

1219

UNIVERSITE DE NEUCHATEL  
FACULTE DES SCIENCES

**ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE METABOLITES  
SECONDAIRES DE *CERATOCYSTIS FIMBRIATA* var. *COFFEA*,  
CHAMPIGNON PARASITE DU CAFEIER**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences  
par

GERARD GREMAUD

Chimiste diplômé de l'Université de Neuchâtel  
pour l'obtention du grade de  
Docteur ès Sciences

Institut de Chimie, Université de Neuchâtel, mars 1994

UNIVERSITE DE NEUCHATEL  
FACULTE DES SCIENCES

**ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE METABOLITES  
SECONDAIRES DE *CERATOCYSTIS FIMBRIATA* var. *COFFEA*,  
CHAMPIGNON PARASITE DU CAFEIER**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences  
par

**GERARD GREMAUD**

Chimiste diplômé de l'Université de Neuchâtel  
pour l'obtention du grade de  
Docteur ès Sciences

Institut de Chimie, Université de Neuchâtel, mars 1994

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

.....  
Isolement et identification de métabolites.....  
secondaires de *Ceratocystis fimbriata* var.....  
*coffea*, champignon parasite du caféier.....  
.....  
.....

de Monsieur Gérard Gremaud.....  
.....

---

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, R. Neier.....  
et G.F. Collet (Lausanne).....  
.....

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 7 juin 1994.....

Le doyen: -



H.-H. Nägeli

## **Remerciements**

Le travail qui est présenté ici a été préparé de septembre 1990 à septembre 1993 dans les laboratoires de l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel, au sein du département de chimie organique analytique du Prof. R. Tabacchi.

Je tiens à remercier le Prof. R. Tabacchi pour m'avoir accueilli dans son département et pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ce travail.

Je remercie l'Etat de Neuchâtel pour m'avoir octroyé un poste d'assistant et le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (FNRS) pour son soutien financier.

Mes remerciements s'adressent également au Dr S. Claude (institut de chimie, Université de Neuchâtel), au Dr D. Moskau (Spektrospin AG) pour l'exécution de nombreux spectres RMN, au Dr Daniel Job (institut de microbiologie, Université de Neuchâtel) pour l'identification de la souche et ses nombreux conseils, au Dr J. Léguizamon (laboratoires Cénicafé, Chinchina, Colombie) pour l'isolation de la souche, au Prof. Patrick Guérin (institut de zoologie, Université de Neuchâtel) pour ses conseils, et au Dr Cécile Pasquier (institut de chimie, Université de Neuchâtel) pour ses recherches sur CAS-on line.

Je veux témoigner également toute ma reconnaissance à Messieurs les Professeurs R. Neier et G.F. Collet pour leurs remarques constructives et leur participation au jury d'évaluation de ce travail.

Finalement, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce travail, ainsi que les années qui ont servi  
à sa réalisation  
à ma femme,

Catherine

## Table des matières

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>1 Relation entre <i>Ceratocystis fimbriata</i> var. <i>coffea</i> et la maladie du chancre du caféier</b>	1
1.1 La maladie du chancre du caféier	1
1.2 Description du champignon	4
1.3 Toxicité du milieu de culture	7
<b>2 Généralités</b>	7
2.1 Les métabolismes primaires et secondaires	7
2.2 Le métabolisme secondaire des champignons	8
2.3 Les mycotoxines	9
2.4 Les maladies fongiques des plantes	11
2.5 Tests d'activité biologique	12
<b>3 L'espèce <i>Ceratocystis fimbriata</i></b>	12
3.1 Origines du nom <i>Ceratocystis fimbriata</i>	12
3.2 Répartition géographique	13
3.3 Spécificité des souches pour leur hôte	13
3.4 Chimie du genre <i>Ceratocystis</i> et de l'espèce <i>C. fimbriata</i> (recherche bibliographique)	13
3.5.1 Chimie de l'espèce <i>C. fimbriata</i>	14
3.5.2 Chimie du genre <i>Ceratocystis</i>	15
3.6 Variabilité de la composition chimique avec la souche	16
<b>4 But du travail</b>	17
<b>5 Résultats</b>	17

<b>RECHERCHE ENTREPRISE</b>	<b>20</b>
<b>6 Matériel de départ</b>	<b>20</b>
6.1 Origines de la souche	20
6.2 Culture du champignon sur milieu gélosé	20
6.3 Culture du champignon en milieu liquide	21
6.4 Traitements préliminaires du milieu de culture	23
<b>7 Test de toxicité</b>	<b>24</b>
7.1 Déroulement du test	24
7.2 Evaluation de la toxicité	24
<b>8 Essais préliminaires</b>	<b>25</b>
8.1 Localisation de l'activité	25
8.2 GC-MS de la fraction étherée volatile	25
8.3 GC-MS de la fraction étherée non volatile	27
8.4 GC-MS des extraits du mycélium	28
<b>9 Etude de la fraction étherée non volatile</b>	<b>32</b>
9.1 Protocole de séparation de la fraction étherée non volatile	32
9.2 Purification et identification des composés isolés	33
9.2.1 Identification de la cytogénine (1)	34
9.2.2 Identification de la dihydroxy-6,8 (hydroxy-2 propyl)-3 isocoumarine (2)	41
9.2.3 Identification de la dihydroxy-6,8 hydroxyméthyl-3 isocoumarine (3)	49
9.2.4 Identification de l'hydroxy-8 méthoxy-6 méthyl-3 isocoumarine (4)	53
9.2.5.1 Identification de la dihydroxy-6,8 méthyl-3 isocoumarine (5)	58
9.2.5.2 Comparaison de 5 avec le produit de synthèse	62

9.2.6	Résumé des données spectroscopiques RMN des composés 1 à 5	63
9.2.7	Identification de l'acide indole-3 acétique (6)	64
9.2.8	Identification du méthyl-3 indolinone-2 (7)	67
9.2.9	Identification de la gliotoxine (8)	71
9.2.10	Identification de la dihydro-3,4-trihydroxy-3,4,8-1(2H) naphthalénone (9)	74
9.2.11	Identification de la vermélone (10)	81
9.2.12	Identification de la scytalone (11)	86
9.2.13.1	Identification de la <i>cis</i> -hydroxy-4 scytalone (12)	92
9.2.13.2	Synthèse d'un dérivé de 12	103
9.2.13.3	Deutération de 12	105
9.2.14	Identification du tyrosol (13)	107
<b>10</b>	<b>Etude de l'extrait brut par MS-MS</b>	<b>110</b>
<b>11</b>	<b>Etude de la toxicité des composés isolés</b>	<b>115</b>
11.1	Résultats du test	115
11.2	Discussion des résultats	116
11.3	Origine biogénétique des composés isolés	118
11.3.1	Isocoumarines	118
11.3.2	Tétralones	119
11.3.3	Composés indoliques	121
11.3.4	Gliotoxine	122
11.3.5	Composés du type tyrosol	122
11.3.6	Composés du type monoterpènes	123
	<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>124</b>

<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>126</b>
<b>12 Techniques chromatographiques</b>	<b>126</b>
12.1 CCM	126
12.2 Révélateurs CCM	126
12.3 HPLC	127
12.4 LPLC	128
12.5 GC	128
<b>13 Méthodes spectroscopiques</b>	<b>128</b>
13.1 $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ -RMN	128
13.2 IR	129
13.3 MS et MS-MS	129
13.4 GC-MS	129
13.5 Rotation spécifique $[\alpha]_D$	130
13.6 UV	131
<b>14 Technique de culture du champignon</b>	<b>131</b>
<b>15 Traitements préliminaires</b>	<b>132</b>
<b>16 Test de toxicité</b>	<b>132</b>
<b>17 Synthèse de 5</b>	<b>133</b>
<b>18 Synthèse d'un dérivé méthylé de 12</b>	<b>135</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>136</b>

## abréviations utilisées

PDA	Potato Dextrose Agar (gélose de dextrose de pommes de terre)
ZMA	Milieu de culture synthétique pour la culture du champignon
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
LPLC	Chromatographie liquide à basse performance
CCM	Chromatographie sur couche mince
GC	Chromatographie en phase gazeuse
MS	Spectrométrie de masse
DCI (NH <sub>3</sub> )	Ionisation chimique directe (gaz réactant)
EI	Ionisation par impact électronique
Rf	Facteur de rétention (CCM)
Rt	Temps de rétention (GC)
UV	Spectroscopie ultraviolette
IR	Spectroscopie infrarouge
<sup>1</sup> H-RMN	Spectroscopie de résonance magnétique du proton
<sup>13</sup> C-RMN	Spectroscopie de résonance magnétique du carbone
s	Singulet
d	Doublet
t	Triplet
q	Quadruplet
quint.	Quintuplet
sext.	Sextuplet
sept.	Septuplet
m	Multiplet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
COSY	Spectre de corrélation $\delta^1\text{H} - \delta^1\text{H}$
HETCOR	Spectre de corrélation $\delta^1\text{H} - \delta^{13}\text{C}$
NOE	Effet nucléaire Overhauser
EtOH	Ethanol
MeOH	Méthanol
AcOH	Acide acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
PM	poids moléculaire
RDA	Rétro-Diels Alder

## INTRODUCTION

### 1 Relation entre *Ceratocystis fimbriata*<sup>1</sup> et la maladie du chancre du caféier

Déjà signalée à Java en 1900 par Zimmermann [1], et très répandue au Brésil et au Venezuela, la maladie du chancre du caféier d'Arabie (souvent nommée "Llaga Macana" par les cultivateurs) est reliée au champignon *Ceratocystis fimbriata*. Cette relation a été démontrée de manière certaine par Pontis [2]. L'auteur s'est servi d'une quarantaine d'arbres âgés de trois ans et les a inoculés avec une suspension d'ascospores et de conidies du champignon. 20 jours plus tard 100 % des arbres inoculés étaient infectés. Des ré-isolations faites à partir des bords des lésions ont redonné un *Ceratocystis* identique à celui utilisé pour l'inoculation.

#### 1.1 La maladie du chancre du caféier [3]

Le premier symptôme visible de la maladie, est l'aspect fané du feuillage et la coloration vert jaunâtre ou jaune des limbes (Fig. 1a et 1b). Les branches principales et le tronc d'un arbre atteint peuvent paraître extérieurement normaux mais l'écorçage révèle des lésions chancreuses brunes ou noires, de taille variable et de forme irrégulière (Fig. 2). La maladie progresse lentement, un peu plus vite vers les racines que vers le sommet du caféier. Le parasite pénètre peu dans le bois et il ne le colore que rarement sur plus de 20 mm de profondeur. La nécrose des jeunes tissus s'étend progressivement et ceinture finalement le tronc ou les branches. Habituellement le ceinturage complet est précédé par le départ d'une nouvelle tige feuillée à quelques centimètres en dessous du chancre. Les jeunes caféiers d'Arabie sont plus rarement atteints que les arbres de 8 à 10 ans ou plus. Les arbres malades continuent à porter quelques fruits mais leur production décroît vite et devient sans intérêt économique.

#### *Mode de pénétration*

Les lésions chancreuses se développent le plus communément à l'emplacement des plaies de tailles et des blessures accidentelles. Pontis [2] a reproduit expérimentalement le chancre en insérant du mycélium et des périthèces dans des blessures verticales de la tige. Les premiers symptômes apparaissent entre le septième et le neuvième jour.

---

<sup>1</sup> Abrégé par la suite *C. fimbriata*

Une forte humidité et une situation ombragée favorisent également l'infection. Contrairement à ce qui est observé dans d'autres cas (pourriture noire de la patate douce, maladie de l'hévéa) les insectes semblent ne jouer aucun rôle dans la propagation du champignon [4].



Fig. 1a caféier atteint de "Uaga Macana"



Fig. 1b caféier sain

(les spécimens présentés proviennent de Chinchina, Colombie)

#### *Possibilités de lutte*

Pour l'heure, les principales mesures prises touchent aux pratiques de culture [5]. Il est recommandé de réduire l'ombragement dans les zones critiques et de construire des digues permettant d'éviter que les eaux de ruissellement d'une parcelle infectée traversent une parcelle saine. Les hautes herbes et les buissons qui pourraient maintenir de l'humidité sont également à éviter. Les plantes malades doivent être brûlées et les instruments de taille désinfectés. Il est à noter qu'un arbre dont seul une branche est atteinte peut être sauvé pourvu que l'on coupe cette branche suffisamment loin de l'infection.

### *Choix de souches de caféier résistantes*

Certaines souches de caféier sont moins susceptibles que d'autres au champignon, et certaines sont tout-à-fait résistantes. Castillo et Quinceno [6] ont comparé des plants de café susceptibles et résistants des espèces *Borbon* et *Tipica*. D'une manière générale, la variété *Tipica* est plus sensible que la variété *Borbon*. Il existe des plants de la variété *Borbon* qui résistent parfaitement au champignon. Cette différence de résistance n'a pas encore pu être expliquée. Cependant il est prévisible que cela pourrait à l'avenir faire l'objet d'un sujet de recherche. Les plantes sensibles montrent une mortalité de 100% deux ans après l'inoculation alors que les souches les plus résistantes ont une mortalité nulle sur la même période. Le croisement des plantes susceptibles avec des résistantes produit un hybride dont la résistance est moyenne (50-60% de mortalité sur deux ans). Il serait vraisemblable que cette résistance soit du type générale. Ce type de résistance implique la compatibilité plante - pathogène. Le pathogène est alors plus ou moins freiné dans son développement par les défenses de la plante.



Fig. 2 coupe d'un tronc de caféier atteint de "Llaga Macana" (le spécimen présenté provient de Chinchina, Colombie)

### Mode de transmission

La dissémination des spores à courte distance peut se faire par le vent et les cours d'eau. Par contre, le fait que l'on retrouve *C. fimbriata* actuellement sur à peu près toutes les régions cultivées de la planète provient certainement d'un transport effectué par l'homme. Par exemple lors de l'envoi de marchandises dans des caisses en bois contaminées ou lors d'échanges de semences. Le champignon peut aussi être transporté sur les outils des ouvriers pratiquant la taille, si ces outils ne sont pas suffisamment désinfectés. Le formol commercial à 40% dilué dans un rapport de 5-10 parts de formol pour 100 parts d'eau est cité par Castano [7] comme un moyen très efficace pour éliminer le champignon.

### 1.2 Description du champignon [2]

*C. fimbriata* var. *coffea* est un *ascomycète*, c'est-à-dire un organisme qui produit des spores sexuelles appelées ascospores à l'intérieur de sortes de sacs appelés asques. Il appartient à la classe des *pyrénomycètes*, ce qui implique que les asques sont enfermés dans des corps de fructification (périthèces). Les périthèces foncés et munis de parois épaissies en font un représentant de l'ordre des *Sphaeriales*. Enfin dans le genre *Ceratocystis*, les périthèces sont caractérisés par une base élargie et un col fin contenant des asques évanescents qui renferment environ huit ascospores hyalines, monocellulaires, et qui sont exsudées de l'ostiole dans une matrice collante. Les périthèces sont produits seuls ou en groupes et sont superficiels ou ont leur base immergée dans le substrat. Ils ne sont pas formés sur ou dans un stroma (tissu conjonctif). Dans l'espèce *C. fimbriata*, les périthèces ont la base est brune à noire sont parfois aplatis et ont un diamètre de 130-200  $\mu$ . Ils sont non ornés et des hyphes non-différenciés sont attachés sur la surface. Les cols sont noirs, hyalins au bout, étroits, ils mesurent jusqu'à 800  $\mu$  de long et 20-30  $\mu$  de diamètres à la base contre 10-20  $\mu$  au sommet. L'extrémité du col est fimbriée. Les ascospores hyalines sont produites en grand nombre, elles ont une forme de chapeau et mesurent 4.7  $\mu$  – 7.0  $\mu$  x 3.2  $\mu$  – 4.8  $\mu$ . A la maturité, ces spores sont extrudées en longues spirales gélatineuses hors de la cavité périthéciale. Il existe deux types de conidies (spores asexuées), des conidies hyalines, cylindriques et tronquées aux deux bouts qui mesurent de 9.5  $\mu$  – 49.2  $\mu$  de long, et des conidies brunes, à parois épaissies (chlamydo-spores) et en forme de tonneau 10.5  $\mu$  x 18.8  $\mu$  à 7.7  $\mu$  x 10.3  $\mu$ .

Toutes les figures proviennent de la souche utilisée dans le cadre du présent travail. La Fig. 3 montre les deux types de conidies, les hyalines et celles à parois épaissies. La Fig. 4 montre un périthèce et son long col fimbrié à l'extrémité. Ce col fimbrié caractéristique est encore mieux visible sur la Fig. 5. La Fig. 6 permet de voir des conidies et des hyphes, les hyphes sont des formations typiques des champignons, ils consistent en cellules appondues les unes aux autres pour former des longs tubes.

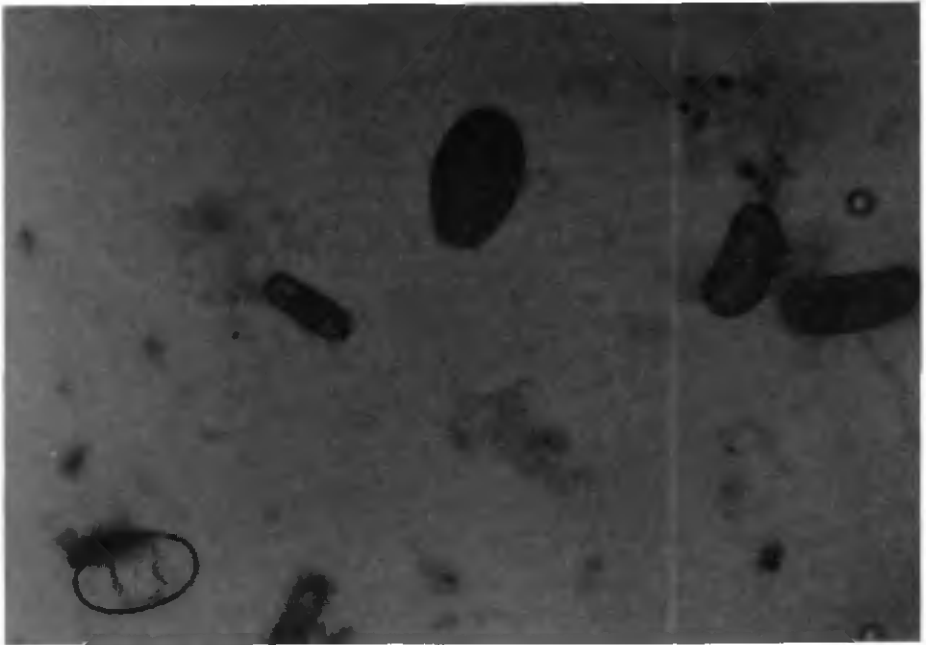


Fig. 3 Conidies 1000 X



Fig. 4 Périthèce 100 X



Fig. 5 Col fimbrié 250 X



Fig. 6 Hyphes et conidies 1000 X

### 1.3 Toxicité du milieu de culture

La relation entre le champignon *C. fimbriata* et la maladie du chancre du café étant établie, il se pose dès lors une question: Une ou plusieurs toxines fongiques jouent-elles un rôle dans cette maladie?

Dans un essai préliminaire, nous avons inoculé un milieu de culture synthétique avec une suspension de spores, de mycélium et de conidies. Après incubation pendant 21 jours à température ambiante et sous agitation, le mycélium est écarté par filtration et le filtrat est extrait en continu à l'éther pendant 48 h. L'extrait éthéré brut est évaporé puis redissout à raison de 1 mg/ml dans de l'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'acétone pour faciliter la dissolution. Un témoin est constitué d'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'acétone. De petites feuilles de café (variété *arabica*) fraîchement coupées sont plongées dans les solutions à tester. Après 3 jours (72 h.) le témoin est resté vert et les feuilles plongées dans la solution présentent une nécrose très visible sur la base du pétiole. Sur la base de ce résultat, nous avons retenu l'hypothèse que *Ceratocystis fimbriata* var. *coffea* produit des toxines qui peuvent jouer un rôle dans la maladie observée sur les caféiers infectés par ce champignon.

## 2 Généralités

### 2.1 Les métabolismes primaires et secondaires

Tous les systèmes vivants possèdent un réseau de réactions chimiques interdépendantes que l'on désigne globalement par le terme *métabolisme primaire*. Cet ensemble de réactions permet de répondre à deux exigences vitales:

1. extraire de l'énergie de l'environnement

2. synthétiser les *blocs de base des macromolécules* constituant les cellules

Toutes les réactions intervenant dans le métabolisme primaire sont catalysées par des enzymes et sont globalement les mêmes quel que soit l'organisme vivant considéré. Le métabolisme primaire n'est donc pas spécifique, et les métabolites issus du métabolisme primaire ne le sont pas non plus. Les champignons sont capables de tirer parti des protéines, des graisses et surtout des sucres comme matière première pour leur métabolisme primaire. C'est pourquoi, ils ne sont pas autotrophes mais hétérotrophes, c'est à dire qu'ils sont incapables de réaliser la photosynthèse et dépendent donc des formes de vie autotrophes pour leur survie.

Bien que l'on ne connaisse pas de définition définitive du métabolisme secondaire et que la frontière avec le métabolisme primaire reste souvent

floue, on peut dire que le métabolisme secondaire est plus caractéristique du groupe biologique concerné (famille, genre). Cette spécificité est d'ailleurs un moyen de classifier les organismes suivant leur composition chimique (chimiotaxonomie). La fonction des métabolites secondaires est encore mal connue, mais elle consisterait principalement à assurer les interactions chimiques qu'un organisme peut avoir avec son environnement [48].

## 2.2 Le métabolisme secondaire des champignons

Les métabolites secondaires de champignons ne possèdent aucune unité structurale et on y trouve des composés très différents tels que les coumarines, les terpénoïdes, les flavonoïdes, les polycétides et les peptides. Les conditions de culture, l'histoire et l'environnement de la souche influencent aussi la production de métabolites secondaires. Le schéma 1 montre les grands embranchements du métabolisme secondaire [47,48]. Ces grands embranchements sont les mêmes que l'on parle des champignons ou, par exemple, des plantes.

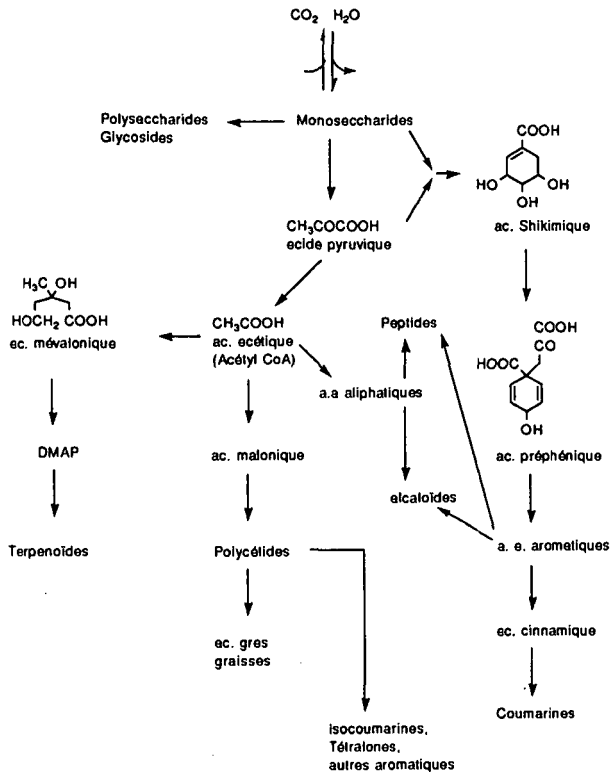


Schéma 1 Principaux embranchements du métabolisme secondaire

Plusieurs milliers de métabolites secondaires de champignons ont été décrits pendant les 40 dernières années. Le groupe de métabolites secondaires d'origine fongique le plus connu est celui des antibiotiques, dont la pénicilline et la céphalosporine C, desquels l'industrie a tiré des milliers de dérivés. Viennent ensuite les mycotoxines citées au point 2.3. Dans tous les cas le lien avec le métabolisme primaire existe, même si il est parfois difficile à mettre en évidence si on considère le produit fini (par exemple un antibiotique de structure complexe) et que l'on perd de vue le schéma biosynthétique complet.

### 2.3 Les mycotoxines [49,50]

Les mycotoxines sont des substances toxiques produites par les champignons et qui ont un effet néfaste sur les plantes. En tant que groupe, les mycotoxines n'ont aucune caractéristique structurale commune. Elles appartiennent à des classes aussi diverses que les peptides, les terpénoïdes, les glycosides, les composés phénoliques.

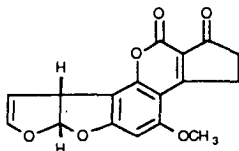
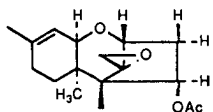
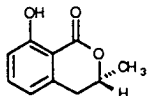
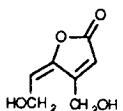
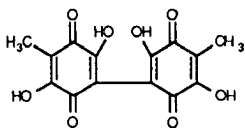
Nom	Classe	Produit par	Structure
Aflatoxine B1	aflatoxine	<i>Aspergillus flavus</i>	
Trichodermine	trichothécènes	<i>Trichoderma lignorum</i>	
Melléine	ochratoxines	<i>Aspergillus melleus</i>	
Ascladiol	lactones toxiques	<i>Aspergillus clavatus</i>	
Oosporéine	toxine de pénicilliums	<i>Penicillium rubrum</i>	

Fig. 7 Exemples de toxines fongiques

Des combinaisons entre ces classes ou encore des structures différentes des quelques-unes précitées sont décrites. Les champignons produisent des mycotoxines dans les plantes infectées aussi bien que dans les milieux de culture et il n'est pas rare de trouver plusieurs mycotoxines dans le même milieu de culture d'un pathogène.

Plusieurs genres de champignons sont des producteurs notoires de mycotoxines, il s'agit de *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Rhynchosporium*, *Fusicoccum*, *Ceratocystis*, et *Stemphylium*. La Fig. 7 présente quelques exemples de ces toxines fongiques [51].

Certains auteurs [49] font la distinction entre deux familles de produits ayant un effet néfaste sur les plantes. La première est la famille des mycotoxines qui sont des composés qui attaquent les cellules hôtes. Cette attaque peut se réaliser en affectant la perméabilité des membranes cellulaires ou en inhibant des enzymes, ce qui bloque les fonctions enzymatiques correspondantes. Les toxines peuvent aussi agir comme antimétabolites en induisant une déficience d'un facteur de croissance essentiel.

La deuxième famille comprend tous les régulateurs de la croissance des plantes, mais dont la synthèse peut se faire également par voie fongique. Appartiennent à cette famille des produits comme l'acide indole-3-acétique, l'acide abscissique et les polysaccharides.

#### *Acide indole-3-acétique (AIA)*

Ce produit est connu sous le nom d'auxine, c'est un composé naturellement produits par les plantes. L'AIA provoque l'élongation et la différenciation des cellules et affecte la perméabilité des membranes. Ce produit cause une augmentation générale de la respiration des plantes et favorise la synthèse d'ARN messenger et partant, de protéines. Un excès d'AIA peut provenir soit de l'inhibition de l'enzyme qui provoque la "condensation" (inactivation réversible) de l'AIA, soit d'une production d'AIA par le champignon lui-même. Un niveau trop haut d'AIA peut engendrer l'inhibition de la lignification des tissus, une respiration excessive ou, comme l'AIA affecte aussi la perméabilité cellulaire, une transpiration plus intense.

#### *L'acide abscissique*

Ce produit est synthétisé par les plantes et par certains champignons pathogènes. Son action est inhibitrice de la croissance et des fonctions hormonales, il stimule la fermeture des stomates.

#### *Les polysaccharides*

Les champignons produisent continuellement des quantités variables de substances mucilagineuses qui recouvrent leur structure et créent une interface entre la surface externe du microorganisme et son environnement.

Le rôle des polysaccharides est important pour les maladies causées par des pathogènes qui envahissent le système vasculaire des plantes. Cela, conjugué avec l'accumulation de produits dégradés dans la plante hôte par les enzymes du pathogène peut conduire à un blocage mécanique de la circulation des fluides dans les vaisseaux et, par conséquent, participer au dépérissement.

## 2.4 Les maladies fongiques des plantes [47]

Les dégâts aux plantes cultivées dus aux maladies se chiffrent chaque année en milliards de francs. Ces maladies peuvent aujourd'hui encore être la cause de famines. Même avec une protection appropriée, c'est 10-20% des récoltes potentielles qui sont perdues par les maladies des plantes. Si aucune contre-mesure n'était prise, cette perte serait rapidement augmentée. Plusieurs agents peuvent être responsables de ces maladies; principalement des bactéries, des virus et des champignons. Parmi ces agents, les champignons constituent le groupe le plus important et sont responsable de la grande majorité des maladies des plantes. Ainsi en Europe, sur les 162 principales maladies des plantes, 135 (83%) sont dues à des champignons. Les champignons parasites peuvent se classer en trois types selon le genre d'association qu'ils forment avec leur hôte.

### *Les parasites obligatoires*

Ils sont totalement dépendants des tissus vivants. Leur culture est impossible sur les milieux de culture usuels utilisés en laboratoire. Ils ne poussent qu'exceptionnellement sur des milieux très spécifiques comme par exemple une culture de cellules de la plante hôte. Dans beaucoup de cas, ces champignons n'endommagent que très peu leur hôte. Les partenaires de cette association ont trouvé un équilibre qui leur permet de vivre. En effet, si la plante meurt, le champignon disparaît aussi. Malgré cela, on trouve dans cette catégorie les parasites parmi les plus nuisibles à l'économie rurale. Tels que *Puccinia graminis* (rouille du blé, Basidiomycètes), et *Peronospora tabacina* (moississure bleue du tabac, Oomycètes).

### *Les parasites facultatifs*

Ils envahissent également les tissus vivants, mais n'en sont pas dépendants et peuvent aussi vivre après la mort de leur hôte. Il est possible de les cultiver en laboratoire sur des milieux synthétiques. Un grand nombre d'ascomycètes appartiennent à ce groupe. On peut citer comme exemple le parasite du pommier *Venturia inaequalis* (Dothideales, Ascomycètes) et *C. fimbriata* (Sphaeriales, Ascomycètes).

### *Les champignons nécrotrophes*

Ces champignons ne peuvent pas s'introduire dans un organisme vivant. Ils occupent les cellules ou les tissus morts où ils prospèrent grâce à l'extension de la partie morte de la plante. Il se produit parfois une diffusion des toxines du champignon à travers le réseau vasculaire de la plante hôte. Ainsi des symptômes peuvent apparaître très loin du foyer de l'infection. L'acide fusarique, produit par les champignons de la classe des *fusariums*, agit selon ce mode.

## 2.5 Tests d'activité biologique

L'activité biologique d'une mycotoxine peut être mesurée de plusieurs manières différentes. Cela dépend de sa nature chimique et de l'effet que cette toxine a sur la plante. Le développement d'un test adéquat est donc un point clé dans l'isolation d'une toxine à partir du milieu de culture d'un pathogène. En règle générale, il est préférable d'avoir un test aussi quantitatif que possible. Dans notre cas, nous avons opté pour un test du type nécrose de feuilles. Ce genre de test permet une estimation semi-quantitative de l'activité [50], ce qui est fort utile pour guider l'isolement des toxines. Il a l'avantage d'être simple, rapide et d'utiliser directement la plante hôte comme organisme test. Une approche plus quantitative, mais aussi beaucoup plus sophistiquée techniquement parlant est l'électrophysiologie appliquée aux plantes. Le principe consiste à mesurer le potentiel des membranes cellulaires à l'aide de microélectrodes. Ce potentiel peut être influencé par une micro-injection dans la cellule végétale de composés organiques dissous ou de ions en solution [52].

## 3 L'espèce *Ceratocystis fimbriata*

### 3.1 Origines du nom *Ceratocystis fimbriata*

Il est fait mention pour la première fois du nom *Ceratocystis* (Cerato = corne, cyst = poche) *fimbriata* vers 1890 par Elliot et Halsted [8] comme étant un champignon pathogène responsable de la maladie de la "pourriture noire" de la patate douce (*Ipomea batatas* (L.)). Par la suite, les premières descriptions ayant interprété à tort les périthèces (stade sexué) de *C. fimbriata* comme étant des pycnidies (stade asexué), le genre *Ceratocystis* et les espèces s'y rattachant furent une source de difficultés taxonomiques et changèrent plusieurs fois de nom.

En 1892 Saccardo [9], sur la base du stade pycnidial supposé élimina le genre *Ceratocystis* et transféra le champignon dans le genre *Sphaeronaema* en le nommant *S. fimbriatum* (Ell. and Halst.) Sacc. En 1923 [10] et 1925 [11] Elliot établit que les "pycnidies" de *S. fimbriatum* étaient en fait un stade sexuel et transféra les espèces dans le genre *Ceratostomella*. Plus tard, elles furent encore transférées en 1934 dans le genre *Ophiostoma* par Nannfeldt et Melin

[12] puis dans *Endoconidiophora* par Davidson en 1935 [13]. Finalement, en 1950 Bakshi [14] réactualisa le nom *Ceratocystis* comme nom de genre. Parallèlement, en 1900 Zimmermann [1] décrivait *Rostrella coffeae* comme un parasite responsable du chancre du caféier. Ce fut Pontis [2] en 1951 qui constata la similitude morphologique entre *Rostrella coffea* et *Ceratocystis fimbriata* et les rassembla dans la même espèce. Cela fut maintenu par Hunt [15] qui publia en 1956 une taxonomie du genre *Ceratocystis* et désigna comme synonymes *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst (Hunt) = *Sphaeronaema fimbriatum* (Ell. & Halst) Sacc. = *Ceratostomella fimbriatum* (Ell. & Halst) Elliot = *Ophiostoma fimbriatum* (Ell. & Halst) Nannf. = *Endoconidiophora fimbriata* (Ell. & Halst) Davidson = *Rostrella coffeae* Zimmerm. = *Ophiostoma coffeae* (Zimmerm.) Arx. Le nom complet de notre champignon est donc *Ceratocystis fimbriata* (Ell. & Halst.) Hunt var. *coffea*. Pour des raisons pratiques, nous le désignerons dans ce travail par son nom abrégé *C. fimbriata*.

### 3.2 Répartition géographique

*C. fimbriata* a été isolé dans des régions géographiques très variées et sur des hôtes très divers, incluant le caféier [1, 2], l'hévéa [16], le cacao [17], la patate [18], le crotalaire [19, 20], le chêne [21], différents fruits à noyau [22], et naturellement aussi la patate douce [8, 23]. Les régions où l'on trouve ce champignon sont réparties absolument partout sur le globe, même dans des zones très isolées comme Hawaï.

### 3.3 Spécificité des souches pour leur hôte

Les souches isolées des diverses plantes hôtes sont la plupart du temps différentes au point de vue de l'aspect des colonies et également en morphologie ou en dimensions [24]. Le caractère pathogène des différentes souches n'est pas non plus le même. Par exemple, une souche isolée de l'hévéa au Mexique est très semblable morphologiquement à celle trouvée sur la patate douce aux Etats-Unis, mais n'est pas pathogène pour la patate douce. Inversement, la souche de la patate douce n'est pas pathogène pour l'hévéa [25]. Cela indique que l'espèce *C. fimbriata* est définie par des critères assez larges et qu'il existe une diversité génétique, parmi les différentes souches. Il y a donc différents pathovars. Il a été démontré [26] que l'origine de cette sélectivité provenait, dans le cas des souches du taro et de la patate douce, de la faculté de la plante hôte à produire des phytoalexines. Ces dernières sont des composés de défense produits par la plante et qui inhibent la croissance du champignon.

### 3.4 Chimie du genre *Ceratocystis* et de l'espèce *C. fimbriata*

Le but de ce chapitre est d'établir une liste de tous les produits connus dans la littérature comme étant des métabolites de l'espèce *C. fimbriata* ou du genre *Ceratocystis*.

### 3.5.1 Chimie de l'espèce *C. fimbriata*

Les produits décrits ici proviennent des références collectées lors de la réalisation du présent travail. La recherche par ordinateur (CAS-on line) en utilisant une commande qui liait les articles contenant le nom *Ceratocystis* avec ceux contenant le nom *fimbriata* nous a permis de constater que notre liste était complète.

#### Terpénoïdes [27,28]

trans-ocimène  
cis-ocimène  
 $\alpha$ -pinène  
 $\beta$ -pinène  
linalool  
néral  
géraniol  
 $\alpha$ -terpineol  
citronellol  
géraniol  
acétate de citronellyle  
acétate de géranyle  
2,2,6,triméthyl-6-vinyl tetrahydropyrane  
acide abscissique [33]

#### Hydrocarbures [83]

éthylène

#### Alcools, esters et cétones [28-30]

éthanol  
isobutanol  
acétate d'éthyle  
acétate d'isobutyle  
acétate d'isoamyle  
6-méthyl-5-heptène-2-ol  
6-méthyl-5-heptène-2-one

#### Polycétides [31,32]

6,8-dihydroxy-3-méthyl-isocoumarine  
8-hydroxy-6-méthoxy-3-méthyl-isocoumarine

Dérivés du phényléthanol [32]

phényléthanol  
*p*-hydroxyphényléthanol  
ac. phényllactique  
ac. *p*-hydroxyphényllactique

Acide indole-3-acétique [32]

Protéines , acides nucléiques (structure non-identifiée) [34,35]

molécule de type DNA  
fimbriatan, protéine PM =15000

3.5.2 Chimie du genre *Ceratocystis*

Les produits cités dans ce paragraphe sont ceux synthétisés par d'autres espèces de *Ceratocystis* que *C. fimbriata*. Seuls les produits qui n'ont pas déjà été mentionnés au point 3.1 sont cités ici.

