus représentatifs)

IR (cm^{-1}): 3390 (νOH), 2965 ($\nu\text{-CH}_2$ et $\nu\text{-CH}_3$), 1640 ($\nu\text{C}=\text{C}$), 1020 (νOH).



2.5. Analyse des fractions du bois sain

L'analyse de ces fractions a mis en évidence une grande quantité de lupérol et de bétuline, ainsi que d'autres stérols en trace tel que le stigmastène-4 one-3. La présence de triglycérides a également été observée.

La recherche de l'Eutypine par GC-MS comme précédemment, n'a pas montré la présence de celle-ci ni de composés apparentés.

3. ETUDE DES TIGES

3.1. Matériel de départ

Nous avons reçu de Toulouse des tiges herbacées saines (t_S) et malades (t_M) provenant de cépages de Ugni-Blanc (U.B.), de Cabernet-Sauvignon (C.S.) et de Merlot (ME.). Les masses de matériel frais avant lyophilisation sont :

- 320 et 416 g de t_M (U.B.);
- 417 et 418 g de t_S (U.B.);
- 276 g de t_M (C.S.) et 57 g de t_S (C.S.);
- 172 g de t_M (ME.) et 45 g de t_S (ME.).

3.2. Extraction

Ce procédé s'applique également pour les feuilles et les inflorescences (III.4. et 5.); il consiste tout d'abord à éliminer une grande partie des chlorophylles en prenant soin de ne pas perdre les produits recherchés.

Après lyophilisation et conservation à - 20°C dans des sachets en plastique, le contenu encore froid est broyé pendant 30 secondes.

Pour 3,5 g de matériel frais, on ajoute 20 ml d'acétone et on agite à température ambiante pendant 2.5 heures; la solution est filtrée et le filtrat est conservé.

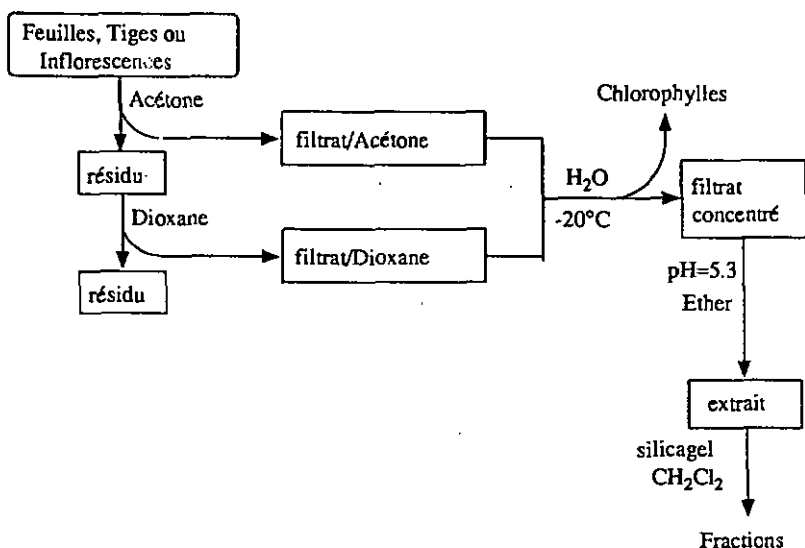
Le résidu est repris dans un volume de dioxane tel que l'on en utilise 2,5 ml pour 10 ml d'acétone utilisés précédemment; la solution est agitée à température ambiante pendant 2 heures; elle est ensuite filtrée; le résidu est conservé et les deux filtrats sont réunis.

Sous agitation lente, on ajoute goutte à goutte 4 ml d'eau pour un volume total dioxane + acétone de 12,5 ml. Un léger trouble apparaît et la solution est conservée une nuit à - 20°C.

Après ce temps, on filtre rapidement à froid, le précipité contenant une bonne partie des chlorophylles est éliminé et le filtrat est concentré à sec au Rotavapor sous vide à 35 °C.

Le résidu est repris dans quelques dizaines de millilitres d'eau et l'on ajuste le pH de la solution à 5,3 au moyen d'une solution aqueuse de NaOH 0,1 N. On extrait ensuite par 4 portions d'éther de 150 ml, la phase étherée est séchée sur MgSO₄ anhydre puis l'éther est complètement éliminé. Le résidu est repris dans le dichlorométhane puis la solution est chromatographiée sur colonne de silice en éluant avec CH₂Cl₂.

Schéma général pour l'extraction du matériel végétal:
(valable pour tiges, feuilles et inflorescences).



3.3. Séparation

Comme pour le bois (voir sous III.2.2.), le critère reste le même en ce qui concerne la recherche de l'Eutypine; nous nous sommes intéressés aux fractions possédant un R_f voisin de celui de la toxine.

Vu le nombre relativement élevé de produits obtenus après ce protocole, les fractions soupçonnées de renfermer l'Eutypine ont été extraites avec Na_2CO_3 2 N dans le but de n'isoler que les phénols. On régénère avec HCl 2 N à froid et extrait à l'éther. La phase étherée concentrée à sec est reprise dans le méthanol et analysée par GC-MS.

Les conditions pour la GC sont identiques à celles données sous III.2.3.

3.4. Analyse des fractions

Aucun des échantillons analysés n'a révélé la présence de l'Eutypine dans les ôges saines ou malades.

Ci-dessous, nous donnons un exemple où la recherche du pic à $m/z = 186$ montre un courant ionique nul indiquant l'absence de produit possédant ce poids moléculaire ou un fragment de masse correspondante.

L'absence de courant ionique enregistré pour $m/z = 185$ confirme ce résultat, ce fragment étant très important dans l'Eutypine et inexistant pour les autres produits que nous connaissons.

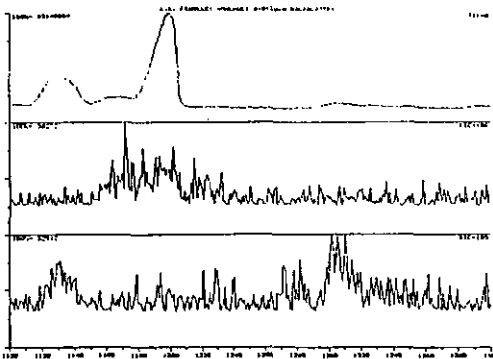


Fig. 61 : recherche de l'Eutypine par GC-MS dans les feuilles malades de Ugni-Blanc. GC-MS (en haut), recherche $m/z = 186$ (au milieu), $m/z = 185$ (en bas).

Nous avons également cherché la présence d'autres métabolites secondaires, en particulier ceux possédant la chaîne méthyl-vinyl- acétylénique et ceux possédant le motif d'une chromanone. Nous avons pu détecter une chloro-diméthyl-2,2 chromanone-4 dans les tiges malades de Cabernet-Sauvignon. Les autres produits ne présentent aucun intérêt particulier puisqu'il s'agit, compte tenu de l'allure des spectres de masse, d'hydrocarbures ou d'alcools à longue chaîne ainsi que de quelques stérols en trace.

4. ETUDE DES FEUILLES

4.1. Matériel de départ

Les masses de feuilles saines (f_S) et de feuilles malades (f_M) dont nous disposions étaient :

- 48, 54 et 75 g de f_M (U.B.);
- 217, 398 et 411 g de f_S (U.B.);
- 200 g de f_M (C.S.) et 65 g de f_S (C.S.);
- 162 g de f_M (ME.) et 36 g de f_S (ME.).

4.2. Analyse

Après avoir fait le procédé habituel décrit précédemment, nous n'avons décelé la présence de l'Eutypine dans aucun échantillon de feuilles malades ou saines.

Au cours du fractionnement sur colonne, nous avons pu récolter sans peine quelques milligrammes d'un produit blanc que nous avons soumis à l'analyse. Les valeurs des spectres données ci-dessous montrent qu'il s'agit du N-(trichlorométhylthio)-phthalimide, un fongicide communément appelé Folpet et utilisé sur diverses plantes. Nous avons eu confirmation de la part du viticulteur, affirmant que ce produit avait bien servi au traitement de la parcelle sur laquelle avaient été prélevés les échantillons reçus!

Le "Folpet" est un des meilleurs fongicides hétérocycliques : il réagit avec les groupes -NH_2 et -SH en désactivant les enzymes de pathogènes possédant ces groupes. C'est un excellent fongicide pour le contrôle des taches sur les feuilles, les pourritures sur les fruits, les légumes, les fleurs ornementales et les herbes. Il est utilisé comme protecteur des semences pour les légumes, les fleurs et les herbes et comme agent de conservation pour les fruits et les légumes. [59]

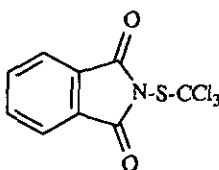
Analyse

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 7.95 et 8.10 (4H, m, ArH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3): 124.87 (C-4 et C-5), 131.79 (C-3 et C-6), 135.50 (C-2a et C-6a), 144.85 (C-Cl₃), 165.86 (C=O).

IR (cm^{-1}): 1750/1720 ($\nu\text{CO-N-CO}$), 710 ($\nu\text{C-Cl}$).

MS (m/z , I%): 299(M^++4 4), 297(M^++2 12), 295(M^+ 12), 264(11), 262(61), 260(89), 232(13), 200(5), 178(12), 150(14), 130(49), 117(48), 104(100), 76(98), 51(27).



N-(trichloromethylthio)phthalimide ou *Folpet*

5. ETUDE DES INFLORESCENCES

5.1. Matériel de départ

Les masses d'inflorescences saines (i_S) et d'inflorescences malades (i_M) dont nous disposions étaient :

- 52 g de i_M et 30 g de i_S (U.B.);
- 38 g de i_M (C.S.);
- 27 g de i_M (ME.).

Nous n'avons pas reçu de matériel sain pour les deux dernières variétés.

5.2. Analyse

Si l'Eutypine n'a pas été retrouvée dans les inflorescences saines, nous avons pu en revanche en déceler dans les inflorescences malades de Ugni-Blanc et de Cabernet-Sauvignon où sa présence ne fait aucun doute.

Sa présence est prouvée par la recherche des fragments descendants à $m/z = 185$, 157 et 128 où un pic apparaît pour le même temps de rétention.

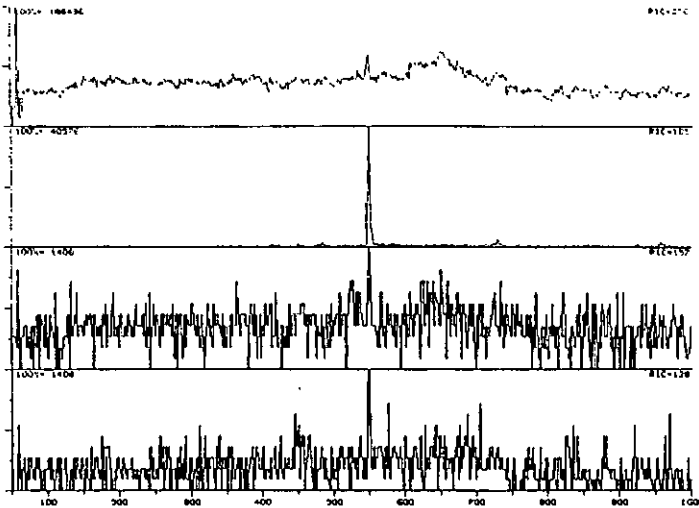


Fig. 62 : recherche de l'Eutypine par GC-MS dans les feuilles malades de Ugni-Blanc.
De haut en bas : GC-MS, recherche $m/z = 185$, $m/z = 157$, $m/z = 128$.

6. Discussion [60]

Il ressort des analyses précédentes que seuls les inflorescences et le bois malades contiennent la toxine en trace. Si cette dernière est absente dans tous les échantillons sains, cela confirme son implication dans l'Eutypiose puisqu'elle se retrouve dans certains organes végétatifs de ceps malades.

Sa présence dans le bois malade ne nous surprend pas trop puisqu'il s'agit de l'endroit où la contamination et l'expansion de la maladie ont lieu le plus souvent.

Son absence dans les tiges malades peut s'expliquer en considérant qu'il s'agit d'une voie de communication importante de l'eau et des sels minéraux depuis les racines vers les feuilles; contrairement à la nourriture qui y est souvent stockée, la toxine est véhiculée ailleurs.

Signalons que TSOUPRAS [61] a effectué un travail sur la sève dans laquelle il a pu mettre en évidence la présence d'Eutypine par MS-MS.

Les feuilles, organe principal de la photosynthèse et de la respiration, sont également un centre où l'eau circule. Pour les mêmes raisons que celles données pour les tiges, nous pouvons comprendre l'absence d'Eutypine à ce niveau et sa présence dans les inflorescences, organe terminal de la plante, où elle aboutit.

Des enzymes différents, une activité chimique spécifique et des fonctions propres dans chaque tissu d'organes impliquent ces différences.

D'autre part, on sait que la nourriture se déplace vers le bas, à travers les tiges et les racines; en outre, au début du printemps, la sève emporte les substances dissoutes vers le haut, vers les branches et les bourgeons. La période de récolte de nos échantillons doit donc se répercuter sur nos résultats. On sait d'ailleurs que le transport de nourriture peut être réduit ou arrêté quand l'oxygène manque.