Terpénoïdes [36-39]

nérol (*C. virescens*, *C. moniliformis*)  
acétate de néryle (*C. virescens*)  
nérolidol (*C. coerulescens*)  
dihydronérolidol (*C. coerulescens*)  
tetrahydronérolidol (*C. coerulescens*)  
2,3-dihydro-6-trans-farnésol (*C. coerulescens*)  
acétate de 2,3-dihydro-6-trans-farnésyle (*C. coerulescens*)  
6-protoilludène (*C. picea*)  
cerapicol (*C. picea*)  
ceratopicanol (*C. picea*)  
isopulégol (*C. coerulescens*) [84]  
limonène (*C. moniliformis*) [86]

Stéroïdes [85]

ergostérol (*C. fagacearum*)

Composés du type méthylheptényl [36]

acétate de 6-méthyl-5-hepten-2-yle  
(*C. virescens*)

Composés aromatiques [40-42]

acide phénylacétique (*C. coerulescens*) [46]  
alcool benzylique (*C. moniliformis*) [86]  
benzaldéhyde (*C. moniliformis*) [86]  
acide 2,4-dihydroxy-6-(1-hydroxy acétyl) benzoïque (*C. Ulmi*)  
acide 2,3-dihydroxybenzoïque (*C. huntii*)  
6,8-dihydroxy-3-hydroxyméthyl isocoumarine (*C. minor*)  
3,4-dihydro-6,8-dihydroxy-3-méthyl-isocoumarine (*C. minor*)  
3,4-dihydro-3-méthyl-3,6,8-trihydroxy-isocoumarine (*C. minor*)  
3,4-dihydro-3-méthyl-3,4,6,8-tétrahydroxy-isocoumarine (*C. minor*)  
3,6,8-trihydroxy- $\alpha$ -tétralone (*C. minor*)  
cératénolone (*C. minor*)

alcools, cétones, esters, aldéhydes [86]

alcool tetrahydrofurfurylique (*C. moniliformis*)  
alcool furfurylique (*C. moniliformis*)  
diéthyl cétone (*C. moniliformis*)  
acétate de propyle (*C. moniliformis*)  
formate d'amyle (*C. moniliformis*)  
2- méthyl propanal (*C. moniliformis*)

Acides gras [87]

acide octadécanoïque (*C. fagacearum*)

Enzymes [43]

trois enzymes hydrolytiques (structure inconnue) (*C. paradoxa*)

3.6 Variabilité de la composition chimique avec la souche

Comme il a été dit plus haut, l'espèce *C. fimbriata* a été définie par des critères assez larges permettant une diversité génétique des différentes souches. Dans le cas des souches du taro et de la patate douce [26], on observe que les phytoalexines secrétées par la patate douce infectée inhibent le développement de la souche provenant du taro. Dans une série d'articles, Sprecher & Hanssen [44-46] ont étudié la production de métabolites volatiles d'après la souche. Il s'avère que non seulement la composition en métabolites volatiles, mais aussi la quantité des métabolites produits diffèrent énormément à l'intérieur d'une même espèce. Par exemple *C. fimbriata* 835 c produit du linalool, de l' $\alpha$ -terpéneol, du citronellol et du géraniol en culture axénique alors que *C. fimbriata* 856 et *C. fimbriata* Pe-4a ne produisent pas du tout ces composés dans les mêmes conditions.

#### 4 But du travail

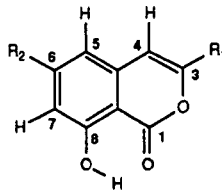
Dans ce travail, nous avons visé principalement à isoler et identifier les métabolites secondaires les plus abondants produits par le champignon *C. fimbriata* var. *coffea* dans son milieu de culture. Ensuite, par un test d'activité biologique, nous avons cherché à mettre en évidence si un ou plusieurs de ces métabolites pouvait être mis en relation avec la maladie dite du chancre du caféier ou "llaga Macana".

La chimie de l'espèce *C. fimbriata* étant peu connue et celle de la variété *coffea* pratiquement pas investiguée, nous avons également estimé intéressant d'identifier un maximum de ses métabolites non volatils et volatils, dans un but chimiotaxonomique.

#### 5 Résultats

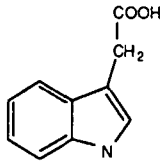
Une quarantaine de métabolites de *C. fimbriata* var. *coffea* ont été identifiés au cours de ce travail. Parmi ceux-ci six ont manifesté une activité phytotoxique sur le caféier. Les composés isolés peuvent se répartir en six catégories:

##### 1. Isocoumarines

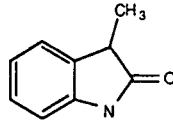


- 1  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$
- 2  $R_1 = \text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$
- 3  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OH}$
- 4  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$
- 5  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{OH}$

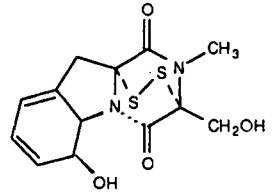
## 2. Composés azotés



6

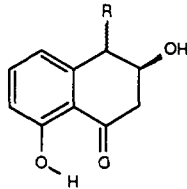


7



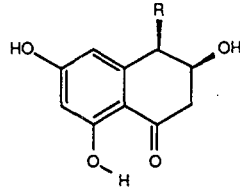
8

## 3. Tétralones



9 R = OH

10 R = H



11 R = H

12 R = OH

## 4. Terpènes

$\beta$ -citronellol

acétate de citronellyle

$\alpha$ -bisabolol

## 5. Dérivés du phényléthanol

phényléthanol

p-hydroxy phényléthanol ou tyrosol (13)

acétate de phényléthyle

6. Alcools et esters simples, hydrocarbures, acides gras

acétate d'isoamyle  
acétate de butyle  
acétate d'éthyle  
hydroxy-3, butanoate d'éthyle  
éthanol  
méthyl-3 propanol  
méthyl-2 propanol  
3,6 nonadienol  
dodecanol  
2,4 decadienol  
ocimène  
tridécène-1  
méthyl-3-pentane  
méthyl cyclopentane  
diméthyl cyclopentane  
hexadécène-9 oate d'éthyle  
myristate d'éthyle  
acide stéarique  
aldéhyde palmitique  
acide palmitique  
palmitate d'éthyle  
linoléate d'éthyle

Les métabolites des catégories 1 à 3 ont été isolés par des techniques chromatographiques, puis identifiés par les méthodes spectroscopiques. Les composés des catégories 4 à 6 (sauf le 13) sont principalement des volatiles et ont été analysés par GC-MS. Les composés identifiés uniquement par GC-MS ne portent pas de numéro. Les composés 1, 2, 3, 4, 6 et 8 ont une activité phytotoxique sur les feuilles de caféier.

## RECHERCHE ENTREPRISE

### 6 Matériel de départ

#### 6.1 Origines de la souche

La souche de *C. fimbriata* var. *coffea* que nous avons utilisée a été isolée le 9 sept. 1991 sur *Coffea arabica* (L.) par le Dr J. Léguizamon aux laboratoires de la "Federación nacional de cafeteros", CENICAFE, Chinchina (Colombie). A son arrivée, la souche a été authentifiée par le Dr. D. Job du laboratoire de microbiologie de l'Université de Neuchâtel.

#### 6.2 Culture du champignon sur milieu gélosé

La souche est maintenue en vie en la repiquant environ une fois par mois dans des boîtes de pétri contenant une gélose de dextrose de pommes de terre (PDA). Nous avons constaté que plus la culture repiquée est âgée, plus son démarrage est lent. A température ambiante, le champignon se développe de manière assez lente. D'abord d'aspect blanc cotonneux, il devient brun après 5-6 jours. Des périthèces peuvent apparaître après déjà une semaine de culture. On les distingue à l'oeil nu sous la forme de petits points noirs à la surface de la gélose. Certains sont surmontés d'une sécrétion mucilagineuse brune claire formée vraisemblablement d'ascospores.

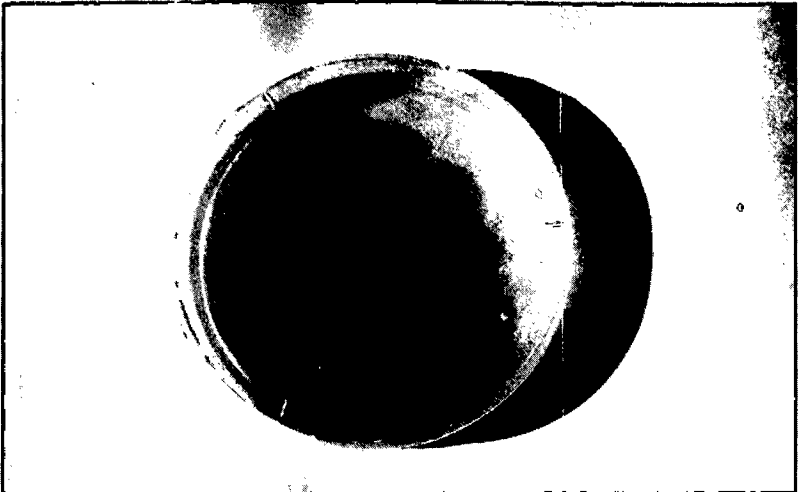


Fig. 8 Culture PDA âgée de 10 jours

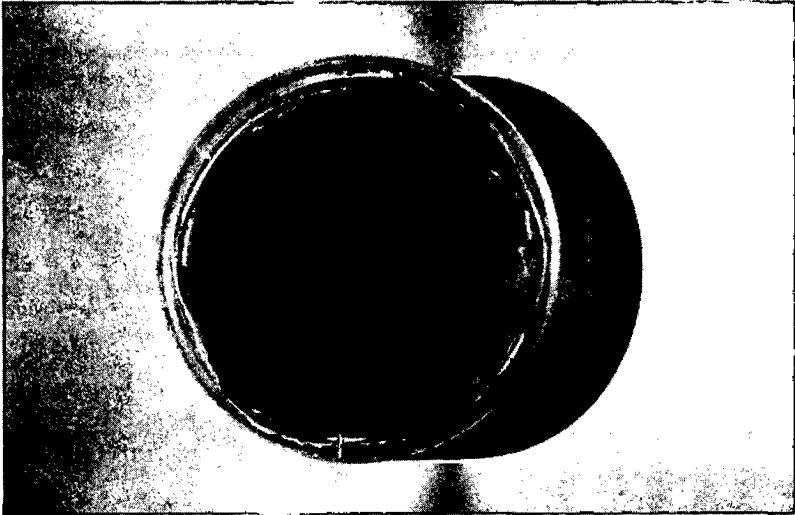


Fig. 9 Culture PDA âgée de 3 mois

Entre 10 jours (Fig. 8) et 3 mois, l'aspect de la culture ne se modifie plus notablement, si ce n'est par une coloration plus foncée en fonction du vieillissement (Fig. 9).

La lumière ne joue aucun rôle dans la vitesse de croissance. En effet des cultures placées sur un bord de fenêtre ou au fond d'une armoire poussent au même rythme. Cela avait d'ailleurs déjà été constaté pour la souche isolée de la patate douce [24]. Par contre, il semble que le cycle des saisons joue un rôle. Nous avons constaté que le champignon pousse de manière nettement plus vigoureuse au printemps que pendant le reste de l'année. Cela pourrait être expliqué par la présence d'un biorythme (horloge interne) du champignon, ou par les variations de la composition de l'atmosphère ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ ).

### 6.3 Culture du champignon en milieu liquide

Pour une production plus massive, le champignon est cultivé dans un milieu liquide parfaitement défini (voir partie expérimentale). Au début, les cultures sont hyalines avec un aspect cotonneux. Après 3-4 jours, la culture devient rose (Fig. 10) et après 7-10 jours, verte olive à brune. Elle commence alors à dégager une agréable odeur de banane mûre. La culture est encore agitée jusqu'à 21 jours sans que d'autres changements notoires ne se produisent, si ce n'est une coloration légèrement plus foncée (Fig. 11). Au vu de la stabilité de l'aspect de la culture après 10 jours, nous déduisons qu'il pourrait s'agir là de la fin de la phase de croissance exponentielle. Le reste de la période,

située entre 10-21 jours est alors la période la plus favorable pour l'élaboration de métabolites secondaires. Cette affirmation est corroborée par une étude de Sprecher et Hanssen [27], qui ont examiné la croissance d'une souche de *C. fimbriata* en fonction du temps de culture. Ils ont constaté que la fin de la croissance exponentielle de la masse de mycélium était atteinte après 15 jours et la masse maximale après 21 jours. Quant à la production de métabolites, elle était maximale à 15 jours.

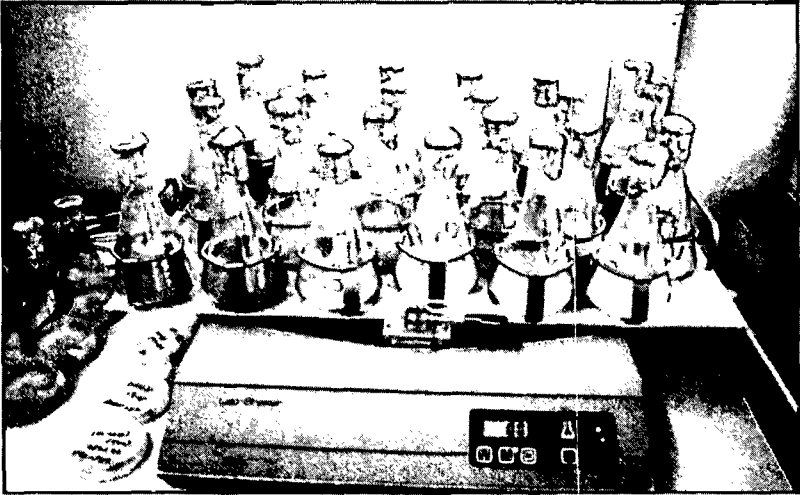


Fig. 10 Culture âgée de 3 jours

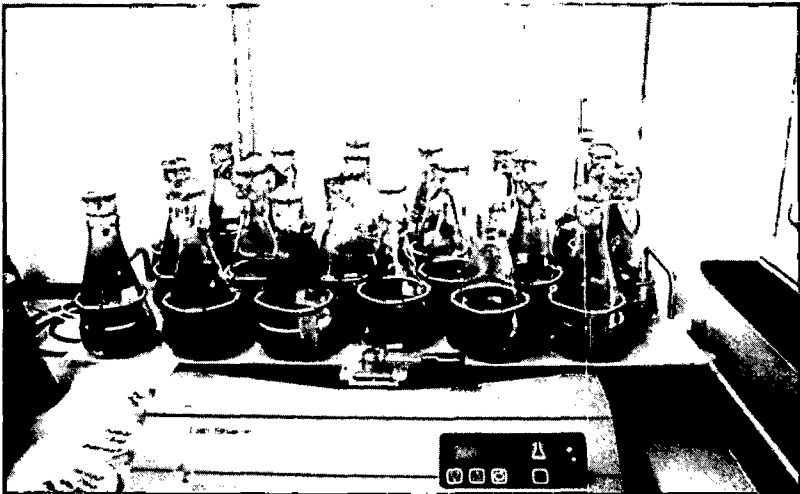


Fig. 11 Culture âgée de 21 jours

## 6.4 Traitements préliminaires du milieu de culture

Dès que la culture a atteint l'âge de 21 jours, les Erlenmeyers sont débouchés et leur contenu est filtré. Le filtrat du milieu de culture ainsi que le mycélium sont récupérés. Le mycélium est lyophilisé puis réduit en poudre à l'aide d'un mixer. Il est ensuite extrait à l'hexane pendant quatre heures, puis le mélange est filtré et le résidu est encore extrait pendant quatre heures à l'acétate d'éthyle. Le filtrat du milieu de culture est transvasé dans des appareils d'extraction liquide-liquide en continu et extrait à l'éther pendant 48 heures. On obtient ainsi l'extrait éthéré (voir partie expérimentale).

### Traitement de l'extrait éthéré

Pour ne pas risquer de perdre les fractions volatiles lors de l'élimination du solvant, nous les avons séparées du reste de l'extrait éthéré par évaporation à environ 70-80°C sous une pression légèrement réduite (100-700 mmHg) et piégeage à l'azote liquide. On récupère ainsi l'éther et la fraction volatile d'une part (fraction éthérée volatile) et la fraction non-volatile de l'autre part (fraction éthérée non-volatile). Les traitements préliminaires sont résumés dans le schéma 2. A la fin du processus, tout le matériel est désinfecté avec une solution à 10 % de formaldéhyde commercial.

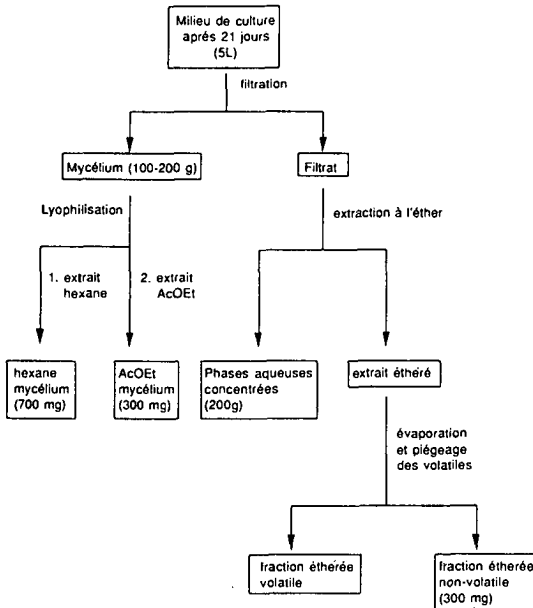


Schéma 2: Traitements préliminaires

## 7 Test de toxicité

### 7.1 Déroulement du test

Nous avons choisi notre test par analogie avec celui utilisé par Borgschulte *et al* [53] qui observent la nécrose des feuilles de peuplier. C'est un test semi-quantitatif mais qui a l'avantage d'être rapide et simple à mettre en œuvre et à interpréter (partie expérimentale).

Les composés sont testés sur une gamme de concentrations allant de 10 à 1000 µg/ml. Pour chaque mesure, au minimum deux essais en parallèle sont préparés. Dans les cas où la quantité à disposition est faible (>100 µg), une seule concentration est utilisée (par exemple 100 µg/ml), mais toujours avec au minimum deux essais en parallèle. Les produits les plus abondants, qui sont testés sur toute la gamme des concentrations, peuvent servir de référence pour évaluer la toxicité relative de ceux qui sont testés à une seule concentration.

### 7.2 Evaluation de la toxicité

L'activité toxique se manifeste après une période de 24 h à 72 h par l'apparition d'une nécrose sur le pétiole des feuilles. (Fig. 12). Nous évaluons cette activité toxique en mesurant la grandeur de la nécrose et appliquons ensuite l'échelle suivante: - : le pétiole reste vert, + : nécrose visible à nécrose jusqu'à 1 mm, + + : nécrose de 1- 3 mm.

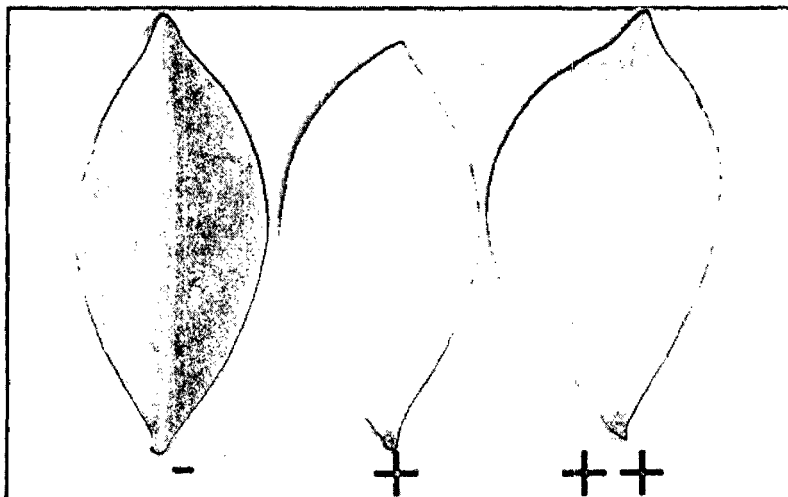


Fig. 12 Nécroses de - à ++

## 8 Essais préliminaires

### 8.1 Localisation de l'activité

Dans le but de concentrer notre recherche sur les fractions les plus actives, nous avons testé, après évaporation du solvant, les différentes fractions obtenues lors du traitement préliminaire du milieu de culture. Nous avons constaté que la fraction active était la fraction étherée non-volatile (tableau 1). C'est donc cette fraction que nous avons analysé en priorité.

Nous n'avons pas pu tester la fraction étherée volatile, elle contient en effet surtout de l'éther, lequel reste à la surface de la solution aqueuse et sature de ses vapeurs l'air contenu dans les flacons de test. Cela provoque un brunissement très rapide (quelques dizaines de minutes) de toute la feuille faussant ainsi totalement le résultat. Comme nous ne pouvons pas séparer l'éther des autres constituants, cette fraction sera analysée telle quelle en GC-MS.

Fraction testée	concentration testée (µg/ml)	activité observée
hexane mycélium	700	-
AcOEt mycélium	600	-
phases aqu. conc.	1700	-
étherée non-volatile	950	+ à ++
étherée volatile	non-testée	non-testée

Tableau 1 Activité des fractions du traitement préliminaire

### 8.2. GC-MS de la fraction étherée volatile

2 µl de la fraction étherée volatile sont injectés dans un GC-MS. Chaque pic du chromatogramme obtenu (Fig. 13) fournit un spectre de masse, qui est ensuite comparé avec une librairie de spectres stockés sur ordinateur. Lorsque la similitude est assez bonne, c'est-à-dire plus grande que 80%, le nom du produit identifié est indiqué. Au cas où la similitude est plus faible que 80%, le nom est indiqué avec un point d'interrogation ou n'est pas mentionné. Les composés analysés figurent dans le tableau 2. Les aires sont exprimées en % de l'aire totale. La colonne Rt indique les temps de rétention absolus. La colonne "similitude %" représente le pourcentage de similitude entre le spectre du produit analysé et le spectre de la librairie.

Nom du composé	Aire %	Rt (min.)	Similitude %
éthanol	23.9	1.64	83
propane-2 one	0.23	1.75	90
pentène-2	0.97	1.99	87
méthyl-2 pentane	0.40	2.36	86
méthyl-3 pentane	0.49	2.49	87
acétate d'éthyle	0.58	2.65	91
méthyl-2 propanol-1	0.75	2.84	95
méthyl- cyclopentane	0.58	3.07	90
cyclohexane	0.21	3.62	90
acétate de n-propyle	0.65	4.37	72
acétate de n-butyle	43.22	6.00	74
acétate d'isoamyle	0.24	9.28	83

Tableau 2 Composés de la fraction étherée volatile

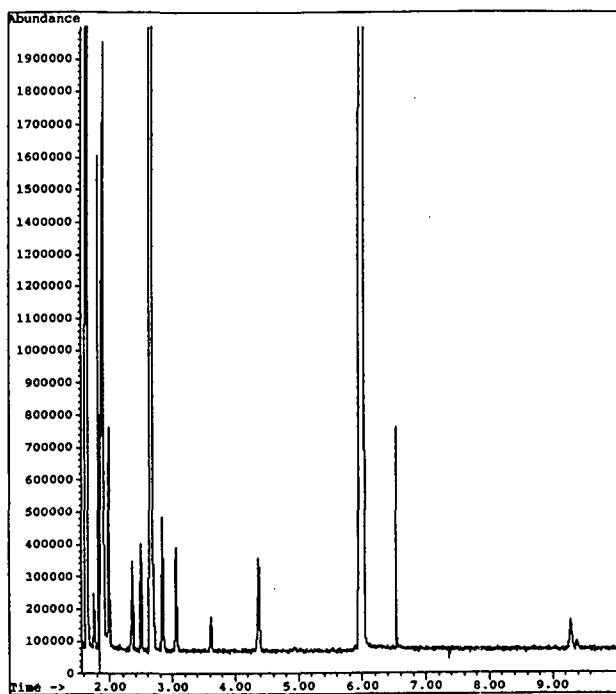


Fig. 13 Chromatogramme de la fraction étherée volatile

### 8.3 GC-MS de la fraction étherée non-volatile

Cet extrait est analysé tel quel par GC-MS afin d'avoir une première idée de la composition avant de commencer la séparation. La Fig. 14 représente le chromatogramme, et les résultats figurent dans le tableau 3.

Nom des composés	Aire % rel.	Rt (min.)	Similitude %
acétate de n-butyle	100	3.18	> 90
acétate d'isoamyle	8.55	5.32	> 90
non identifié	0.57	5.77	----
hydroxy-3 butanoate d'éthyle	0.51	6.75	> 90
acétate d'hydroxy-3 isobutyle	0.84	7.00	> 80
non identifié	0.49	9.55	----
non identifié	0.40	10.4	----
non identifié	1.03	11.1	----
phényléthanol	2.55	11.7	----
nonadiène-3,6-ol-1	0.93	12.8	85
non identifié	0.22	13.1	----
non identifié	0.40	13.5	----
β-citronellol	0.68	14.5	> 90
acétate de phényléthyle	0.22	14.9	> 90
1-H-indole	0.29	15.7	87
acétate de citronellyle	0.37	17.1	> 90
non identifié	1.03	18.7	----
plastifiant (contaminant)	0.56	19.2	----
*isocoumarine (4)	1.28	26.3	----
non identifié (type alcool gras)	0.76	26.6	----
non identifié	0.39	28.4	----
non identifié (type tétradécanol)	2.21	29,5	----

Tableau 3 GC-MS de la fraction étherée non-volatile

Les aires indiquées sont des aires relatives, c'est-à-dire qu'elles sont calculées par rapport à un des pics les plus importants du chromatogramme dont la valeur est normée à 100. Les deux autres colonnes (Rt (min.) et similitude %) sont identiques à celles du point 8.2. Le produit marqué d'un astérisque a été identifié après son isolement de la fraction "étherée non-volatile". Les indications entre parenthèses après la mention "non-identifié" signalent que l'ordinateur avait trouvé une similitude < 80 % avec un produit se trouvant dans la catégorie mentionnée entre parenthèses.

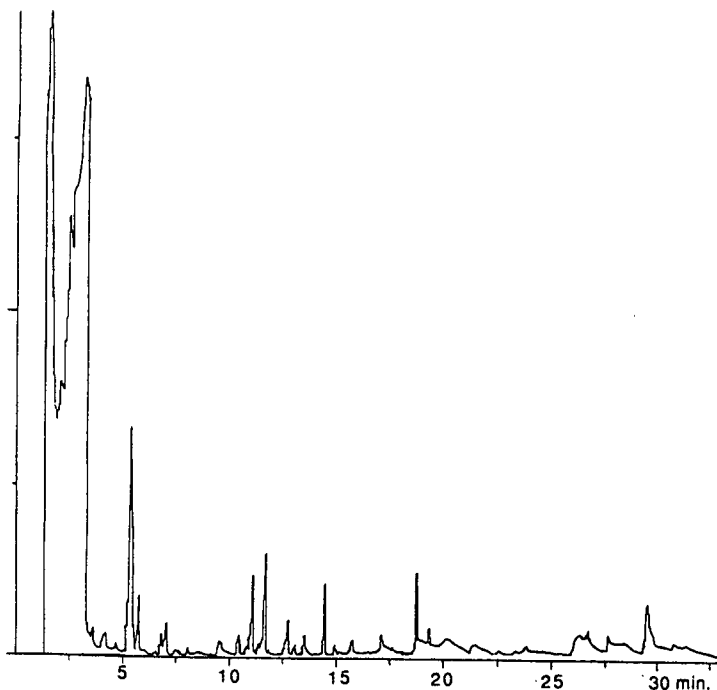


Fig. 14 Chromatogramme de la fraction étherée non-volatile

#### 8.4 GC-MS des extraits du mycélium

Les extraits hexanique (Fig. 15) et à l'acétate d'éthyle du mycélium ne présentent aucune activité biologique. Ils ont néanmoins été analysés par GC-MS selon les mêmes principes que les extraits étherés. Les similitudes ne sont pas indiquées, mais le produit n'est considéré comme identifié que si la similitude dépasse 80%.

Le produit \* du tableau 4 correspond à l'ester éthylique (pics caractéristiques à  $m/z$  88 (Mc-Lafferty) et  $m/z$  101) d'un acide gras en  $C_{15}$ , son PM est 270 et l'ordinateur propose le laurate d'éthyle (PM = 228) ou le myristate d'éthyle (PM = 256) avec la même similitude. La Fig. 15b montre le spectre du pic 5 (en haut) ( $R_t = 22.05$  min.). Les spectres présentés au milieu et en bas sont ceux du laurate d'éthyle (PM = 228) et du myristate d'éthyle (PM = 256). La Fig. 15c, explique les principales fragmentations.

Nom des composés	Aire % rel.	Rt (min.)
décadiénol-2,4 (E,Z)	2.81	7.83
décadiénol-2,4 (E,E)	5.21	8.39
myristate d'éthyle	1.56	19.97
hexadécanal	2.08	20.46
*pentadécanoate d'éthyle	5.46	22.05
hexadécène-9 oate d'éthyle	6.56	23.57
palmitate d'éthyle	100	24.28
linoléate d'éthyle	554	27.74
non-identifié (type ester d'acide gras)	14.4	29.50
non identifié (type acide gras)	22.9	30.70
non identifié (type acide gras)	36.7	32.21
non identifié (type méthyl squalène)	57.0	37.60
non identifié	5.94	39.14
non identifié	6.25	39.82
non identifié	7.18	40.29

Tableau 4 GC-MS de l'extrait hexanique du mycélium

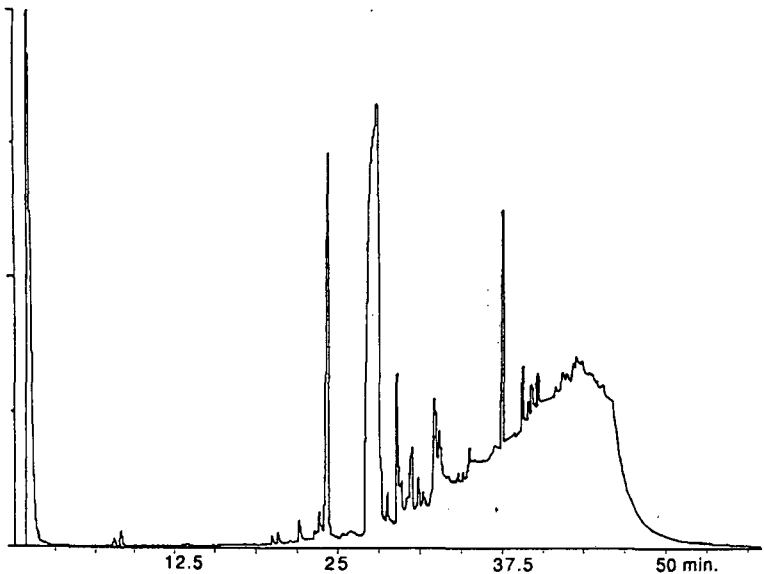


Fig. 15 Chromatogramme de l'extrait hexanique du mycélium

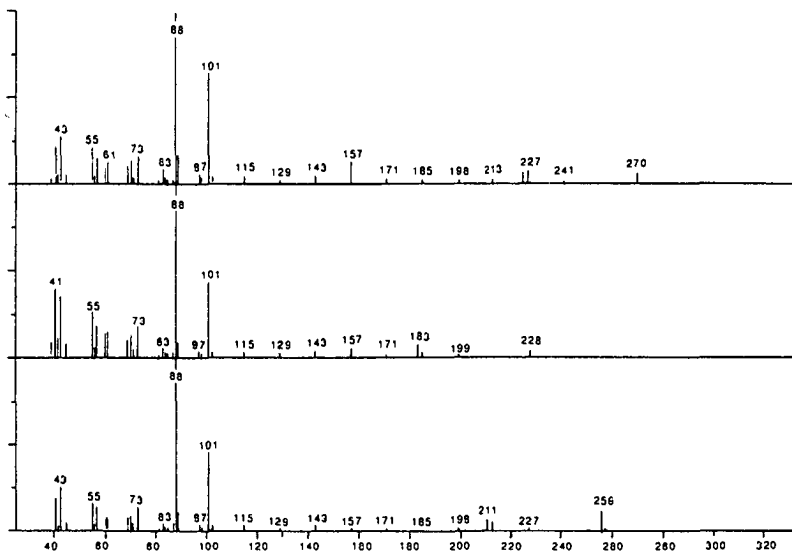


Fig. 15b Spectres du pic 5 à Rt = 22.05 min. (en haut), du laurate d'éthyle (au milieu) et du myristate d'éthyle (en bas).

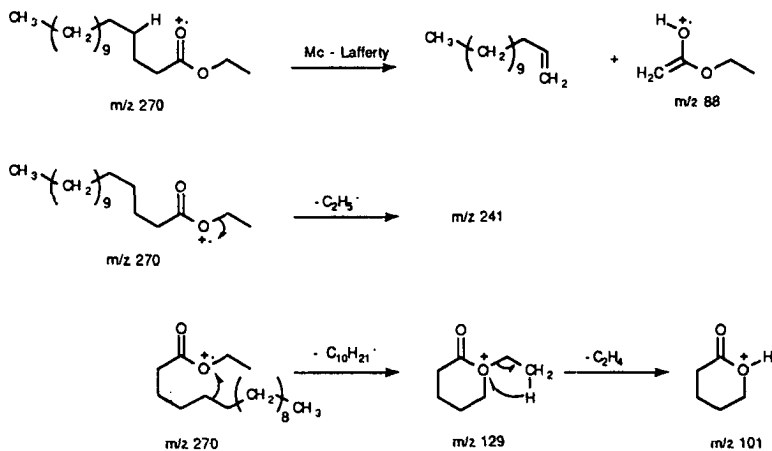


Fig. 15c Fragmentations du pentadécanoate d'éthyle

nom des composés	Aire % rel.	Rt (min.)
acétate de citronellyle	0.90	9.36
dodécane-1 ol	0.86	18.5
myristate d'éthyle	0.88	21.4
hexadécen-9 oate d'éthyle	3.5	25.6
palmitate d'éthyle	100	26.1
linoléate d'éthyle	630	30.1
acide palmitique et stéarique	1190	34.4
non identifié (type stéroïde)	2.20	39.8
non identifié (type stéroïde)	3.00	40.1
non identifié (type méthyle squalène)	27.0	42.5
non identifié	32.0	45.6

Tableau 5 GC-MS de l'extrait AcOEt du mycélium

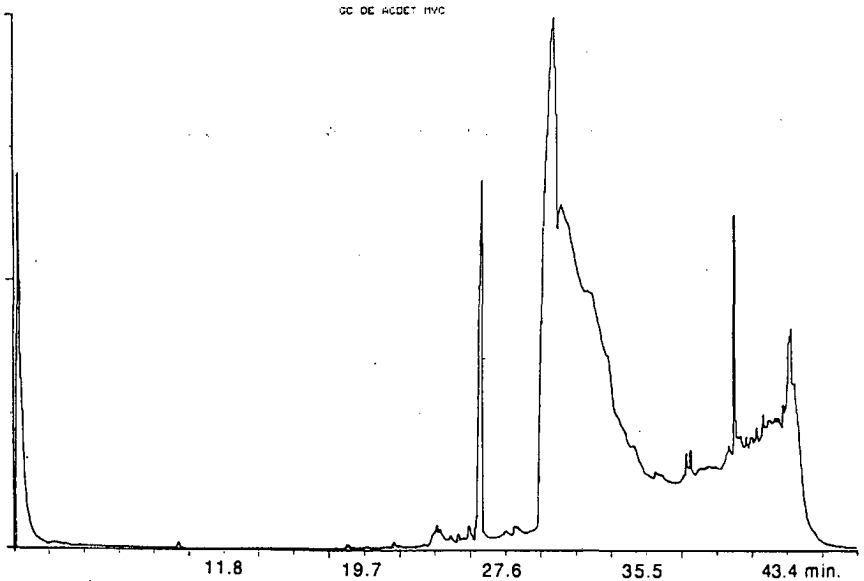


Fig. 16 Chromatogramme de l'extrait AcOEt du mycélium

## 9 Etude de la fraction étherée non volatile

### 9.1 Protocole de séparation de la fraction étherée non volatile

Les produits contenus dans la fraction étherée non volatile présentent une gamme de polarité très étendue. Nous avons effectué une pré-séparation par un lavage au  $\text{NaHCO}_3$  aqu. 1M. Cela permet de séparer les composés très polaires (par ex. les sucres) ou suffisamment acides pour être déprotonés par l'ion bicarbonate. On trouve par exemple les acides carboxyliques dans cette catégorie. Les composés phénoliques et les composés moins polaires se répartissent dans les deux phases, mais principalement dans la phase organique.

La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , puis filtrée et évaporée. Cette fraction éther sera séparée par chromatographie sur gel de silice. La phase aqueuse régénérée à pH 2 avec de l'HCl est ensuite re-extraite avec de l'éther, séchée, filtrée et évaporée. Nous appelons cette fraction la fraction acide. Elle sera chromatographiée sur cellulose. Il se produit parfois (suivant les cultures) un résidu qui cristallise lors de l'évaporation de l'éther utilisé pour extraire les phases aqueuses régénérées et qui ne se redissout plus dans l'éther.

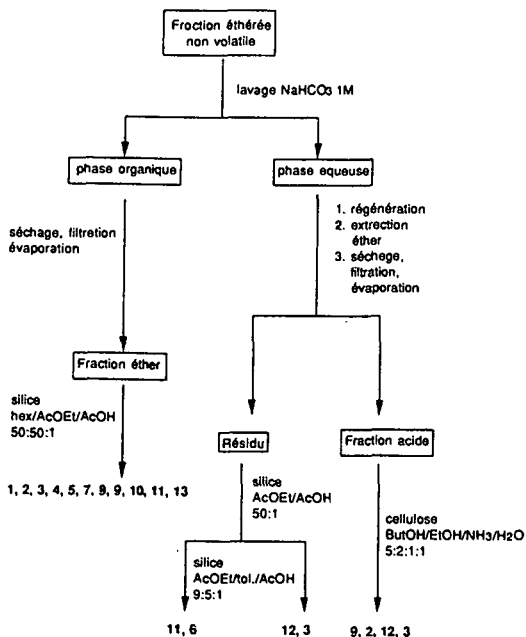


Schéma 3 Séparation de la fraction étherée non volatile

Par contre il se dissout dans un mélange 1:1 acétone/méthanol. Nous appelons cette fraction le résidu (schéma 3). Ce résidu est chromatographié sur gel de silice avec l'éluant AcOEt/AcOH (50:1).

On peut constater que les produits 2, 3, et 9 se retrouvent à la fois dans la fraction acide et la fraction éther. Cela est dû à leur polarité élevée. Nous avons procédé à une estimation de la polarité respective des différents produits isolés de la fraction éther (tableau 6) par mesure de leur Rf sur silicagel avec l'éluant hexane/AcOEt/AcOH 50:50:1. Cette expérience nous permet de constater que les produits les plus retenus (= les plus polaires) sont aussi ceux que l'on retrouve dans la fraction acide, ce qui est logique.

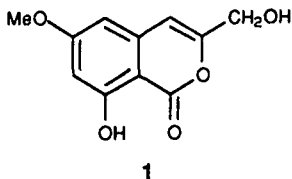
composé	4	10	7	5	1	8	2	3	9	11
Rf	0.54	0.41	0.32	0.28	0.26	0.26	0.16	0.13	0.12	0.05

Tableau 6 Rf des composés de la fraction éther

## 9.2 Purification et identification des composés isolés

Les composés isolés sont dans leur grande majorité insuffisamment purs pour être identifiés et surtout pour pouvoir effectuer un test biologique qui soit représentatif d'un seul et unique produit. Ils nécessitent donc une purification subséquente. Les techniques de purification les plus utilisées sont la CCM préparative sur gel de silice ou sur cellulose et la HPLC sur phase inverse (RP-18). Les phases et les éluants utilisés pour la dernière étape de purification seront indiqués lors de la description individuelle de chaque produit.

### 9.2.1 Identification de l'hydroxy-8 hydroxyméthyl-3 méthoxy-6 isocoumarine ou cytogénine (1)



2,2 mg de cristaux blancs de 1 sont isolés après purification par CCM sur cellulose avec l'éluant n-Butanol/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O 10:1:1 (R<sub>f</sub> = 0.6). On observe une coloration rouge avec la *p*-nitroaniline diazotée (réactif des phénols). Le spectre UV montre des maxima à  $\lambda = 243, 275$  et  $325$  nm (Fig. 17).

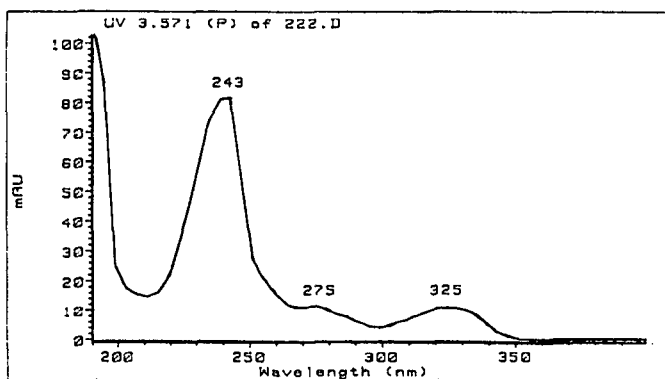


Fig. 17 Spectre UV (MeOH) de 1

Le spectre infrarouge (Fig. 18a) présente une bande OH très forte et large témoignant de la présence d'un ou plusieurs -OH formant des associations inter (3600 - 3200  $\text{cm}^{-1}$ ) et intramoléculaires (3200 - 2800  $\text{cm}^{-1}$ ). Cette bande couvre le domaine des  $\nu$  C-H aromatiques. A 2925  $\text{cm}^{-1}$  et 2853  $\text{cm}^{-1}$ , on observe les  $\nu$  C-H aliphatiques (-CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>). 1732, 1683  $\text{cm}^{-1}$  et 1626  $\text{cm}^{-1}$  sont des bandes que l'on peut attribuer au stretching C=O de la lactone et au stretching C=C de la double liaison et du cycle aromatique. Le fait qu'il y ait plusieurs bandes dans la région des carbonyles pourrait s'expliquer par des formes mésomères (Fig. 18b). Les bandes entre 1450 et 1000  $\text{cm}^{-1}$  proviennent essentiellement des vibrations de stretching des C-O et des vibrations de déformation des C-OH.

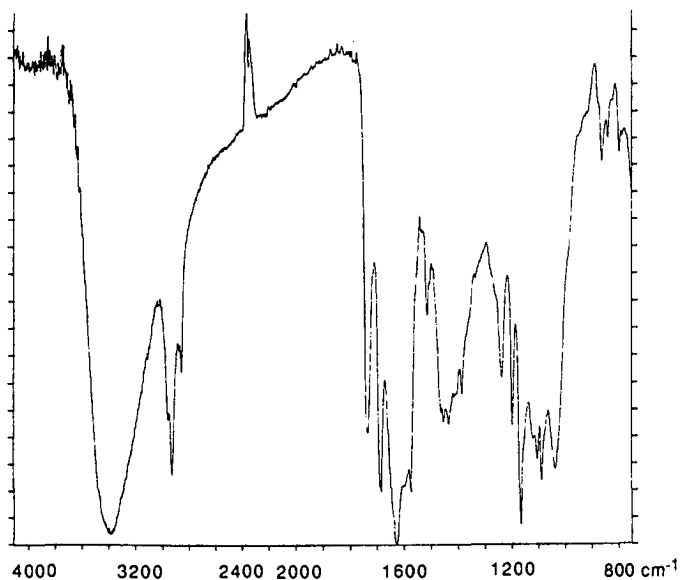


Fig. 18a Spectre IR de 1 (NaCl)

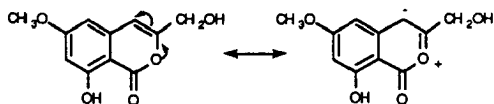


Fig. 18b Formes mésomères de 1

Le spectre  $^1\text{H-RMN}$  de 1 (Fig. 19a) montre six signaux. Le phénol en position 8 apparaît à  $\delta = 11.02$  ppm (1H, s). Sa position très déblindée confirme que cet -OH forme une liaison hydrogène avec la lactone voisine. Ceci n'est possible que si cette lactone est suffisamment proche, et ce signal donne donc une information structurale importante. Ce signal n'est visible que dans le  $\text{CDCl}_3$  mais pas dans l'acétone- $\text{D}_6$ , ce qui indique qu'il s'agit d'un proton échangeable. Le H-C(4) forme un triplet à  $\delta = 6.71$  ppm (1H, triplet,  $J = 0.9$  Hz) il subit avec le  $\text{CH}_2$  un couplage allylique cisoïde de  $0.9$  Hz à travers la double liaison. Les deux signaux suivants à  $\delta = 6.66$  (1H, d.,  $J = 2.2$  Hz, H-C(5)) et  $\delta = 6.54$  (1H, d.,  $J = 2.2$  Hz, H-C(7)) forment un système AX correspondant aux deux H aromatiques couplés en méta. Le H-C(7) est plus blindé car il est en ortho du phénol et du méthoxy. Par comparaison, H-C(5) n'est en ortho que du phénol. Le  $\text{CH}_2\text{OH}$  apparaît à  $\delta = 4.45$  (2H, d.,  $J = 0.9$

Hz). Sa corrélation avec le proton à  $\delta = 6.71$  ppm est démontrée par une expérience de découplage homonucléaire pratiquée en saturant le signal à  $\delta = 4.45$  ppm. On voit alors une transformation du triplet à  $\delta = 6.71$  ppm en un singulet, ce qui provoque un pic de plus grande intensité (Fig. 19b). Il est intéressant de remarquer que dans le  $\text{CDCl}_3$ , le  $\text{CH}_2$  forme un couplage de 6.35 Hz avec le -OH vicinal. Ce couplage n'apparaît pas dans l'acétone- $\text{D}_6$ . Enfin, à  $\delta = 3.95$  ppm (3H, s.), on a un signal qui correspond parfaitement au méthoxy placé sur le cycle aromatique.

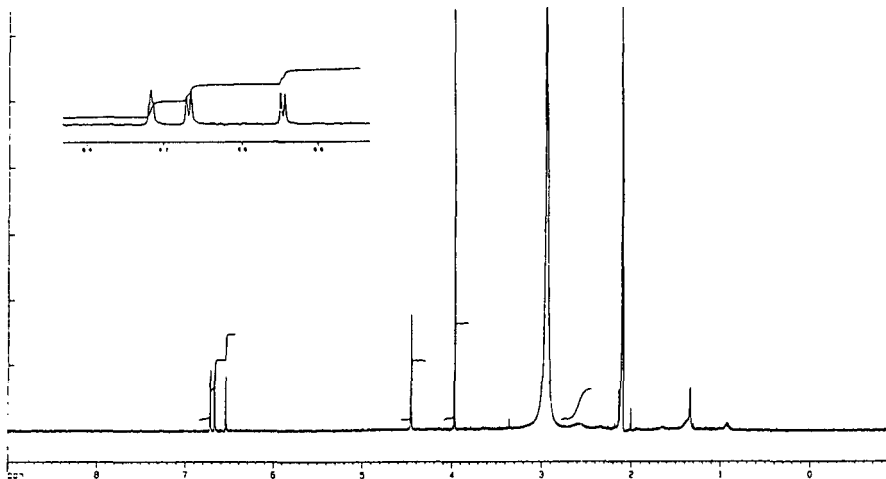


Fig. 19a  $^1\text{H}$ -RMN de 1 (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

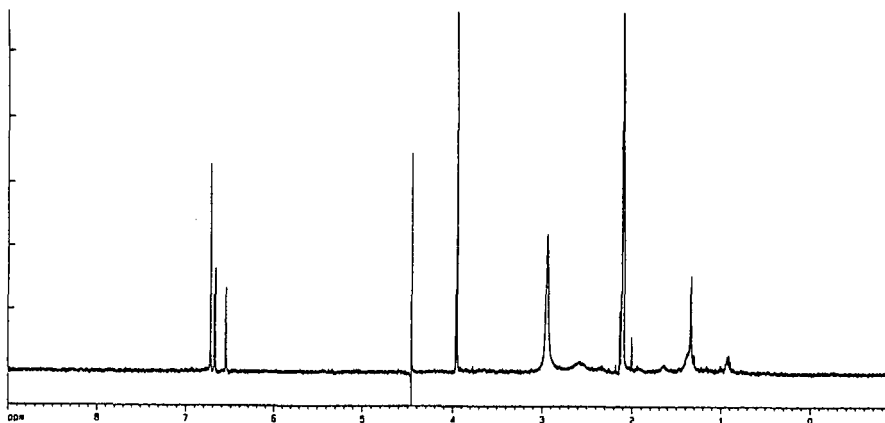


Fig. 19b Irradiation à  $\delta = 4.45$  ppm (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

Le déplacement chimique du proton allylique est passablement influencé par le solvant. Dans le  $\text{CDCl}_3$ , il apparaît à  $\delta = 6.47$  ppm, et se trouve entre les 2 H aromatiques (Fig. 20a et 20b).

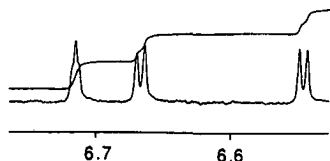


Fig. 20a (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

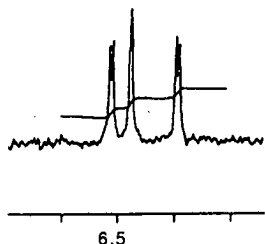


Fig. 20b (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Le spectre  $^{13}\text{C}$  de **1** montre 11 carbones (Fig. 21). L'attribution est facilitée par une expérience HETCOR courtes distances, qui donne les connectivités directes  $\delta^1\text{H}-\delta^{13}\text{C}$  (Fig. 22). On constate une connectivité entre les  $\delta^1\text{H}-\delta^{13}\text{C}$  suivants (ppm): 3.95 - 55.60, 4.45 - 60.27, 6.54 - 100.59, 6.66 - 101.91, 6.71 - 103.20. Le tableau 7 présente une comparaison de nos valeurs  $\delta^1\text{H}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  avec celles décrites pour la cytogénine [54].

position	$\delta_{\text{C}}$ de <b>1</b> (100.6 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ [54] (100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ de <b>1</b> (400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ [54] (400 MHz)
C(1)	165.97	166.93	---	---
C(3)	157.68	157.86	---	---
C(4)	103.201	104.14	6.71 (t, 0.9)	6.48 (br t, -1)
C(4a)	139.75	140.37	---	---
C(5)	101.91	103.59	6,66 (d, 2.2)	6.55 (d, 2.0)
C(6)	167.41	167.99	---	---
C(7)	100.59	101.50	6.54 (d, 2.2)	6.53 (d, 2.0)
C(8)	163.66	164.34	---	---
C(8a)	100.06	101.02	---	---
C(9)	60.27	61.04	4.45 (d, 0.9)	4.33 (dd, 6.0, -1)
C(6)- OCH <sub>3</sub>	55.60	56.66	3.95 (s)	3,86 (s)
C(8)-OH	---	---	11.20 (s)	11.20 (t, 6.0)

Tableau 7 Comparaison de nos valeurs  $\delta^1\text{H}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  (acétone- $\text{D}_6$ ) avec celles de la Cytogénine [54] ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ).

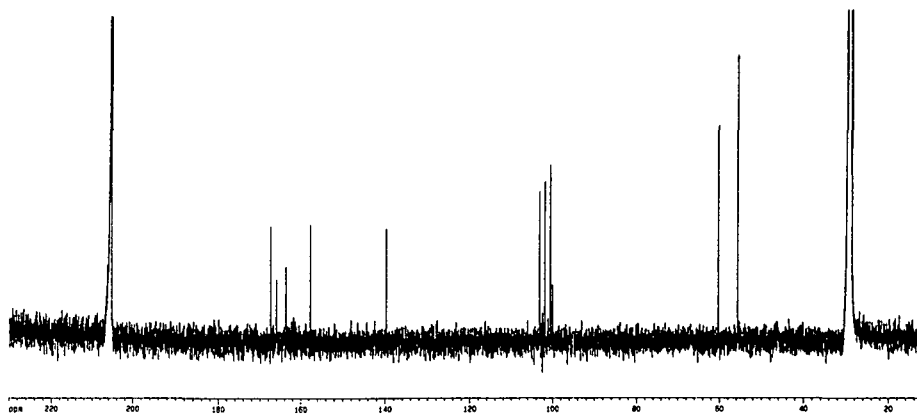


Fig. 21 RMN  $^{13}\text{C}$  de 1 (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

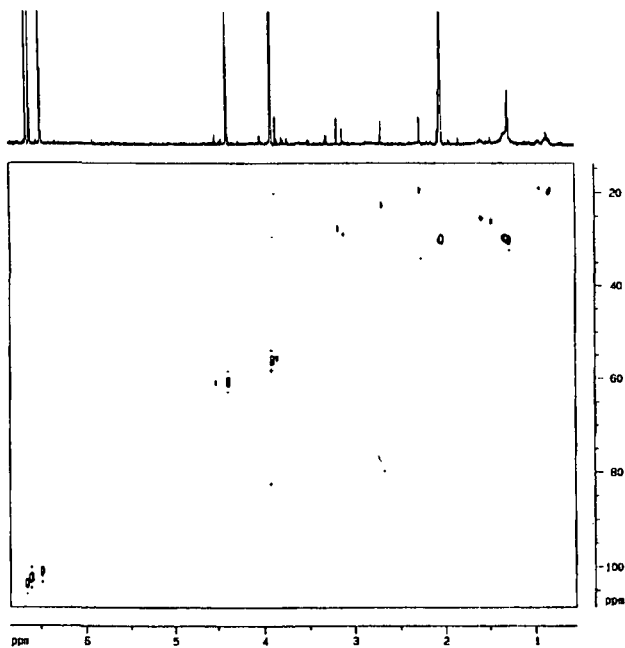


Fig. 22 HETCOR courtes distances de 1 (600 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

Contrairement à Kumagai *et al.* [54], nous doutons que le proton à  $\delta = 11.20$  ppm corresponde au C(9)-OH car cela semble beaucoup trop déblindé pour un -OH aliphatique d'après les valeurs tabulées [55]. Nous pensons qu'il s'agit plutôt du phénol placé sur le C(8) et qui forme une liaison hydrogène avec la lactone voisine. D'autre part, les valeurs pour les protons H-C(4), H-C(5) et H-C(7) ont visiblement été mélangées par les auteurs de [54] lorsqu'ils les citent dans leur tableau. En effet, le triplet à  $\delta = 6.48$  ppm est attribué comme H-C(7) alors qu'il s'agit de H-C(4). Nous avons fait l'attribution des H aromatiques d'après l'HETCOR, qui démontre clairement que le C le plus déblindé des deux CH aromatiques ( $\delta = 101.91$  ppm, C(5)) est corrélé avec le H le plus déblindé ( $\delta = 6.66$  ppm, H-C(5)).

Le spectre de masse (Fig. 23) montre un pic moléculaire à  $m/z = 222$ . Nous proposons un mécanisme de fragmentation tel qu'il est décrit par le schéma 4.

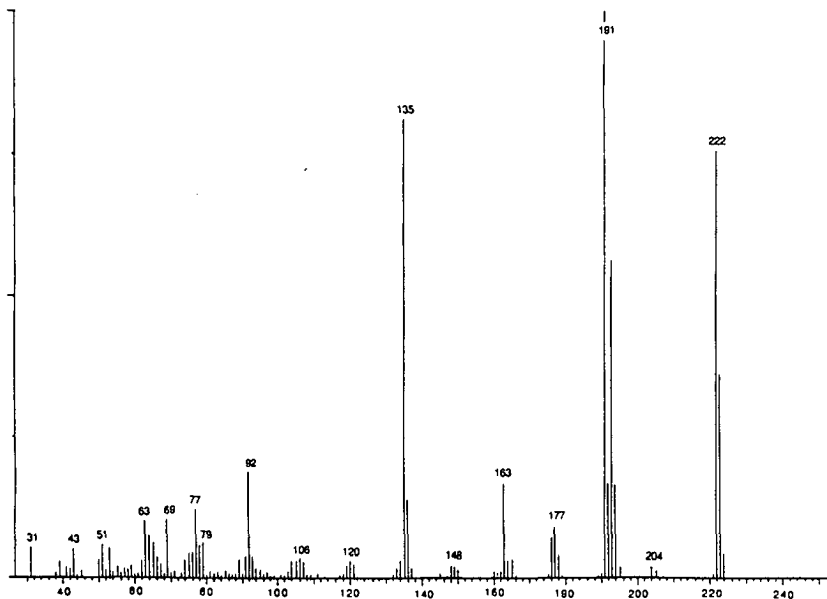


Fig. 23 Spectre de masse de 1 (EI, 70 eV)

Ce produit a déjà été isolé de *Streptoverticillium eurociticum* [54] et a été baptisé Cytogénine. Des analogues de ce produit ont été isolés, notamment la dihydroxy-6,8 hydroxyméthyl-3 isocoumarine dans *Ceratocystis minor* [56] et les diméthoxy-6,7 hydroxy-8 hydroxyméthyl-3 isocoumarine et dihydroxy-6,8 hydroxyméthyl-3 méthoxy-7 isocoumarine, trois produits isolés de *Streptomyces mobaraensis* [57].

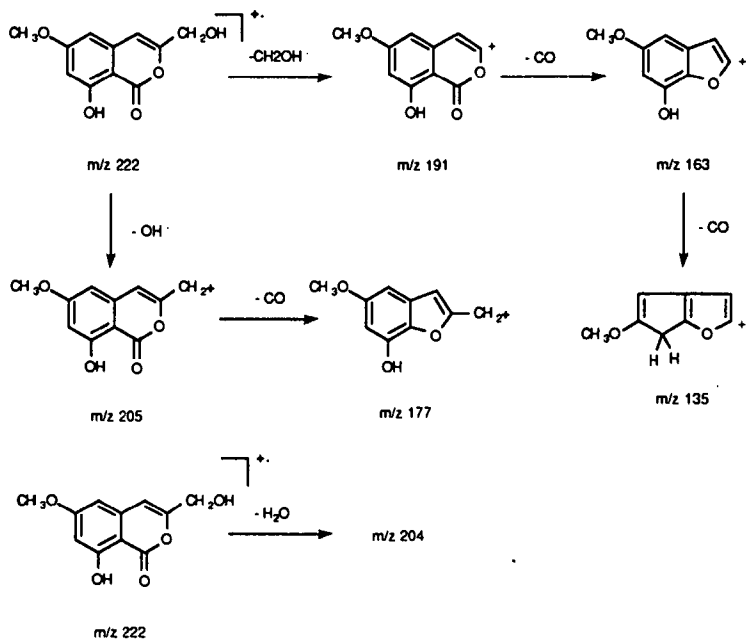
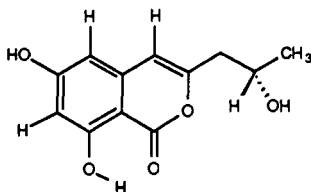


Schéma 4 Mécanisme de fragmentation de 1

### 9.2.2 Identification de la dihydroxy-6,8 (hydroxy-2 propyl)-3 isocoumarine (2)



2

2.9 mg d'un solide blanc amorphe sont isolés après purification par chromatographie (CCM) sur cellulose, solvant ButOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>3</sub> (5:2:1:1). R<sub>f</sub> : 0.51. On observe une coloration brune avec la *p*-nitroaniline diazotée (réactif des phénols). Notre expérience nous a montré que cette coloration est typique des composés possédant deux groupes phénoliques libres. Ceux qui ne possèdent qu'un phénol (par ex. 1) apparaissent toujours rouges. Le spectre UV montre des maxima à  $\lambda = 236$  (épaulement.), 244, 279, 293 (épaulement.), 331 nm (Fig. 24), il a la même allure que celui de 1 (Fig. 16). C'est un spectre caractéristique des isocoumarines 6,8 dihydroxylées.

Le spectre infrarouge (Fig. 25) montre des -OH à 2600-3300 cm<sup>-1</sup>. Les vibrations de stretching des CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> sont à 2964, 2927, 2854 cm<sup>-1</sup>. Les trois bandes à 1682, 1623 et 1587 cm<sup>-1</sup> sont occasionnées par le stretching de la lactone, de la double liaison vinylique, et des doubles liaisons du cycle aromatique. La position de la bande de  $\nu$  C=O pour une  $\delta$  lactone est 1730 cm<sup>-1</sup>. Dans notre cas cette vibration subit deux influences qui diminuent fortement sa fréquence (pont-H, cycle aromatique) et une influence qui l'augmente (double liaison). Cela explique la position inhabituellement basse de cette bande.

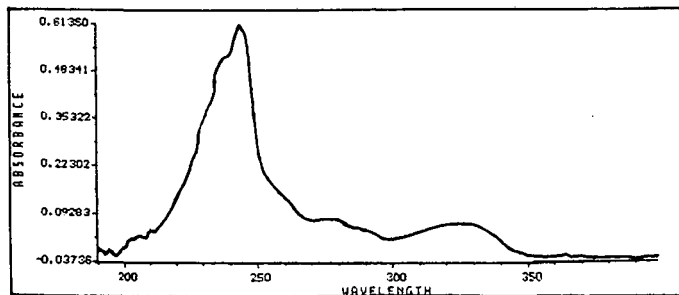


Fig. 24 Spectre UV de 2 (MeOH)

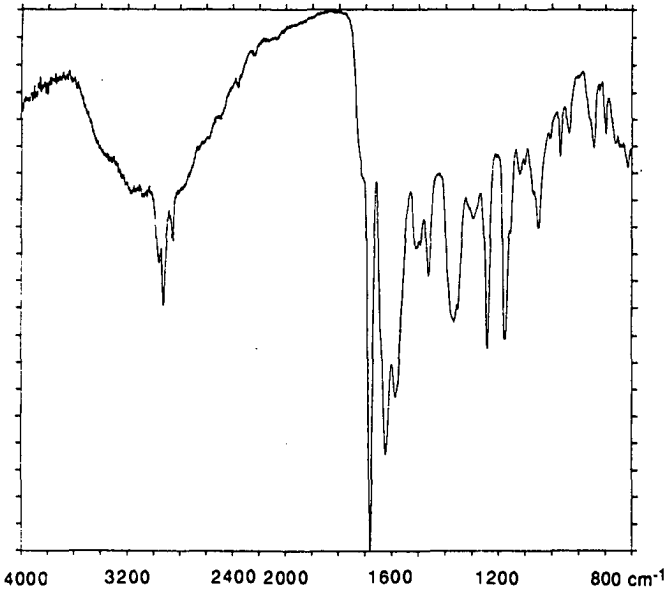


Fig. 25 IR de 2 (NaCl)

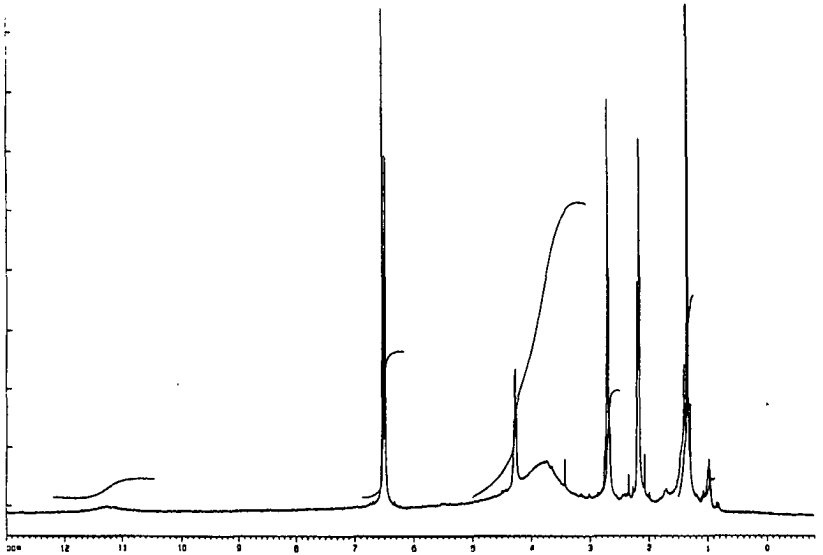


Fig. 26a ¹H - RMN de 2 (400 MHz, acétone-D<sub>6</sub>)

Le spectre  $^1\text{H-RMN}$  (Fig. 26a - e) présente à  $\delta$  (ppm) = 11.2 ppm (1H, bosse, C(8)-OH) le phénol formant une liaison hydrogène avec la lactone voisine. A  $\delta$  = 6.54 ppm (1H, s large, H-C(4)) apparaît le proton de la double liaison. Il se confond en partie avec le système AB formé par les deux H aromatiques à  $\delta$  = 6.53 ppm (1H, d,  $J$  = 2.11 Hz, H-C(5)) et  $\delta$  = 6.49 ppm (1H, d,  $J$  = 2.11 Hz, H-C(7)). Le substituant en 3 produit trois signaux : A  $\delta$  = 4.29 (1H, sx large,  $J$  = 6 Hz, H-C(10)) on voit le CHOH. Sa multiplicité provient de ses cinq voisins (le  $\text{CH}_2$  et le  $\text{CH}_3$ ). C'est la partie X d'un ABX. Son déplacement est dû à l'OH voisin. Le  $\text{CH}_2$  apparaît à 2.7 (2H, m, H-C(9)) sous forme d'un signal d'ordre supérieur, qui est la partie AB d'un système ABX. Le dernier signal est celui du  $\text{CH}_3$  à 1.35 (3H, d, 6.2 Hz, H-C(11)).

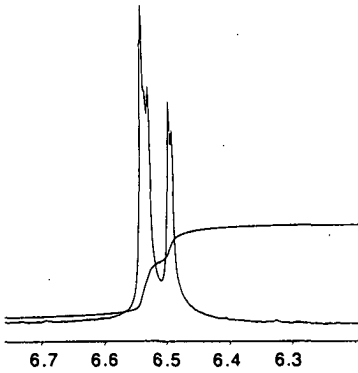


Fig. 26 b

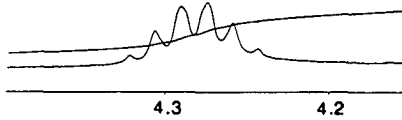


Fig. 26c



Fig. 26d

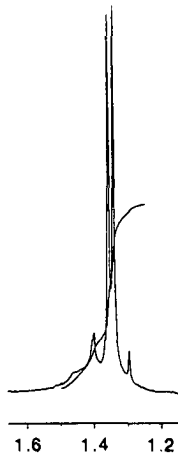


Fig. 26e

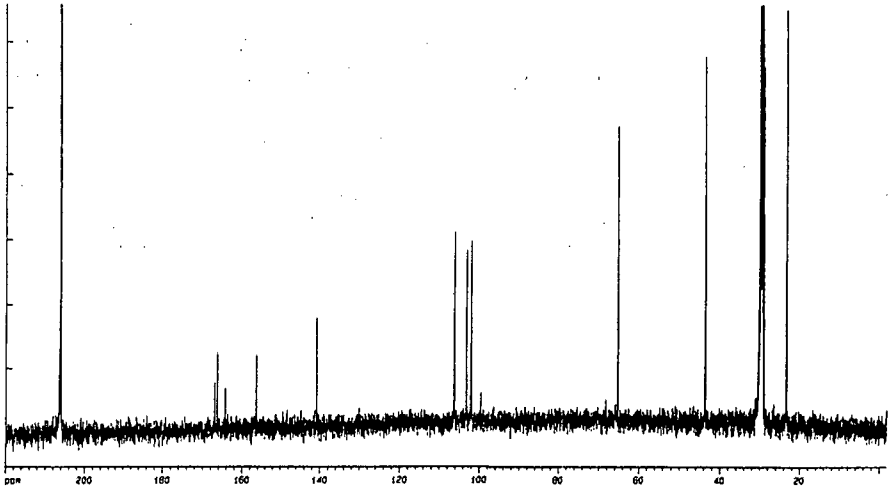


Fig. 27  $^{13}\text{C}$  de 2 (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

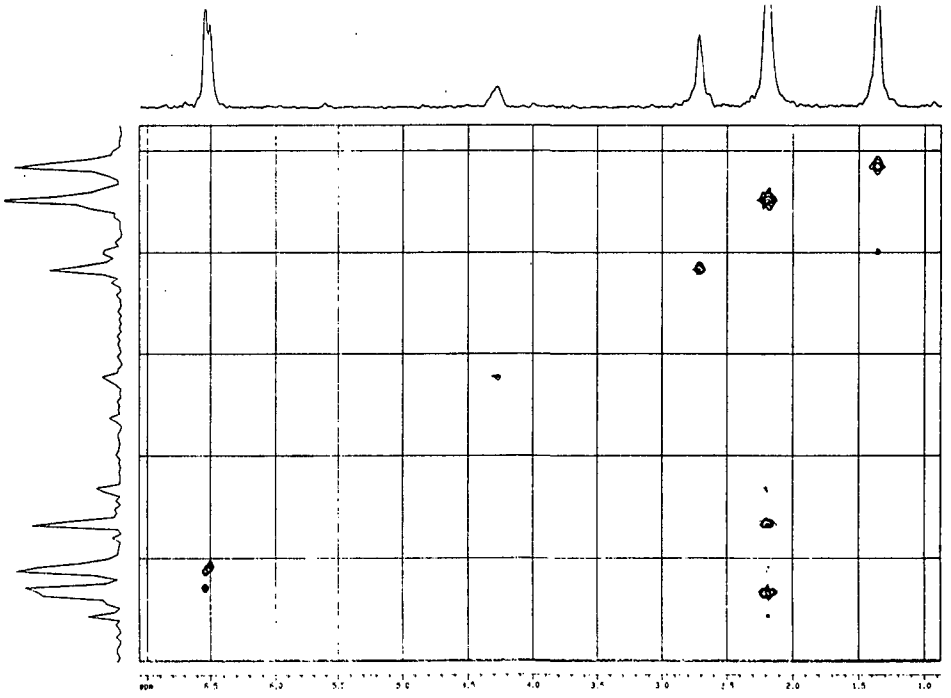


Fig. 28 HETCOR courtes distances de 2 (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

Le spectre  $^{13}\text{C}$  de 2 montre 12 carbones (Fig. 27). L'attribution est facilitée par une expérience HETCOR courtes distances, qui nous donne les connectivités directes  $\delta^1\text{H}$ -  $\delta^{13}\text{C}$  (ppm): 1.35 - 23.55, 2.7 - 43.81, 4.29 - 65.37, 6.49 - 102.11, 6.53 - 103.29, 6.54 - 106.35 (Fig. 28). Nous avons également mesuré un DEPT 135 afin de confirmer que  $\delta = 43.81$  ppm était le seul signal correspondant à un  $\text{CH}_2$  (Fig. 29).

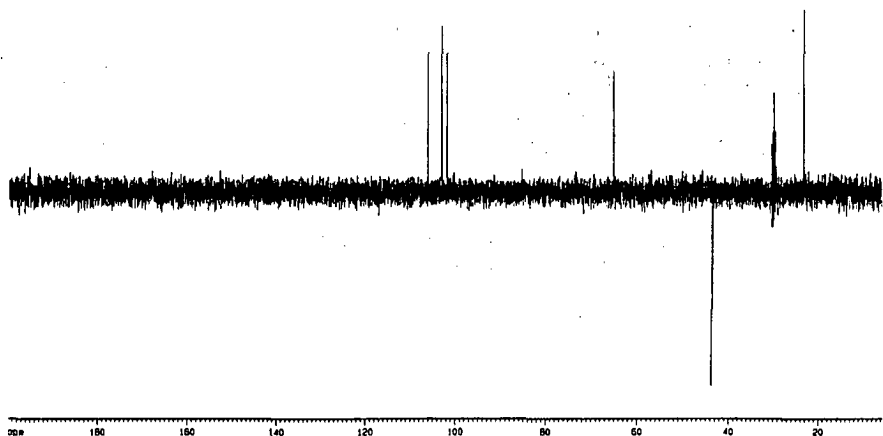


Fig. 29 DEPT 135 de 2 (400 MHz, acétone- $\text{d}_6$ )

position	$\delta^{13}\text{C}$ de 2 (100.6 MHz)	$\delta^{13}\text{C}$ [58] (100 MHz)	$\delta^1\text{H}$ de 2 (400 MHz)	$\delta^1\text{H}$ [58] (attribution modifiée) (400 MHz)
C(1)	167.02	167.8	---	---
C(3)	156.52	156.3	---	---
C(4)	106.35	106.6	6.54 (1H, s)	6.44 (1H, s)
C(4a)	140.89	140.5	---	---
C(5)	103.29	103.8	6.53 (1H, d, J = 2.1)	6.42 (1H, d, J = 2.2)
C(6)	166.37	167.2	---	---
C(7)	102.11	102.4	6.49 (1H, d, J = 2.1)	6.38 (1H, d, J = 2.2)
C(8)	164.30	164.5	---	---
C(8a)	99.71	99.2	---	---
C(9)	43.81	44.1	2.7 (2H, m)	2.60 (2H, m)
C(10)	65.37	65.7	4.29 (1H, m)	4.17 (1H, m)
C(11)	23.55	23.4	1.35 (3H, d, J = 6.2)	1.24 (3H, d, J = 6.2)
C(8)-OH	---	---	11.20 (s, 1H)	11.18 (s, 1H)

Tableau 8 Comparaison de nos valeurs avec la réf. [58]. Nous n'avons pas tenu compte de l'attribution de [58]. Solvant : acétone- $\text{d}_6$ .

Le tableau 8 présente une comparaison de nos valeurs avec celles indiquées pour la de-O-méthyladiaporthine [58]. Les auteurs ne proposent pas d'attribution pour le spectre proton, et n'attribuent que les  $^{13}\text{C}$  à  $\delta = 44,1$  (t, C(9)), 23,4 (q, C(11)), 65,7 (d, C(10)), 140,5 (d, C(4)), 156,3 (s, C(3)). Pour les autres  $^{13}\text{C}$ , seules les multiplicités sont indiquées. L'attribution de  $\delta = 140,5$  ppm à C(4) est visiblement une erreur, en effet la Fig. 28 montre clairement que le signal de proton à  $\delta = 6,54$  ppm est corrélé avec le  $^{13}\text{C}$  à  $\delta = 106,35$  ppm. Le signal à  $\delta = 140,5$  ppm n'est donc pas un doublet mais un singulet. Le carbone à  $\delta = 106,35$  ppm est par contre un doublet et il est curieux que les auteurs de [58] le décrivent comme un singulet, ce qui n'est pas possible vu qu'il est corrélé avec le signal à  $\delta = 6,54$  ppm. Nous n'avons donc pas pu tenir compte de l'attribution et des multiplicité indiquées dans [58].

Le spectre de masse est enregistré par ionisation par impact électronique (Fig. 30) puis par ionisation chimique avec un gaz réactant (Fig. 31). Les fragmentations obtenues correspondent parfaitement au schéma 5a qui décrit les fragmentations pour la de-O-méthyladiaporthine selon Hallock *et al* [58].

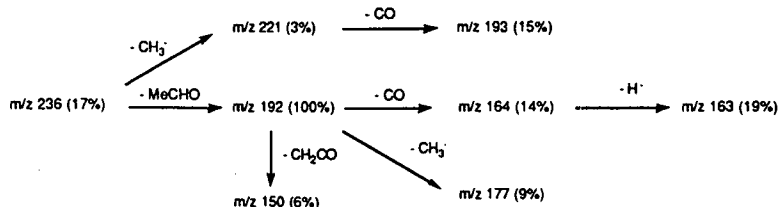


Schéma 5a MS de la de-O-méthyl diaportine selon Hallock *et al*. [58]

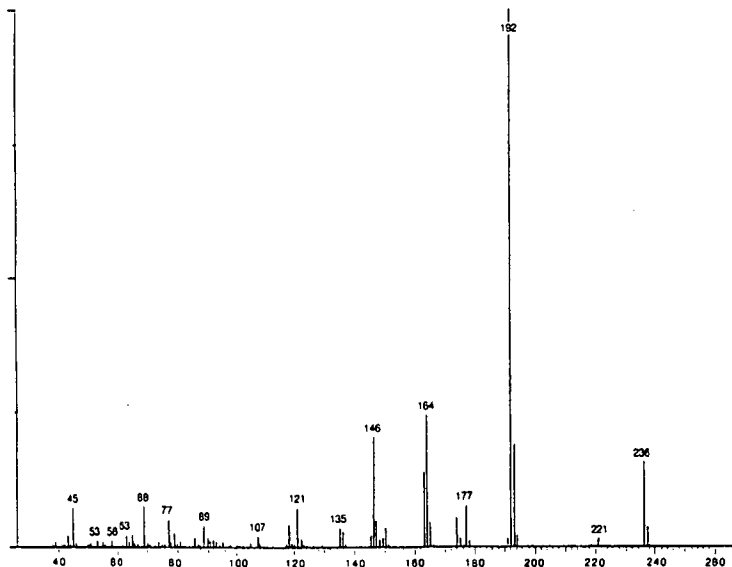


Fig. 30 MS de 2 (EI, 70, eV)

Notre spectre DCI-NH<sub>3</sub> montre en plus des ions déjà cités les  $m/z = 237$  ( $M^+ + H$ , 100%) et  $m/z = 254$  ( $M^+ + NH_4^+$ , 50%).