IV. MARQUAGE RADIO-ACTIF

1. INTRODUCTION

L'étude de la biosynthèse de métabolites secondaires a fait l'objet de peu d'articles ces dernières années; ces recherches vont pourtant en augmentant et ont pu être clarifiées depuis que l'on connaît l'utilisation de précurseurs marqués et surtout la possibilité de détecter et mesurer un radioisotope donné. Le but est de prouver l'origine et la voie biosynthétique d'un produit organique naturel.

Le problème peut être attaqué de la manière suivante : on incorpore dans un milieu naturel ou de culture de petites unités marquées, tels l'acétate ou le mévalonate, afin de définir le chemin impliqué comme voie biosynthétique. Dans cette approche, on utilise en général le carbone-14 comme marqueur. Les métabolites sont extraits du milieu, séparés et purifiés par les procédures habituelles. Finalement on isole les produits après avoir établi qu'ils sont radiochimiquement purs et à l'aide de dégradations chimiques sélectives on peut localiser les atomes radioactifs dans le produit.

Un exemple d'application nous est donné par GRUNWALD [62] où il étudie l'incorporation de l'acide mévalonique [$2\text{-}^{14}\text{C}$] dans des stérols.

Les radioisotopes les plus utilisés dans l'étude des voies biosynthétiques de molécules organiques sont le carbone-14 et le tritium. Il est aussi possible d'utiliser des précurseurs marqués par des isotopes stables tels que le deutérium, où le produit sera analysé par spectrométrie de masse et le carbone-13 qui est détecté par RMN.

2. PRESENTATION DE LA TECHNIQUE DE MESURE [63-64]

2.1. Détection de la radiation

Comparée aux méthodes traditionnelles de fractionnement, la radiochromatographie à débit offre les avantages suivants :

- une haute résolution;
- des analyses très rapides;
- la possibilité de voir les résultats en temps réel;
- des frais réduits.

Lorsqu'un noyau radioactif se désintègre, il émet des particules α , des particules β ou une radiation γ . Parmi les noyaux qui nous intéressent ici (isotopes de H, C, S, P et I), l'émission β est la forme primaire de désintégration.

Pour les particules β , leur masse, leur charge négative et leur énergie relativement faible font qu'elles ne peuvent pas pénétrer les parois du récipient contenant l'échantillon.

Pour détecter et compter les événements de la désintégration β , on utilise le procédé suivant : un cocktail comprenant un mélange de liquides scintillants est ajouté au récipient contenant l'échantillon et convertit l'énergie reçue en une émission visible. Les particules β interagissent avec le cocktail, qui émet un faisceau de lumière, dont l'intensité est directement proportionnelle à l'énergie des particules. Cette lumière est détectée par un photomultiplicateur et les signaux résultants sont enregistrés électroniquement sous forme d'événements. Le nombre de ces événements (appelés coups) sont enregistrés par unité de temps et donne une mesure de la radioactivité présente dans l'échantillon.

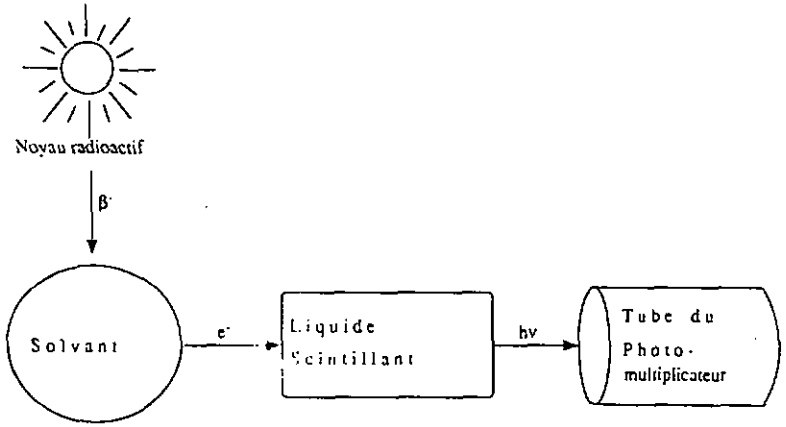


Fig. 63 : Transfert d'énergie avec liquide scintillant.

Le temps de coups (T_C) est mesuré en minutes et l'activité exprimée en coups par minute (CPM) par l'expression :

$$\text{CPM} = \text{Coups observés} / T_C$$

Pour déterminer le nombre de désintégrations par minute (DPM) dans l'échantillon, le CPM est divisé par l'efficacité du système de détection:

$$\text{DPM} = \text{CPM} / (\text{Efficacité \%} / 100)$$

2.2. Détection de la radioactivité pour HPLC

Comme l'échantillon n'est pas statique mais qu'il se déplace suivant le débit à travers un tube, on doit tenir compte de quelques concepts supplémentaires.

Pour convertir l'énergie de la désintégration β en photons, il existe 2 méthodes:

1. Le cocktail est mélangé avec le flux d'échantillon et le mélange résultant est détecté par un photomultiplicateur. Cette méthode homogène requiert une Cellule à Liquide Radio-HPLC.
2. La méthode hétérogène utilise un scintillateur solide et a lieu dans une Cellule à Solide Radio-HPLC.

De plus, on ne peut pas fixer un temps de coups arbitraire, puisque l'échantillon se déplace; n'importe quelle portion donnée de l'échantillon peut être comptée aussi longtemps qu'il coule à travers la cellule. Le temps de séjour pour une portion donnée de l'échantillon dans la cellule est son Temps de Résidence (T_R). Il est fonction du débit de l'échantillon et du volume de la cellule et le calcul du nombre de coups devient:

$$T_R = \text{Voïume de la Cellule} / \text{Débit}$$

$$\text{CPM} = \text{Coups observés} / T_R$$

Avant l'enregistrement d'un échantillon, on prend en considération le bruit de fond de la radioactivité (Background B) en CPM, valeur qui sera ensuite soustraite des valeurs obtenues avec l'échantillon.

On aura finalement:

$$\text{CPM} = \text{Coups observés} - (B * T_R) / T_R$$

2.3. Qualité d'un système de détection

Trois aspects doivent être distingués :

- l'efficacité d'un détecteur est le pourcentage des coups détectés parmi le nombre total d'évènements. Pour une combinaison donnée de détecteur, noyau radioactif, éluant HPLC, cocktail et concentration, l'efficacité est constante. Dans le cas du ^{14}C , avec une cellule à liquide sous conditions statiques, l'efficacité vaut au moins 95%.
- la sensibilité qui est l'habilité à détecter une radiation donnée au-dessus du bruit de fond.
- l'activité minimale détectable (AMD) qui est le niveau minimum d'une activité qui peut être mesurée. Elle peut être calculée à partir de l'équation suivante:

$$\text{AMD} = B * W / T_R * E$$

où:

- B = le background en CPM,
- W = la largeur du pic en minutes,
- T_R = le temps de résidence en minutes,
- E = le pourcentage de l'efficacité/100.

Il est possible d'augmenter la sensibilité du système (diminution de AMD) en diminuant la vitesse du débit ou en augmentant les dimensions de la cellule.

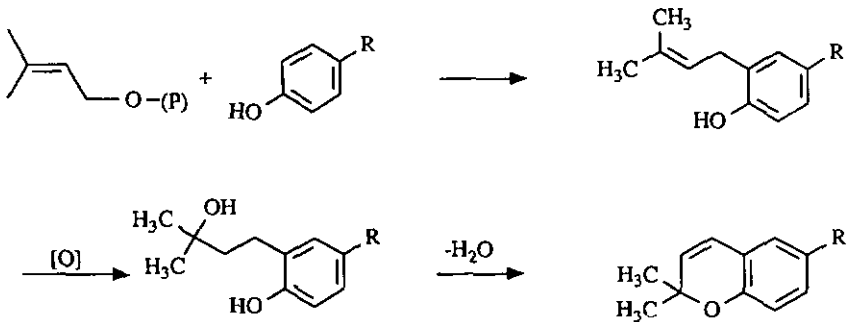
2.4. Enregistrement

Un ordinateur rassemble et traite les données enregistrées, montre les résultats de l'analyse, calcule les CPM et DPM; ces valeurs peuvent être sauveées sur disque ou être imprimées; en particulier, un chromatogramme représentant l'absorption dans l'UV en fonction du temps superposé à une représentation de la radioactivité détectée pour un marqueur en fonction du temps sont montrés. Il est ainsi possible de repérer les produits radio-actifs dans un mélange brut.

3. OBJECTIF

Les connaissances actuelles sur l'origine biosynthétique de nombreux produits naturels permettent d'envisager un chemin réactionnel pour la formation des produits du type chromène, tels ceux rencontrés dans notre travail (C et N.5). [65]

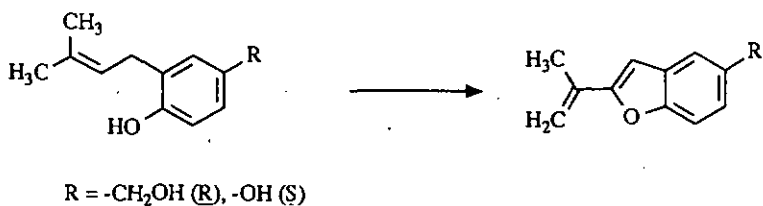
Nous savons que lors du métabolisme secondaire, l'acide mévalonique provenant de l'acide acétique, est dérivé en diméthyl-3,3 pyrophosphate. Cette dernière unité se condense avec un composé aromatique provenant de la voie de l'acide shikimique (anisaldehyde, p-hydroxybenzaldehyde, etc.) [11]; le produit résultant subit une hydroxylation puis cyclise avec élimination d'eau.



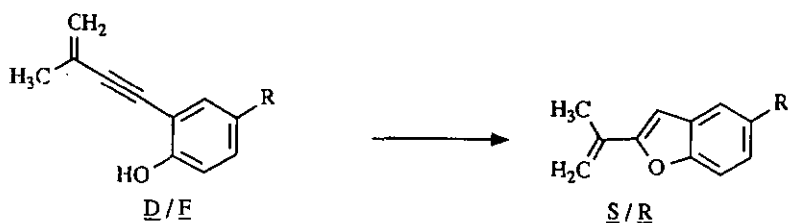
$R = -OH, CH_2OH$

PROKSCH et al. [66] ont prouvé par marquage que le précoceène I ($R = -OMe$) était issu de la voie biogénétique de l'acide shikimique.

On peut également envisager une cyclisation sans hydroxylation conduisant à un composé benzofuranique :

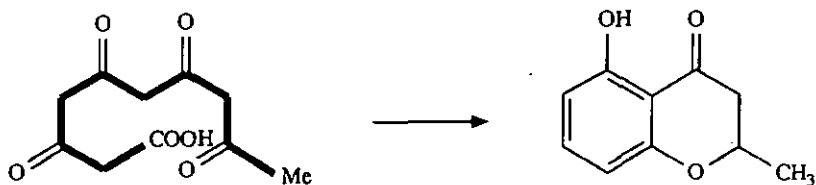


Cette réaction explique la présence dans notre milieu de culture des produits R comme étant issus de F et S provenant de D.

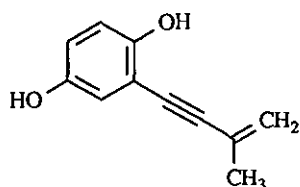


Pour les composés acétyléniques, qui sont d'origine polycétide, la triple liaison provient d'une déhydrogénation de la double liaison.

Par cyclisation d'un pentacétide, il est possible d'obtenir une structure benzopyranique, motif de base des chromanones (selon le schéma ci-dessous) et de la melléine :



La **Siccayne**, nom attribué au produit **D** et mentionné dans [11], fait partie des métabolites inclassifiables tout comme le frustulosinol [67]; cela signifie que l'origine biosynthétique de ces composés n'est pas élucidée ou reste ambiguë par manque d'expérience de marquage. S'il n'y a aucun doute quant à l'origine du cycle aromatique comme dérivé de la route de l'acide shikimique, l'origine de la chaîne méthyl-vinyl- acétylénique n'est pas connue.



Siccayne (D)

L'étude de la voie biogénétique des métabolites de type acétylénique tels **A**, **B**, **D**, **F**, **J** et **K** est l'objet principal de ce chapitre. Nous voulons montrer que la chaîne latérale isopentyle est biosynthétisée à partir de la voie provenant de l'acide mévalonique.

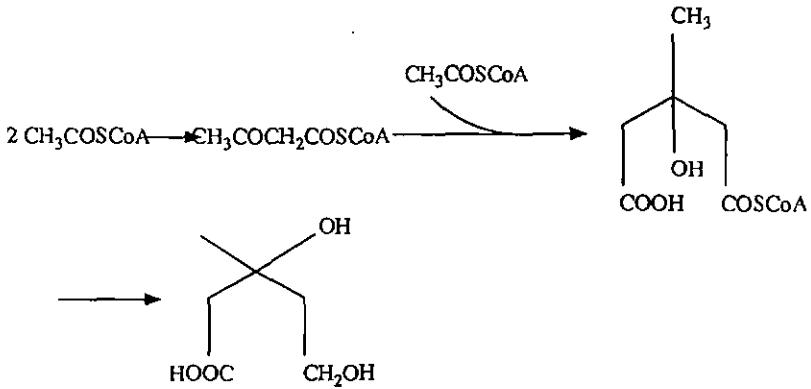
NAIR [8] a expliqué la formation du frustulosinol, un métabolite ayant des propriétés antibiotiques isolé de *Stereum Frustulosum*, composé qui ne diffère que par la présence supplémentaire du groupe -CH₂OH en position ortho de la chaîne latérale par rapport au produit **D**. Il pense que la chaîne latérale serait formée à partir de l'acétyl-CoA via l'acide mévalonique, tandis que le reste de la molécule serait dérivé de l'acide shikimique.