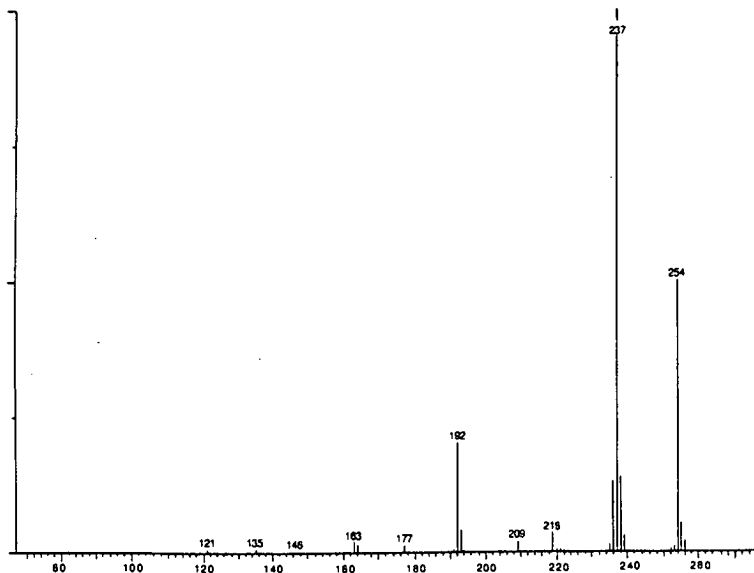


Fig. 31 MS de 2 (DCI, NH<sub>3</sub>, +)

Pour le ion à  $m/z = 135$  qui n'est pas expliqué dans [58], nous proposons le mécanisme du schéma 5b.

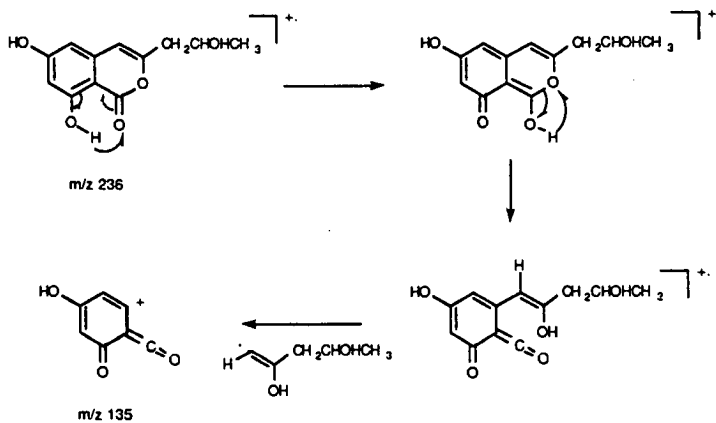


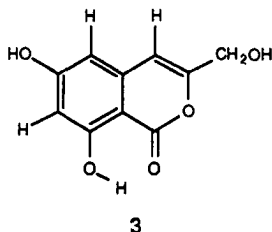
Schéma 5b Formation de  $m/z = 135$

Comme 2 est optiquement actif, nous avons mesuré sa rotation spécifique. La mesure ayant été faite avec très peu de substance, nous n'avons pas été en mesure d'établir précisément cette valeur, cependant nous avons constaté qu'elle était nettement positive dans le méthanol. Cette information est à mettre en relation avec la valeur fournie par [58].

$[\alpha]_D = +22^\circ$  (méthanol,  $c = 0.09$ )

Comme ce composé ne contient qu'un centre asymétrique, on peut raisonnablement supposer que 2 possède la même configuration absolue que la de-O-méthyladiaporthine décrite dans la référence [58]. La de-O-méthyladiaporthine a été isolé pour la première fois du champignon *Drachsierra siccans* [58]. Ce produit est un dérivé de la diaporthine ou méthoxy-6 hydroxy-8 (hydroxy-2 propyl)-3 isocoumarine, un métabolite de *Endothia parasitica* [59].

9.2.3 Identification de la dihydroxy-6,8 hydroxyméthyl-3 isocoumarine (3)



5.8 mg de **3** sont isolés sous forme d'un solide blanc-jaune amorphe. Le produit est purifié sur cellulose par CCM (n-ButOH/EtOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O; 5:2:1:1) R<sub>f</sub> = 0.44. On observe une coloration brune-ocre avec la *p*-nitroaniline diazotée (réactif des phénols), ce qui selon notre expérience dénote de la présence de deux groupes phénoliques. Le spectre UV montre des maxima à  $\lambda = 243, 276, 288, 326$  nm (Fig. 32). Ce spectre a la même allure que celui du produit **1** (Fig. 16), ce qui confirme que **3** est aussi une isocoumarine 6,8 dihydroxylée. Le spectre infrarouge (Fig. 33) montre des  $\nu$  -O-H à 2900-3600  $\text{cm}^{-1}$ . Cette bande très large indique que les phénols forment beaucoup d'associations intra- et intermoléculaires. L'épaule à 3090  $\text{cm}^{-1}$  est dû au  $\nu$  C-H des protons aromatiques. Le CH<sub>2</sub> apparaît à 2932, 2963, et 2858  $\text{cm}^{-1}$ . Les deux bandes larges à 1683 et 1623  $\text{cm}^{-1}$  correspondent à la lactone qui forme un pont-H avec le phénol voisin et aux vibrations de la doubles liaison. Les deux bandes moyennes à 1560 et 1590  $\text{cm}^{-1}$  proviennent vraisemblablement du stretching des doubles liaisons aromatiques. Le reste des bandes entre 1500 et 800  $\text{cm}^{-1}$  est dû à  $\delta$  *ip* =CH,  $\nu$  C-O,  $\delta$  *oop* =CH,  $\delta$  *ip* -OH et  $\delta$  *oop* -OH.

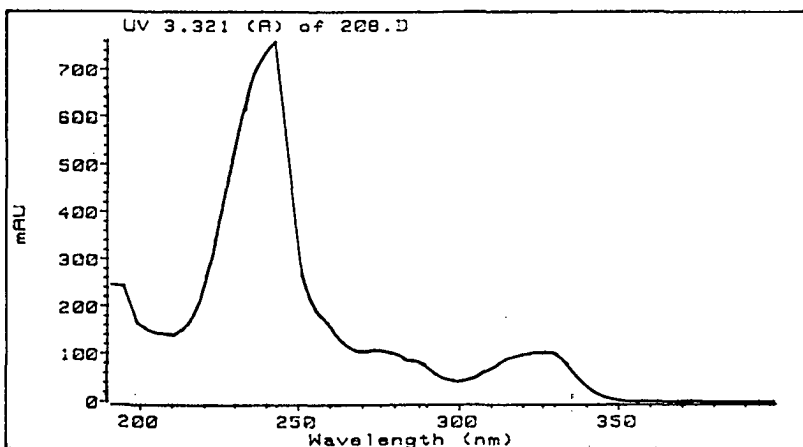


Fig. 32 UV de **3** (MeOH)

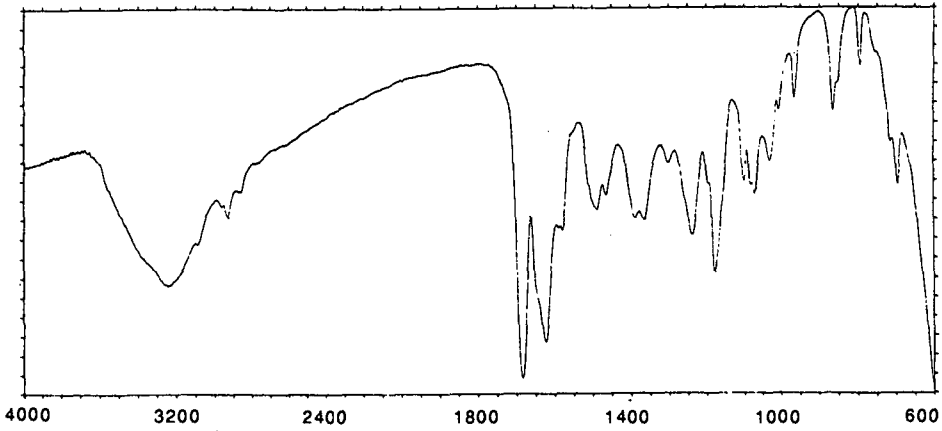


Fig. 33 IR de 3 (NaCl)

Le spectre  $^1\text{H-RMN}$  de 3 (Fig. 34a, b, c) présente six signaux à  $\delta$  (ppm) = 11.15 (1H, bosse, C(8)-OH), 6.64 (1H, s large, H-C(4)), 6.54 (1H, d,  $J = 2.11$  Hz, H-C(5)), 6.45 (1H, d,  $J = 2.11$  Hz, H-C(7)), 4.44 (2H, d.,  $J = 0.8$  Hz, H-C(9)), 2.50 (1H, large, C(9)-OH).

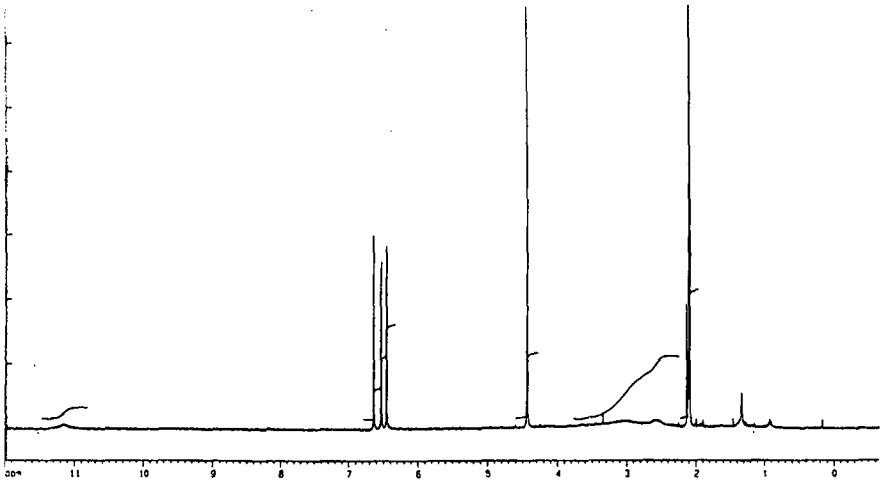


Fig. 34a  $^1\text{H-RMN}$  de 3 (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

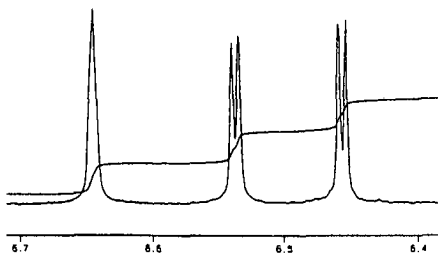


Fig. 34b

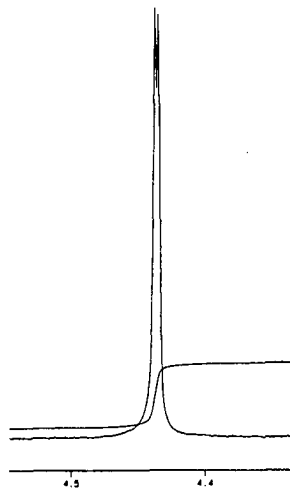


Fig. 34c

Ce produit a été isolé pour la première fois par Mc Graw *et al.* à partir de *Ceratocystis minor* [56] le tableau 9 présente une comparaison de nos valeurs avec celles décrites par la littérature [56].

position	$\delta^1\text{H}$ de 3 (400 MHz)	$\delta^1\text{H}$ [56] (400 MHz)
H-C(4)	6.64 (1H, s, large)	6.63 (1H, s)
H-C(5)	6.54 (1H, d, J = 2.2)	6.5-6.4 (dd, J = 2.5)
H-C(7)	6.45 (1H, d, J = 2.2)	6.5-6.4 (dd, J = 2.5)
H-C(9)	4.44 (2H, d., J = 0.8)	4.35 (2H, s)
C(9)-OH	2.50 (s, bosse, 1H)	---
C(8)-OH	11.20 (s, bosse, 1H)	11.4 (1H, s)

Tableau 9 Comparaison de 3 (acétone-D<sub>6</sub>) avec la dihydroxy-6,8 hydroxyméthyl-3 isocoumarine [56] (solvant non-mentionné).

Le spectre de masse (Fig. 35) montre un pic moléculaire à  $m/z = 208$ . Nous proposons un mécanisme de fragmentation tel qu'il est décrit par le schéma 6.

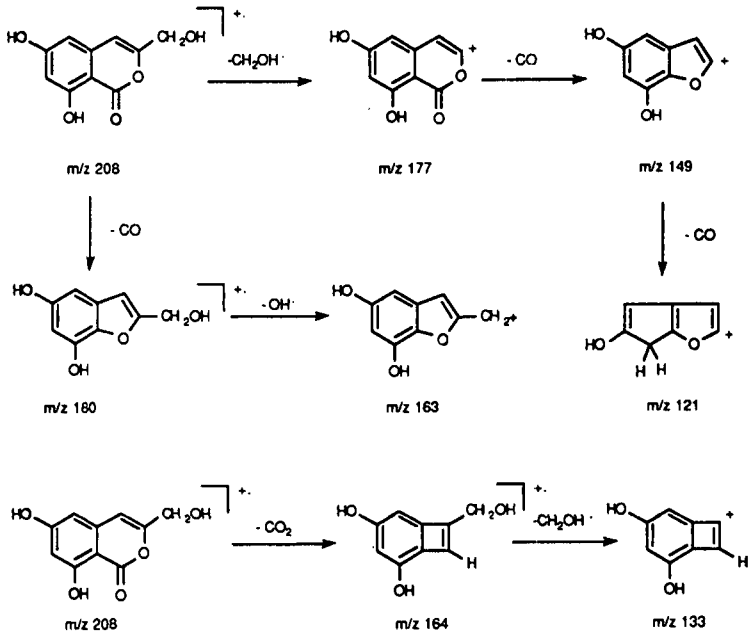


Schéma 6 Fragmentation de 3

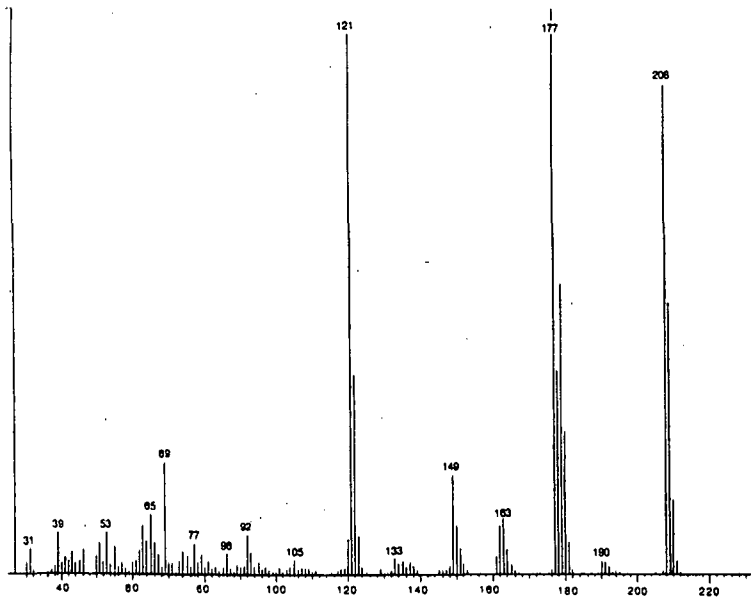
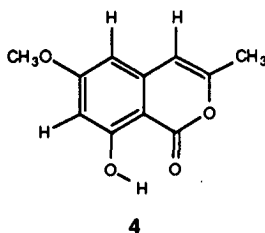


Fig. 35 : MS de 3 (EI, 70 eV)

### 9.2.4 Identification de l'hydroxy-8 méthoxy-6 méthyl-3 isocoumarine (4)



3.4 mg de **4** sont isolés sous forme d'un solide blanc amorphe. Le produit est obtenu pur après la colonne préparative de silice avec comme éluant AcOEt/AcOH/Hexane (50:1:50). Sur cellulose avec l'éluant *n*-ButOH/EtOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (5:2:1:1) on observe un R<sub>f</sub> = 0.76. Une coloration rouge est visible au test de la *p*-nitroaniline diazotée (réactif des phénols), ce qui dénote de la présence d'un seul groupe phénolique. Le spectre UV montre des maxima à  $\lambda = 244, 276, 288, 307$  nm (Fig. 36), ce qui est typique des isocoumarines 6,8 dihydroxylées.

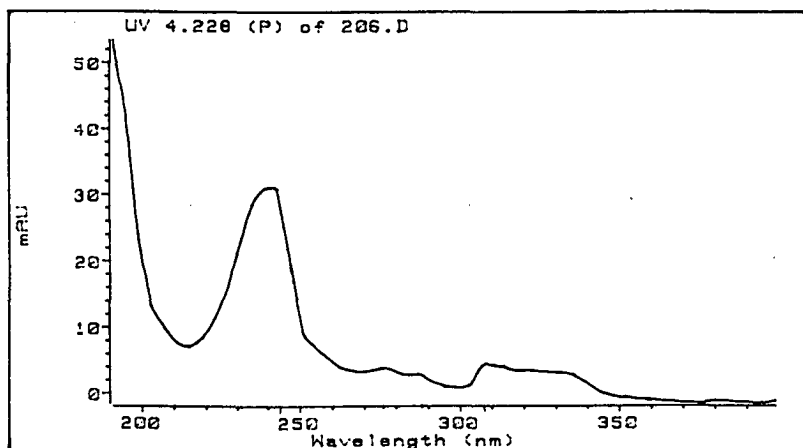


Fig. 36 UV (MeOH) de **4**

Le spectre infrarouge (Fig. 37) montre la bande  $\nu$  O-H à 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$ . A 3084  $\text{cm}^{-1}$ , on voit la bande des H aromatiques. La  $\nu$  CH<sub>3</sub> sont à 2958, 2923, 2853  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes à 1683, 1645, 1622 et 1574  $\text{cm}^{-1}$  correspondent au  $\nu$  C=O de la lactone qui forme une liaison hydrogène avec le phénol voisin, aux  $\nu$  C=C du cycle aromatique, et à la  $\nu$  C=C de la double liaison du deuxième cycle. Le spectre <sup>1</sup>H-RMN (Fig. 38a, et Fig. b, c) de **4** présente des signaux à

$\delta$  (ppm) = 11.10 (1H, s, C(8)-OH) , 6.45 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-C(5)), 6.29 (1H, d,  $J = 2.3$  Hz, H-C(7)), 6.18 (1H, q large,  $J = 0.9$  Hz, H-C(4)), 3.86 (3H, s., C(6)-OCH<sub>3</sub>), 2.25 (3H, d,  $J = 0.9$  Hz, CH<sub>3</sub> (9)). Une irradiation du signal à  $\delta = 2.25$  ppm nous a permis de confirmer le couplage avec le quartet à  $\delta = 6.18$  ppm (Fig. 38d).

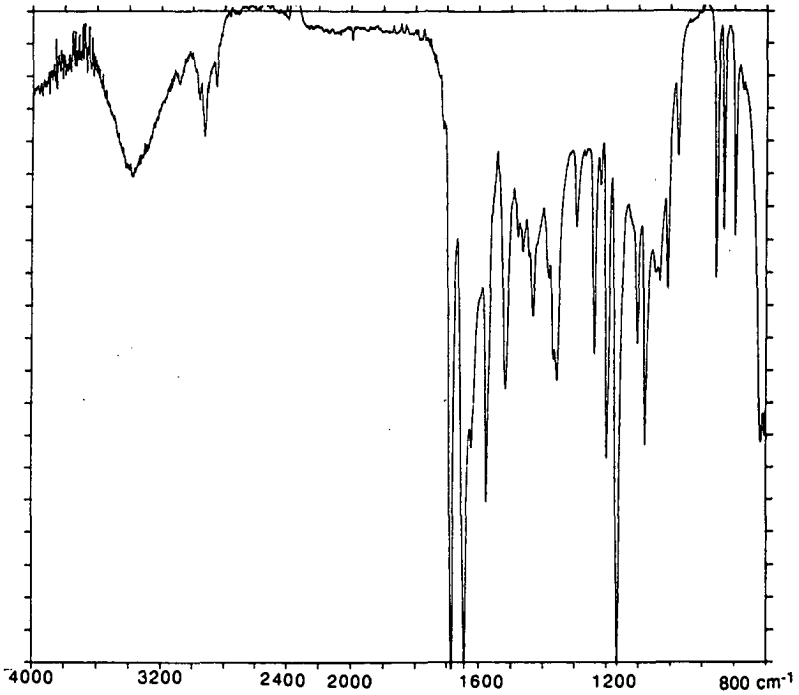


Fig. 37 IR de 4 (NaCl)

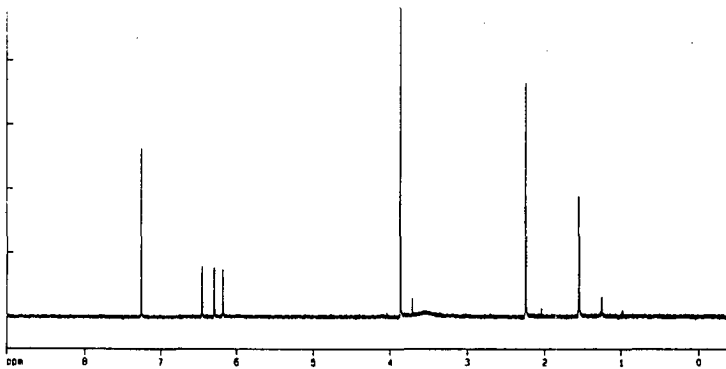


Fig. 38a <sup>1</sup>H-RMN de 4 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

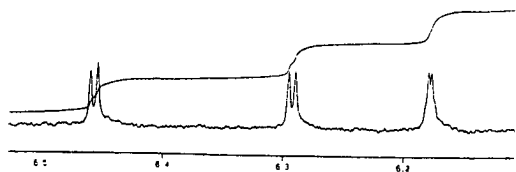


Fig. 38b

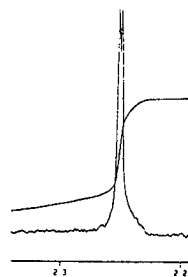


Fig. 38c

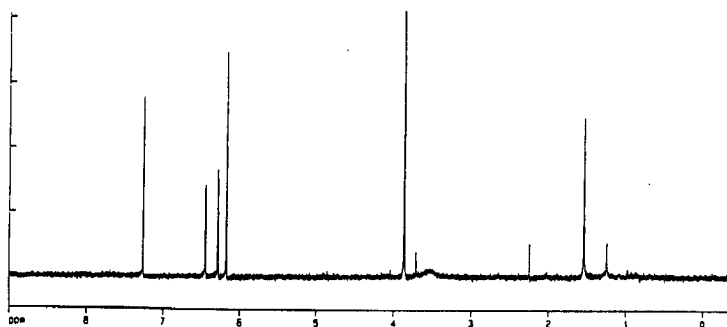


Fig. 38d  $^1\text{H}$ -RMN de 4, irradiation du signal à 2.25 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

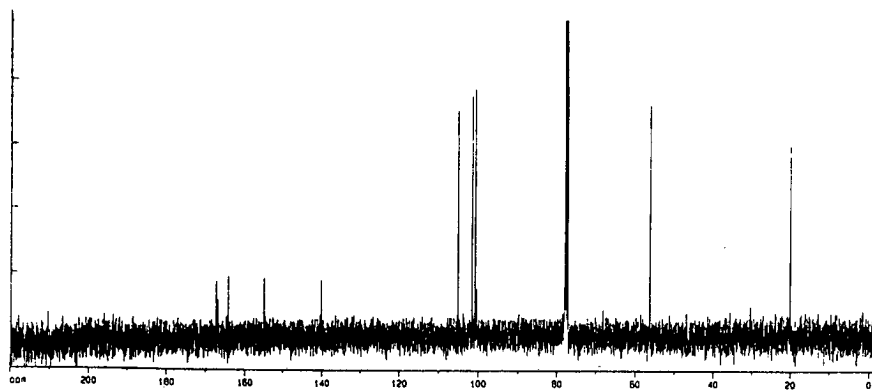


Fig. 39 Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de 4 (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

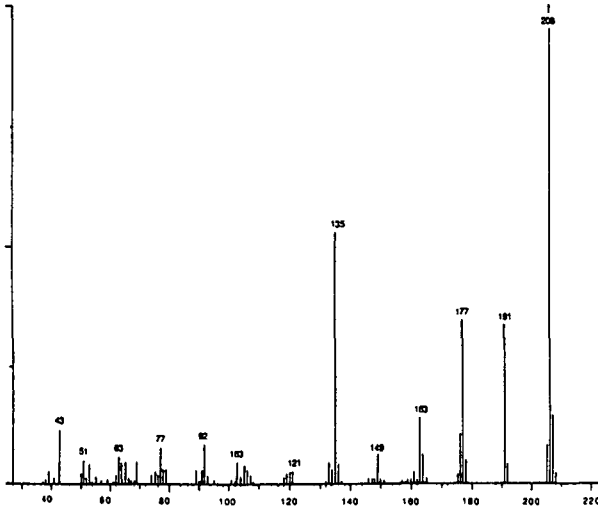


Fig. 40 Spectre de masse de 4 (EI, 70 eV)

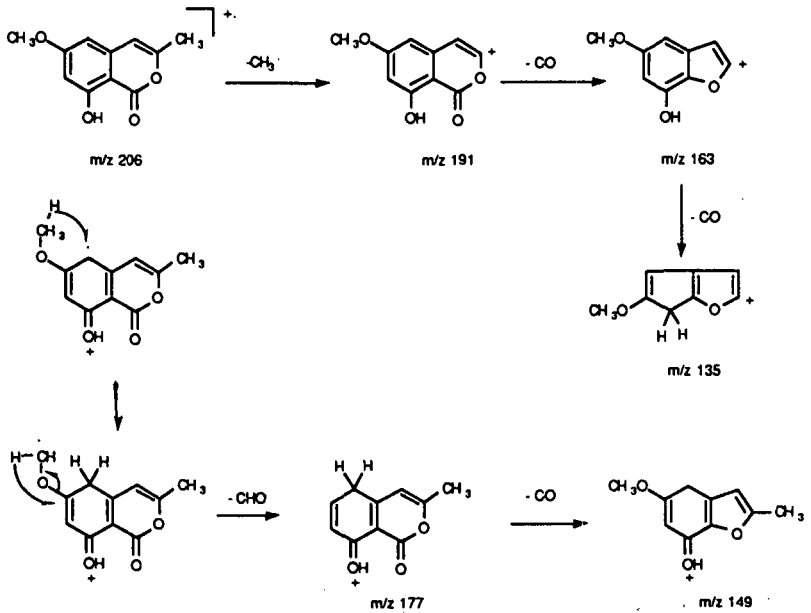


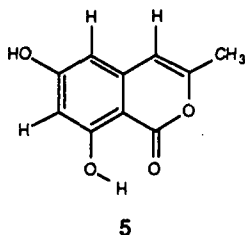
Schéma 7 Fragmentation de 4

Nous avons également mesuré le spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN de **4** (Fig. 39). Il montre 11 carbones :  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) = 167.5 C(1), 167.1 C(6), 164.4 C(8), 155.0 C(3), 140.2 C(4a), 105.3 C(4), 101.7 C(5), 100.9 C(7), 100.5 C(8a), 56.13 C(6)- $\text{OCH}_3$ , 20.10 C(9).

Le spectre de masse de **4** (Fig. 40) montre un pic moléculaire à  $m/z = 206$ . Nous proposons un mécanisme de fragmentation tel qu'il est décrit par le schéma 7.

Ce produit a été isolé pour la première fois par Curtis dans *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst [31]. Les auteurs ne donnent cependant pas de données spectrales, raison pour laquelle nous n'avons pas effectué de comparaisons.

### 9.2.5.1 Identification de la dihydroxy-6,8 méthyl-3 isocoumarine (5)



0.5 mg de 5 sont isolés sous forme d'un solide blanc amorphe après purification sur cellulose (n-ButOH/EtOH/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O; 5:2:1:1) R<sub>f</sub> = 0.55. On observe une coloration brune avec la *p*-nitroaniline diazotée (réactif des phénols), ce qui selon notre expérience dénote de la présence de deux groupes phénoliques. Le spectre UV est similaire à ceux des composés décrits précédemment et montre des maxima à  $\lambda = 241, 277, 289, 325$  nm (Fig. 41).

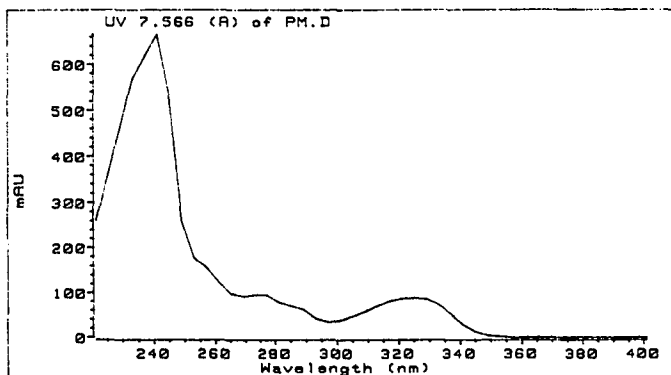


Fig. 41 UV de 5 (MeOH)

Le spectre infrarouge (Fig. 42) montre une  $\nu$  O-H à 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  cette largeur est typique d'associations intra et intermoléculaires. Les bandes  $\nu$  C-H du CH<sub>3</sub> apparaissent à 2960, 2922, 2848  $\text{cm}^{-1}$ . Les bandes entre 1681 et 1550  $\text{cm}^{-1}$  correspondent au  $\nu$  C=O de la lactone (qui forme une liaison hydrogène avec le phénol voisin) et aux vibrations des doubles liaisons  $\nu$  C=C du cycle et de la double liaison en C(3). La bande forte entre 1000 et 1100  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la  $\nu$  C-O de la lactone.

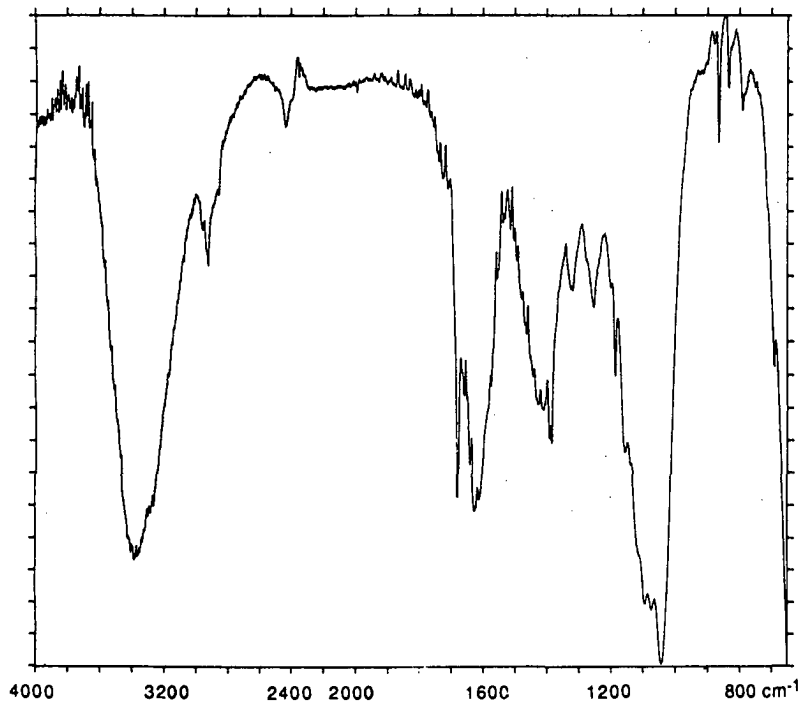


Fig. 42 IR de 5 (NaCl)

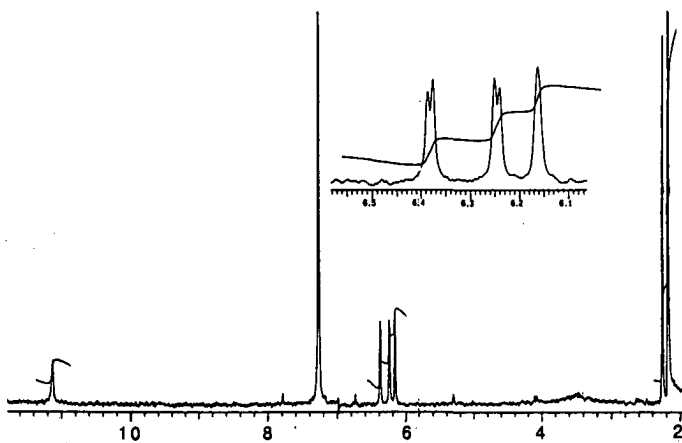


Fig. 43 <sup>1</sup>H-RMN de 5 (CDCl<sub>3</sub>/acétone-D<sub>6</sub>, 200 MHz)

Le spectre  $^1\text{H-RMN}$  (Fig. 43) de **5** présente des signaux à  $\delta = 11.13$  ppm (1H, s, C(8)-OH), 6.38 (1H, d,  $J = 2.12$  Hz, H-C(5)), 6.24 (1H, d,  $J = 2.24$  Hz, H-C(7)), 6.16 (1H, s. large, H-C(4)), 2.25 (3H, d,  $J = 0.9$  Hz,  $\text{CH}_3$  (9)). Par comparaison, le spectre de **5** mesuré dans l'acétone deutérée (pas représenté ici) donne un seul large multiplet pour les deux H aromatiques et H-C(4).

Ce produit a été isolé pour la première fois par R.F.Curtis dans *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst [31]. Cette référence ne présente pas de données RMN, nous avons donc comparé nos valeurs avec celles de la référence [60] (tableau 10).

position	$\delta$ $^1\text{H}$ de <b>5</b> (acétone- $\text{D}_6$ ) (400 MHz)	$\delta$ $^1\text{H}$ [60] (acétone- $\text{D}_6$ ) (300 MHz)
H-C(4),H-C(5), H-C(7)	6.38 (1H, large)	6.37 (3H, s)
$\text{CH}_3$ (9)	2.25 (3H, s)	2.22 (3H, s)
C(8)-OH	11.20 (s, 1H)	11.2 (1H, s)

Tableau 10 Comparaison des valeurs des  $^1\text{H-RMN}$  de **5** avec la littérature

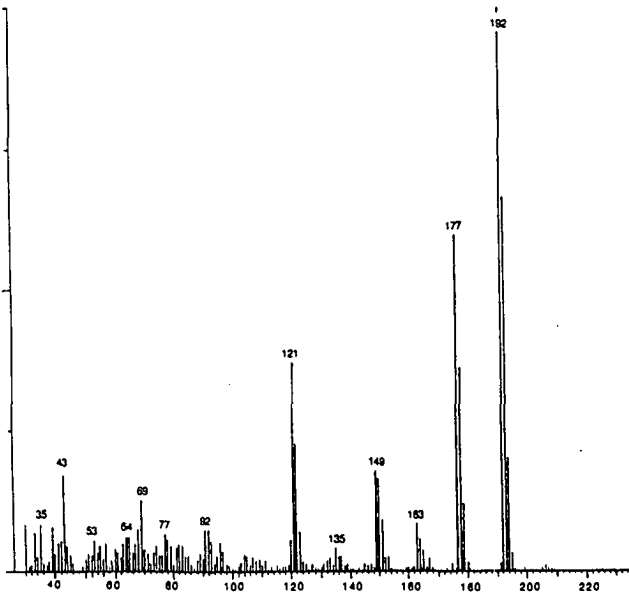


Fig. 44 MS de **5** (EI, 70 eV)

Le spectre de masse de 5 (Fig. 44) montre un pic moléculaire à  $m/z = 192$ . Nous proposons un mécanisme de fragmentation tel qu'il est décrit par le schéma 8.

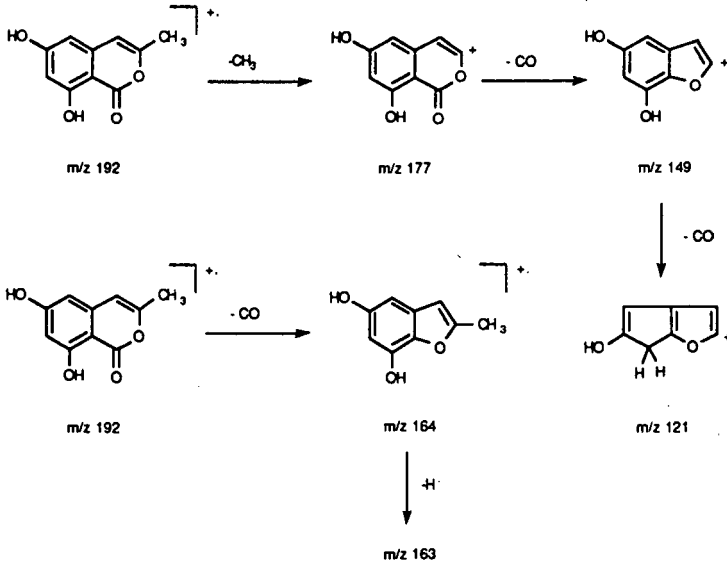


Schéma 8 Fragmentation de 5

### 9.2.5.2 Comparaison de 5 avec le produit de synthèse

Vu la faible quantité de 5 isolée, il ne restait à la fin des analyses que très peu de produit pour effectuer le test biologique. Pour cette raison, nous avons procédé à sa synthèse selon le mode opératoire décrit par Kendall et al [60] (Schéma 9).

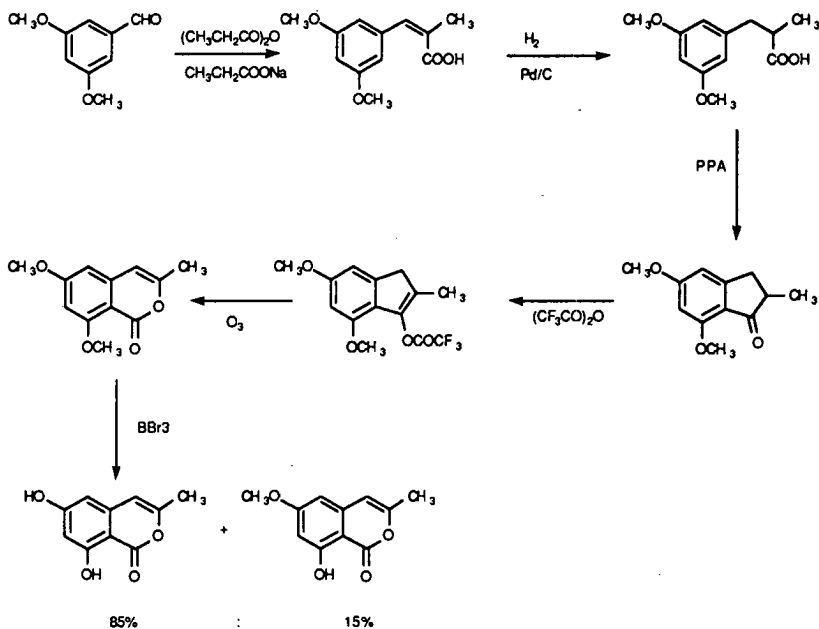


Schéma 9 Synthèse de 5

Après les six étapes de la synthèse (voir partie expérimentale), on obtient finalement 250 mg de dihydroxy-6,8 méthyl-3 isocoumarine (5) encore mélangée avec environ 15% de hydroxy-8 méthoxy-6 méthyl-3 isocoumarine (4). Ce qui met en évidence une déméthylation incomplète. Une comparaison des valeurs  $^1\text{H-RMN}$  et MS permet de constater que le produit naturel et le synthétique sont identiques. Le produit naturel et le synthétique ont aussi le même Rf (0.58) sur silicagel avec l'éluant  $\text{AcOEt}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10:3) et la même coloration brune au test de la *p*-nitroaniline diazotée. 5 est obtenu pur après chromatographie sur couche épaisse de silicagel (1mm) avec l'éluant toluène/acide acétique (25:5).

9.2.6 Résumé des données  $^1\text{H}$ -RMN et  $^{13}\text{C}$ -RMN des composés 1 à 5

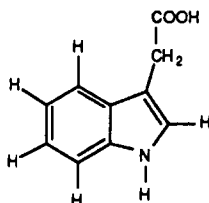
position	$\delta$ $^1\text{H}$ de 1 (400 MHz) acétone- $\text{D}_6$	$\delta$ $^1\text{H}$ de 2 (400 MHz) acétone- $\text{D}_6$	$\delta$ $^1\text{H}$ de 3 (400 MHz) acétone- $\text{D}_6$	$\delta$ $^1\text{H}$ de 4 (400 MHz) $\text{CDCl}_3$	$\delta$ $^1\text{H}$ de 5 (200 MHz) $\text{CDCl}_3$
H-C(4)	6.71 (t, J = 0.9)	6.54 (s)	6.64 (s)	6.18 (q, J = 0.9)	6.16 (s)
H-C(5)	6.66 (d, J = 2.2)	6.53 (d) (d, J = 2.1)	6.54 (d, J = 2.2)	6.45 (d, J = 2.3)	6.38 (d, J = 2.1)
H-C(7)	6.54 (d, J = 2.2)	6.49 (d) (d, J = 2.1)	6.45 (d, J = 2.2)	6.29 (d, J = 2.3)	6.24 (d, J = 2.1)
C(8)-OH	11.20 (s)	11.20 (s)	11.20 (s)	11.10 (s)	11.13 (s)
H-C(9)	4.45 (s)	2.7 (m)	4.44 (d, J = 0.8)	2.25 (s)	2.25 (s)

Tableau 11 Comparaison des  $\delta$  H (ppm) des composés 1 à 5

position	$\delta$ $^{13}\text{C}$ de 1 acétone- $\text{D}_6$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ de 2 acétone- $\text{D}_6$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ de 4 $\text{CDCl}_3$
C(1)	165.97	167.02	167.5
C(3)	157.68	156.52	155.0
C(4)	103.20	106.35	105.3
C(4a)	139.75	140.89	140.20
C(5)	101.91	103.29	100.9
C(6)	167.41	166.37	167.1
C(7)	100.59	102.11	100.9
C(8)	163.66	164.30	164.4
C(8a)	100.06	99.71	100.5
C(9)	60.27	43.81	20.10
C(6)- $\text{OCH}_3$	55.60	----	56.13

Tableau 12 Comparaison des  $\delta$   $^{13}\text{C}$  (ppm) des composés 1, 2, et 4

### 9.2.7 Identification de l'acide indole-3 acétique (6)



Acide indole-3 acétique (6)

Env. 0.5 mg de 6 sont isolés sous forme d'un solide blanc amorphe après purification sur silicagel (AcOEt/hex/ButOH/H<sub>2</sub>O/AcOH; 6:7:1.4:1:1) R<sub>f</sub> = 0.78. On observe une coloration rosée atypique avec la *p*-nitroaniline diazotée (réactif des phénols). Ce produit est isolé en mélange (impuretés marquées d'une croix), mais ses spectres de masse et de <sup>1</sup>H-RMN sont suffisamment clairs pour permettre une identification. Le spectre <sup>1</sup>H-RMN (Fig. 45a) de 6 dans l'acétone-D<sub>6</sub> présente un signal à δ = 10.2 ppm (1H, bosse, COOH), un ensemble de signaux dans la zone aromatique: δ (ppm) = 7.70 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.48 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.39 (1H, s. large), 7.20 (1H, t, J = 7.7 Hz), 7.12 (1H, t, J = 7.1 Hz), et un singulet à δ = 3.85 (2H, s, large, H-C(8)).

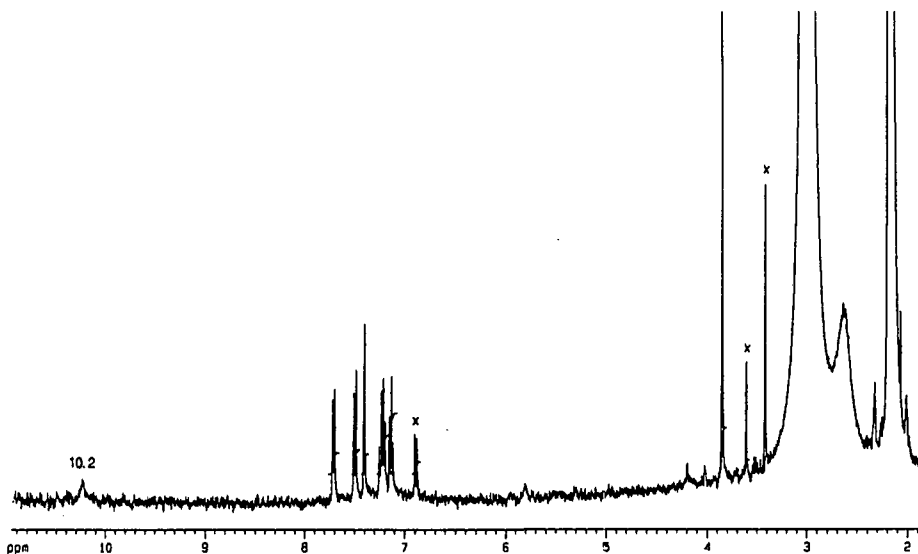


Fig. 45a <sup>1</sup>H-RMN de 6 (acétone-D<sub>6</sub>, 400 MHz)

La partie aromatique (Fig. 45b) montre que nous sommes en présence de quatre protons adjacents, et donc d'un cycle disubstitué en ortho. Le singulet à  $\delta = 7.39$  ppm provient du H-C(2) sur la double liaison. La largeur de ce signal, ainsi que celle du CH<sub>2</sub> à  $\delta = 3.85$  ppm provient du couplage allylique en <sup>4</sup>J entre ces deux entités. Par comparaison avec les valeurs tabulées [55], on voit que cet ensemble de signaux est très caractéristique des dérivés de l'indole (tableau 13).

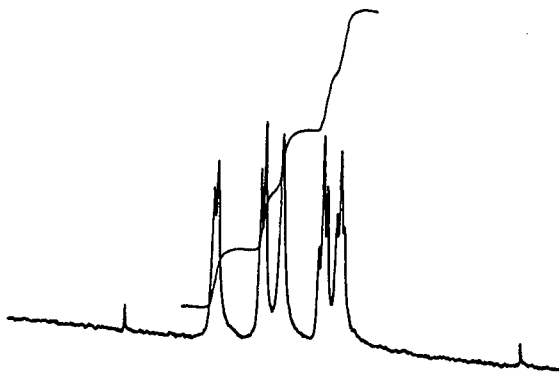


Fig. 45b <sup>1</sup>H-RMN de la partie aromatique de 6 (acétone-D<sub>6</sub>, 200 MHz)

position	$\delta$ <sup>1</sup> H (acétone-D <sub>6</sub> ) (400 MHz) de 6	$\delta$ <sup>1</sup> H [55] de l'indole (CDCl <sub>3</sub> )
H-C(1)	10.2	10.10
H-C(2)	7.39	7.26
H-C(3)	----	6.45
H-C(4)	7.70	7.55
H-C(5)	7.12	6.99
H-C(6)	7.20	7.09
H-C(7)	7.48	7.40

Tableau 13 Comparaison de 6 avec l'indole

Comme on le voit dans le tableau 13, l'accord est assez bon, moyennant un décalage systématique de env. = 0.1 ppm. Il n'est pas possible de trouver un correspondant pour le H3, et cela confirme que cette position est substituée dans le produit 6.

Le spectre de masse de 6 (Fig. 46) montre un pic moléculaire à  $m/z = 175$ . Cette masse impaire pour le pic moléculaire est annonciatrice d'un nombre impair d'atomes d'azote dans la molécule. Le pic de base est à 130 ( $M^+ - 45$ ), ce qui correspond à une perte d'un groupe carboxylique. Ce pic correspond au pic de base de la plupart des dérivés indoliques. Le schéma 10 explique la formation de ce ion.

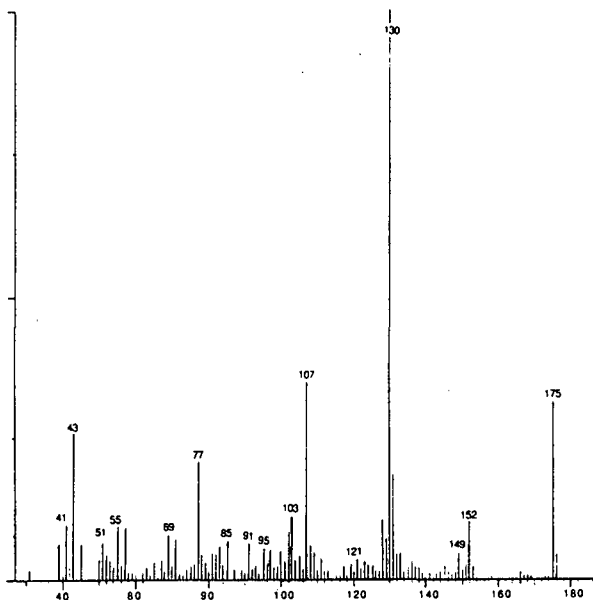


Fig. 46 Spectre de masse de 6 (EI, 70eV)

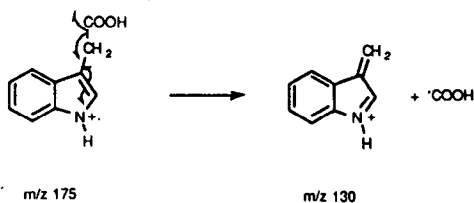
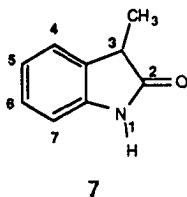


Schéma 10 Explication du ion 130

Ce produit est courant dans le règne végétal. En tant qu'auxine, il joue un rôle assez important chez les plantes. L'acide indole-3 acétique a déjà été isolé par Stoessl chez *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst [32].

### 9.2.8 Identification de la méthyl-3 indolinone-2 (7)



Env. 0.2 mg de 7 sont isolés sous forme d'un solide blanc amorphe après purification par CCM sur silicagel (toluène/dioxane/AcOH; 100:15:5) suivie d'une seconde purification sur silicagel avec AcOEt comme éluant ( $R_f = 0.36$ ). On observe une légère coloration rose atypique avec la *p*-nitroaniline diazotée (réactif des phénols). Notre expérience nous a permis de constater que les amines peuvent réagir en produisant ce genre de coloration. Le spectre infrarouge (Fig. 47) montre les  $\nu$  O-H et  $\nu$  N-H à  $3000-3600\text{ cm}^{-1}$ . Les  $\nu$  C-H du  $\text{CH}_3$  sont à  $2925$  et  $2855\text{ cm}^{-1}$ . La  $\nu$  C=O de la lactame est à  $1712\text{ cm}^{-1}$ . Cette valeur est proche de celle qui est donnée dans les tables pour les  $\gamma$  lactames et qui vaut  $1700\text{ cm}^{-1}$  [55]. A titre de comparaison, la même vibration est à  $1650\text{ cm}^{-1}$  pour les  $\delta$  lactames et à  $1745\text{ cm}^{-1}$  pour les  $\beta$  lactames.

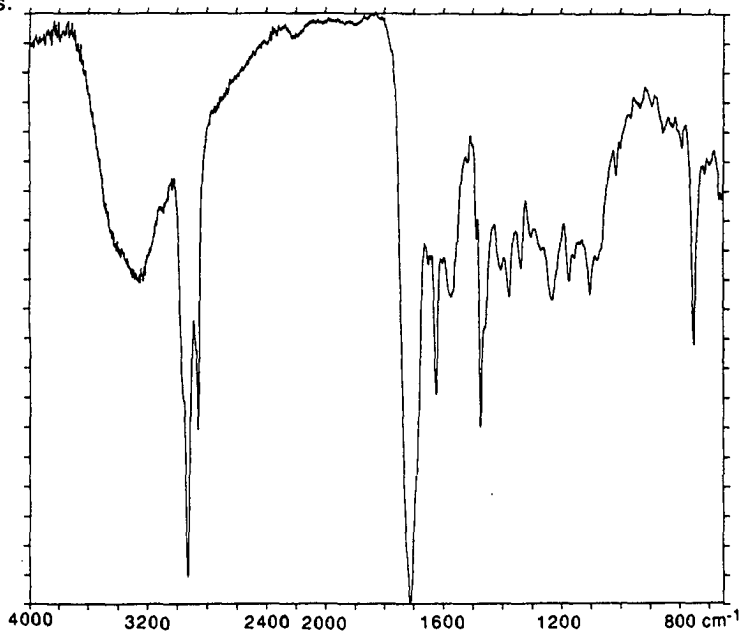


Fig. 47 Spectre infrarouge (NaCl) de 7

A  $1623\text{ cm}^{-1}$ , on voit la vibration de stretching des doubles liaisons du cycle. A  $1472\text{ cm}^{-1}$ , apparaît la bande de vibration de déformation  $\delta$  ip N-H. La bande correspondant à la  $\delta$  oop N-H est à  $750\text{ cm}^{-1}$ .

Il fut impossible, à cause des faibles quantités isolées, d'obtenir un spectre  $^1\text{H-RMN}$  de bonne qualité. Le spectre présenté (Fig. 48a, b) de **7** dans l'acétone- $\text{D}_6$  permet néanmoins de distinguer les signaux suivants:  $\delta$  (ppm) = 9.43 (1H, bosse, NH), 7.37 (1H, d,  $J = 7.3\text{ Hz}$ ), 7.29 (1H, t,  $J = 7.7\text{ Hz}$ ), 7.08 (1H, t.,  $J = 7.7\text{ Hz}$ ), 7.01 (1H, d,  $J = 7.3\text{ Hz}$ ). L'examen de la partie aromatique permet de conclure à une même substitution que dans le cas de **6**. Les signaux restants sont  $\delta$  (ppm) 3.49 (1H, q,  $J = 7.6\text{ Hz}$ , H-C(3)) et 1.51 (3H, d,  $J = 7.6\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ ). Ce dernier signal correspond au CH en position 3. Il forme un couplage vicinal avec le méthyle à  $\delta = 1.51\text{ ppm}$ .

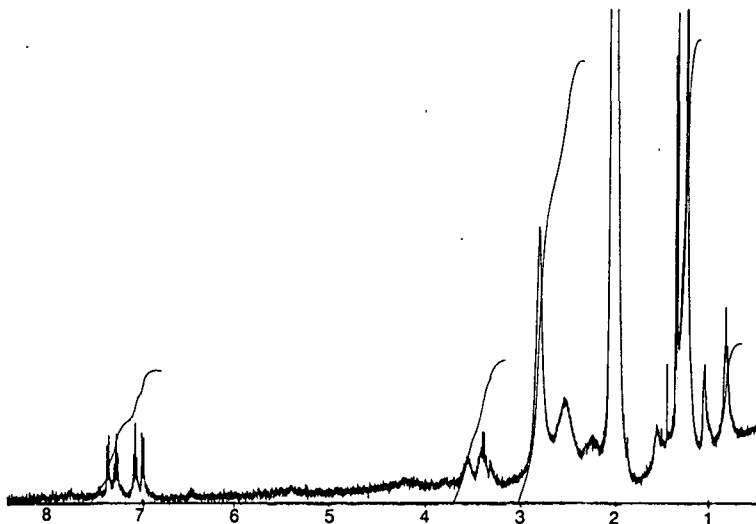


Fig. 48a  $^1\text{H-RMN}$  de **7** (acétone- $\text{D}_6$ , 400 MHz)

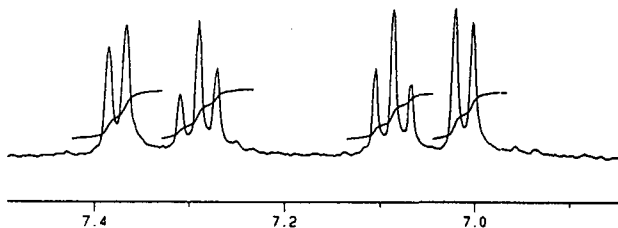


Fig. 48b  $^1\text{H-RMN}$  de **7** partie aromatique (acétone- $\text{D}_6$ , 400 MHz)

Le spectre de masse (Fig. 49) présente un ion moléculaire impair, ce qui dénote de la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote dans la structure. La perte de 15 ( $m/z = 132$ ) confirme la présence d'un méthyle. Une perte de 28 ( $m/z = 119$ ) indique la présence probable d'un carbonyle.

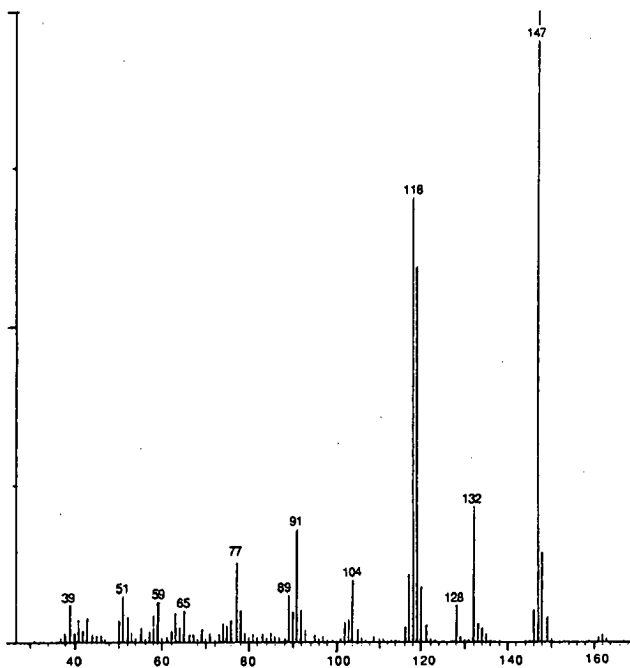


Fig. 49 Spectre de masse de 7 (EI, 70eV)

Nous proposons le mécanisme du schéma 11 pour l'explication des principales fragmentations.

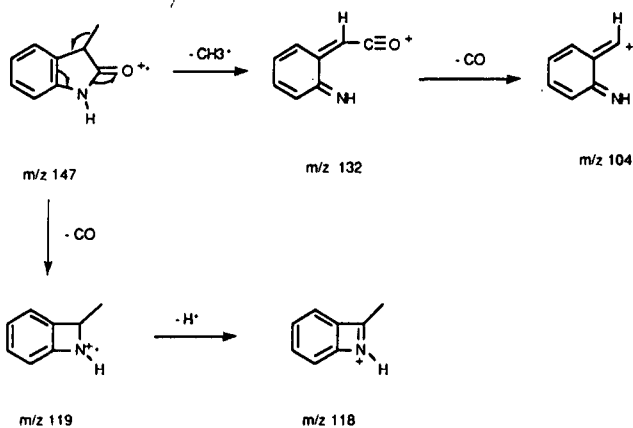
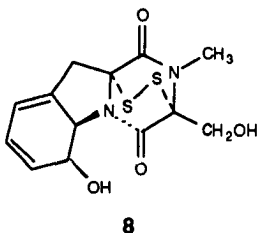


Schéma 11 Fragmentations de 7

Ce produit est cité comme étant un dérivé du métabolisme de l'acide indole-3-acétique (6) [61]. Il est très probable que dans notre cas également, le champignon forme 7 à partir de 6.

### 9.2.9 Identification de la gliotoxine (8)



Environ 0.15 mg de **8** sont isolés sous forme de longues aiguilles incolores après purification par HPLC sur phase inverse RP-18. L'éluant est un gradient de méthanol dans l'eau 50%-90% en 20 min,  $R_t = 3.74$  min.  $\lambda_{\max}$  (méthanol) = 265 nm (Fig. 50). Le  $R_f$  vaut 0.21 sur silicagel avec comme éluant toluène/dioxane/AcOH (100:15:5). **8** ne réagit pas avec la *p*-nitroaniline diazotée (réactif des phénols).

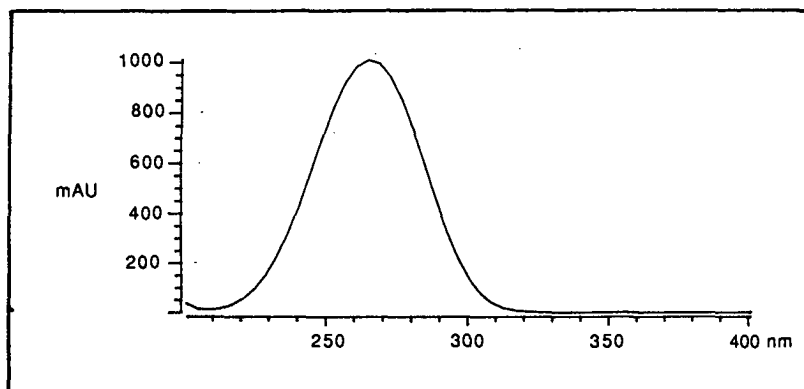


Fig. 50 UV de **8** (MeOH)

Vu la faible quantité isolée, nous avons limité les analyses subséquentes à deux spectres de masse il s'agit d'un spectre EI (Fig. 51) et d'un CI (Fig. 52). Nous avons pu procéder à une recherche dans la librairie de spectres du spectromètre, ce qui nous a permis de constater une parfaite corrélation des intensités entre l'échantillon **A** et le spectre de référence **B** qui est la gliotoxine. Le spectre d'ionisation chimique confirme ce résultat en montrant un pic à 327 ( $M^+ + H$ ).

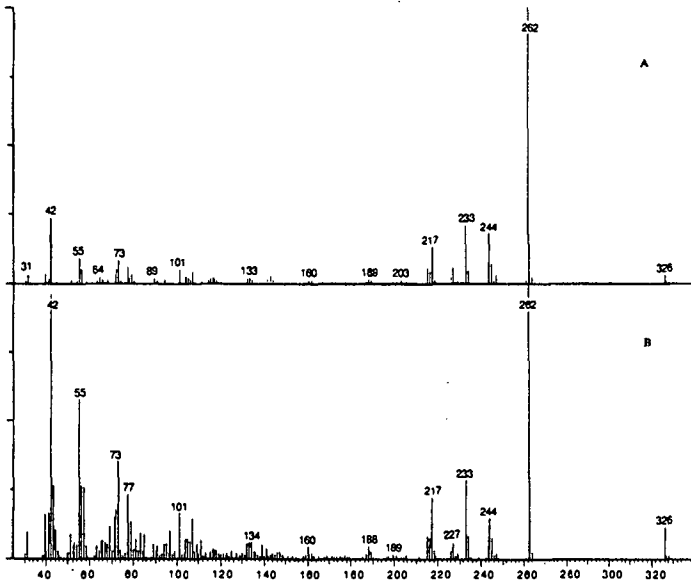


Fig. 51 MS de 8 (EI, 70eV) et comparaison avec la gliotoxine

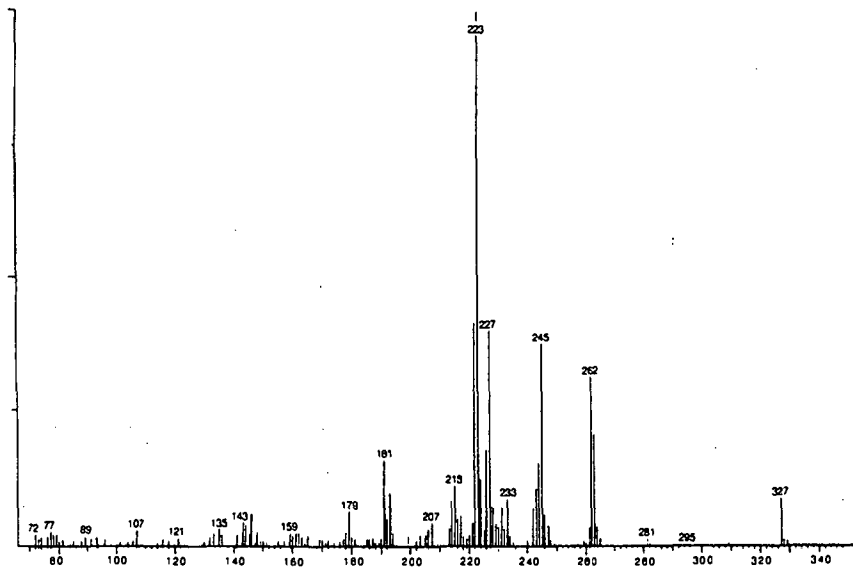
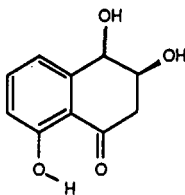


Fig. 52 MS de 8 (DCI,  $\text{NH}_3$ , +)

La gliotoxine a été isolée pour la première fois en 1936 par Weindling et Emerson [62] à partir d'une culture du champignon *Trichoderma lignorum* (Tode) un pathogène de *Rhizoctonia solani* Kühn., qui est un champignon vivant dans le sol. Depuis lors ce métabolite a également été isolé à partir de plusieurs autres sources fongiques.

### 9.2.10 Identification de la dihydro-3,4-trihydroxy-3,4,8-1(2H) naphthalénone (9)



9

1.3 mg de 9 sont récoltés sous forme d'un solide blanc amorphe après purification sur silicagel avec l'éluant AcOEt / Et<sub>2</sub>O/AcOH (50:10:2), R<sub>f</sub> = 0.13. Le produit absorbe l'UV à 254 nm et émet une fluorescence bleue à 366 nm. On observe une réaction colorée orange-brune au test de la *p*-nitroaniline diazotée (phénols), et une réaction colorée jaune (faible) au test de la 2,4 dinitrophénylhydrazine (cétones). Le spectre UV montre des maxima à  $\lambda$  (nm) = 216, 258, 332. (Fig. 53). Du fait de la faible quantité de produit, la valeur de la rotation spécifique n'a pas pu être déterminée précisément. Malgré cela nous avons pu établir qu'elle devait se situer entre -12 et -38 ° (c ~ 0.035, MeOH). La valeur mentionnée par [63] pour l' $[\alpha]_D$  de l'isomère *trans* de la dihydro-3,4-trihydroxy-3,4,8-1(2H) naphthalénone est -36° (MeOH, c = non-mentionnée), ce qui est comparable avec nos mesures.

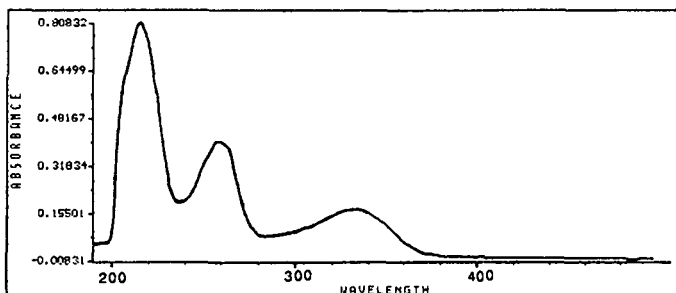


Fig. 53 UV de 9 dans le méthanol

Le spectre infrarouge (Fig. 54) montre les absorptions suivantes: 3000-3400 cm<sup>-1</sup> (ν -O-H), 2925 et 2855 cm<sup>-1</sup> (ν OC-H<sub>3</sub>), 1641 cm<sup>-1</sup> et 1712 cm<sup>-1</sup> (cétone cyclique à six membres, pont-H avec le phénol voisin), 1579 cm<sup>-1</sup> (ν C=C

aromatique),  $1456\text{ cm}^{-1}$ ,  $1339\text{ cm}^{-1}$  (O-H  $\delta$  *p*),  $1247\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  arC-O),  
 $1214\text{ cm}^{-1}$ ,  $1163\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  alC-O).

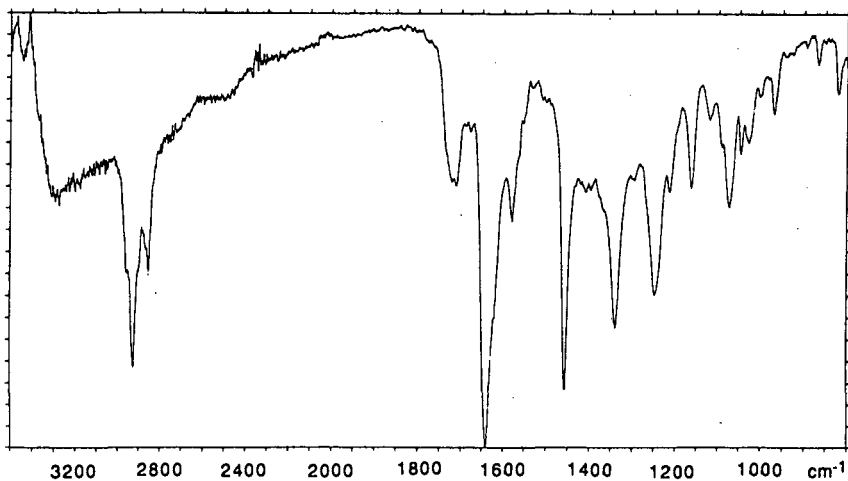


Fig. 54 IR de 9 (NaCl)

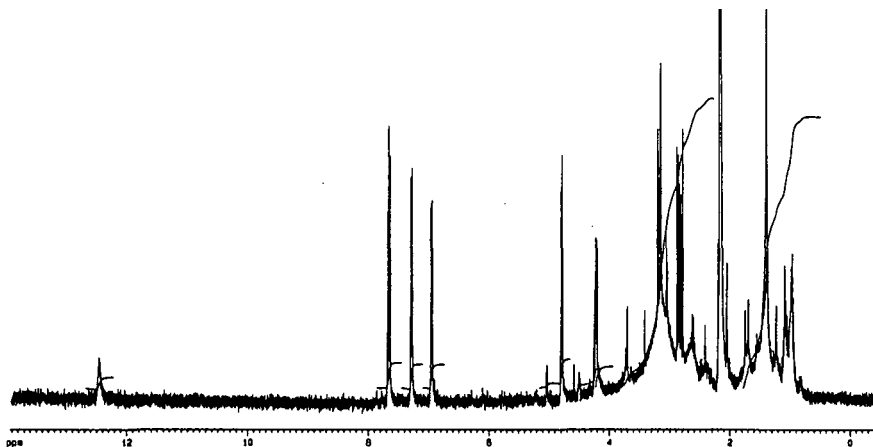


Fig. 55a  $^1\text{H}$ -RMN de 9 dans (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

Le spectre  $^1\text{H}$ -RMN (Fig. 55a, b, c, d) de 9 dans l'acétone- $\text{D}_6$  présente des signaux à  $\delta$  (ppm) = 12.46 (1H, bosse, OH-C(8)), 7.67 ppm (1H, dd,  $J = 8.3\text{ Hz}$ ,  $J = 7.6\text{ Hz}$ , H-C(6)), 7.29 (1H, dd,  $J = 6.5\text{ Hz}$ ,  $J = 0.9\text{ Hz}$ , H-C(5)), 6.96 (1H, dd,

$J = 8.3$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, H-C(7)), 4.79 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-C(4)), 4.23 (1H, m, H-C(3)), 3.18 (1H, dd,  $J = 17.2$  Hz,  $J = 4.1$  Hz, Hb-C(2)), 2.85 (1H, dd,  $J = 8.3$  Hz,  $J = 17.2$  Hz, Ha-C(2)). La présence d'un phénol ponté à  $\delta = 12.46$  ppm apporte la preuve que la cétone est branchée directement sur le cycle aromatique. Les couplages des trois H aromatiques ( $\delta = 7.67$ -6.96 ppm) permettent de déduire qu'ils sont adjacents. Le plus blindé d'entre eux doit logiquement se situer à côté du phénol. En effet, ce groupe renforce le blindage des H aromatiques dans l'ordre ortho > para > méta. Nous pouvons donc également placer les H à  $\delta = 7.67$  et 7.29 ppm en méta et respectivement para de ce phénol. Un "effet de toit" visible sur les signaux à  $\delta = 3.18$  (CHOH) et  $\delta = 2.85$  ppm (CH<sub>2</sub>) rend évident le couplage entre ces deux signaux.

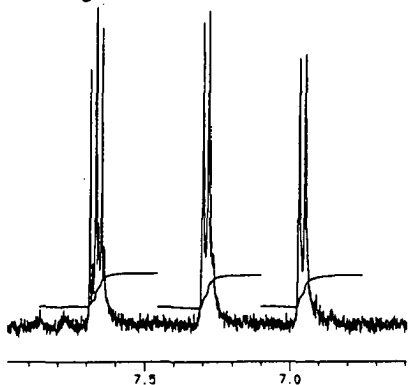
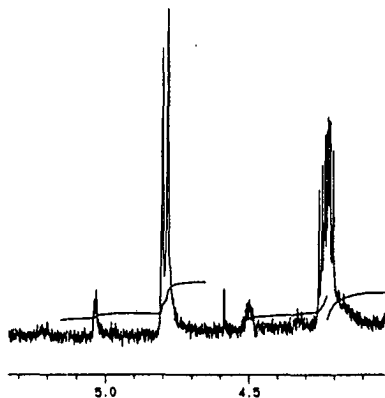


Fig. 55b



55c

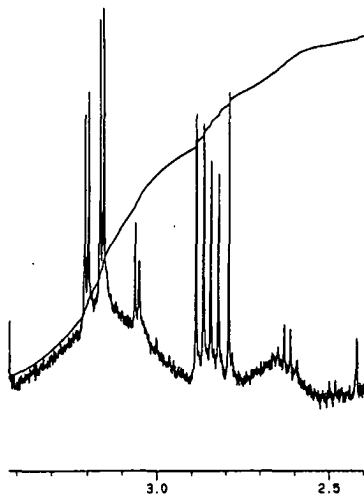


Fig. 55d

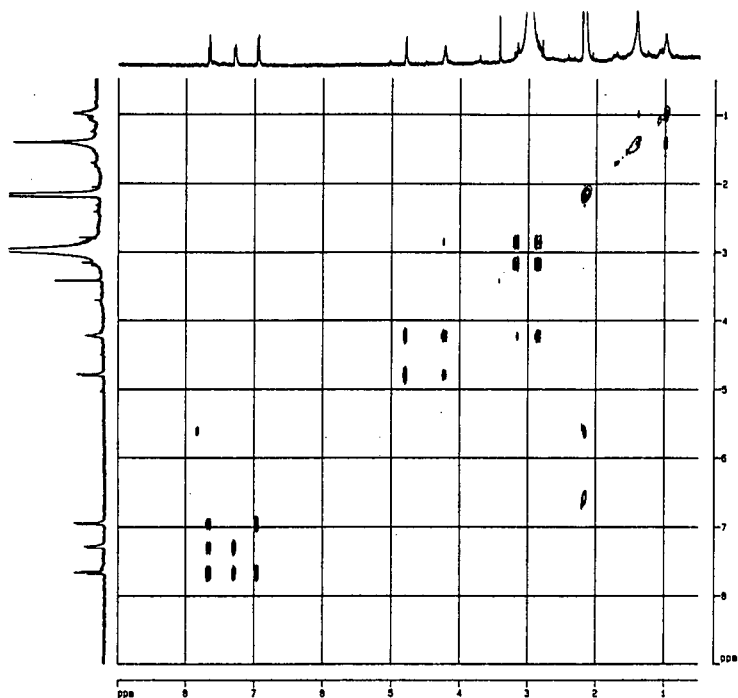


Fig. 56 COSY de 9 (400 MHz, acétone-D<sub>6</sub>)

position	$\delta$ <sup>1</sup> H de 9 (400 MHz)	$\delta$ <sup>1</sup> H [63] (non-mentionné)
Ha-C(2)	2.85 (1H, dd, J = 17.2 Hz, J = 8.76 Hz)	2.70 (1H, q, J = 17.5 Hz, J = 8.0 Hz)
Hb-C(2)	3.18 (1H, dd, J = 17.2 Hz, J = 4.1 Hz)	3.06 (1H, q, J = 17.5 Hz, J = 5.0 Hz)
H-C(3)	4.23 (1H, m)	4.07 (1H, m)
H-C(4)	4.79 (1H, d, J = 7.3 Hz)	4.66 (1H, d, J = 8.0 Hz)
H-C(7)	6.96 (1H, dd, J = 8.3 Hz, J = 0.9 Hz)	6.73 (1H, d, J = 7.5 Hz)
H-C(5)	7.29 (1H, dd, J = 6.5 Hz, J = 0.9 Hz)	7.15 (1H, d, J = 7.5 Hz)
H-C(6)	7.67 ppm (1H, dd, J = 8.3 Hz, J = 7.6 Hz)	7.54 (1H, t, J = 7.5)
C(8)-OH	12.46 (s, bosse, 1H)	---

Tableau 14 Comparaison de 9 (solvant acétone-D<sub>6</sub>) avec la référence [64] (solvant acétone-D<sub>6</sub>).