Si cette hypothèse s'avère exacte avec l'un ou l'autre de nos composés acétyléniques, nous pouvons admettre qu'il en est de même avec les autres dérivés du même type, puisque le passage de l'un à l'autre consiste en une réaction de réduction ou d'oxydation en général.

4. Mécanisme d'insertion

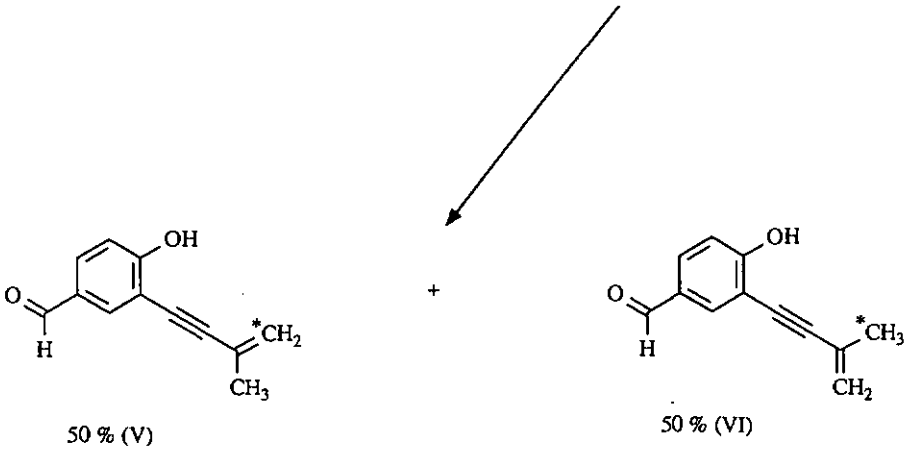
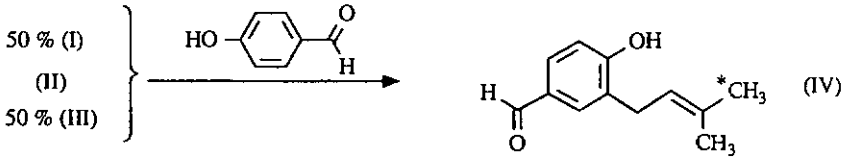
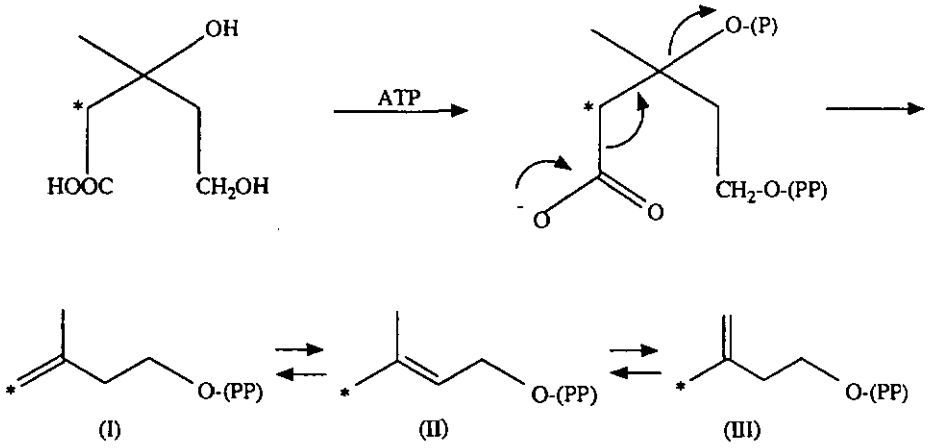
L' "unité isoprénique" est connue comme étant l'isopentényl pyrophosphate, formé à partir de l'acétate via le mévalonate.

Pour la formation du mévalonate, l'acétoacétate est formé par condensation de deux molécules d'acétyl-coenzyme-A. L'équilibre est déplacé en faveur d'une condensation entre l'acétoacétyl-coenzyme-A et une troisième molécule d'acétyl-coenzyme-A pour donner le β -hydroxy β -méthylglutarate qui est réduit en mévalonate.



L'acide mévalonique est activé enzymatiquement par phosphorylation. Une élimination avec décarboxylation donne le pyrophosphate d'isopentèn-3 yle (I) qui s'isomérisé en pyrophosphate d'isopentèn-2 yle (II).

Si nous représentons ce mécanisme avec de l'acide mévalonique dont le carbone en position 2 est marqué par du carbone-14, nous obtenons le schéma suivant:



-O-(P) = -O-PO(OH)₂

-O-(PP) = -O-PO(OH)-O-PO(OH)₂

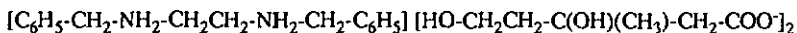
Compte tenu de l'équilibre entre les isomères I et II, le produit II peut redonner l'isomère III où la double liaison prend place à une position telle que le carbone marqué se retrouve sur le carbone porteur du groupe méthyle.

Il s'en suit que l'isomère II, 50% de I et 50% de III réagissent avec le para-hydroxybenzaldéhyde pour donner l'intermédiaire IV. Après nouvelle isomérisation, nous obtenons 50% du produit V où l'atome radioactif est sur le carbone méthylénique et 50% de VI où c'est le carbone du groupe méthyle qui est radioactif.

5. PROTOCOLE DU MARQUAGE RADIO-ACTIF [68]

5.1. Choix du marqueur

Nous avons choisi l'acide mévalonique dont le carbone en position 2 est porteur du carbone-14. Le produit, obtenu dans le commerce, est un mélange racémique sous forme de sel double. Il s'agit du di-(D,L)-[2-¹⁴C] mévalonate de N,N'-dibenzylethylènediamine.



Pour minimiser la décomposition du produit, celui-ci est stocké sous cette forme à - 20°C sous azote.

Le sel est préparé selon la méthode de ELLISON et al. [69] par réaction de deux équivalents de (D,L)-[2-¹⁴C] acide mévalonique avec un équivalent de N,N'-dibenzylethylènediamine et purifié par cristallisation dans un mélange méthanol:éther.

L'activité spécifique de l'échantillon (PM = 538) est de 57 mCi/mmmole ou 106 µCi/mg, correspondant à 3.92 MBq/mg.

5.2. Inoculation et incorporation

Les conditions cinétiques de production des métabolites secondaires pour *Eutypa lata* ont montré que la croissance maximale a lieu après environ une semaine et c'est après cette période que le marqueur est introduit dans le milieu de culture.

5 l de milieu de culture ont été préparés selon les conditions habituelles décrites sous II.1. Sept jours après le début de l'agitation, nous avons introduit le sel de l'acide mévalonique marqué en solution aqueuse, soit 4,8 ml divisés équitablement dans 24 erlenmeyers. L'eau utilisée pour cette solution est stérilisée puis filtrée à travers un filtre bactériologique. Ce dernier consiste en une membrane Millipore attachée directement à une seringue graduée.

5.3. Isolement des produits

Après 4 semaines sous agitation, le mycélium est éliminé par filtration, le milieu est concentré à un volume de 800 ml, le pH ajusté à 5,3 puis on extrait avec 4 x 150 ml d'éther. Le champignon a synthétisé les métabolites attendus parmi lesquels nous avons vérifié par GC-MS la présence des produits A, F et M.

Nous avons voulu connaître quels étaient les métabolites secondaires présents dans le mélange brut ayant incorporé des atomes de carbone-14. A cet effet nous avons injecté une quantité de l'extrait brut dans un chromatographe HPLC couplé en série avec un radio-détecteur β et un détecteur UV. La superposition des 2 chromatogrammes ci-après montre que les produits correspondant aux pics # 1, 4 et 5 sont les plus radio-actifs.

Remarque : la quantité injectée a provoqué une saturation du détecteur UV, d'où la forme des pics. C'est uniquement dans ces conditions que les faibles valeurs de radio-activité ont pu être détectées dans ce cas. Un comptage préalable des coups avant la mesure a dicté une quantité minimale d'échantillon.

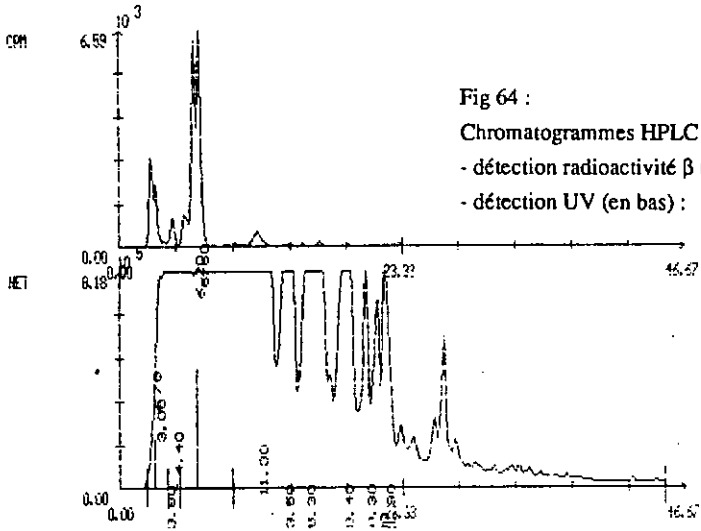


Fig 64 :
 Chromatogrammes HPLC :
 - détection radioactivité β (en haut)
 - détection UV (en bas) :

Conditions d'enregistrement
 (seul le canal 2 est utilisé pour le ^{14}C):

Cell size = 0.50
 Flow rate = 3.50

USER LABEL	RT	CS			
		RADIOACTIVE CHANNEL 1	RADIOACTIVE CHANNEL 2	MASS CHANNEL 3	MASS CHANNEL 4
LABEL		3H	14C	UV	
LL energy (Kev)		0	0		
UL energy (Kev)		20	100		
UPDATE TIME (s)		6		6	
DELAY TIME (s)				6	
BKG SUBT (cps)		0	76	2	
STORED VALUES		CTS			

Valeurs enregistrées (RT = temps de rétention en minutes) :

Peak #	Peak Name	channel 1			channel 2		
		RT	CPM	%	RT	CPM	%
1	-	-	-	-	2.70	9816	11.31
2	-	-	-	-	3.88	5564	7.48
3	-	-	-	-	4.48	3881	4.77
4	-	-	-	-	6.28	31838	38.93
5	-	-	-	-	6.58	23310	29.24
6	-	-	-	-	11.38	6601	8.28
Total :						79738	100.00

Nous avons alors isolé par chromatographie sur gel de silice (éluant CH_2Cl_2 en augmentant progressivement avec 10% MeOH), puis par HPLC à l'échelle semi-préparative les produits les plus radio-actifs correspondants aux pics 4 et 5. Si ces derniers semblent avoir incorporé une grande partie du précurseur marqué, il a été très difficile de les isoler compte tenu de la faible quantité retrouvée. Il semble pourtant, d'après un spectre de masse réalisé sur le pic 5, que le produit pourrait correspondre à 1.1. Le pic 4 pouvant correspondre à 1.2, justifierait la proximité entre les deux.

A partir de l'extrait brut obtenu précédemment et compte tenu de la faible quantité d'Eutypine produite lors de cette culture, nous avons préféré isoler tout d'abord le produit E. Une analyse de ce produit par Radio-HPLC montre les chromatogrammes suivants dans une représentation tridimensionnelle :

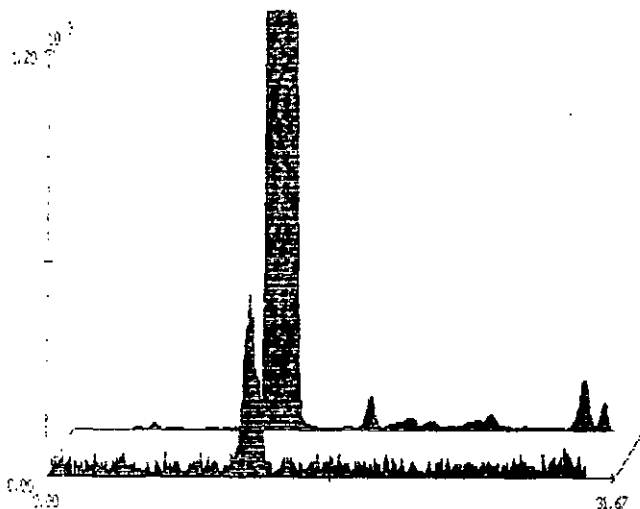


Fig. 65 : chromatogrammes en représentation tridimensionnelle - UV (derrière) et radioactivité β (devant) -.

La superposition des deux pics montre bien que le produit est porteur de carbone-14.