Le tableau 14 présente une comparaison des spectres  $^1\text{H}$ -RMN de **9** et de la dihydro-3,4-trihydroxy-3,4,8-1(2H) naphthalénone [63]. Le spectre de corrélation proton (COSY) (Fig. 56) permet de constater une corrélation entre les signaux suivants:  $\delta^1\text{H}$ - $\delta^1\text{H}$  (ppm) 7.67 - 7.29; 7.67 - 6.96; 4.79 - 4.23; 3.18 - 2.85. Cela nous permet de confirmer que le proton à  $\delta = 7.67$  ppm doit se trouver au centre des trois protons aromatiques adjacents. Comme le couplage vicinal H-C(3)-H-C(4) est fort, cela entraîne, selon la règle de Karplus, une position soit complètement éclipsée ( $\phi = 0^\circ$ ), soit totalement décalée ( $\phi = 180^\circ$ ) pour ces deux protons (et donc aussi pour les deux hydroxys). Pour des raisons d'encombrement stérique, nous pensons que la deuxième proposition, donc la structure trans, a le plus de probabilité d'exister.

La quantité isolée ne permettant que difficilement d'obtenir un spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN de bonne qualité, nous avons mesuré un spectre HETCOR (Fig. 57) afin d'obtenir les déplacements des  $^{13}\text{C}$  portant des atomes d'hydrogène (tableau 15).

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	7.67	7.29	6.96	4.79	4.23	3.18	2.85
$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	137.2	118.8	116.4	72.9	71.4	43.8	43.8

Tableau 15 Corrélations directes  $\delta^{13}\text{C}$  -  $\delta^1\text{H}$ .

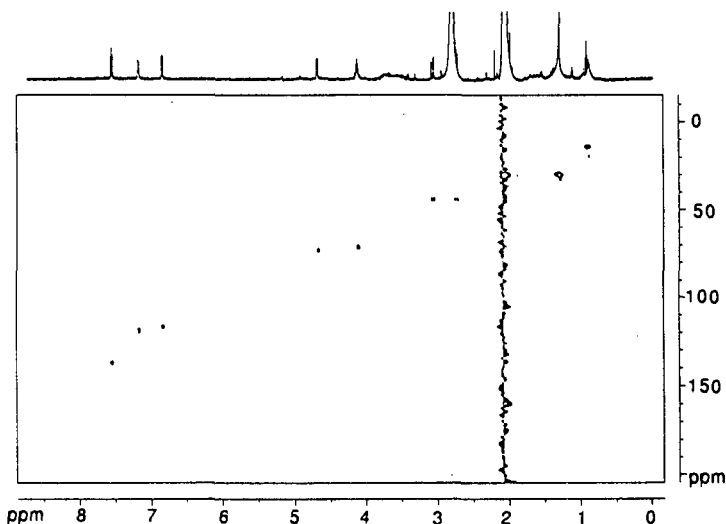


Fig. 57. HETCOR de **9** (600 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

Cette expérience montre que les signaux à  $\delta = 3.18$  et  $2.85$  ppm sont les deux corrélés avec le même carbone à  $\delta = 43.8$  ppm. Cela confirme que ces deux H sont géminaux.

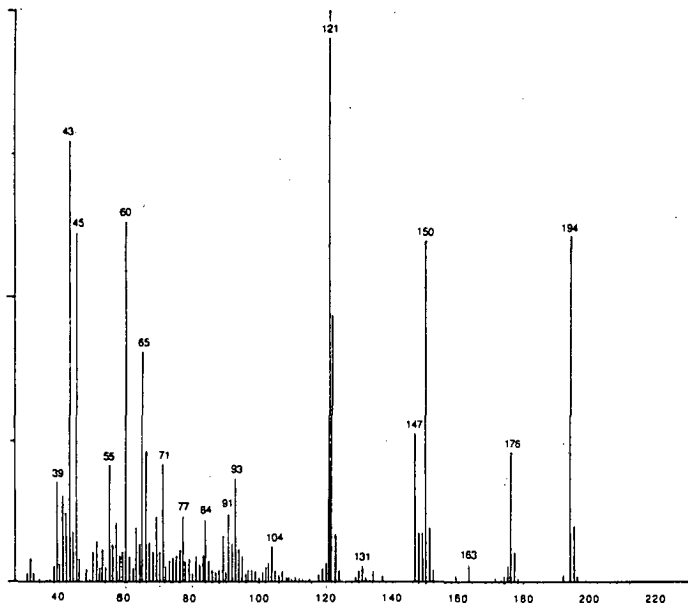


Fig. 58. MS (EI, 70 eV) de 9

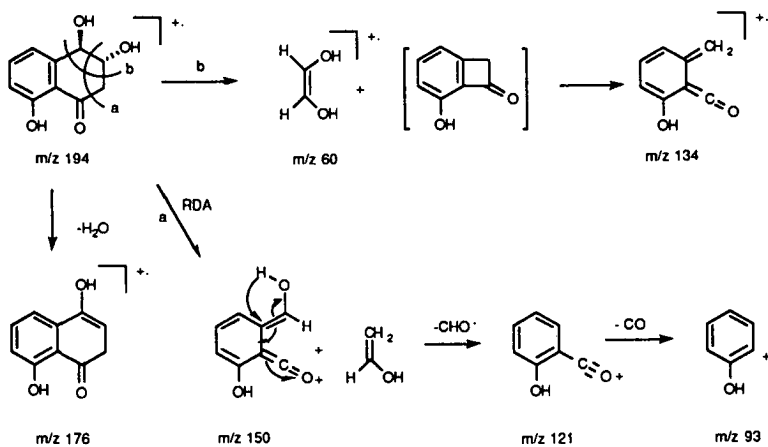


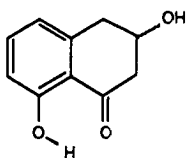
Schéma 12 Fragmentation de 9

Le spectre de masse (Fig. 58) montre un pic moléculaire à  $m/z = 194$ , cette masse est paire car il n'y a aucun atome d'azote dans la molécule. La forte intensité de ce pic (60.9 %) témoigne d'un produit massif, de structure cyclique, ne présentant pas de chaîne latérale. La perte de 18 (-  $H_2O$ ) s'explique par la déshydratation facile qui peut se produire à partir du ion moléculaire.

Nous proposons le mécanisme du schéma 12 pour l'explication des principaux ions de 9.

Ce produit a été décrit pour la première fois dans *Pyricularia oryzae* [63]. Il a été isolé depuis à partir d'autres sources fongiques, comme *Hypoxylon mammatum* [53].

9.2.11 Identification de la dihydro-3,4-dihydroxy-3,8-1(2H)-naphtalénone ou vermélone (**10**)



**10**

0.4 mg de **10** sont récoltés sous forme d'un solide blanc amorphe après purification sur silicagel avec l'éluant AcOEt (Rf = 0.27). Le produit absorbe l'UV à 254 nm et émet une fluorescence bleue-blanche à 366 nm. On observe une réaction colorée brune-ocre au test de la *p*-nitroaniline diazotée (phénols). Le spectre UV montre des maxima à  $\lambda$  (nm) = 218, 258, 334. (Fig. 59). Ce spectre est très similaire à celui de **9**. Cela provient d'une même substitution du cycle aromatique.

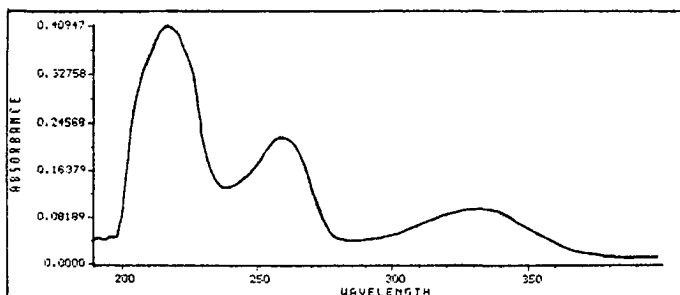


Fig. 59 UV (MeOH) de **10**

Le spectre  $^1\text{H}$ -RMN (Fig. 60a, b, c) montre 8 signaux aux déplacements de  $\delta$  (ppm) = 12.27 (1H, bosse, C(8)-OH), 7.41 ppm (1H, t, large, J = 7-8 Hz, H-C(6)), 6.84 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-C(5)), 6.75 (1H, d, J = 7.1 Hz, H-C(7)), 4.44 (1H, m, H-C(3)), 3.23 (1H, dd, J = 4Hz, J = 17-18Hz, Hb-C(2)), 2.95-3.05 (2H, m, Ha-C(2) et Ha-C(4)), 2.78 (1H, dd, J = 7.5, J = 16-17 Hz, Hb-C(4)). L'unique CHOH doit la complexité de son signal au fait qu'il est entouré de quatre voisins non-équivalents. Ces voisins sont les CH<sub>2</sub> en 2 et 4. Chaque proton de ces CH<sub>2</sub> forme un couplage géminel fort avec son jumeau. L'ampleur du couplage vicinal dépend, selon la règle de Karplus, de l'angle formé avec le H-C(3). L'attribution du spectre proton est faite par analogie avec celle du produit **11**.

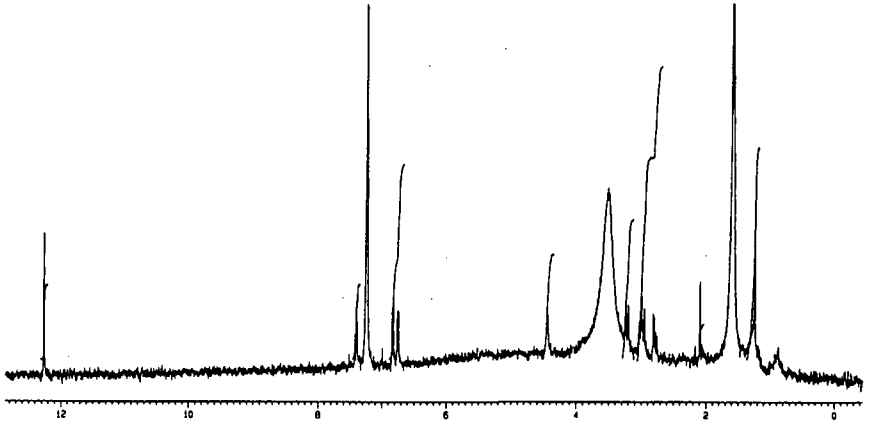


Fig. 60a  $^1\text{H}$ -RMN de **10** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

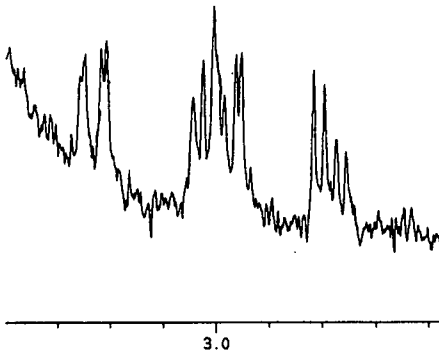


Fig. 60b  
 $^1\text{H}$ -RMN de **10** ( $\text{H}_{b,a}\text{-C}(2)$  et  $\text{H}_{a,b}\text{-C}(4)$ )

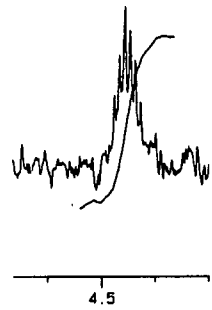


Fig. 60c  
 $^1\text{H}$ -RMN de **10** ( $\text{H-C}(3)$ )

Le tableau 16 montre une comparaison entre les déplacements chimiques de **10** et de la (-) verménone [64].

position	$\delta$ $^1\text{H}$ de <b>10</b> (400 MHz)	$\delta$ $^1\text{H}$ [64] (100 MHz)
Ha-C(2), Ha-C(4)	2.95-3.05 (2H, m)	2.75-2.95 (m)
Hb-C(2)	3.23 (1H, dd, J = 4Hz, J = 17-18Hz)	3.00-3.20 (m)
Hb-C(4)	2.78 (1H, dd, J = 7.5, J = 16-17 Hz)	
H-C(3)	4.44 (1H, m)	4.32 (1H, m)
H-C(7)	6.75 (1H, d, J = 7.1 Hz)	6.75 (1H, d, J = 7.3 Hz)
H-C(5)	6.84 (1H, d, J = 8.2 Hz)	6.75 (1H, d, J = 7.3 Hz)
H-C(6)	7.41 ppm (1H, t, J = 7-8 Hz)	7.45 (1H, t, J = 7.3 Hz)
C(8)-OH	12.27 (s, bosse, 1H)	12.42 (s, bosse, 1H)

Tableau 16 Comparaison entre **10** et la (-) vermélone

Le spectre de masse par impact électronique (EI) montre un pic moléculaire à  $m/z = 178$  (Fig. 61). Le spectre de masse par ionisation chimique (DCI,  $\text{NH}_3$ ) (Fig. 62) montre en plus un pic à 179 ( $M + H$ ) et à 196 ( $M + \text{NH}_4^+$ ). Ce résultat confirme le PM de 178 uma.

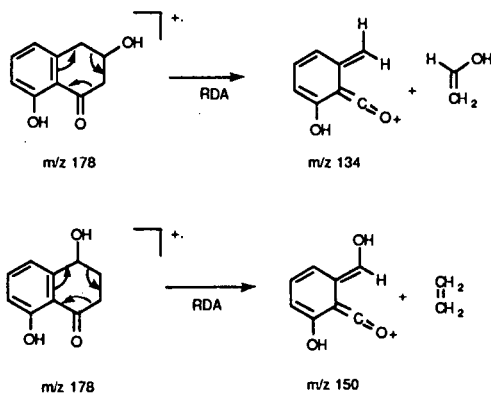


Schéma 13 Comparaison des fragmentations de la vermélone et de l'isoclérone.

Il existe un produit très voisin de la vermélone, qui est la dihydro-3,4-dihydroxy-4,8-1(2H) naphthalénone ou isoclérone, isolée à partir de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary [65]. Ce produit est hydroxylé en 4 plutôt qu'en 3. La spectrométrie de masse permet de distinguer ces deux produits d'un manière très simple grâce à la fragmentation de type Rétro-Diels-Alder (RDA) qui a lieu dans les deux produits.

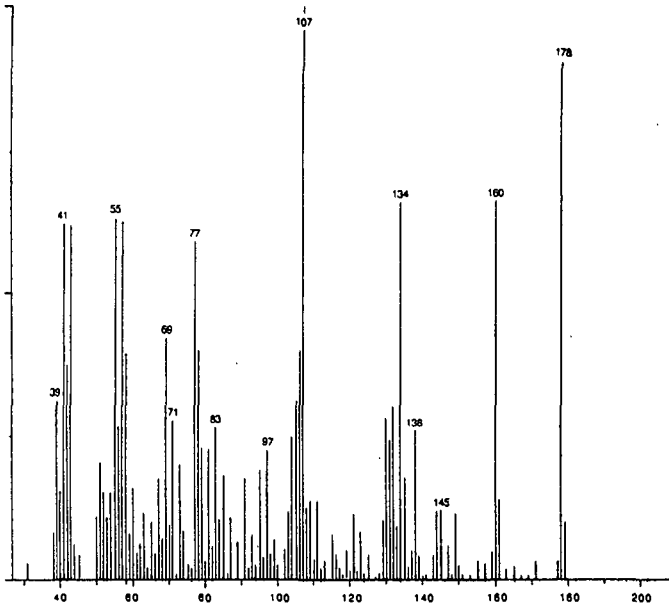


Fig. 61 MS (EI, 70eV) de 10

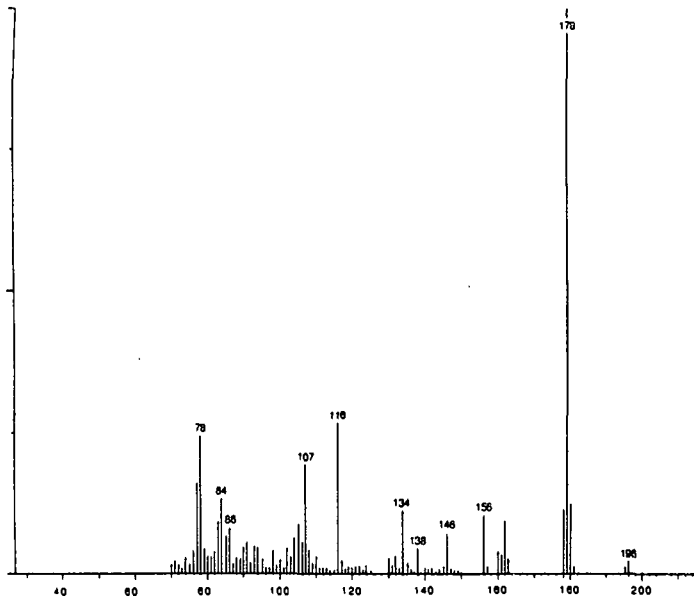


Fig. 62 MS (DCI, NH<sub>3</sub>, +) de 10

Les fragments formés seront très différents selon que le CHOH soit positionné en 3 ou en 4 (schéma 13). Le spectre EI montre un pic important (env. 70 %) à 134, ce qui prouve que **10** est la bien la vermélone.

Le mécanisme probable pour la fragmentation de **10** est montré par le schéma 14.

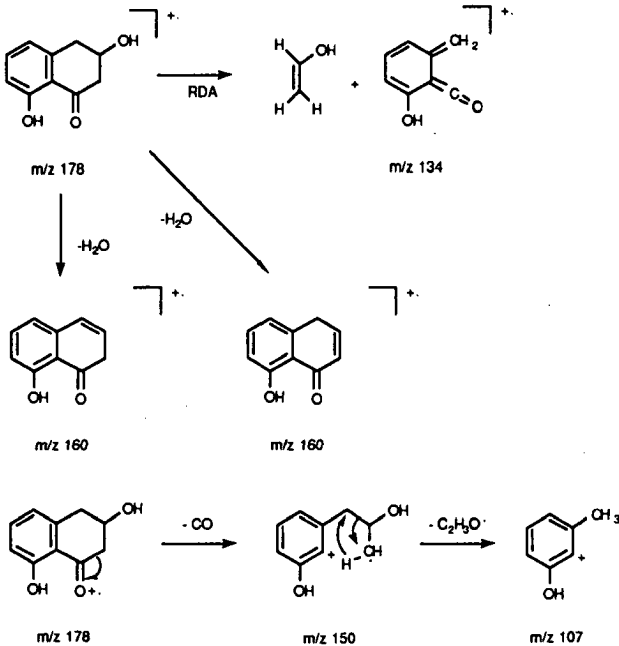
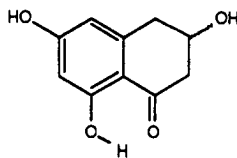


Schéma 14 Fragmentations de la vermélone

La (-)-dihydro-3,4-dihydroxy-3,8-1(2H)-naphtalénone ou (-) vermélone, a été isolée pour la première fois par Stipanovic et Bell [64] à partir de *Verticillium dahliae*.

### 9.2.12 Identification de la 3,6,8-trihydroxy tétralone ou scytalone (11)



11

Le composé 11 (env. 1 mg) se présente sous la forme de cristaux en étoile après purification par CCM sur silicagel avec l'éluant toluène/AcOEt/AcOH (5:9:1),  $R_f = 0.34$ , puis repurification par HPLC sur une phase inversée RP-18. Le programme pour la HPLC est un gradient linéaire de méthanol (A) dans une solution aqueuse  $5 \cdot 10^{-3}$  M d'acide formique (B): 40% (A)-90%(A) en 30 min, débit = 2 ml/min. Sur cellulose avec l'éluant n-ButOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>3</sub> (5:2:1:1), le  $R_f$  vaut 0.51. 11 est visible à l'UV à 254 nm et fluorescent à 366 nm. Il produit une réaction orange-brune avec le test de la *p*-nitroaniline diazotée (test des phénols) et une réaction jaune-brune avec le test de la 2,4 dinitrophénylhydrazine (test des cétones). La rotation spécifique  $[\alpha_D]$  (méthanol) montre une valeur clairement négative. La valeur exacte n'a pas pu être déterminée en raison du peu de substance disponible. La référence [66], ne mentionne pas de rotation spécifique, par contre la scytalone isolée de *Verticillium dahliae* [67] a été mesurée à  $[\alpha_D] = + 32^\circ$  (éthanol 95%). Il semble donc que nous ayons isolé l'autre antipode optique. Le spectre UV de 11 (Fig. 63) montre des maxima à  $\lambda =$  (nm) 233 (sh.), 281 et 317. Ce spectre est différent de ceux obtenus pour les tétralones 9 et 10 en raison d'une substitution différente de ces deux composés. Le pic qui était à 258 nm dans 10 est déplacé à 281 nm dans 11. Ce déplacement bathochrome est dû à l'introduction d'un hydroxyle supplémentaire sur le cycle aromatique.

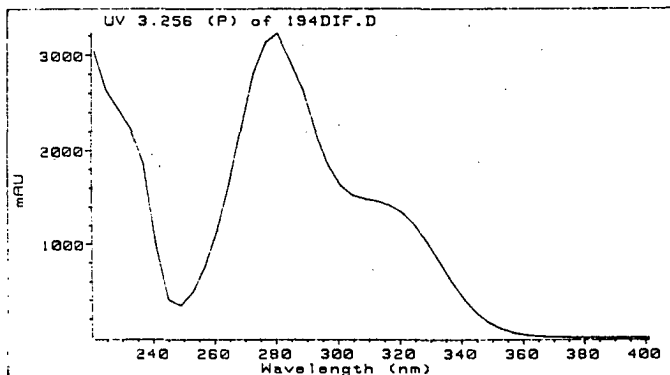


Fig. 63 UV de 11 (méthanol)

Le spectre  $^1\text{H-RMN}$  de **11** (Fig 64a, b, c) permet de constater la présence de sept signaux:  $\delta$  (ppm) = 12.91 (1H, s, C(8)-OH), 6.41 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-C(5)), 6.29 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-C(7)), 4.43 (1H, m, H-C(3)), 3.22 (1H, dd,  $J = 3.5$  Hz,  $J = 15.9$  Hz, Hb-C(2)), 2.94-3.01 (2H, m, Ha-C(2), Ha-C(4)), 2.75 (1H, dd,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 16.8$  Hz, Hb-C(4)).

Le faible déplacement chimique du système aromatique est dû aux hydroxyles en position 6 et 8. En effet, les protons en ortho de phénols subissent un blindage de  $\Delta\delta = -0.56$  ppm. Le cycle saturé qui contient la cétone ne possède qu'un CHOH à  $\delta = 4.43$  ppm. Ce CHOH est entouré de deux  $\text{CH}_2$ , chacun avec deux protons Ha et Hb non-équivalents. Il forme ainsi la partie X commune de deux spectres ABX. Sur chaque  $\text{CH}_2$ , Ha et Hb sont couplés entre eux de manière géminale (15-18. Hz) et forment avec le CHOH un couplage vicinal dont la constante dépend de l'angle dièdre formé entre ces protons.

Une comparaison avec le spectre  $^1\text{H-RMN}$  de la (-) vermélone (**10**) montre une parfaite identité entre **10** et **11** pour la partie du spectre comprise entre 0 et 5 ppm. Le tableau 17 compare les  $\delta$   $^1\text{H}$  de **11** et de la scytalone de la réf. [66].

Le spectre COSY proton de **11** (Fig. 65) montre une corrélation entre les signaux suivants  $\delta$   $^1\text{H}$ - $\delta$   $^1\text{H}$  (ppm): 6.41-6.29, 4.43-3.22, 4.43-2.97, 4.43-2.75, 3.22-2.97 et 2.97-2.75. Le fait qu'il n'y ait pas de corrélation entre les signaux à  $\delta = 3.22$  ppm et  $\delta = 2.75$  ppm prouve qu'il s'agit là de protons portés par des  $\text{CH}_2$  différents.

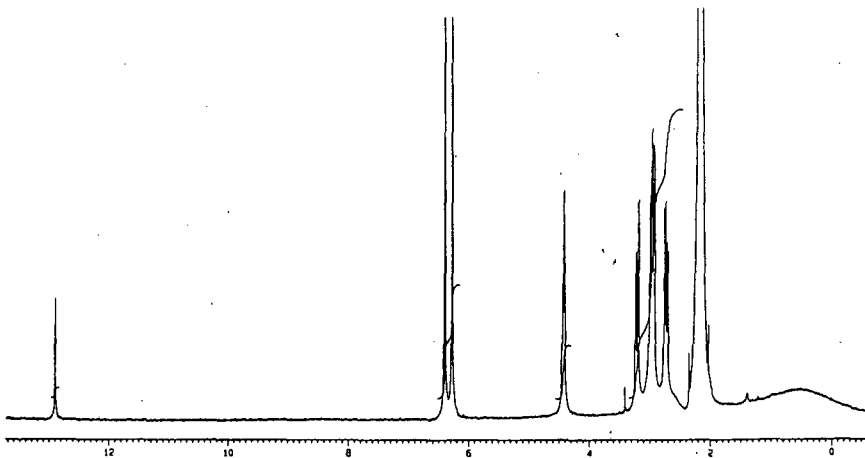


Fig. 64a  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ ) de **11**

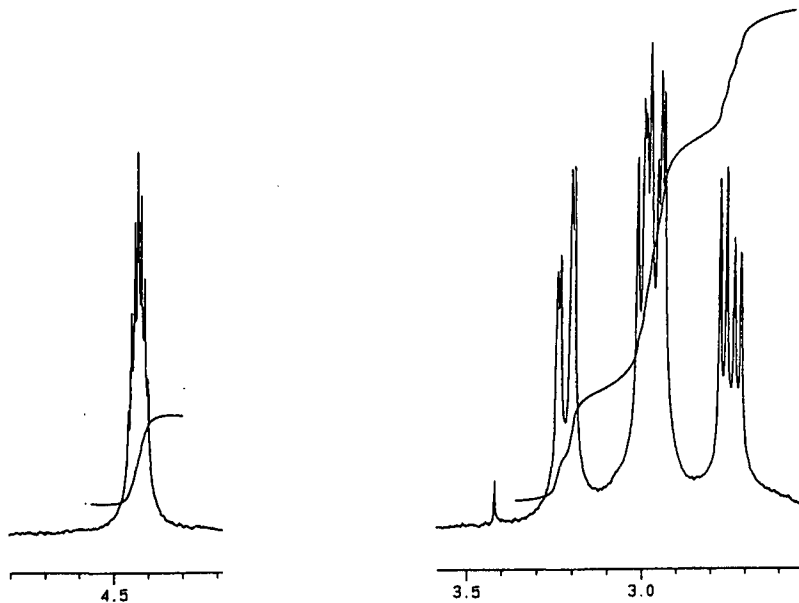


Fig 64b et c  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ ) de 11 (agrandissements)

position	$\delta$ $^1\text{H}$ de 11 (400 MHz) acétone- $\text{D}_6$	$\delta$ $^1\text{H}$ [66] (60 MHz) acétone- $\text{D}_6$
Hb-C(2)	3.22 (1H, dd, 3.5 Hz, 15.9 Hz)	
Hb-C(4)	2.75 (1H, dd, 7.7 Hz, 16.8 Hz)	Ha-C(2), Hb-C(2), Ha-C(4) Hb-C(4): 3.2-2.7 (4H)
Ha-C(2), Ha-C(4)	2.97 (2H, m)	
H-C(3)	4.43 (1H, m)	4.3 (1H, m)
H-C(5)	6.41 (1H, d, $J = 1.9$ Hz)	6.30 (1H, dd, $^1J = 2$ Hz, $^2J = 1$ Hz)
H-C(7)	6.29 (1H, d, $J = 1.9$ Hz)	6.15 (1H, d, $J = 2$ Hz)
C(8)-OH	12.27 (s, bosse, 1H)	12.8 (s, bosse, 1H)

Tableau 17 Comparaison entre les  $\delta$   $^1\text{H}$  de 11 et de la scytalone [66], l'attribution des signaux s'est faite par analogie avec l'attribution des  $\delta$   $^{13}\text{C}$  telle qu'elle est donnée dans [68].

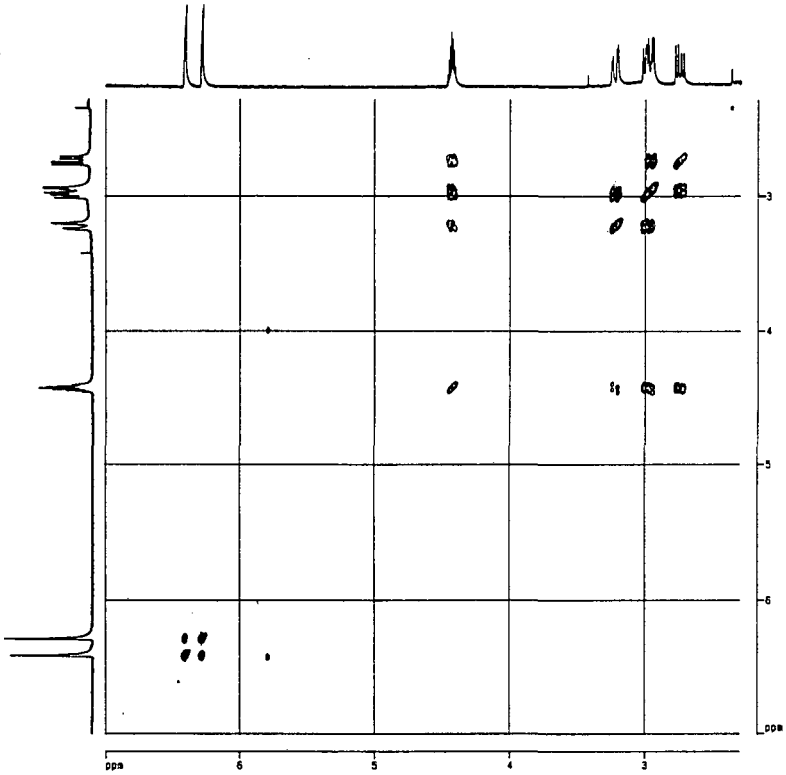


Fig. 65 COSY de 11 (400 MHz, acétone-D<sub>6</sub>)

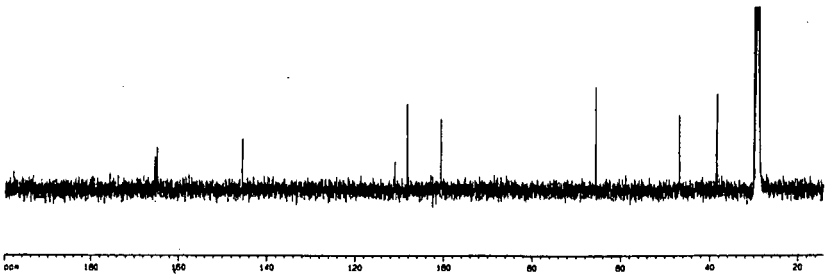


Fig. 66 <sup>13</sup>C-RMN de 11 (400 MHz, acétone-D<sub>6</sub>)

Le spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN (Fig. 66) montre des signaux à  $\delta$  (ppm) = 38.49, 46.84, 65.68, 100.63, 108.26, 111.07, 145.48, 164.83, 165.29. Le signal de la cétone (env. 200 ppm) n'est pas visible. Comme Findlay et Kwan [66] ne donnent que des valeurs pour le proton, nous avons dû comparer nos valeurs de  $\delta$   $^{13}\text{C}$  avec la référence [68]. Le tableau 18 compare les déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  de 11 et de la scytalone de la réf [68].

position	$\delta$ $^{13}\text{C}$ de 11 (100.6 MHz) acétone- $\text{D}_6$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ [68] (100 MHz) acétone- $\text{D}_6$
C(1)	----	202.0
C(2)	46.84	47.1
C(3)	65.68	66.3
C(4)	38.49	38.8
C(4a)	145.48	145.7
C(5)	108.26	108.9
C(6)	164.83	165.4
C(7)	100.63	101.3
C(8)	165.29	165.9
C(8a)	111.07	111.4

Tableau 18 Comparaison des  $\delta$   $^{13}\text{C}$  de 11 et de la scytalone [68]

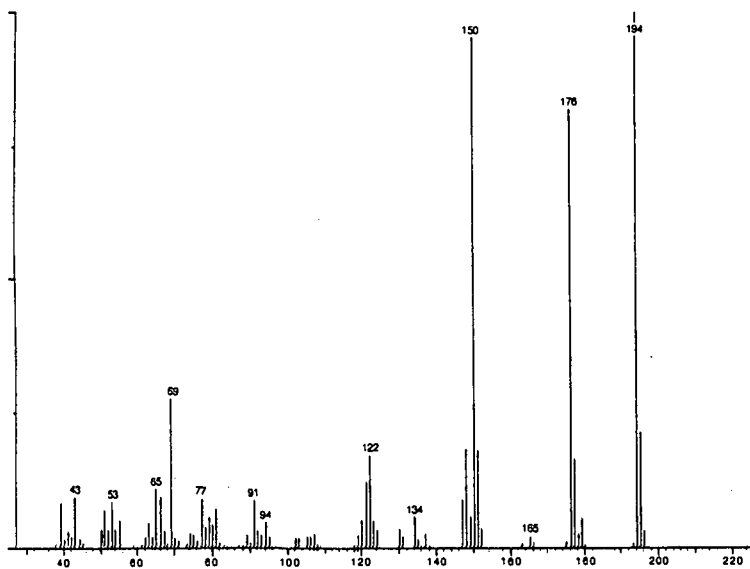


Fig. 67 MS de 11 (EI, 70 eV)

Le spectre de masse (Fig. 67), montre un ion moléculaire à  $m/z = 194$  et des fragments principaux à 176 ( $M^+ - 18, H_2O$ ) et 150 ( $M^+ - 44, CH_2CHOH, RDA$ ). Les principales fragmentations de 11 sont expliquées par le schéma 15.

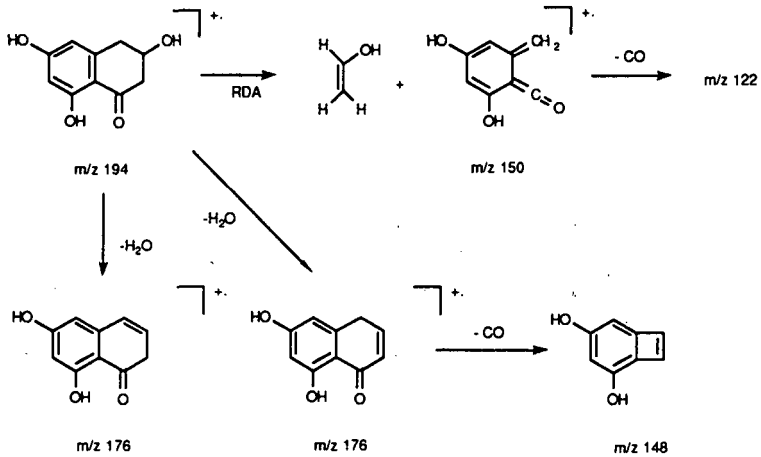
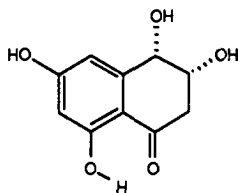


Schéma 15 Fragmentations de 11

Ce produit a été isolé pour la première fois par Findlay et Kwan [66] à partir d'un extrait du champignon *Scytalidium* FY. Les autres sources fongiques mentionnées dans la littérature sont *Ceratocystis minor* [56], *Phialophora lagerbergii* [68] et *Verticillium dahliae* [67].

9.2.13 1 Identification de la *cis*-hydroxy-4 scytalone (12)



12

Nous avons isolé 19.6 mg d'une substance cristalline jaunâtre fortement polaire après purification sur cellulose avec l'éluant n-ButOH/EtOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>3</sub> (5:2:1:1), R<sub>f</sub> = 0.26. 12 est visible à l'UV à 254 nm et fluorescent à 366 nm. Il produit une réaction brune avec le test de la *p*-nitroaniline diazotée (test des phénols). Rotation spécifique  $[\alpha]_{400}$  (22°C, éthanol, c = 0.49) = - 22° ± 1°. A titre de comparaison, l'isomère *trans* est à  $[\alpha]_{400}$  (éthanol) = - 75° [69], et l'isomère *cis* à  $[\alpha]_D$  (éthanol 95%) = - 56° [67].

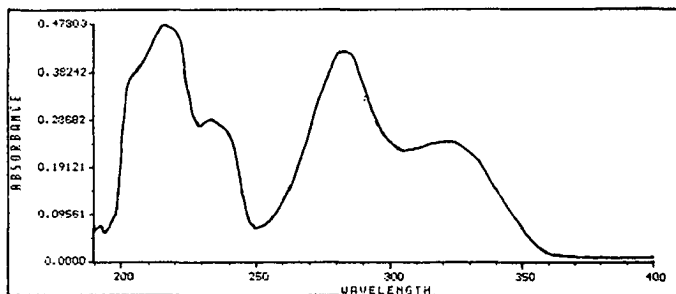


Fig. 68 UV de 12 (MeOH)

Le spectre UV de 12 (Fig. 68) montre des maxima à  $\lambda$  (nm) = 216, 234, 283 et 332. Ce spectre est différent de ceux obtenus pour les tétralones 9 et 10, mais très voisin de celui du composé 11, ce qui indique une même partie aromatique pour 11 et 12.