Les conditions d'enregistrement et les valeurs obtenues sont données dans les tableaux ci-dessous :

Le background (60 cpm) a déjà été soustrait aux valeurs.

Le CPM et le DPM montre que l'appareillage possède une efficacité de 89,7 % selon cette mesure.

Les temps de rétention correspondent au début du pic.

File 159010 Date 24/11/98 11:51:25 from raw file

USER	ms			
LABEL	SI alcool 5 us			
	FACIDMETIVE CHANNEL 1	FACIDMETIVE CHANNEL 2	AGE CHANNEL 3	MSS CHANNEL 4
LABEL	3H	14C	UV	
LL energy (KeV)	0	0		
UL energy (KeV)	20	160		
UPDATE TIME (s)	5		1	
DELAY TIME (s)			6	
ENG SWET (cps)	2	50	0	
STORED VALUES	CT5	CT6		

<F12 = Exit> <F4 = Continue>

Cell size = 0.50
Flow rate = 3.50

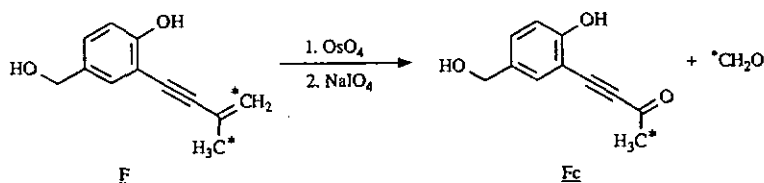
		channel 1			channel 2		
Peak #	Peak Name	RT	CPM	%	RT	CPM	%
1	-	-	-	-	10.40	3633	100.00
Total :						3633	100.00

		channel 1			channel 2		
Peak #	Peak Name	RT	CPM	%	RT	CPM	%
1	-	-	-	-	10.30	4852	100.00
Total :						4852	100.00

6. DISCUSSION

Même s'il n'apparaissait pas radio-actif lors de l'analyse du mélange brut, le composé F, une fois isolé, montre bien qu'une incorporation de carbone-14 a eu lieu. Vis-à-vis du mélange brut, la quantité de radioactivité emmagasinée par ce produit est très faible, vu que la majeure partie se retrouve dans d'autres produits. L'acide mévalonique marqué ne s'incorpore que très faiblement dans nos métabolites de type acétylénique, mais une fois ceux-ci isolés et vu la sensibilité élevée de la technique de détection, il n'y a aucun doute quant à leur teneur en carbone-14.

Il ressort de cette analyse que la chaîne isopentyle doit provenir de la voie de l'acide mévalonique. Puisque cela est vrai pour le composé F, il doit en être de même pour l'Eutypine A ainsi que pour les autres produits acétyléniques. Il n'y a pratiquement aucune chance de trouver un carbone-14 ailleurs qu'aux 2 positions prévues selon le schéma donné auparavant. Reste à déterminer la localisation exacte des 2 atomes marqués. Pour cela, un clivage oxydatif de la double liaison vinylique à l'aide de $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$ devrait former un produit cétonique Fc dont l'activité serait la moitié du produit de départ F puisqu'un atome de C-14 est éliminé sous forme d'acétaldéhyde.



Il n'a malheureusement pas été possible de mener à terme cette étape, la quantité en matériel "froid" et "chaud" disponible étant très faible.

Au moyen du compteur à scintillation nous avons enregistré 2695 CPM en 10 minutes pour 2,73 mg de produit D dans 300 µl de toluène scintillant, correspondant à une activité spécifique de 987 CPM/mg.

Nous avons également réalisé un milieu de culture dans lequel nous avons incorporé de l'acétate de sodium $^{14}\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ (50 µCi). Après procédé habituel, nous sommes parvenus à isoler sous forme cristalline l'Eutypine A et le produit M puis à mesurer le nombre de coups comme précédemment.

Nous avons obtenu :

- 2,76 mg de A ont donné 172 CPM en 10 min, soit 62 CPM/mg;

- 2,33 mg de M ont donné 2707 CPM en 10 min, soit 1162 CPM/mg.

Le fait de détecter une incorporation dans ces produits purs confirme l'origine naturelle de nos produits. Lors du marquage avec l'acétate, un atome de carbone sur deux se retrouve marqué; il n'est donc pas possible de les localiser les uns après les autres.

V. CONCLUSION GENERALE

I. RESUME DES RESULTATS

1.1. Milieu de culture *Eutypa lata*

La cause principale du dépérissement de la vigne observée en Suisse et en France pendant ces dernières années est le champignon *Eutypa lata*, d'où le nom de "Eutypiose" donné à cette maladie.

Le champignon attaque plusieurs espèces d'arbres et apparaît largement distribué dans plusieurs pays du monde. Les symptômes de la maladie sont reconnaissables sur les parties végétales des ceps, en particulier sur les feuilles.

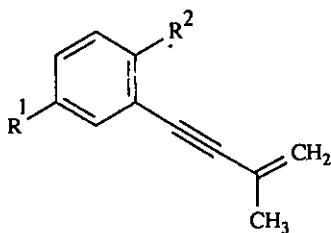
Des études biologiques antérieures ont suggéré que le mode d'action du champignon était dû à un métabolite secondaire toxique pour l'hôte.

Notre travail a permis d'isoler et d'identifier plusieurs métabolites secondaires à partir du milieu de culture d'*Eutypa lata* dont certains n'avaient jamais été décrits dans les études antérieures.

Les conditions de production des métabolites secondaires dans le milieu de culture ont été améliorées dans le but d'obtenir un rendement maximum. Une fraction biologiquement active a pu être isolée à partir de l'extrait étheré provenant du filtrat du milieu de culture.

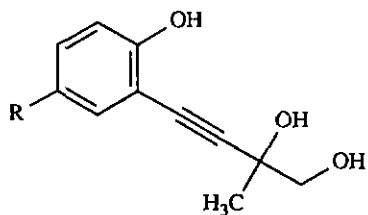
L'utilisation des techniques chromatographiques (principalement la chromatographie sur colonne et HPLC) a permis d'isoler 31 différents métabolites secondaires dont 9 sont des nouveaux composés naturels tandis que les techniques spectroscopiques (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, IR, UV et MS) ont permis d'élucider leurs structures.

Liste des composés identifiés:



R ¹	R ²	Lettre	
--	--	-----	
-CHO	-OH	A	
-CH ₂ OH		-OCH ₃	B
-OH	-OH	D	
-CH ₂ OH		-OH	F
-CHO	-OCH ₃	J	
-COOH		-OH	K

- (A) : hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzaldéhyde *X¹⁾
 (B) : alcool méthoxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzylique *)
 (D) : hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-2 phénol
 (F) : alcool hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzylique *)
 (J) : méthoxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzaldéhyde *)
 (K) : acide hydroxy-4 (méthyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzoïque **)

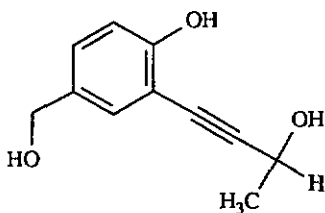


R	Lettre
-	-----
-COOH	O.1
-CHO	O.2
-CH ₂ OH	O.3

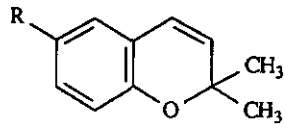
(O.1) : acide hydroxy-4 (dihydroxy-3,4 méthyl-3 butynyl-1)-3 benzoïque **)

(O.2) : hydroxy-4 (dihydroxy-3,4 méthyl-3 butynyl-1)-3 benzaldéhyde **)

(O.3) : alcool hydroxy-4 (dihydroxy-3,4 méthyl-3 butynyl-1)-3 benzylique **)



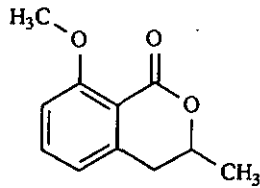
(P) : alcool hydroxy-4 (hydroxy-3 méthyl-3 propynyl-1)-3 benzylique **)



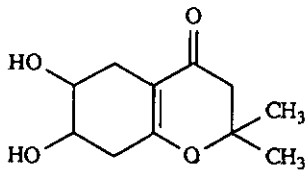
R	Lettre
-	-----
-CH ₂ OH	C
-OH	N.5

(C) : hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène **)

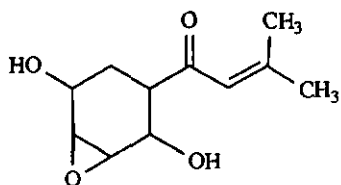
(N.5) : hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromène



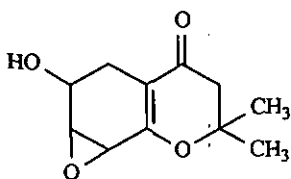
(E) : méthoxy-8 melléine *)



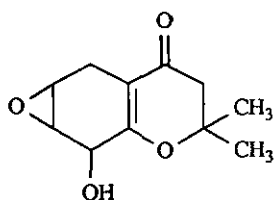
(G) : dihydroxy-6,7 diméthyl-2,2 pentahydro-3,5,6,7,8 benzopyranone-4



(H) : crotonyl-4 époxy-1,2 cyclohexadiol-3,6 **)



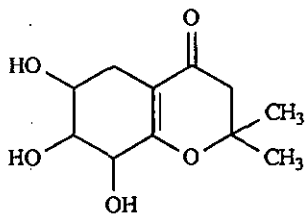
1.1



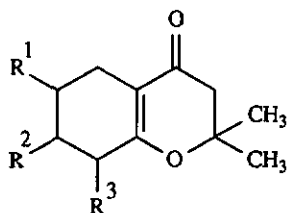
1.2

(1.1) : hydroxy-6 diméthyl-2,2 tétrahydro-5,6,7,8 époxy-7,8 chromanone-4 *)

(1.2) : hydroxy-8 diméthyl-2,2 tétrahydro-5,6,7,8 époxy-6,7 chromanone-4 *)

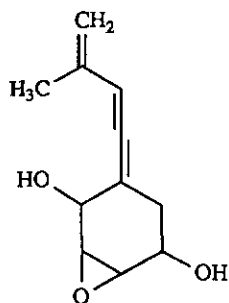


(L.1) : trihydroxy-6,7,8 diméthyl-2,2 pentahydro-3,5,6,7,8 benzopyranone-4 *)

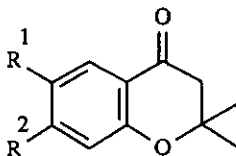


R ¹	R ²	R ³
..
-OH	-OH	-Cl
-OH	-Cl	-OH] → L.2/L.3 ¹⁾
-Cl	-OH	-OH]

(L.2/L.3): chloro dihydroxy diméthyl-2,2 pentahydro-3,5,6,7,8 benzopyranone-4 ¹⁾



(M) : époxy-3,4 (méthyl-3 butadiènylidène)-1 cyclohexanediol-2,5 ^{*}



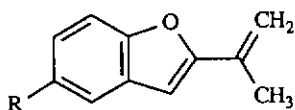
R ¹	R ²	Lettre
--	--	-----
-H	-H	N.1
-OH	-H	N.2
-OH	-OH	N.3
-Cl	-H	N.4

(N.1) : diméthyl-2,2 chromanone-4

(N.2) : hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromanone-4

(N.3) : dihydroxy-6,7 diméthyl-2,2 chromanone-4

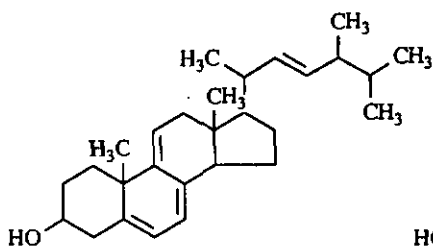
(N.4) : chloro-6 diméthyl-2,2 chromanone-4



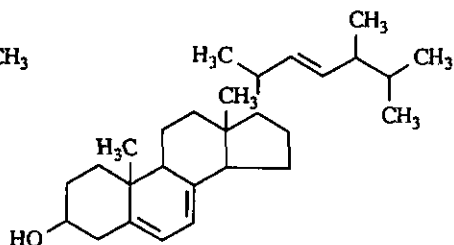
R	Lettre
-	-----
-CH ₂ OH	R
-OH	S

(R) : hydroxyméthyl-5 isopropényl-2 benzofurane **)

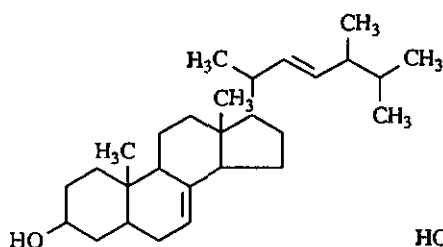
(S) : hydroxy-5 isopropényl-2 benzofurane **)



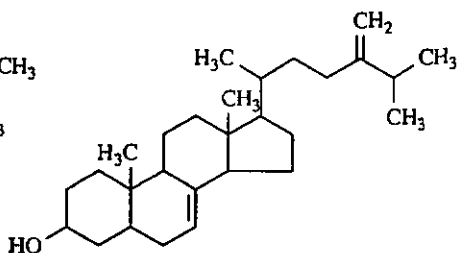
Q.1



Q.2



Q.3



Q.4

(Q.1) : ergostatétraène-5,7,9(11),22 3β-ol ²⁾

(Q.2) : ergostatériène-5,7,22 3β-ol ²⁾

(Q.3) : ergostadiène-7,22 3β-ol ²⁾

(Q.4) : ergostadiène-7,24(28) 3β-ol ²⁾

Remarques :

- Les composés sans indication n'ont jamais été signalés dans ce milieu de culture;

*) = composés déjà décrits précédemment [14][18];

**) = composés nouveaux;

!) = baptisée "Eutypine", toxine responsable de l'Eutypiose;

l) = la position des groupes -OH et -Cl reste indéterminée;

2) = composés provenant du mycélium;

Des tests d'activité biologique effectués à Toulouse sur nos fractions ont permis de mettre en évidence le produit A comme étant le plus toxique. A ce jour, l'Eutypine semble être le composé le plus actif alors que les autres produits ne montrent aucune activité toxique sur la vigne.

Un dérivé de la melléine accompagné de p-hydroxy-benzaldéhyde est présent dans le milieu lorsque la souche a vieilli et que le champignon ne produit plus les métabolites attendus. Ces composés sont reconnus comme phytotoxiques dans d'autres cas (septoriose du blé) mais n'ont montré aucune activité toxique.

L'Eutypine remplit ainsi plusieurs conditions pour agir en tant que toxine : sa structure avec ses deux extrémités polaires et polarisables, séparées par un espaisseur apolaire; c'est le composé le plus actif à tous les tests; en particulier, elle détermine des mêmes symptômes que l'Eutypiose après absorption par des feuilles saines.

Sa mise en évidence rapide a été mise au point par extractions suivies d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par recherche des fragments et du pic moléculaire.

L'utilisation d'un appareil HPLC comprenant un détecteur à barette de diodes (DAD) a également permis la détection de l'Eutypine et des autres produits principaux dans différents milieux de culture; la réalisation d'un dosage quantitatif de la toxine a pu être réalisé.

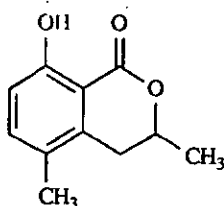
La synthèse de l'hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène a permis de confirmer la structure de ce produit.

Les synthèses de la chloro-6 diméthyl-2,2 chromanone-4 et de la chloro-7 diméthyl-2,2 chromanone-4 sont nouvelles; les 2 spectres de masse étant identiques, le choix de l'isomère où le chlore est en position 6 est déterminé principalement par l'origine biogénétique.

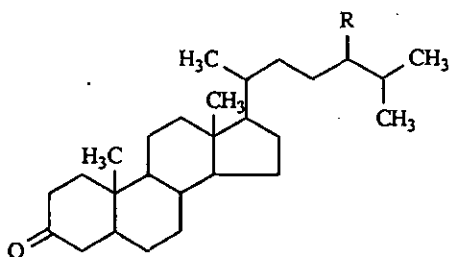
Le choix de l'isomère exact n'a pas pu être déterminé avec les produits L.2 et L.3 car seul le spectre de masse a pu être enregistré.

1.2. Matériel végétal

La recherche de l'Eutypine dans du bois malade prélevé sur le terrain a abouti à sa mise en évidence, preuve supplémentaire du caractère toxique de ce produit; dans du bois sain aucune trace n'a été décelée. Mis à part la présence d'un triglycéride (U), d'acides gras et d'hydrocarbures, 15 autres produits ont été identifiés dans le bois malade :



(V) : méthyl-5 melléine

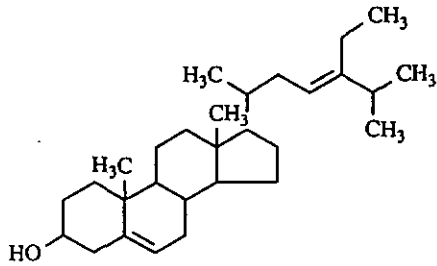


(W.1) : ergostanone-3

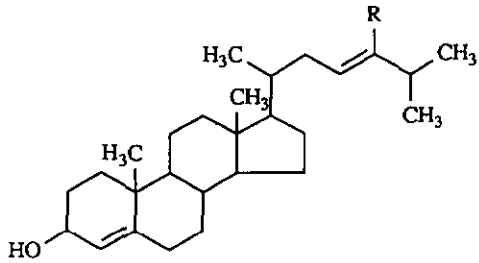
(R = -H)

(W.3) : stigmatone-3

(R = -CH₂CH₃)

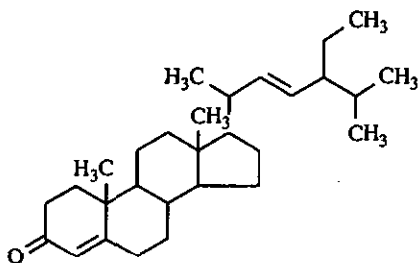


(W.2) : stigmastadiène-5,23 ol-3

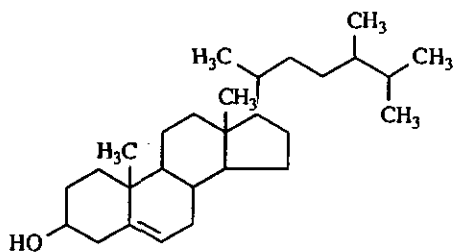


(Y.1) : stigmasterène-4 one-3 (R = -CH₂CH₃)

(Y.2) : ergostène-4 one-3 (R = -CH₃)

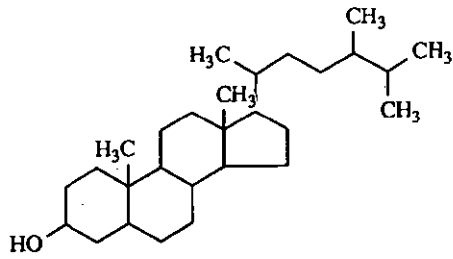


(Y.3) : stigmastadiène-4,22 one-3

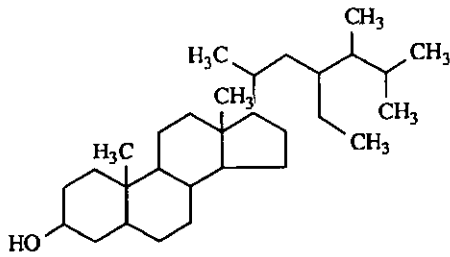


(Y.4) : stigmastène-5 ol-3 (R = -CH₂CH₃)

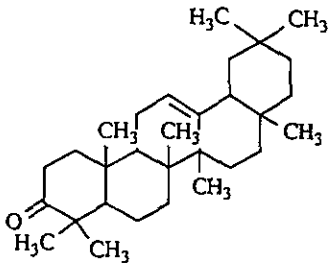
(Y.6) : ergostène-5 ol-3 (R = -CH₃)



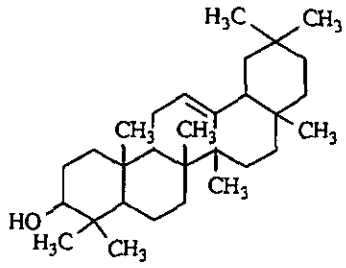
(Y.7) : epiergostanol



(Y.8) : éthyl-23 cholestanol-3



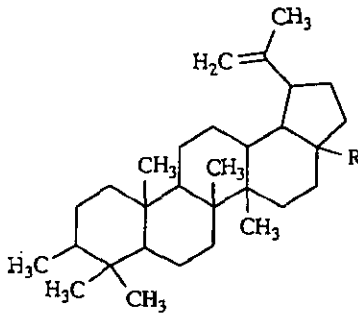
W.4



Y.5

(W.4) : oléanoate de méthyle

(Y.5) : ursolate de méthyle



(X) : lupénol

(R = -CH₃)

(Z) : betuline

(R = -CH₂OH)

La recherche de l'Eutypine dans les tiges, feuilles et inflorescences saines et malades a montré que seules les inflorescences malades en contenaient.

1.3. Voie biosynthétique

Un marquage au moyen de mévalonate [^{14}C -2] de notre milieu de culture a montré une incorporation non négligeable d'atomes radio-actifs dans le produit E, ce qui suppose que l'origine de la chaîne isopentyle provient de la voie de l'acide mévalonique. Cette affirmation vaut en principe également pour les autres dérivés méthyl-vinyl-acétyléniques dont en particulier l'Eutypine. La distribution exacte de ces atomes marqués est demeurée sans succès à ce stade.

Un autre marquage à l'aide d'acétate [^{14}C -2] a également permis de retrouver quelques produits purs radio-actifs.

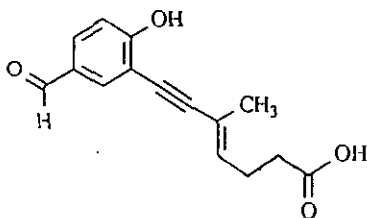
Les produits isolés sont bien des métabolites secondaires synthétisés par le champignon.

2. CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Si au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence le rôle de l'Eutypine, l'étude du mécanisme d'intoxication sur les ceps de vigne reste à élaborer. Actuellement le groupe du Professeur J. Fallot à l'ENSAT-Toulouse étudie le mode d'action de l'Eutypine aux niveaux physiologique et cytologique et essaye de sélectionner des clones tolérants à *Eutypa lata* à l'aide de méthodes biotechnologiques.

Sur le plan chimique, on ne connaît toujours pas le fongicide miracle qui pourrait enrayer la maladie, mais le problème tente d'être résolu au moyen d'une application thérapeutique.

Dans nos laboratoires, Th. ZESSIGER [25] a élaboré une molécule susceptible de générer des anti-corps au sein d'un lapin. Sa structure ressemble à l'Eutypine et comprend un espaceur neutre suivi d'une fonction carboxylique pouvant former une liaison peptidique avec la fonction amine d'une protéine se trouvant dans l'animal.



Les anti-corps ainsi formés, prélevés dans le sang de l'animal, seraient capable de reconnaître l'Eutypine. Dès lors, il est possible d'envisager des réactions anti-gènes/ anti-corps qui pourraient faire office de test sensible et spécifique pour diagnostiquer la maladie.

VI. PARTIE EXPERIMENTALE

1. PURIFICATION ET PREPARATION DE L'AMBERLITE XAD-7 [11]

200 g de résine synthétique XAD-7 sont lavés 7 fois avec de l'eau dans un bécher et décantés. Le lavage est répété 7 fois avec du méthanol puis la résine est séchée par filtration sur Büchner. Finalement, la résine est lavée avec de l'éther dans un Soxhlet pendant 2 x 12 h et ensuite séchée à l'air.

2. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

Nous avons utilisé un gel de silice 60F, plaques ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ avec une couche de 0.25 mm sur feuilles d'aluminium. Il nous a permis d'analyser toutes les fractions des produits naturels et de synthèses. Les plaques sont analysées à la lumière visible, ultra-violette (254 et 360 nm), puis révélées par vaniline-H₂SO₄ 10%, suivi d'un chauffage à 100°C pendant 5 minutes. Différents systèmes de solvants ont été utilisés, dont le principal est le dichlorométhane contenant 2-10% de méthanol.

3. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Des colonnes de longueurs et diamètres adaptés aux quantités ont été utilisées avec différents systèmes de solvants préalablement distillés et déterminés par CCM. Les colonnes ont été remplies de Silica Gel 60 MERCK - 0,040-0,063 mm - 230-400 mesh pour les mélanges supérieurs à 1 g, 0,063-0,020 mm - 70-230 mesh pour les mélanges inférieurs à 1 g environ.

4.1. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PRESSION (HPLC)

L'appareil est un PERKIN ELMER série 3B relié à un détecteur UV LC-75.

Le support est une colonne analytique (250 x 4,6 mm), semi-préparative (250 x 8 mm) ou préparative (250 x 12 mm) RP-18 - 5 ou 7 μm - KNAUER. L'éluant est un gradient MeOH-Eau à des débits compris entre 0,8 et 3 ml/min. Les solvants sont de qualité HPLC, filtrés sur millipore et dégazés par bain ultra-sonique. La détection a lieu à 254 nm.

4.2. CHROMATOGRAPHIE HPLC AVEC DETECTEUR A BARETTE DE DIODES (DAD)

L'appareil est un PERKIN ELMER série 3 muni d'une colonne analytique (250 x 4,6 mm) RP-18 - 5 μm - BISCHOFF relié à un détecteur à barette de diodes HP 1040A, un computer HP 300 et un driver HP 9153C.

5. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (GC)

L'appareil est un DANI 3900 muni d'une colonne OV-73 de 12 m. Le gaz vecteur est l'hélium et la détection a lieu dans un détecteur FID. Le programme de base pour l'analyse des échantillons et du déroulement des synthèses est : 120°C pendant 3 min, puis 3°C/min jusqu'à 200-300°C suivant les cas; la température de l'injecteur et du détecteur est 160°C.

6. ANALYSE INSTRUMENTALE

6.1. RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire sont enregistrés sur un appareil BRUCKER WP-200 à 200 MHz ($^1\text{H-RMN}$) et 50,29 MHz ($^{13}\text{C-RMN}$). Le TMS a été utilisé comme référence interne (valeur de 0 ppm).