Le spectre infrarouge (Fig. 69) montre les absorptions suivantes: 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  -O-H), 2932  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-H aliph.), 1627  $\text{cm}^{-1}$  (cétone cyclique à six membres, pont-H avec le phénol voisin) et ( $\nu$  C = C aromatique), 1494 et 1461  $\text{cm}^{-1}$  (O-H  $\delta$  ip), 1268  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  arC-O), 1167  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  alC-O).

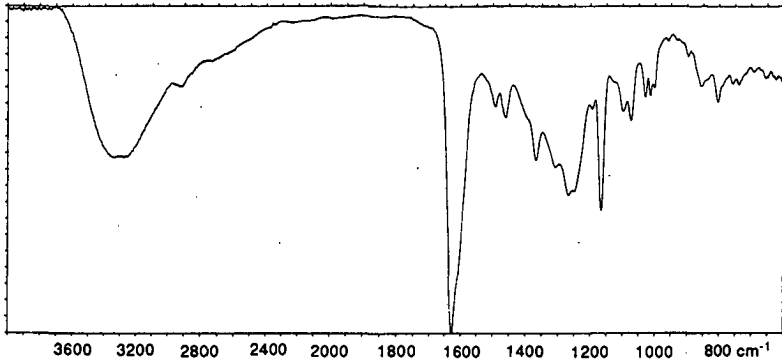


Fig. 69 IR de 12 (NaCl)

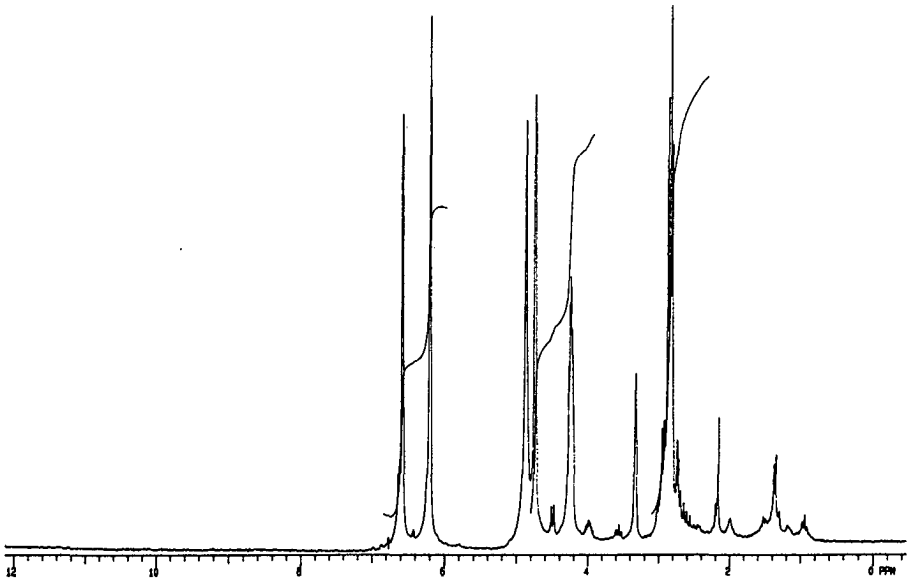


Fig. 70  $^1\text{H}$ -RMN de 12 (200 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

En plus d'un signal de phénol chélatant à  $\delta = 12.8$  (ppm) (généralement peu visible, C(8)-OH), le spectre  $^1\text{H}$  RMN de 12 montre six signaux (Fig. 70). A  $\delta$  (ppm) = 6.57 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-C(5)) et 6.19 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-C(7)) apparaissent les protons aromatiques. Leurs déplacements ainsi que le couplage confirment l'hypothèse faite à partir du spectre UV, selon laquelle la

partie aromatique de 11 et celle de 12 sont identiques. Les deux CHOH sont observés à  $\delta = 4.74$  ppm (1H, d,  $J = 2.6$  Hz, H-C(4)) et  $\delta = 4.23$  ppm (1H, m., H-C(3)). Le fait que les CHOH soient côte-à-côte explique que le signal du CHOH à  $\delta = 4.74$  ppm soit un doublet (un seul voisin). Le CHOH à  $\delta = 4.23$  ppm se trouve par contre entre un CHOH et le CH<sub>2</sub>. Cette disposition produit un multiplet du genre ddd. Le CH<sub>2</sub> produit un signal complexe à  $\delta = 2.83$  ppm (2H, m, H-C(2)). Ce signal ressemble à un doublet déformé. Un des hydroxyles aliphatiques est visible à  $\delta = 4.86$  ppm (1H, s large, OH).

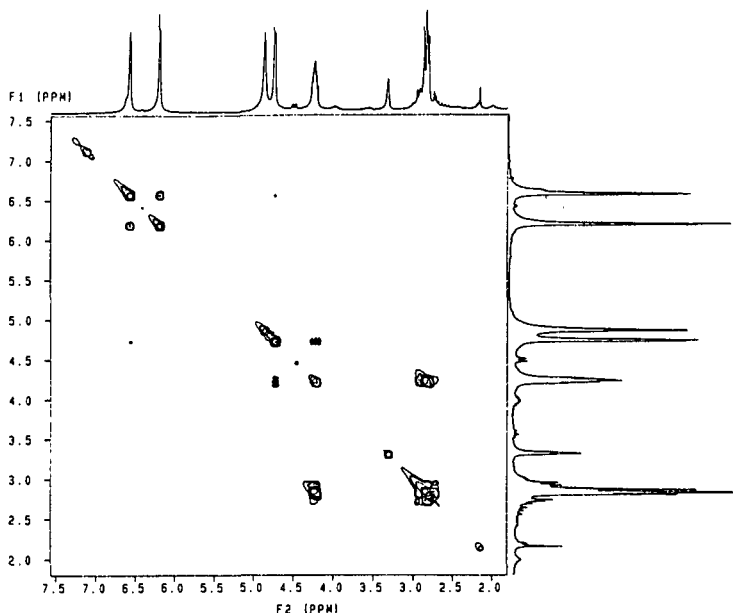


Fig. 71. Spectre proton COSY (200 MHz, acétone-D<sub>6</sub>) de 12

position du signal irradié $\delta$ (ppm)	aspect des signaux				
	2.83 (H-C(2))	4.23 (H-C(3))	4.74 (H-C(4))	6.19 (H-C(7))	6.57 (H-C(5))
spectre non-irradié	m	m	d, $J = 2.6$ Hz	d, $J = 2.2$ Hz	dd ou d large, $J = 2.2$ Hz
4.74 (H-C(4))	d, $J \sim 5$ Hz.	t, $J \sim 5$ Hz	----	d, $J = 2.2$ Hz	d, $J = 2.2$ Hz
4.23 (H-C(3))	s	----	s	d, $J = 2.2$ Hz	dd ou d large, $J = 2.2$ Hz
2.83 (H-C(2))	----	d, 2.7Hz	d, 2.7Hz	d, $J = 2.2$ Hz	dd ou d large, $J = 2.2$ Hz

Tableau 19 Découplage homonucléaire (400MHz, acétone-D<sub>6</sub>)

Le spectre COSY de **12** (Fig. 71) permet de confirmer la position centrale du CHOH à  $\delta = 4.23$  ppm. En effet, il existe une corrélation entre  $\delta$  (ppm) = 4.23-4.74, 4.23-2.83, mais rien entre  $\delta$  (ppm) 4.74-2.83. Il faut signaler qu'il existe une faible tache de corrélation (et donc un faible couplage en  $^4J$ ) entre le CHOH à  $\delta = 4.74$  ppm et le proton aromatique à  $\delta = 6.57$  ppm. Afin d'obtenir des données supplémentaires sur les couplages, nous avons effectué plusieurs expériences de découplage homonucléaires, dont les résultats sont indiqués dans le tableau 19. Nous déduisons de ces expériences que le signal à  $\delta = 4.23$  ppm est couplé avec  $\delta = 4.74$  ppm ( $J = 2.7$  Hz), et avec  $\delta = 2.83$  ppm ( $J = 5$  Hz). Le signal à  $\delta = 6.57$  ppm est couplé avec  $\delta = 6.19$  ppm ( $J = 2.2$  Hz) et forme un petit couplage ( $J < 1$ Hz) avec  $\delta = 4.74$  ppm.

Le spectre  $^{13}\text{C}$  de **12** (Fig. 72) montre 10 carbones à  $\delta$  (ppm) = 201.5 (C1), 165.7 (C8), 165.5 (C6), 148.4 (C4a), 110.2 (C8a), 108.1 (C5), 101.9 (C7), 70.67 (C4), 70.12 (C3), 43.40 (C2). Le signal du  $\text{CH}_2$  à  $\delta = 43.40$  ppm n'est pas un pic fin comme les autres pics, mais apparaît sous forme d'un massif. Nous pensons que cela peut être dû soit à la deutération accidentelle de cette position, soit à l'existence d'un équilibre cétone-énol dans **12**. L'attribution des déplacements des carbones du cycle aromatique se fait par comparaison avec **11**, qui a la même partie aromatique.

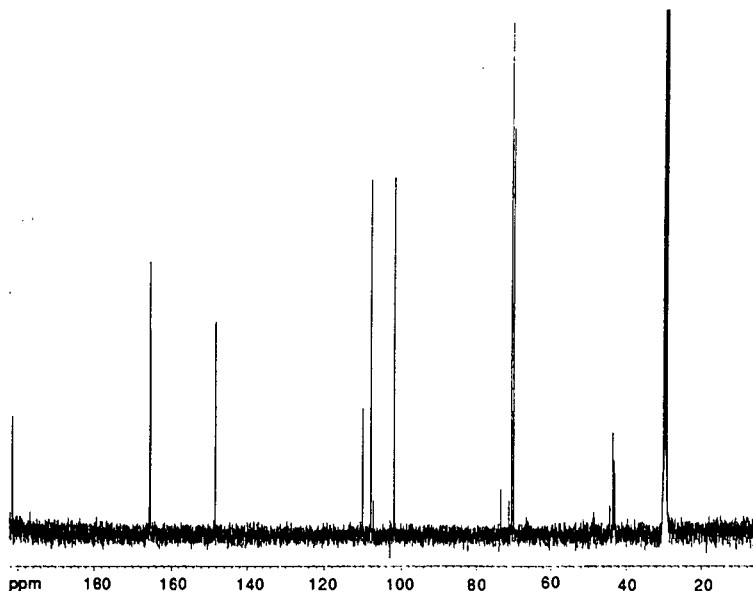


Fig. 72 Spectre  $^{13}\text{C}$  de **12** (100.6 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

L'expérience de DEPT (Fig. 73) montre la présence de cinq carbones protonés, dont 4 CH à  $\delta$  (ppm) = 108.1, 101.9, 70.67, 70.12 et un  $\text{CH}_2$  à  $\delta =$

43.40 ppm. L'expérience HETCOR (Fig. 74) permet de corréler les signaux  $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^1\text{H}$  (ppm) suivants: 43.40-2.83, 70.12-4.23, 70.67-4.74, 101.9-6.19, 108.1-6.57.

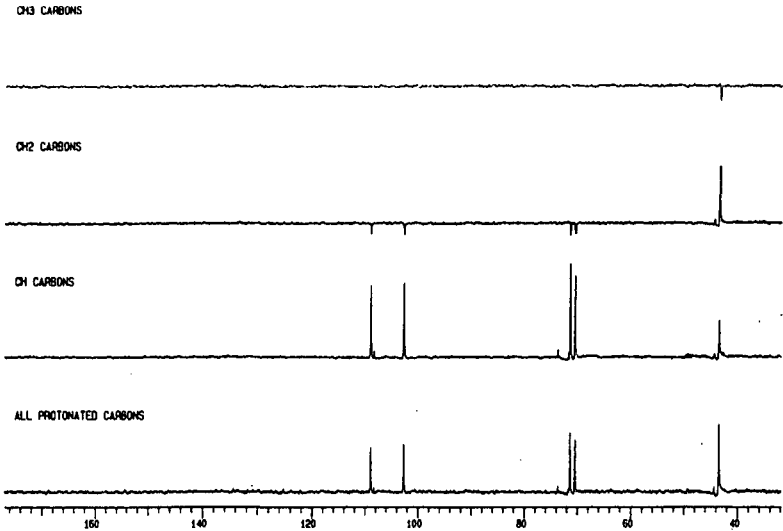


Fig. 73 DEPT de 12 (50 MHz, acétone-D<sub>6</sub>)

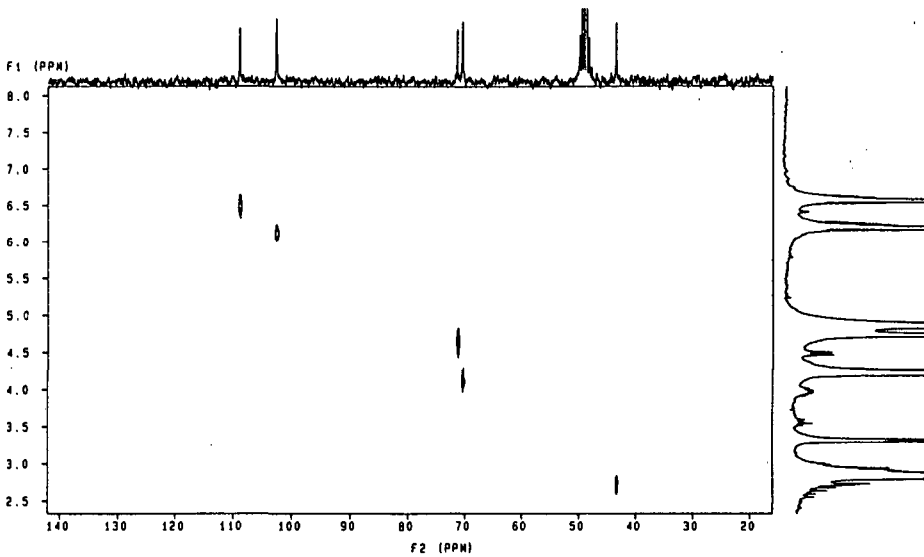


Fig. 74 HETCOR courtes distances de 12 (50 MHz, acétone-D<sub>6</sub>)

Les  $^{13}\text{C}$  qui portent les CHOH à  $\delta$  (ppm) = 4.23 et 4.74 sont respectivement à  $\delta$  (ppm) = 70.12 et 70.67, et le  $\text{CH}_2$  à  $\delta = 2.83$  ppm est porté par le  $^{13}\text{C}$  à  $\delta = 43.40$  ppm. Afin de prouver que le  $\text{CH}_2$  est bien en position 2, nous avons pratiqué une expérience de HETCOR longues-distances (Fig. 75). Cette expérience permet de connaître les corrélations entre un  $^{13}\text{C}$  et les  $^1\text{H}$  situés sur des  $^{13}\text{C}$  voisins. En d'autres termes, cette expérience fait apparaître les corrélations entre les protons et les  $^{13}\text{C}$  qui sont couplés en  $^2\text{J } ^{13}\text{C}-^{12}\text{C}-^1\text{H}$  ou en  $^3\text{J } ^{13}\text{C}-^{12}\text{C}-^1\text{H}$ . Cela permet de tirer des conclusions sur le voisinage entre carbones.

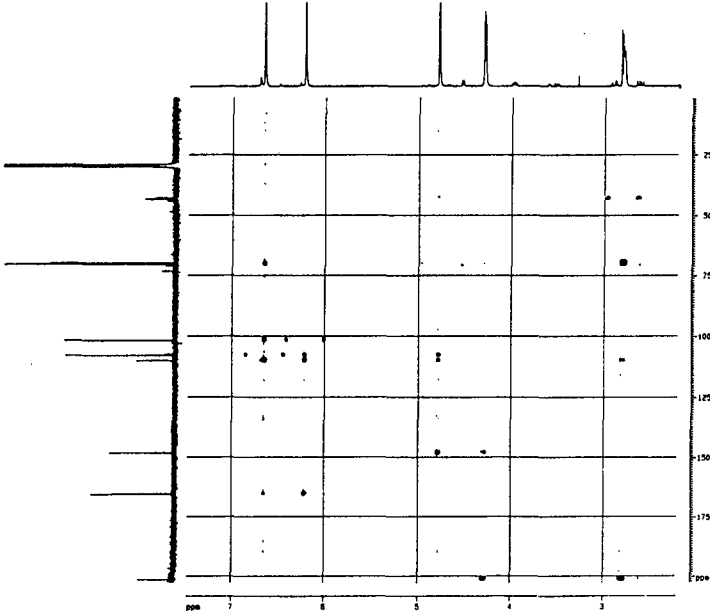


Fig. 75 HETCOR longues-distances de **12** (400 Mz, acétone- $\text{D}_6$ )

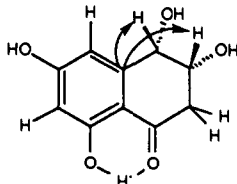


Fig 76a Connectivités du C(4a).

Les Fig 76a, b et c permettent de visualiser les connectivités directement sur la structure. Les couplages rendus visibles ici sont des  $^2J$  et  $^3J$  de l'ordre de 5Hz. En HETCOR courtes distances, seuls les  $^1J$   $\delta^1H-\delta^{13}C$ , de l'ordre de 100-200Hz, seraient visibles.

Les couplages  $^2J$  ( $^1H-C-^{13}C$ ) ont une valeur théorique de l'ordre de 1-6 Hz [55]. Ce qui explique qu'on les voit sans problèmes. Par contre, les  $^3J$  ( $^1H-C-C-^{13}C$ ) dépendent de l'angle dièdre formé par le  $^1H$  et  $^{13}C$ . En fait, ce couplage suit une règle du type Karplus. Le fait que l'on voie bien le couplage C(4a) - H-C(3) indique donc que l'angle dièdre entre ces deux noyaux est plus proche d'une position complètement éclipsée (ou complètement décalée) que d'une position bissectrice. Les couplages  $^2J$  et  $^4J$  entre C(4a) et les H-C(5) et respectivement H-C(7) ne sont pas visibles, et nous pensons que cela est dû à leur faible intensité. En effet sur les aromatiques, les couplages théoriques  $^1H-^{13}C$  ortho ( $^2J \approx 1Hz$ ) et para ( $^4J$ ) sont nettement plus faibles que les couplages méta ( $^3J \approx 8 Hz$ ) [55].

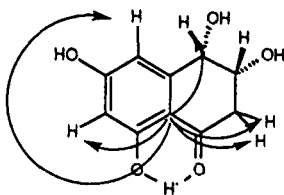


Fig. 76b Connectivités du C(8a)

On observe les connectivités attendues en  $^2J$  : C(8a) - Ha,b-C(2); et en  $^3J$  : C(8a) - H-C(4). Les couplages avec les protons aromatiques ( $^3J$  méta) sont également visibles.

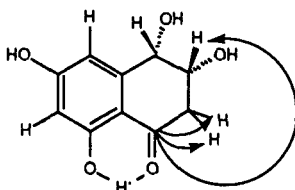


Fig. 76c Connectivités du C(1)

Les connectivités attendues sont visibles entre C(1) - H-C(2) ( $^2J$ ) et C(1) - H-C(3) ( $^3J$ ).

### Détermination de la stéréochimie

Les OH en 3 et en 4 peuvent être dans une configuration *cis* ou *trans*. Afin de connaître quel est la configuration présente dans le produit **12**, nous avons plusieurs méthodes à disposition. La première est la comparaison des constantes de couplage scalaires avec les valeurs de la littérature. La seconde méthode utilise les couplages dipolaires.

### Utilisation des couplages scalaires

Le couplage entre H-C(3) et H-C(4) varie selon l'angle dièdre. On peut donc facilement identifier la configuration de **12** si l'on dispose des données de la littérature pour l'isomère *cis* et l'isomère *trans* de l'hydroxy-4 scytalone. Le tableau 20 montre la comparaison entre les déplacements <sup>1</sup>H de **12**, ceux de la *trans*-hydroxy-4 scytalone [69] et ceux de la *cis*-hydroxy-4 scytalone [67].

position	δ <sup>1</sup> H de <b>12</b> (200 MHz) acétone-D <sub>6</sub>	δ <sup>1</sup> H du <i>cis</i> [67] (non-mentionné) acétone-D <sub>6</sub>	δ <sup>1</sup> H du <i>trans</i> [69] (60 MHz) acétone-D <sub>6</sub>
Ha,b-C(2)	2.83 (1H, m)	2.86 (1H, d, 4.8 Hz)	Ha-C(2) = 3.03 (1H, q, 17.5 Hz, 5.0 Hz) Hb-C(2) = 2.68 (1H, q, 17.5 Hz, 5.0 Hz)
H-(3)	4.23 (1H, m)	4.37 (1H, m)	4.01 (1H, m)
H-C(4)	4.74 (1H, d, 2.6 Hz)	4.86 (1H, d, 2.5 Hz)	4.54 (1H, d, 8.0 Hz)
H-C(5)	6.57 (1H, dd, 2.2 Hz, ≈ 1Hz)	6.73 (1H, dd, 2.0 Hz, 1.0Hz)	6.70 (1H, d, 2.5 Hz)
H-C(7)	6.19 (1H, d, 2.2 Hz)	6.29 (1H, d, 2.0 Hz)	6.26 (1H, d, 2.5 Hz)
C(8)-OH	12.8 (1H, s, bosse)	12.89 (1H, s, bosse)	----

Tableau 20 Comparaison de **12** avec la *cis* et la *trans*-hydroxy-4 scytalone

On peut constater que l'isomère *cis*, qui présente une valeur de 2.5 Hz pour le couplage H-C(3) - H-C(4) est nettement plus proche de nos valeurs que le *trans*, qui montre un couplage de 8 Hz pour les mêmes protons.

### Utilisation des couplages dipolaires

Les couplages dipolaires sont les couplages qui se propagent à travers l'espace et non à travers les liaisons. En mesurant l'ampleur de ces couplages, on peut en principe tirer des conclusions sur leur distances respectives. Les techniques relatives à cette seconde méthode sont le NOESY et le NOEDIFF. Bien que ces méthodes soient a priori des "solutions élégantes" pour résoudre les problèmes de configuration, il faut être très prudent dans leur mise en oeuvre et l'interprétation des résultats, qui sont très sujets aux artéfacts. Nous avons d'abord mesuré un NOESY et l'avons comparé à notre COSY. En effet, le NOESY utilise une séquence de pulses proche de celle du COSY, si bien que les  $^1\text{H}$ , déjà couplés de manière scalaire en COSY, paraissent l'être aussi de manière dipolaire en NOESY. La conséquence est que si les spectres NOESY et COSY, donnent les mêmes corrélations, on ne peut alors tirer aucune information du NOESY.

Une comparaison de nos spectres COSY et NOESY nous a donné strictement les mêmes corrélations. Nous avons donc éliminé le NOESY des techniques pouvant résoudre ce problème et avons utilisé le NOEDIFF, qui est une technique présentant l'avantage de n'être sensible qu'aux couplages dipolaires. Les expériences doivent se faire signal après signal. A chaque fois, on perturbe un signal et on observe l'effet sur l'intensité des autres signaux du spectre, puis on soustrait le spectre non perturbé. L'expérience est répétée plusieurs fois pour une meilleure qualité de mesure. Le signal du proton perturbé ( $H_p$ ) apparait inversé, avec une intensité de -100%. Le signal d'un proton  $H_X$  couplé de manière dipolaire avec le proton perturbé  $H_p$  apparait avec une intensité positive de quelques %.

L'effet Nucléaire Overhauser (NOE) est défini comme étant le rapport entre l'intensité du signal de  $H_X$  avant et après l'irradiation de son voisin [70]:

$$n_i(H_X) = (I - I_0)/I_0$$

Cet effet NOE est en principe relié à la distance entre  $H_X$  et  $H_p$  par la relation:

$$\frac{1}{n_i(H_X)} \approx C \times r^6$$

Où  $C$  est une constante spécifique à la molécule et  $r$  est la distance séparant  $H_X$  et  $H_p$ . Donc théoriquement, plus l'effet NOE observé est fort et plus la distance séparant  $H_X$  de  $H_p$  est faible.

Dans **12** les distances qui nous intéressent sont les distances entre H-C(3) - H-C(4) d'une part,  $H_{a,b}$ -C(2) - H-C(3) d'autre part. Si **12** est l'isomère *cis*, alors la distance H3-H4 devrait en principe être plus grande que celle  $H_{a,b}$ -C(2) - H-C(3). Nous considérons ici H-C(3) comme environ équidistant de  $H_{a,b}$ -C(2) et  $H_b$ -C(2). Ce qui paraît raisonnable si l'on considère que l'irradiation de H-C(4) transforme H-C(3) en un triplet et pas en un doublet de doublet (tableau 19).

La Fig. 77 montre les traces des différentes expériences NOEDIFF effectuées sur 12. le tableau 21 résume les résultats et donne les valeurs calculées en %.



Fig. 77 Expériences NOEDIFF de 12: 1 = irradiation de  $\delta = 4.74$  ppm; 2 = irradiation de  $\delta = 4.23$  ppm; 3 = irradiation de  $\delta = 2.83$  ppm

Proton irradié $\delta$ (ppm)	effet NOE observé (%)				
	2.83 (H-C(2))	4.23 (H-C(3))	4.74 (H-C(4))	6.19 (H-C(5))	6.57 (H-C(6))
2.83 (H-C(2))	-100.0	+2.83	0.0	0.0	0.0
4.23 (H-C(3))	+4.38	-100.0	+6.56	0.0	0.0
4.74 (H-C(4))	0.0	+5.82	-100.0	0.0	+3.59

Tableau 21 Résumé des expériences de NOEDIFF (200 MHz, acétone-D<sub>6</sub>)

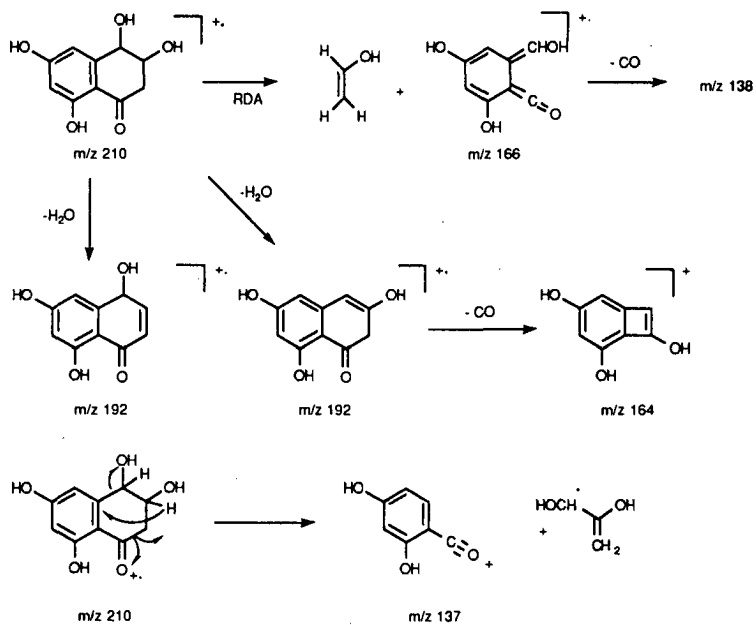


Schéma 16 Fragmentation de 12

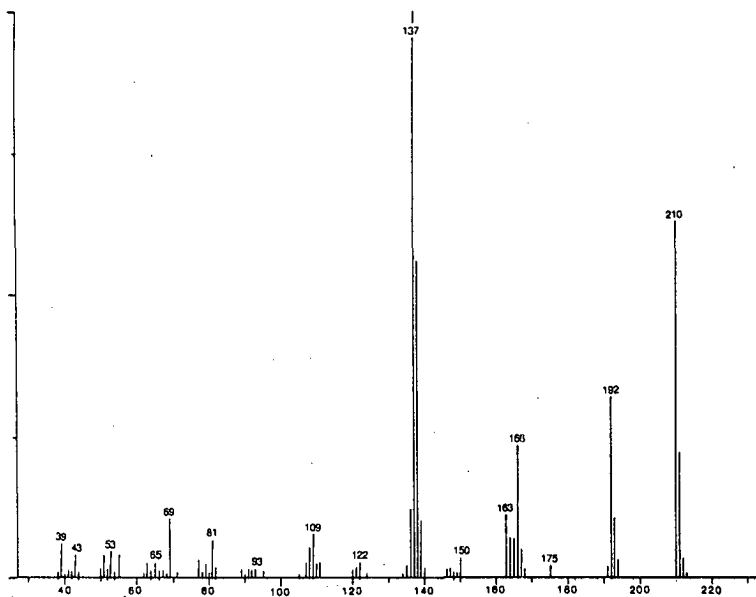


Fig. 78 MS de 12 (EI, 70eV)

Nous déduisons de ces valeurs que la distance H-C(3) - H-C(4) est vraisemblablement plus faible que la distance H-C(2) - H-C(3), et que donc c'est la configuration *cis* qui serait présente. Naturellement, cette affirmation implique que la distance soit la même entre H-C(3) et chacun des deux protons de H-C(2), ce qui est démontré par la transformation du signal d'H-C(3) en un triplet lors de l'irradiation du signal de H-C(4) (Tableau 19).

Le spectre de masse de **12** (Fig. 78) présente un ion moléculaire à  $m/z = 210$  (Fig 87). Un des ions les plus caractéristiques est le 166 ( $M^+ - CH_2=CHOH$ ) qui provient de la RDA du ion moléculaire. Cette fragmentation permet de prouver que les positions 2 et 3 sont occupées par un  $CH_2$  et respectivement un  $CHOH$ . Le schéma 16 explique les principales fragmentations de **12**.

Ce produit a été isolé pour la première fois à partir de *Pyricularia Oryzae* Cavara [69].

### 9.2.13.2 Synthèse d'un dérivé méthylé de **12**

Nous avons synthétisé un dérivé méthylé de **12** afin de prouver le nombre de groupes OH portés par **12** et les positions de ces OH. La synthèse est faite par analogie avec le mode opératoire décrit par Findlay et al.[71] pour la méthylation de la scytalone (partie expérimentale ).

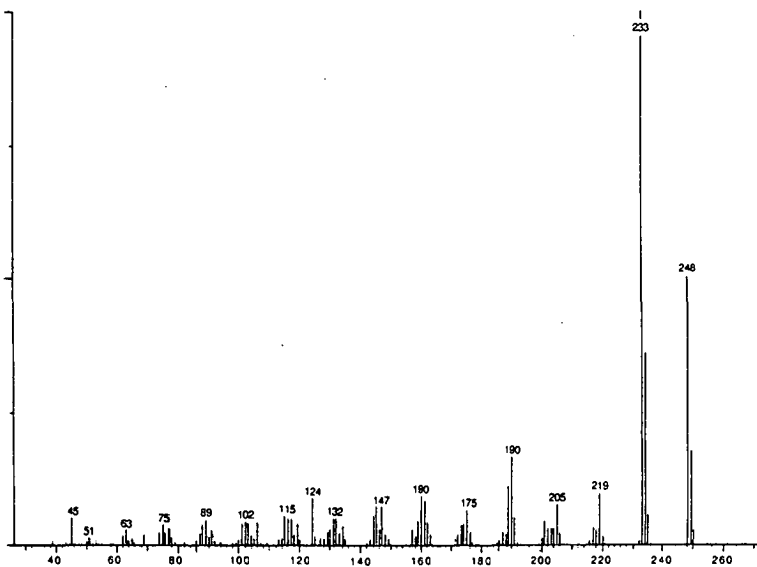


Fig. 79 MS du dérivé méthylé de **12** (EI, 70 eV)

Le schéma réactionnel est donné par le schéma 17. Le spectre de masse (EI, 70 eV) montre un ion moléculaire à  $m/z = 248$  ( $= M^+$ ), ce qui correspond à un naphthalène tétraméthylé. Le pic de base est à  $m/z = 233$  ( $M^+ - CH_3$ ) (Fig. 79).

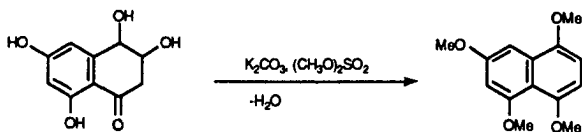


Schéma 17 Méthylation de 12

Le spectre  $^1\text{H}$ -RMN (Fig. 80) montre 16 protons,  $\delta$  (ppm) = 7.18 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-C(5)), système AB centré à 6,69 (2H, AB,  $J = 8.5$  Hz, H-C(2), H-C(3)), 6.57 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-C(7)), 3.96 (s, 3H, OMe), 3.95 (s, 3H, OMe), 3.93 (s, 3H, OMe), 3.90 (s, 3H, OMe).

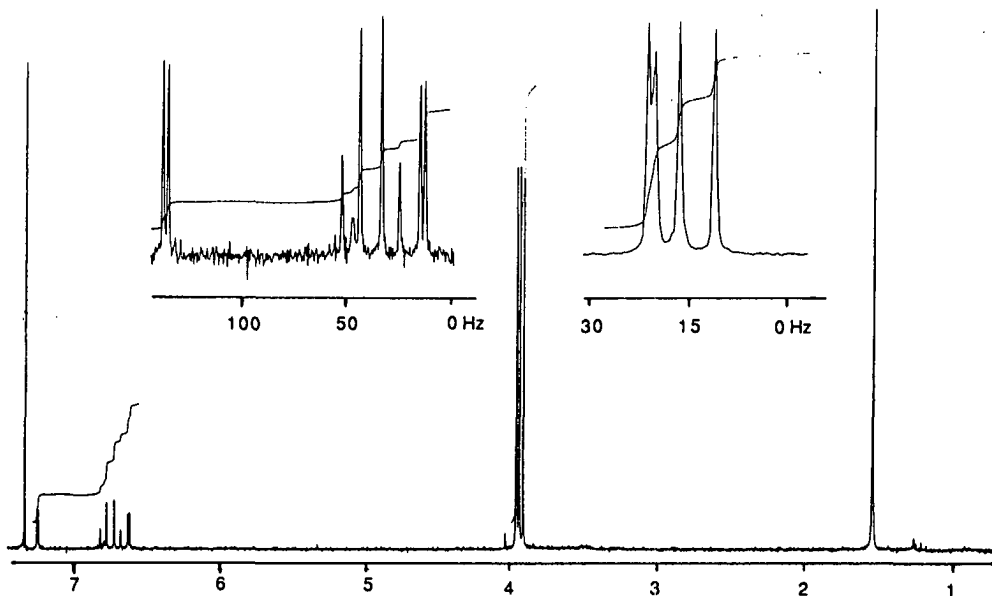


Fig. 80  $^1\text{H}$ -RMN du dérivé méthylé de 12 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

On constate que le produit obtenu contient quatre méthoxy. Les H restants sont au nombre de quatre. Deux d'entre eux forment un système AB avec un constante de couplage de 8.5 Hz, ce qui correspond à un couplage ortho. Nous pensons qu'il s'agit des H-C(2) et H-C(3). Cela implique qu'une déshydratation est intervenue à partir du H-C(4) et du OH en position 3. Dans le cas de la scytalone également [71], l'hydroxy en position 3 est perdu par déshydratation, et c'est la cétone en 1, ou plus précisément sa forme l'énol, qui est méthylée. L'aromatisation du cycle de droite provient donc de

l'énolisation de la cétone, et d'une déshydratation. Les deux H restants à  $\delta = 7.18$  ppm et  $\delta = 6.57$  ppm montrent un couplage en méta de 2.5 Hz. Il s'agit de H-C(5) et H-C(7).

### 9.2.13.3 Deutération de 12

Après plusieurs semaines en contact avec les solvants deutérés, notre échantillon a subi une deutération partielle en position 2, C'est à dire en  $\alpha$  de la cétone. La substitution a pu se faire alors que 12 était sous forme énol et donc échangeable. Le spectre de masse (Fig. 81) montre un ion moléculaire à  $m/z = 211$  et les pics principaux montrent une distribution isotopique anormale. Le spectre  $^1\text{H}$ -RMN de 12 deutéré est surtout reconnaissable par la transformation du multiplet à  $\delta = 4.23$  ppm en un doublet de doublet (Fig. 82).