6.2. MS

Les spectres de masse ont été enregistrés avec un appareil NERMAG R 30-10 par introduction directe à 70 eV (EI); la pression de la source était de 0,1 Torr et la température était de 180°C.

L'ammoniac (NH_3) a été utilisé comme gaz réactant pour effectuer les spectres par ionisation chimique (DCI).

Dans certains cas, le spectromètre de masse a été couplé à un chromatographe en phase gazeuse DANI 6500 (GC-MS) équipé d'une colonne OV-1 de 30 m.

6.3. IR

Les spectres infrarouges sont enregistrés en pastilles KBr sur un appareil Perkin-Elmer modèle 521.

6.4. $[\alpha]_D$

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Perkin-Elmer 241 en solution généralement dans le chloroforme à 20°C à la raie D du sodium (589 nm).

7. DERIVE SILYLE

Mode opératoire relatif au chapitre II/3.2.15 et 6.1 :

A 1 mg d'échantillon A (Eutypine) sous azote, on ajoute 0,8 ml de pyridine anhydre préalablement séchée et distillée sur KOH puis 1 goutte de triméthyl-chlorsilane purum (Fluka). On laisse réagir 18 heures à température ambiante puis on dilue dans l'éther. La partie soluble dans l'éther est analysée par GC.

8. OXYDATION DE DOUBLE LIAISON TERMINALE

Mode opératoire relatif au chapitre II/3.2.15 :

A 3,25 mg (0,0173 mmole) d'échantillon A dissous dans 1,6 ml d'éther, on ajoute 1,6 ml d'une solution étherée de tétraoxyde d'osmium 1% puriss (Fluka). On laisse réagir à température ambiante sous agitation pendant 4 heures, puis on lave deux fois la phase étherée avec 2 ml d'eau, sèche sur $MgSO_4$ et on élimine le solvant.

9.1. SPECTRES UV/VIS

Les spectres UV/VIS ont été enregistrés avec l'appareillage décrit précédemment sous 4.2. Ci-dessous sont donnés les spectres obtenus relatifs au chapitre II/8.4. Le chiffre indiqué après le signe UV est le temps de rétention correspondant aux conditions données à la page 77.

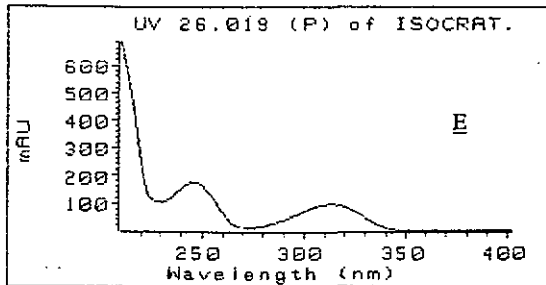
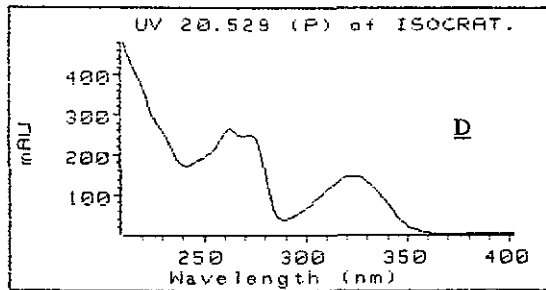
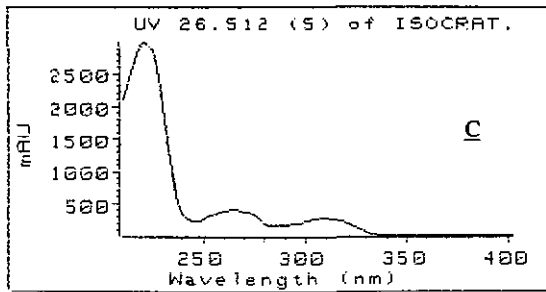
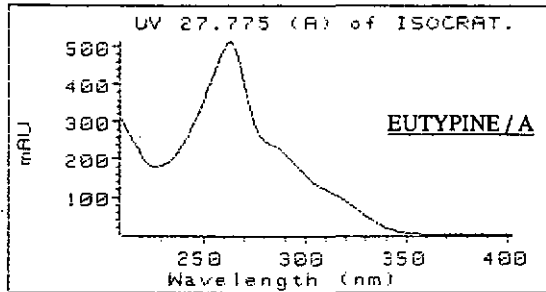
9.2. DOSAGE QUANTITATIF A L'AIDE DU DAD

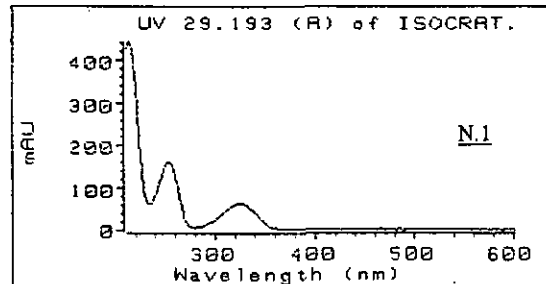
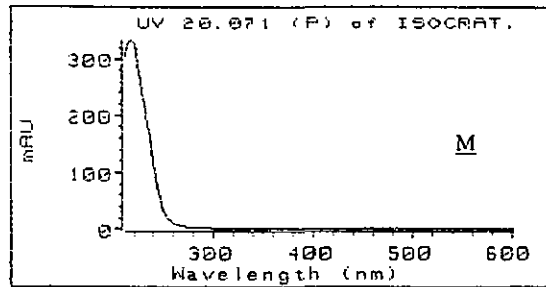
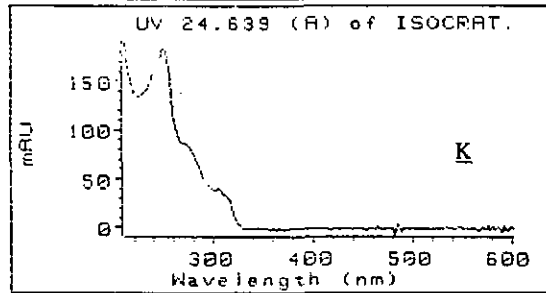
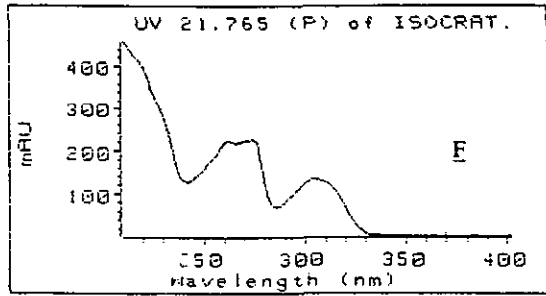
La solution d'étalon interne (p-hydroxy-benzaldéhyde - FLUKA) est préparée par pesée de 0,26822 g dissous dans 50 ml de méthanol distillé.

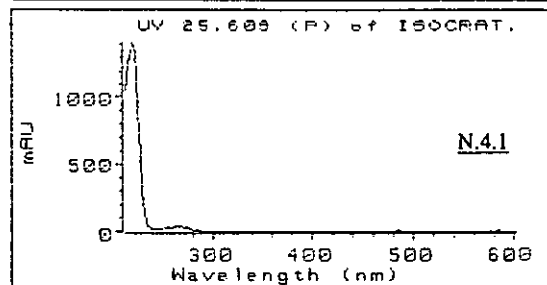
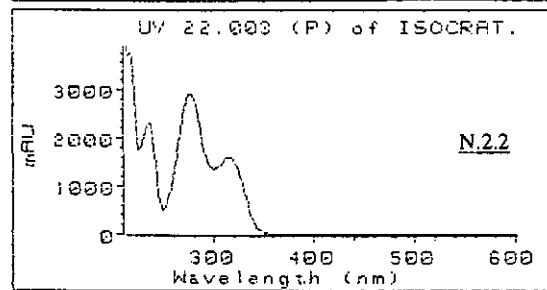
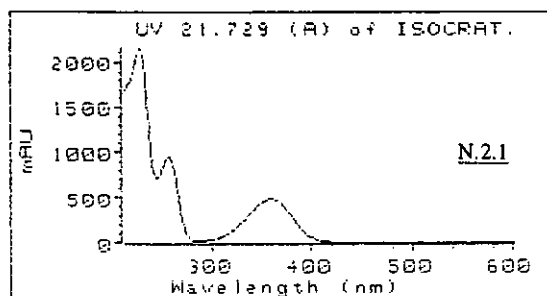
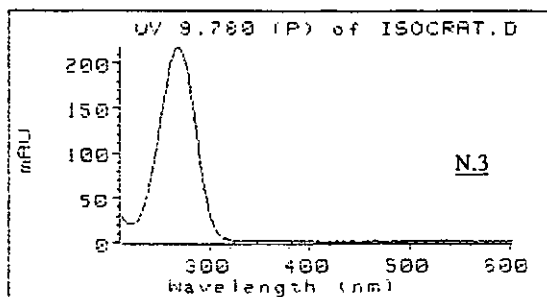
La courbe d'étalonnage est établie par pesée exacte d'une quantité d'environ 2 mg d'Eutypine synthétique dans 1 et 5 ml de MeOH.

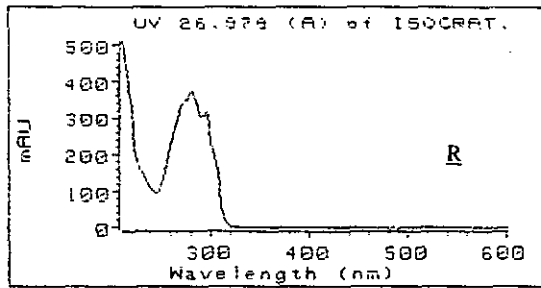
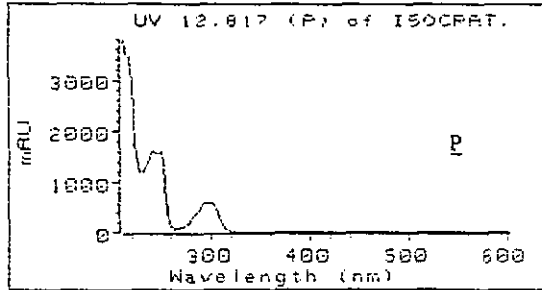
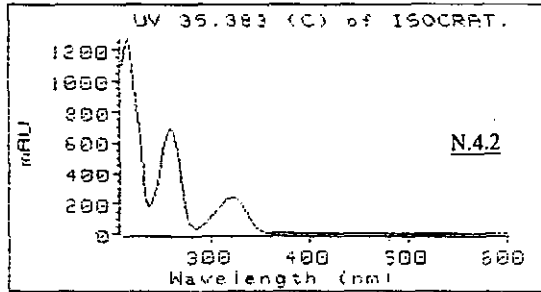
Le programme d'éluion est : 40-60% en 10 min - 60-90% en 30 min MeOH/Eau à 0,8 ml/min; RP-18 (250 x 4.6 mm).

Spectres UV/VIS de quelques produits isolés dans le milieu de culture d'*Eurypha lata* et de produits de synthèse :









10. SYNTHESES

Les synthèses décrites sous 10.1.3., 10.4. et 10.5. aboutissent à des produits nouveaux; les spectres sont donnés uniquement pour ceux-ci. Pour les autres synthèses, seuls les tableaux de valeurs sont donnés.

10.1. Synthèse de l'hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène. (C)

Mode opératoire relatif à II/9.2. :

10.1.1. Synthèse du diméthyl-2,2-dihydro-3,4 2H benzopyrane-1 carboxylate-6 de méthyle.

[29]

Une solution d'isoprène (10 ml, 0.1 mole) dans l'éther de pétrole (40 ml) est ajoutée à un mélange de hydroxy-4 benzoate de méthyle (10 g, 0.07 mole), d'acide orthophosphorique (85%, 20 ml) et d'éther de pétrole (40 ml) sous agitation constante à 30-35° pendant 8 h. Après ce temps, le chauffage est coupé et l'agitation continue 12 h. Le mélange réactionnel est neutralisé avec NaHCO₃ 5% et extrait à l'éther (4 x 200 ml). La solution est lavée avec de l'eau puis séchée sur Na₂SO₄. Après élimination de l'éther, l'huile résiduelle est chromatographiée sur gel de silice en éluant avec un mélange ligroïne-dichlorométhane 1:1. 11,5 g de prismes incolores dont le point de fusion vaut 84° sont obtenus.

¹H-RMN (CDCl₃): 1.36 (6H, s, C(CH₃)₂), 1.83 (2H, t, H-3), 2.83 (2H, t, H-4), 3.88 (3H, s, COOCH₃), 6.82 (1H, d, J = 9 Hz, H-8), 7.77 (2H, m, H-5 et H-7).

MS (m/z, I%): 220 (M⁺ 58), 205(24), 189(20), 165(100), 161(25).

10.1.2. Synthèse du diméthyl-2,2 2H benzopyrane-1 carboxylate-6 de méthyle. [29]

Méthode 1)

5 g (0.022 mole) du chromane obtenu précédemment dans 700 ml de CCl_4 fraîchement distillé et séché sur P_2O_5 sont portés à reflux pendant 4 h avec 4 g de NBS recristallisé et 25 mg de peroxyde de benzoyle. La réaction se déroule à la lumière (lampe de 60 W). La solution refroidie est filtrée et le filtrat distillé. L'huile obtenue est purifiée sur gel de silice en éluant avec de la ligroïne.

Méthode 2)

5 g (0.022 mole) du chromane obtenu précédemment dans 300 ml de benzène sec sont portés à reflux pendant 100 h dans 5 g de DDQ. La solution est filtrée et le filtrat est distillé. La purification a lieu comme dans la méthode 1.

Dans les 2 cas, nous obtenons une huile claire avec 75 et 25% de rendement respectivement.

MS (m/z, 1%): 218 ($\text{M}^+ 10$), 203(100), 187(4), 159(2).

10.1.3. Synthèse de l'hydroxyméthyl-6 diméthyl-2,2 chromène.

0,9 g (4 mmole) du chromène précédemment synthétisé dans 30 ml d'éther sec sont introduits sur 0,9 g de LiAlH_4 dans 45 ml d'éther sec en 35 minutes. Le mélange est ensuite porté à reflux 45 minutes et après refroidissement on hydrolyse avec 60 ml de H_2SO_4 20%. La solution est extraite avec 3 x 30 ml d'éther, séchée sur Na_2SO_4 et concentrée à sec. 0,41 g du produit final sont obtenus sous forme de cristaux jaune pâle avec un rendement de 45%.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 1.43 (6H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.75 (1H, large, -OH), 4.57 (2H, s, CH_2), 5.62 et 6.32 (2H, d, $\text{CH}=\text{CH}$), 6.75 (1H, dd, ArH), 7.04 (1H, d, ArH), 7.11 (1H, m, ArH).

MS (m/z, 1%): 190 ($\text{M}^+ 8$), 175(100), 158(11), 145(10), 128(9), 115(12), 91(8), 77(13).

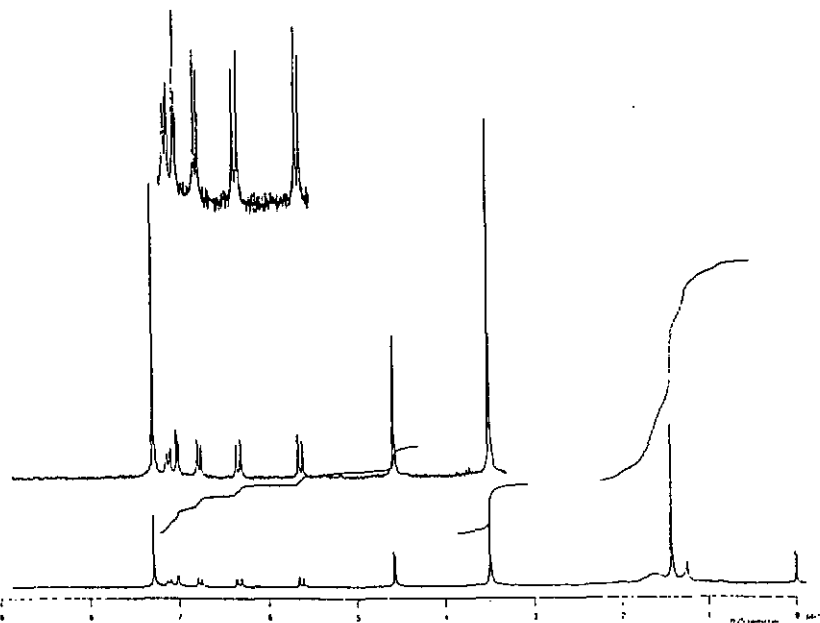


Fig 66 :
Spectre ^1H -RMN de C synthétique.

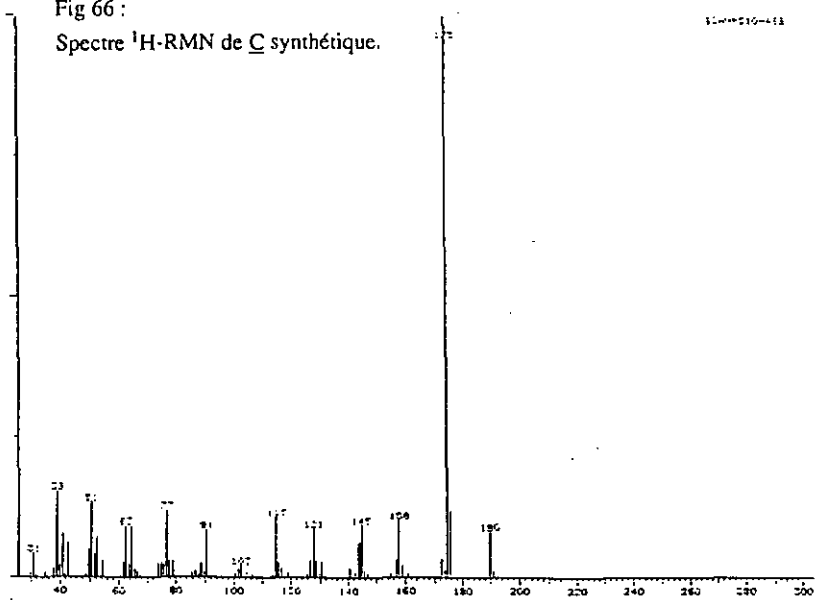


Fig 67 :
Spectre MS de C synthétique

10.2. Synthèse du diméthyl-2,2 chroménol-6. (N.5)

Mode opératoire relatif à II/9.3. :

10.2.1. Synthèse du méthoxy-6 diméthyl-2,2 dihydro-3,4 2H benzopyrane.

Cette étape a lieu comme sous 10.1.1. en utilisant l'hydroxy-4 anisole au lieu de l'hydroxy-4 benzoate de méthyle.

MS (m/z, 1%): 192(M⁺ 100), 177(17), 163(7), 149(5), 137(72), 136(55), 108(20), 91(11), 77(21).

10.2.2. Synthèse du méthoxy-6 diméthyl-2,2 2H benzopyrane.

1 g (5 mmole) du chromane obtenu sous 10.2.1. dans 10 ml de CH₂Cl₂ est refroidi à 0°C puis on additionne 1 ml de BBr₃ sous N₂ en 30 min. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation 15 minutes puis on hydrolyse avec HCl 0,1 N. On extrait ensuite avec NaOH 1 N dans l'éther, la phase aqueuse est régénérée avec HCl 5 N jusqu'à pH = 4, puis le chroménol-6 est extrait dans l'éther. Après séchage sur MgSO₄ et élimination du solvant, le produit est purifié sur gel de silice en éluant avec le dichlorométhane.

MS (m/z, 1%): 178(M⁺ 52), 163(14), 149(9), 135(7), 123(100), 122(28), 107(11), 94(14).

10.2.3. Synthèse de l'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromène.

La dernière étape est effectuée comme sous 10.1.2. - méthode 2.

¹H-RMN (CDCl₃): 1.40 (6H, s, 2xCH₃), 1.83 (1H, large, OH), 5.62 et 6.26 (2H, d, J = 10 Hz, CH=CH), 6.49 (1H, d, ArH), 6.63 (2H, m, ArH).

MS (m/z, 1%): 176(M⁺ 17), 161(100), 144(2), 131(5), 115(7), 105(6), 91(7), 77(18).

10.3. Synthèse de 1'hydroxy-6 diméthyl-2,2 chromanone-4. (N.2.1)

Mode opératoire relatif à 11/9.5. :

A une solution de 5,07 g (30 mmol) de dihydroxy-2,5 acétophénone et 14,22 g (90 mmol) d'acétone dans 60 ml de toluène, on ajoute 3,06 g de pyrrolidine. Le mélange est agité à température ambiante une nuit et ensuite chauffé à reflux 6 heures avec élimination azéotropique de l'eau. Lorsque la réaction est complète, le mélange réactionnel refroidi est lavé avec HCl 6 N froid, neutralisé avec de l'eau et séché sur Na_2SO_4 . La solution est extraite avec Na_2CO_3 2 N, la phase aqueuse acidifiée à $\text{pH} = 2$ avec HCl 5 N et extraite à nouveau à l'éther. Après séchage sur MgSO_4 et élimination du solvant, nous obtenons 2.05 g de cristaux sous forme de paillettes.

^1H -RMN (CDCl_3): 1.44 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 2.71 (2H, s, CH_2), 6.84 (1H, d, ArH), 7.07 (1H, dd, ArH), 7.34 (1H, d, ArH).

MS (m/z , I%): 192(M^+ 56), 177(100), 137(60), 136(52), 108(10).

10.4. Synthèse de la chloro-6 diméthyl-2,2 chromanone-4. (N.4.1)

Mode opératoire relatif à II/9.9. :

10.4.1. Synthèse de l'acétate de chloro-4 phényle.

26 g (0.2 mol) de p-chloro-phénol dans 140 ml de ligroïne sont refroidis à 0°C; on ajoute ensuite 46 g de AlCl_3 anhydre puis 28 g (0.36 mol) de chlorure d'acétyle goutte à goutte. Une fois l'addition terminée, on continue l'agitation 1 heure puis on chauffe à 40°C à l'aide d'un bain-marie pendant 2 heures. Après refroidissement, la ligroïne est éliminée puis on ajoute lentement 300 ml de HCl 2 N. Le mélange réactionnel est extrait à l'éther, la phase étherée lavée à l'eau puis séchée sur CaCl_2 . Après élimination de l'éther, le produit est distillé (Eb = 156-7°/14 mmHg). Nous obtenons 24.25 g d'acétate de chloro-4 phényle, soit un rendement de 71%.

MS (m/z, I%): 172 (5), 170(M^+ 15), 130(32), 128(100), 99(7), 43(23).

10.4.2. Synthèse de la chloro-5 hydroxy-2 acétophénone.

A 7.6 g (0.45 mol) d'acétate de chloro-4 phényle on ajoute par petites portions 6 g de AlCl_3 anhydre en poudre sous agitation vigoureuse puis on chauffe à 155°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, le résidu est décomposé avec HCl 2 N et glace puis on extrait à l'éther. La phase étherée est lavée avec HCl 5 N, H_2O , KOH 10%, H_2O , puis séchée sur MgSO_4 . L'éther est éliminé, puis le produit est purifié sur colonne de silice en éluant dans un mélange hexane-dichlorométhane de polarité croissante. Nous obtenons 4.5 g du produit dont F = 47°C, soit un rendement de 58%.

^1H -RMN (CDCl_3): 2.63 (3H, s, CH_3), 6.94 (1H, d, ArH), 7.42 (1H, dd, ArH), 7.70 (1H, d, ArH), 12.15 (1H, s, ArOH).

MS (m/z, I%): 172(17), 170(M^+ 46), 157(31), 155(100), 127(17), 99(9), 63(11), 43(22).

10.4.3. Synthèse de la chloro-6 diméthyl-2,2 chromanone-4

3.06 g de pyrrolidine sont ajoutés à une solution comprenant 2.55 g (0.015 mol) de chloro-5 hydroxy-2 acétophénone, 2,6 g (0.045 mol) d'acétone et 50 ml de toluène. Le mélange est agité à température ambiante une nuit puis chauffé à reflux pendant 6 heures avec élimination azéotropique de l'eau formée. Après refoidissement, le mélange réactionnel est lavé avec HCl 6 N froid, H₂O, NaOH 2 N et H₂O successivement et ensuite séché sur Na₂SO₄. L'élimination du solvant conduit à une huile qui est purifiée sur colonne de silice en éluant avec le dichlorométhane.

¹H-RMN (CDCl₃): 1.47 (6H, s, 2xCH₃), 2.73 (2H, s, CH₂), 6.90 (1H, d, ArH), 7.43 (1H, dd, ArH), 7.83 (1H, d, ArH).

MS (m/z, I%): 212(17), 210(M⁺ 53), 197(35), 195(100), 168(12), 155(33), 154(24), 126(22), 77(15), 63(31).

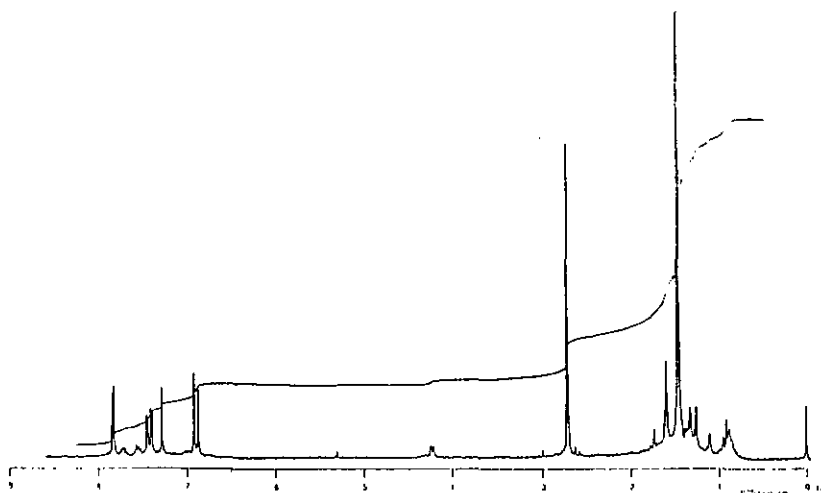


Fig. 68 : spectre ¹H-RMN de N.4.1 synthétique.

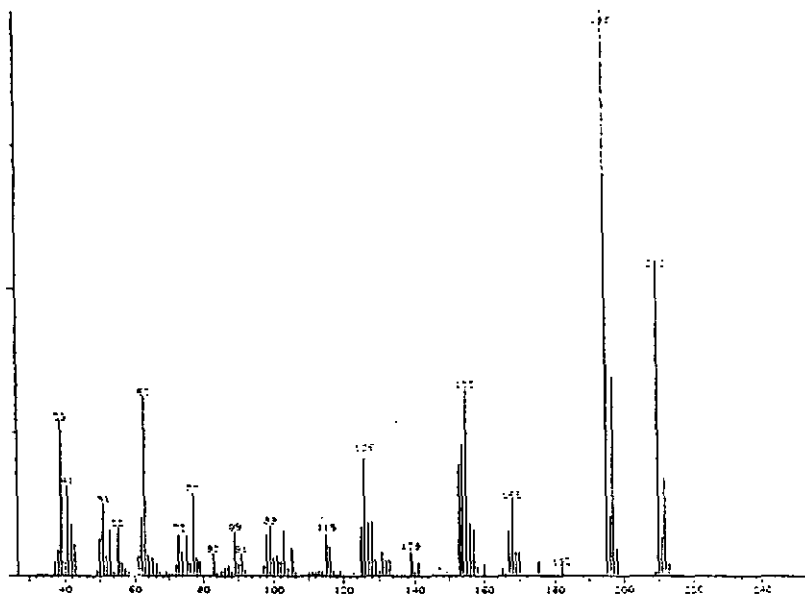


Fig. 69 : spectre MS de N,4,1 synthétique.

10.5. Synthèse de la chloro-7 diméthyl-2,2 chromanone-4. (N,4,2)

Mode opératoire relatif à II/9.9. :

Cette synthèse s'effectue de la même manière que celle décrite précédemment en remplaçant le p-chloro-phénol par le m-chloro-phénol. La dernière étape donne un rendement de 42%.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3): 1.46 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 2.72 (2H, s, CH_2), 6.94 (1H, d, ArH), 6.96 (1H, d, ArH), 7.80 (1H, dd, ArH).

MS (m/z , 1%): 212(20), 210(M^+ 52), 197(28), 195(100), 155(41), 154(23), 126(23), 63(25).

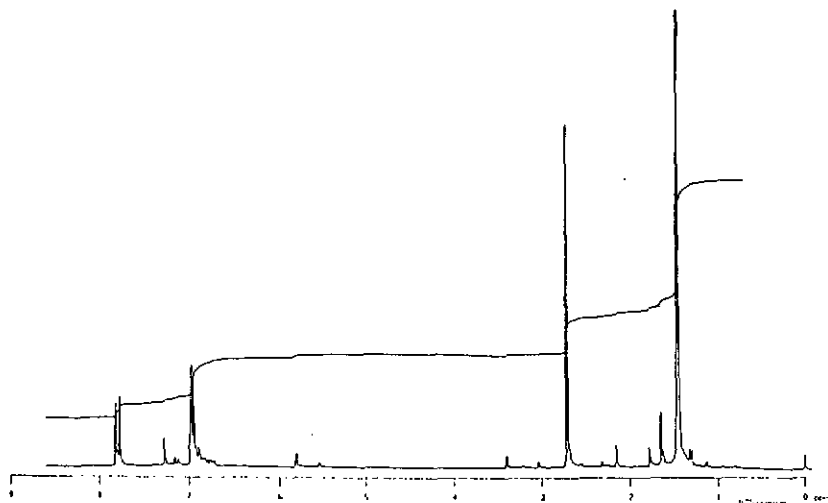


Fig. 70 : spectre ¹H-RMN de N.4.2 synthétique.

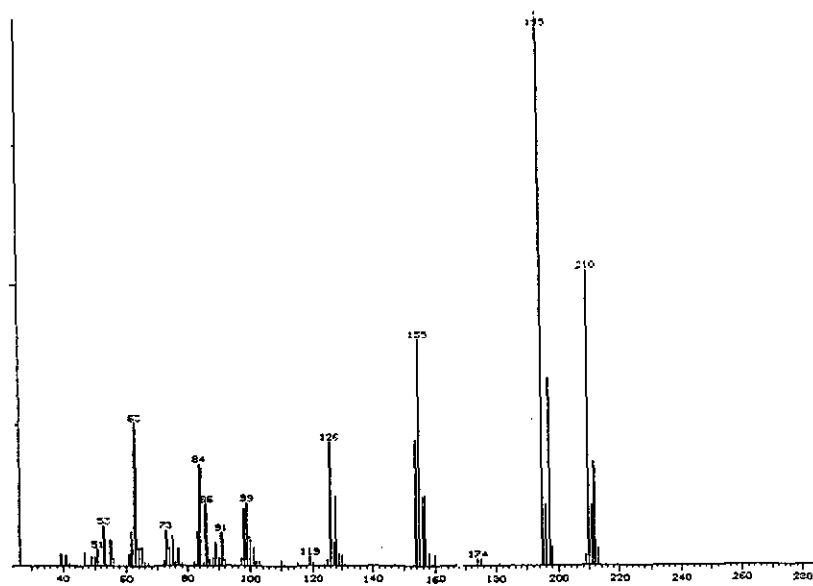


Fig. 71 : spectre MS de N.4.2 synthétique.

11. DETECTION RADIOACTIVITE

Le compteur à scintillation pour le comptage des coups (CPM) est un Kontron PSI γ 80. Les solutions contiennent environ 2 mg de produits purs dissouts dans 300 μ l de toluène de scintillation BECKMAN; ce liquide de scintillation contient 4 g/l de PPO pour Scintillation (diphényl-2,5 oxazole puriss FLUKA - λ_{max} = 303 nm) et 0,1 g/l de POPOP pour Scintillation (bis-(phényloxazolyl-2,5)-1,4 benzène BECKMANN - λ_{max} = 418 nm).

L'appareil couplé au chromatographe HPLC est un FLO-ONE[®] Beta Serie A-200 (Packart Instruments).

VII. BIBLIOGRAPHIE

- [1] Y. Mathieu, Relations entre *Eutypa* et la vigne cultivée in vitro, ENSAT, 1985, 7-13
- [2] R. Tabacchi, Trav. chim. aliment. hyg., 1989, 80, 1-9
- [3] A. Bolay et W.J. Moller, Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic., 1977, 9, 241-251
- [4] Progrès Agricole et Viticole, 1987, 104, 393-395
- [5] B. Dubos et al., Cycle biologique d'*Eutypa lata*, ENSAT-Toulouse, 1983
- [6] J. Fallot, Amélioration de la Vigne cultivée in vitro, 1985, 1-12
- [7] J. Huberty, Bull. Soc. Nat. luxemb., 1986, 86, 75-83
- [8] M.S.R. Nair and M. Anchel, Phytochemistry, 1977, 16, 390-392
- [9] J.M. Gardner, Phytochemistry, 1985, 24, 2861-2867
- [10] M. Devys et col., Phytochemistry, 1980, 19, 2221-2222
- [11] W.B. Turner, Fungal Metabolites I, 1971, Academic Press Inc, London
- [12] B. Andersson and K. Andersson, J. Chromatogr., 1982, 242, 353-359
- [13] N.S. Narasimhan and B.H. Bhide, Tetrahedron, 1971, 27, 6171-6176
- [14] J.M. Renaud, Travail de Doctorat, Université de Neuchatel, 1985
- [15] P. Tey-Rulh. Travail de Doctorat, ENSAT-Toulouse, 1988
- [16] G. Mellerio, J. Chromatogr., 1983, 261, 311-314
- [17] P. Joseph-Nathan, Phytochemistry, 1987, 26, 809-811

- [18] T.J. Mabry, K.R. Markham and M.B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, 1970, Springer-Verlag, New-York
- [19] G. Tsoupras and R. Tabacchi, *Hel. Chim. Acta*, 1989, 72, 1262-1267
- [20] M.C. Mauro, *Travail de Doctorat*, INP-Toulouse, 1986
- [21] P. Coutouly, *Approche cytologique des effets de métabolites toxiques sécrétés par Eutypa lata sur feuilles de Vitis vinifera*, DEA, INP-Toulouse, 1989
- [22] Z.A. Wojciechowski, L.J. Goud et T.W. Goodwin, *Phytochemistry*, 1973, 12, 1433-1436
- [23] F.W. McLafferty and D.B. Stauffer, *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, 1988, 5, J. Wiley & Sons
- [24] R.S. Burden, D.T. Cooke and G.A. Carter, *Phytochemistry*, 1989, 28, 1791-1804
- [25] Th. Zessiger, *Travail de doctorat*, Uni. Neuchâtel, 1990
- [26] A.J. Owen, *The Diode-Array Advantage in UV/VIS Spectroscopy*, 1988, Hewlett-Packard GmbH, FRG
- [27] V.K. Ahluwalia, R.S. Jolly and A.K. Tehim, *Tetrahedron*, 1982, 38, 3673-3677
- [28] V.K. Ahluwalia and K.K. Arora, *Tetrahedron*, 1981, 37, 1437-1439
- [29] V.K. Ahluwalia, K.K. Arora and R.S. Jolly, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1982, 335-338
- [30] Y. Kawase, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984, 57, 442-445
- [31] A. Banerji and N.C. Goomer, *Indian J. Chem.*, 1984, 23B, 885-886
- [32] *Comprehensive Heterocycl. Chem.*, 1984, 3, 848-849
- [33] N. Vinot et P. Maitte, *J. Heterocyclic Chem.*, 1989, 26, 1013-1021
- [34] W. Baker, J.F. McOmic, J.H. Wild, *J. Chem. Soc.*, 1956, 2010-2017

- [35] A. Sato, *J. of Natural Products*, 1989, 52, 975-981
- [36] W. Theilheimer, *Synthetic Method of Organic Chemistry*, 1961, 15, 459
- [37] F. Camps, J. Coll, A. Messegue, *Synthesis, Communications*, 1980, 725-727
- [38] E. Klarmann, V.A. Shternov and L.W. Gates, *J. Am. Chem. Soc.*, 1933, 55, 2583-2587
- [39] A.B. Sen and P.M. Bhargava, *Jour. Indian Chem. Soc.*, 1949, 26, 366-370
- [40] J. Fallot, *ENSAT-Toulouse*, 1988
- [41] R. Peset, *Station fédérale de recherches agronomiques de Changins*, 1986
- [42] H. Budzikiewicz, C. Djerassi and D.H. Williams, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Volume II*, 1964, Holden-Day, Inc, San Francisco
- [43] J.K. Kendall and Th.H. Fisher, *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 4218-4220
- [44] M.A. De Alvarenga et al., *Phytochemistry*, 1978, 17, 511-516
- [45] N.S. Narasimhan, R.S. Mali, *Synthesis*, 1983, 957-986
- [46] P. Nichols et al., *Phytochemistry*, 1988, 27, 3541-3544
- [47] H. Budzikiewicz and C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 84, 1430-1439
- [48] H. Budzikiewicz, J.M. Wilson and C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, 3688-3699
- [49] G. Nicollier et R. Tabacchi, *Helv. Chim. Acta*, 1979, 62, 807-810
- [50] L. Ogunkoya, *Phytochemistry*, 1981, 20, 121-126
- [51] S.G. Wyllie and C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, 1968, 33, 305-313
- [52] J.A. Palermo et al., *Phytochemistry*, 1984, 23, 2688-2689

- [53] T. Furuka et al., *Phytochemistry*, 1987, 26, 715-9
- [54] A. Ikuta and H. Itokawa, *Phytochemistry*, 1986, 25, 1625-1628
- [55] S.K. Sarbar et al., *J. Indian. Chem. Soc.*, 1979, 56, 112-114
- [56] F. Bohlmann et al., *Phytochemistry*, 1977, 16, 965-985
- [57] J.W. Cole et al., *Phytochemistry*, 1988, 27, 2175-2176
- [58] F. Sauter et al., *Phytochemistry*, 1989, 28, 2229-2242
- [59] E. Maslowsky, *J. Chem. Educ.*, 1985, 62, 774-776
- [60] J.H. Otto and A. Towle, *Biologie moderne*, 1971, Holt, Rinehart et Winston, Liée, Montréal - Toronto
- [61] G. Tsoupras, *Publication en préparation*
- [62] L. Huang and C. Grunwald, *Phytochemistry*, 1989, 28, 465-468
- [63] Th. F. Woolf, *LC-GC International*, 1989, 2, 28-32
- [64] **RADIOMATIC**, Application Note, An Introduction to Flow Radiochromatography, Tampa - U.S.A.
- [65] K.B.G. Torsell, *Natural Product Chemistry*, 1983, John Wiley & Sons Limited, Norwich
- [66] R. Siebertz, P. Proksch and L. Witte, *Phytochemistry*, 1990, 29, 2135-2138
- [67] W.B. Turner and D.C. Aldridge, *Fungal Metabolites II*, 1983, Academic Press, London
- [68] H.G. Floss, *Radiotracers techniques and applications in Biosynthetic Studies*, 1977, 1, 689-732
- [69] A. Ellison et al., *Synthesis*, 1974, 10, 719