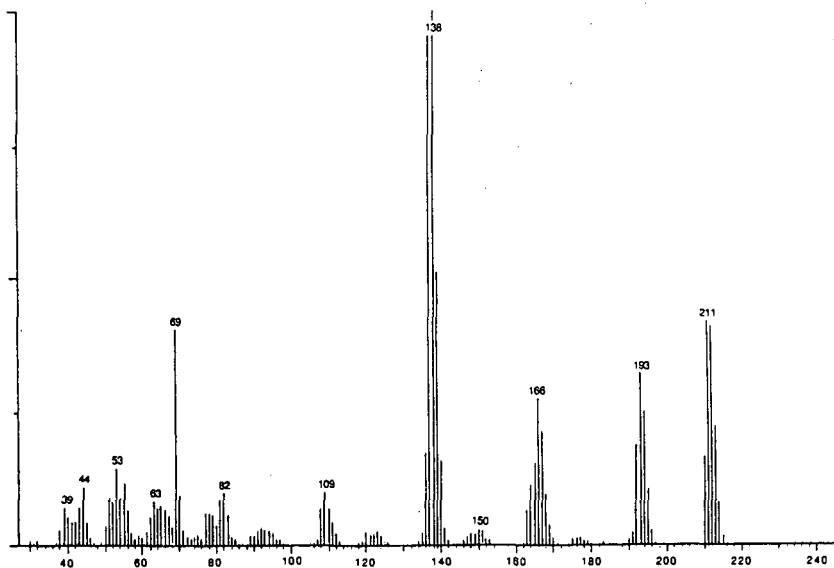


Fig. 81 MS de 12 deutéré (EI, 70 eV)

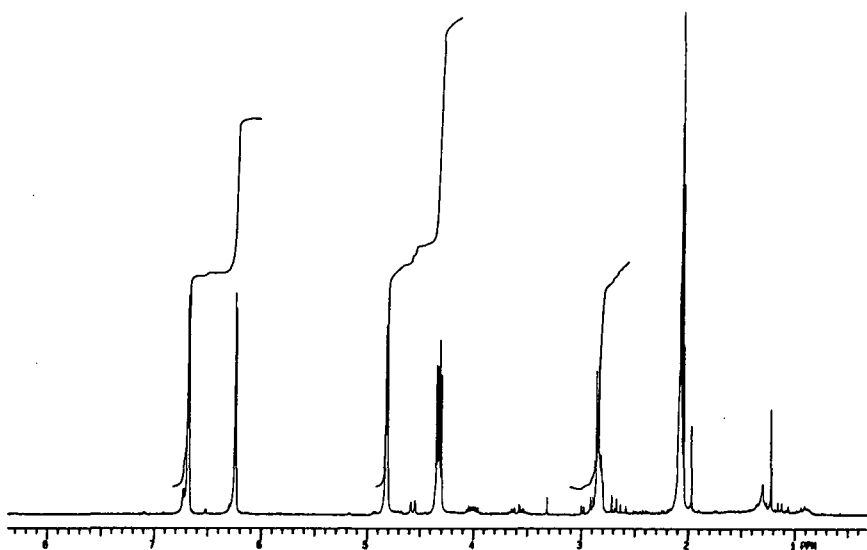
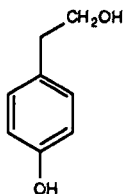


Fig. 82  $^1\text{H}$ -RMN de 12 deutéré (200 MHz, acétone  $\text{D}_6$ )

### 9.2.14 Identification du tyrosol (13)



tyrosol (13)

**13** est isolé sous forme de 0.8 mg d'un solide blanc amorphe après chromatographie sur silicagel avec l'éluant toluène/AcOEt/AcOH (10:5:1),  $R_f = 0.32$ . Ce composé est visible à l'UV à 254 nm. On observe une réaction colorée orange avec le test de la *p*-nitroaniline diazotée (test des phénols). La réaction positive au test de la *p*-nitroaniline diazotée prouve que l'un des substituants est un phénol.

Le spectre  $^1\text{H-RMN}$  de **13** (Fig. 83) montre cinq signaux:  $\delta$  (ppm) = 7.16 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-C(3), H-C(5)), 6.85 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-C(2), H-C(6)), 3.78 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 2.91 (1H, s, bosse, C(1)-OH), 2.81 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ). Visiblement il s'agit d'un cycle aromatique *p*-disubstitué.

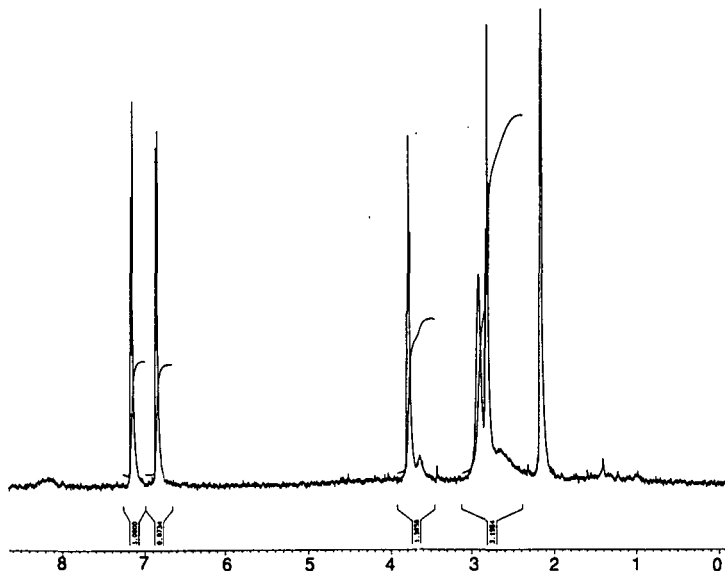


Fig. 83  $^1\text{H-RMN}$  de **13** (400 MHz, acétone- $\text{D}_6$ )

La substitution en para explique la simplicité du spectre. Les H-C(2) et H-C(6) sont équivalents, de même que les H-(3) et H-C(5). Les deux triplets couplés entre eux et la bosse (OH) à  $\delta = 2.91\text{ppm}$  indiquent un éthyl -2 ol pour le deuxième substituant. La position déblindée du  $\text{CH}_2$  à  $\delta = 3.78\text{ ppm}$  provient de l'effet du OH.

Le spectre de masse (Fig. 84) confirme parfaitement cette structure, avec un ion moléculaire à  $m/z = 138$ . Les fragments à  $m/z = 120$  (perte d'eau) et  $m/z = 107$  (hydroxytylium) sont particulièrement caractéristiques.

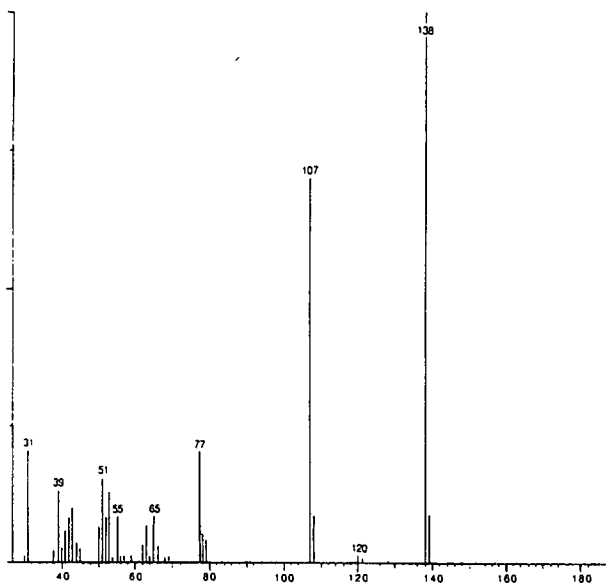


Fig. 84 Spectre de masse de 13 (EI, 70 eV)

Les principales fragmentations de 13 sont expliquées par le schéma 18

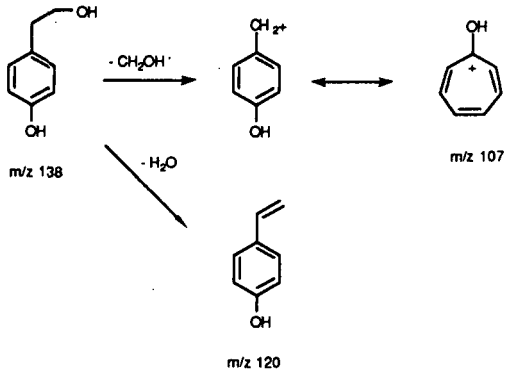


Schéma 18 Principales fragmentations de 13

Ce produit est un métabolite connu, il a été isolé comme métabolite principal d'un extrait du champignon *Ceratocystis clavigera*, un champignon associé à la maladie connue sous le nom de "bleuissement " (blue stain) du pin de montagne américain [72].

## 10 Etude de l'extrait brut par MS-MS

Dans ce travail, nous avons plusieurs fois été confrontés au problème de quantités insuffisantes de produit à analyser. Nous avons partiellement résolu cet inconvénient en rassemblant les extraits de plusieurs cultures successives. Nous nous sommes dès lors posé la question de savoir si la composition des différents extraits présentait des variations d'une culture à l'autre. Cette question a pu être résolue par l'examen des extraits au moyen de la spectrométrie de masse en tandem (MS-MS). Cette méthode a l'avantage d'être très spécifique, ce qui permet de minimiser les interférences sans avoir à traiter l'échantillon au préalable. C'est une technique rapide, qui nécessite peu d'échantillon, et évite sa purification, manipulation au cours de laquelle des pertes ou des transformations sont toujours possibles.

Dans cette technique, le premier spectromètre permet d'isoler les ions cherchés de la matrice. Ils pénètrent alors dans la chambre de collision où ils sont fragmentés lors de leur collision avec des molécules d'un gaz inerte. Ces fragments sont finalement analysés dans le second spectromètre. Un composé est considéré comme identifié lorsque son ion moléculaire est accompagné d'au minimum deux de ses fragments les plus caractéristiques. L'intensité de l'ion moléculaire permet de se faire une première idée de l'abondance du composé. Nous avons recherché principalement les ions moléculaires des principales tétralones, isocoumarines et composés indoliques. Il s'agit de  $m/z = 210, 194, 178, 192, 208, 206, 236, 222, 147$  et  $175$ .

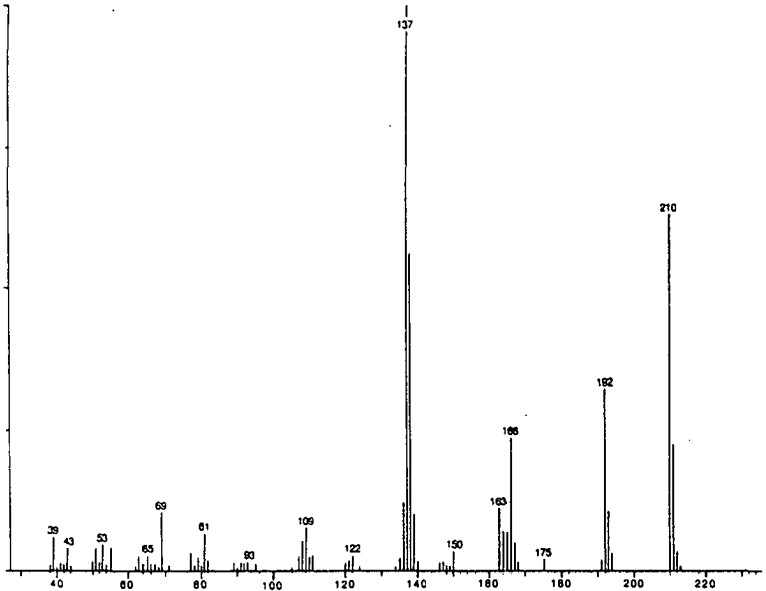


Fig. 85a. MS de 12 (EI, 70 eV)

Les figures 85a, b, et 86a, b permettent de comparer les spectres de MS-MS (en haut) et les spectres de MS (en bas) des produits 12 et 2.

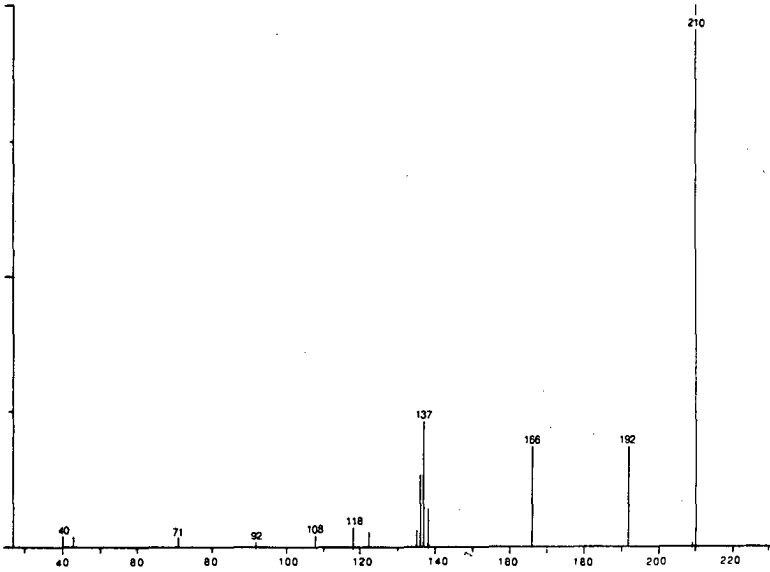


Fig. 85b MS-MS de 12 (EI, 70ev, Argon, descendants)

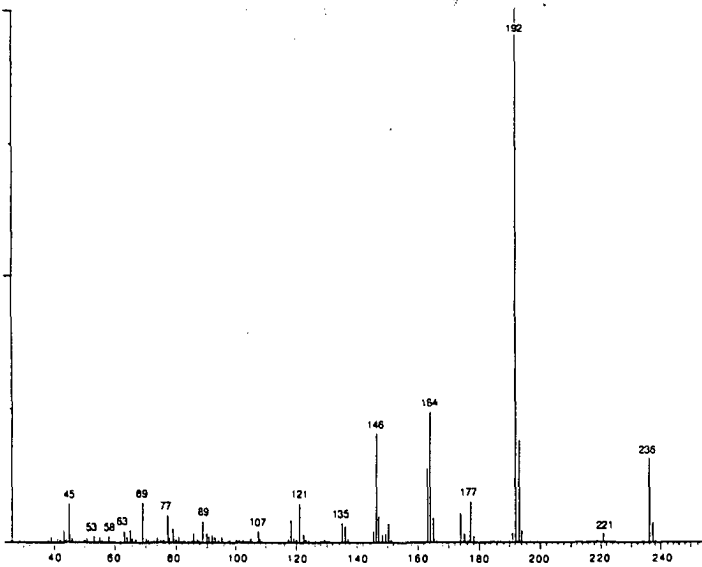


Fig. 86a MS de 2 (EI, 70 eV)

Les intensités respectives de 12 ( $i = 49356$ ) et de 2 ( $i = 14630$ ) permettent de constater que le produit 12 est plus abondant que le 2, ce qui est parfaitement exact.

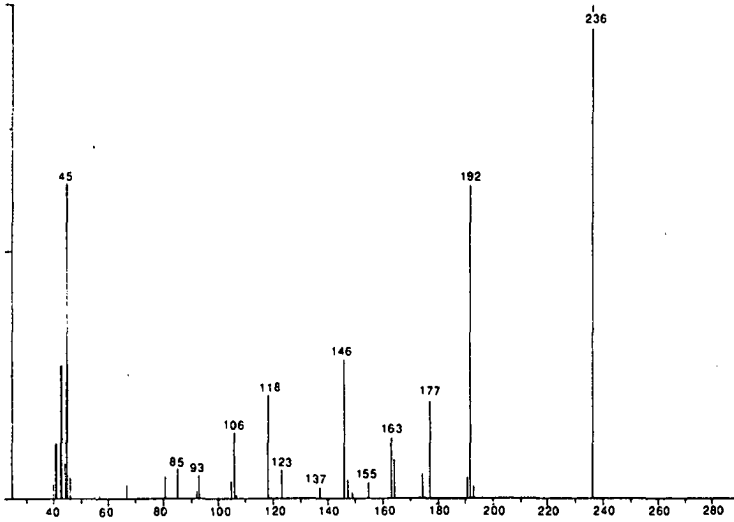


Fig. 86b MS-MS de 2 (EI, 70 eV, Argon, descendants)

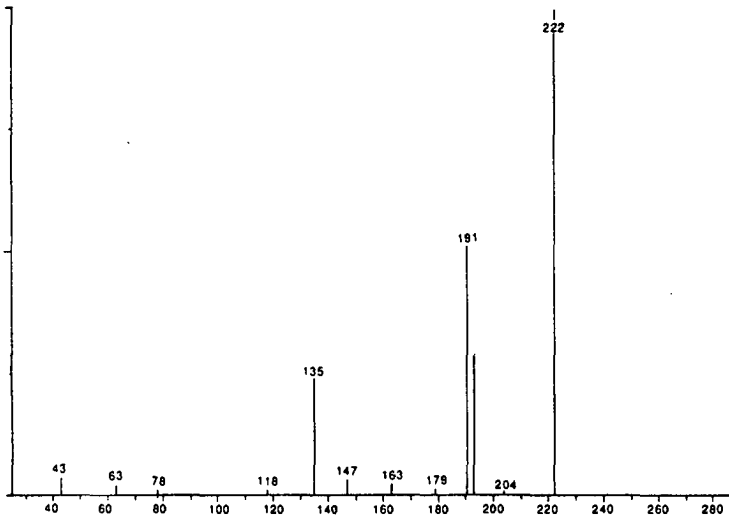


Fig. 87a MS-MS de 1 (EI, 70eV, Argon, descendants)

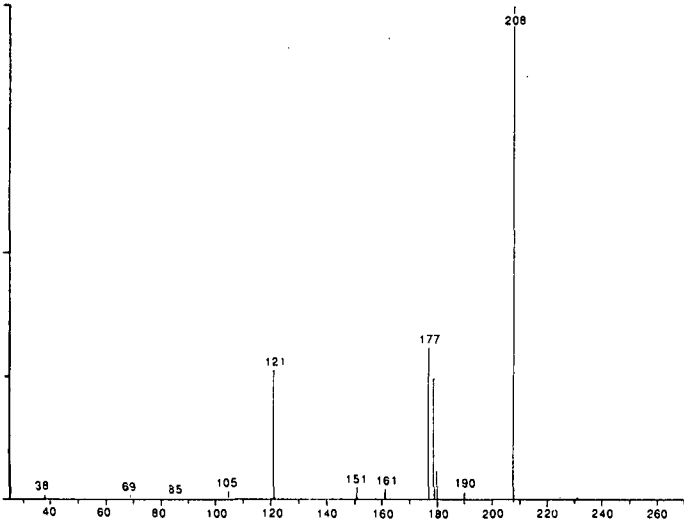


Fig. 87b MS-MS de 3 (EI, 70ev, Argon, descendants)

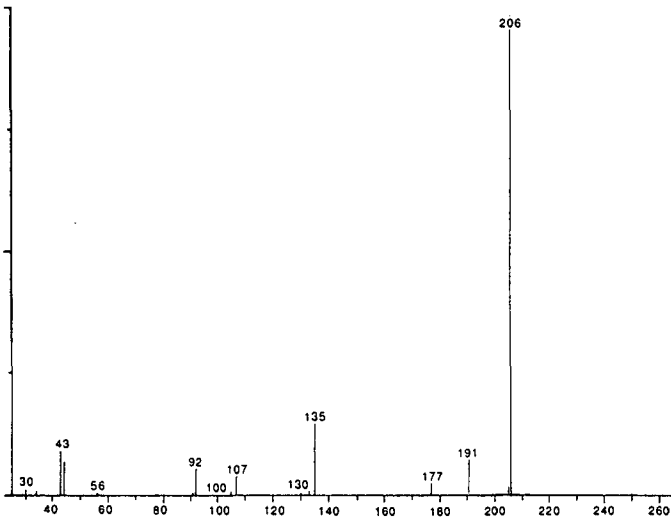


Fig. 87c MS-MS de 4 (EI, 70ev, Argon, descendants)

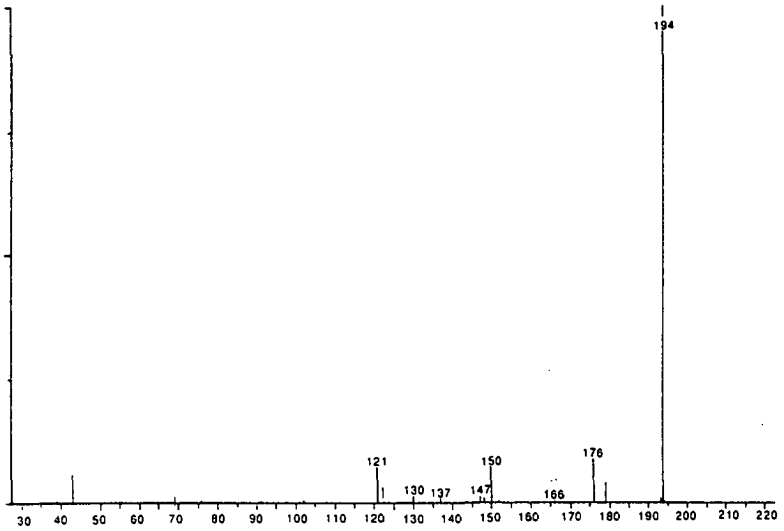


Fig. 87d MS-MS de 9 (EI, 70eV, Argon, descendants)

Les figures 87 a, b, c et d montrent les spectres MS-MS de quatre autres importantes isocoumarines et tétralones. Il s'agit de 1 ( $m/z = 222$ ), 3 ( $m/z = 208$ ), 4 ( $m/z = 206$ ) et 9 ( $m/z = 194$ ).

Cette technique nous a permis de constater qu'il n'y avait que peu de différences dans la composition des différents extraits. C'est-à-dire que tous les composés correspondant aux ions cités plus haut ont été détectés par MS-MS dans les extraits que nous avons rassemblés. Par contre la masse totale de l'extrait brut est sujette à des variations allant du simple au quintuple ou plus (voir partie expérimentale, culture du champignon).

## 11 Etude de la toxicité des composés isolés

Tous les composés isolés ont fait l'objet du test de toxicité. Tous les tests sont faits au minimum à double et si possible à plusieurs concentrations. Un blanc constitué d'eau et d'acétone est toujours préparé dans les mêmes conditions.

### 11.1 Résultats du test de toxicité

#### *Isocoumarines*

Composé	1	2	3	4	5
concentration	1.46 (+)	0.15 (-)	0.13 (-)	0.04 (-)	0.36 (-)
pour le test	2.70 (+)	0.61 (-)	0.48 (+)	0.97 (+)	1.82 (-)
(mmol/l)	3.38 (++)	2.33 (+)	2.40 (+)	1.94 (++)	3.64 (-)

#### *Tétralones*

Composé	9	10	11	12
concentration	0.62 (-)	4.2 (+)	0.77 (-)	0.37 (-)
pour le test	3.09 (-)	----	3.09 (-)	3.73 (-)
(mmol/l)				

#### *Composés azotés*

Composé	6	7	8
concentration			
pour le test	1.14 (-)	1.36(+ ?)	0.61 (++)
(mmol/l)	2.85 (+)	----	----

#### *Tyrosol*

13
3.62 (-)

évaluation de l'activité: - = non-toxique, + = nécrose 0.1-1 mm, ++ = nécrose de 1 mm à 3 mm.

## 11.2 Discussion des résultats

### *Isocoumarines*

La plupart des isocoumarines montrent une nette activité toxique aux concentrations testées. Les isocoumarines sont une classe de composés dont l'activité biologique a déjà été fréquemment citée. La cytogénine (1) présente une action antitumorale sur le carcinome de Ehrlich à des concentrations de 6.3 à 100 mg/kg/jour [54]. Hallock *et al.*[58] ont étudié la toxicité de la de-O-méthylidiaporthine (2) et ont constaté que si les plantes hôtes comme l'avoine (*Avena sativa* 'Park'), l'ivraie pérenne (*Lolium perenne* L.) et l'ivraie italienne (*Lolium multiflorum* Lam.) ne montraient qu'une faible ou aucune sensibilité à ce composé. D'autres plantes en revanche, comme le maïs, la crabgrass, et le soja réagissaient à 1 µg (4nmol). Les pâquerettes et l'amarante épineuse étaient sensibles à 8, respectivement 21 nmol. La phytotoxicité des composés 3 - 5 n'a pas été étudiée, mais Curtis [31] a suggéré que 3 serait métabolisé par les plantes pour former la melléine correspondante (dihydro-3,4 hydroxy-8 méthoxy-6 méthyl-3 isocoumarine). Ce dernier composé fut isolé à partir de carottes infectées par *Ceratocystis fimbriata* et qui avaient développé un goût amer pendant leur stockage. Il est donc probable que la phytotoxicité des isocoumarines 3 - 5 puisse être en relation avec la phytotoxicité de leurs melléines correspondantes. Les melléines sont souvent citées pour leurs activités biologique. Par exemple dans Kameda *et al.*[73], où les auteurs montrent que la dihydro-3,4 méthyl-3 trihydroxy-3,6,8 isocoumarine produit un faible symptôme nécrotique sur les feuilles de poirier à 500 ppm et inhibe la croissance de plantules de riz, de choux et de radis à des valeurs entre 100 et 500 ppm.

### *Composés azotés*

L'acide indole-3 acétique (6) est le représentant le plus connu de la classe des auxines. L'AIA est produit continuellement par les tissus végétaux en croissance. Son taux est maintenu très bas par la présence d'une enzyme qui l'inactive par condensation, l'acide indole-3 acétique oxydase. Les effets de l'AIA sur les plantes sont nombreux et affectent entre autres la perméabilité des membranes et le rythme de la respiration. Une augmentation du niveau d'AIA a lieu dans beaucoup de plantes infectées par des champignons. Les champignons responsables de la pourriture du chou (*Plasmodiophora brassicae*), de la maladie du charbon du maïs (*Ustilago maydis*) et du dépérissement du bananier (*Fusarium oxysporum* f. *cubense*) induisent un niveau élevé d'AIA dans leurs hôtes par inhibition de l'AIA oxydase. Cependant, ils sont également capables de synthétiser eux-mêmes ce produit. *Ceratocystis fimbriata* fait partie des champignons pathogènes produisant eux-mêmes de l'AIA.

Notre test a mis en évidence une certaine toxicité du méthyle-3 hydroxy-2 (3-H) indole (7) cependant ce produit n'a jamais pu être isolé sous forme tout-à-fait pure, et cela est dû aux faibles quantités isolées. Le résultat obtenu demande donc vérification.

Des trois composés azotés isolés, seul **8** montre une activité toxique indiscutable. La gliotoxine (**8**) a été isolée de plusieurs sources fongiques différentes (*Trichoderma lignorum* [62], *Gliocladium fimbriatum* [74] *Penicillium obscuro* [75], elle est connue pour son action toxique et antibiotique. C'est un produit toxique pour les animaux (DL<sub>50</sub> 45 mg/Kg (lapin) et 50 mg/kg (rat)). A 0.3 ppm. elle inhibe la croissance des hyphes du champignon *Rhizoctonia solani* [62]. La gliotoxine présente donc une action fongicide, comparable à celle du HgCl<sub>2</sub> sur certains champignons mais beaucoup plus spécifique. Une concentration de 10 µg/ml suffit à inhiber le développement d'une grande variété de bactéries (dont *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *E. typhosus*, *E. coli*) [74]. Une étude comparative [76] a montré que la gliotoxine possède une activité bactériostatique plus forte que des composés tels que la pénicilline, la gramicidine ou l'actinomycine.

### Tétralones

Comme on peut le voir, les tétralones n'ont dans l'ensemble pas d'activité toxique et n'induisent donc pas de nécrose sur les feuilles de café, même à des concentrations assez élevées. La seule exception pourrait être **10**, qui montre une certaine activité. Malheureusement pour ce produit une seule concentration a pu être mesurée.

La littérature est assez partagée sur l'activité toxique des tétralones. Borgschulte *et al* [53] signalent **9** comme un métabolite manifestant une activité toxique sur les feuilles de peuplier. A 100 ppm (100 µg/ml) **9** provoque une légère stimulation de la croissance des pousses de riz. Par contre **12**, ne provoque aucun effet sur les pousses de riz à 500 ppm. D'une manière générale, les tétralones **10**, **11** et **12** sont surtout cités dans la littérature comme des métabolites clés dans la biosynthèse de la mélanine par les champignons [67], [68], [77]. Une démonstration impressionnante a été faite par Bell *et al* [67], qui ont ajouté de la scytalone (**11**) à des cultures mutantes albinos de *Thiavelopsis basicola*. Une mélanisation intense de ces souches albinos se produit une heure déjà après l'adjonction.

### Composés monophénoliques (tyrosol, phényléthanol)

Ce type de composés semble n'avoir aucune activité selon notre test. Cependant, le tyrosol est cité dans la littérature comme ayant une activité phytotoxique sur le riz et une action inhibitrice de la germination des graines de laitues [78], il a également été isolé comme le composé majeur d'un extrait de *Ceratocystis clavigera*, un champignon lié à la maladie dite du "bleuissement" (blue stain) du pin de montagne américain [72].

### Composés volatils

Les composés volatils n'ont pas été testés car il ne nous était pas possible de les séparer de l'éther, cependant la totalité de ces produits a pu être identifiée par GC-MS. Aucun de ces composés n'appartient à une famille de substances réputée pour son activité biologique.

### 11.3 Origine biogénétique des composés isolés

#### 11.3.1 Isocoumarines

Les composés 1 à 5 sont tous des dérivés de pentacétides. Ils sont biosynthétisés à partir d'une unité acétyl CoA et de quatre unités malonyl CoA sous action enzymatique (schéma 19) [79]. Le composé polycétonique résultant I possède des groupes méthylènes actifs qui peuvent prendre part à des condensations aldoliques internes conduisant à des composés aromatiques.

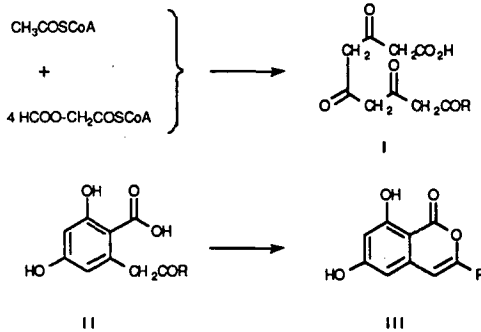


Schéma 19 Voie biogénétique des isocoumarines

La lactonisation des composés du type II conduit au groupe des isocoumarines (III), il est important de remarquer que tous les composés de cette série conservent le groupe hydroxy en ortho du groupe carboxylique originel. Une grande variété de composés peut être obtenue suivant le modèle du schéma 19, cela dépend principalement :

- du nombre d'unités acétyl CoA constituant la chaîne
- du mode de cyclisation
- de la condensation avec des polycétides synthétisés séparément
- des processus secondaires tels que alkylations, halogénations, réactions rédox, réarrangements, etc...

### 11.3.2 Tétralones

La biogénèse des tétralones passe, comme celle des isocoumarines, par le chemin des pentacétides. La biosynthèse de la scytalone (11) a été étudiée par marquage isotopique (schéma 20) [68].

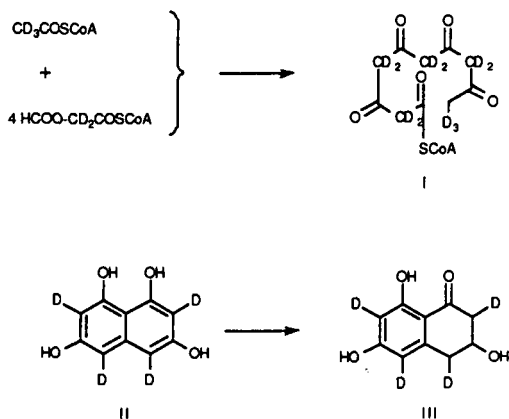


Schéma 20 Voie biosynthétique pour la scytalone

Toutes les tétralones que nous avons isolées sont reliées entre elles selon un schéma biosynthétique proposé par Greenblatt et Wheeler pour la biosynthèse de la mélanine (schéma 21) [80].

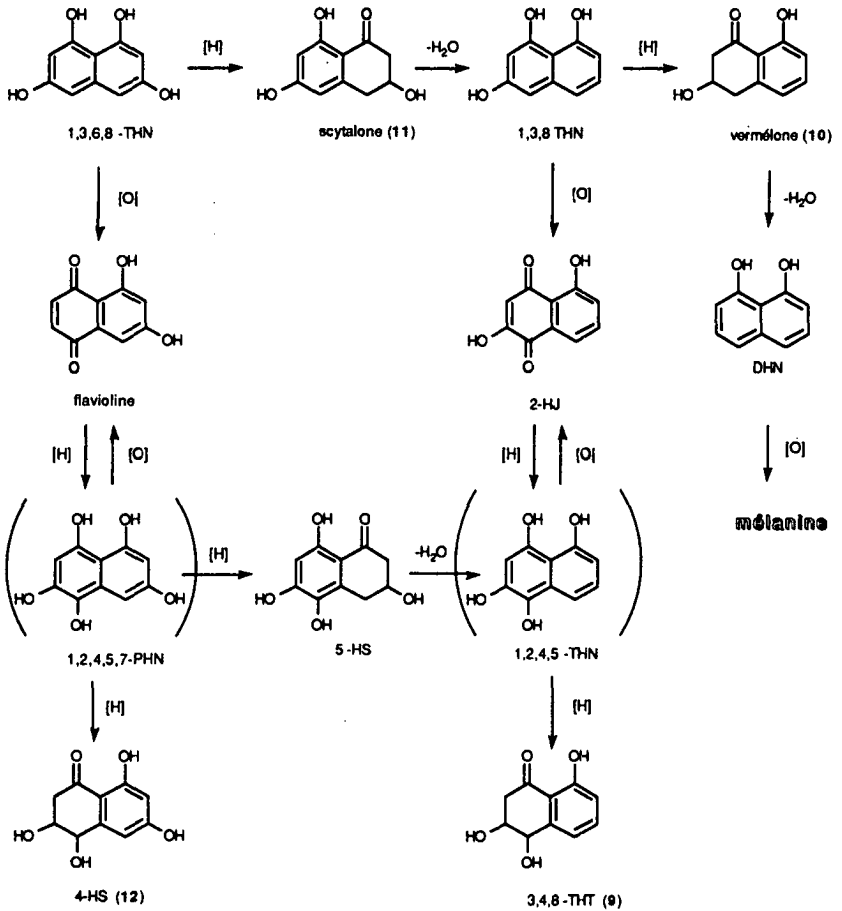


Schéma 21 Relation biogénétique entre les différentes tétralones et la mélanine.

Explication des symboles: DHN = dihydronaphtol, THN = trihydronaphtol ou tétrahydronaphtol, PHN = pentahydronaphtol, HS = hydroxyscytalone, HJ = Hydroxyjuglone, THT = trihydrotétralone

Contrairement aux animaux, qui créent un pigment foncé par polymérisation d'un dérivé du DOPA (dihydroxyphénylalanine), les champignons de la subdivision des ascomycètes et les champignons imparfaits (*fungi imperfecti*) sont capables de synthétiser un pigment noir également appelé mélanine mais dont la biosynthèse passe par la voie des polycétides. Cette mélanine est produite par polymérisation du DHN. La mélanine se situe dans les parois cellulaires des champignons. Les cellules mélanisées survivent nettement mieux à la dessiccation et au rayonnement UV que leurs consoeurs hyalines.

Le fait que nous ayons pu isoler les intermédiaires de la mélanine dans *C. fimbriata* var. *coffea* ainsi que la couleur uniformément noire du mycélium de nos cultures permet de penser que ce champignon produit également de la mélanine.

### 11.3.3 Composés indoliques

Le chemin biogénétique de l'acide indole-3 acétique est connu et passe par l'acide shikimique et le tryptophane [48] (schéma 22).

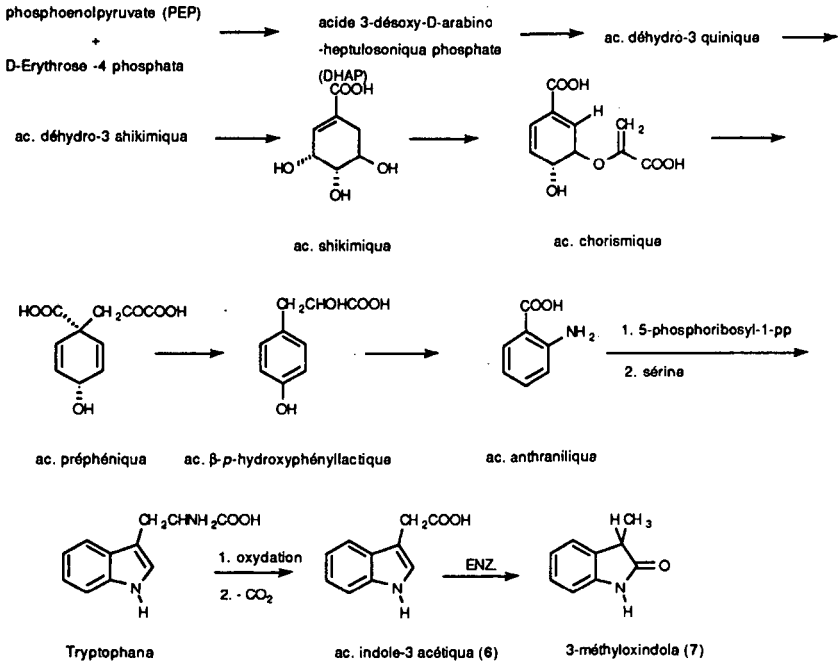


Schéma 22 Biosynthèse des composés indoliques

### 11.3.4 Gliotoxine

La voie biosynthétique de la gliotoxine [48] emprunte également le chemin de l'acide shikimique, le précurseur est un cyclopeptide formé à partir de la phénylalanine et de la sérine. Il a été établi que les neufs carbones de la phénylalanine sont incorporés dans la gliotoxine (schéma 23).

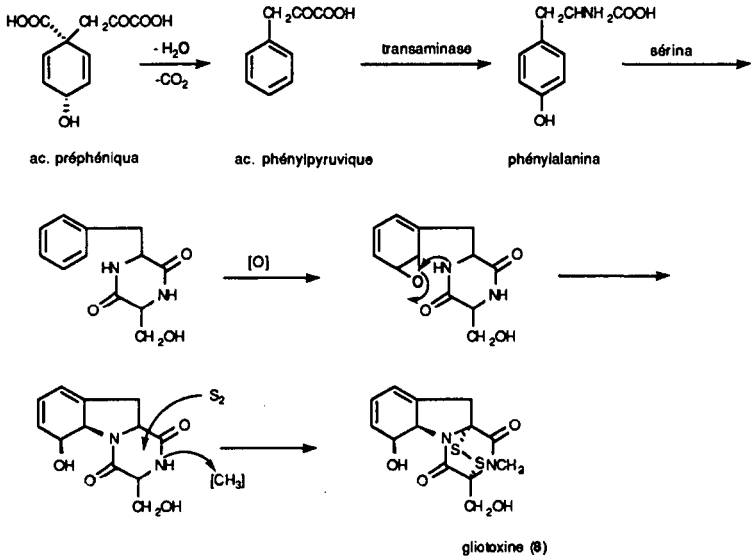


Schéma 23 Biosynthèse de la gliotoxine

### 11.3.5 Composés du type tyrosol (13)

Ce composé est un dérivé de l'acide shikimique, et plus précisément de l'acide  $\beta$ -*p*-hydroxyphényllactique [48] (schéma 24).

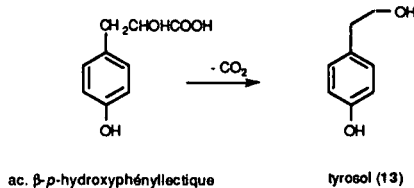


Schéma 24 Biosynthèse du tyrosol

### 11.3.6 Composés du type monoterpènes

La biosynthèse des monoterpènes emprunte une voie différente des composés décrits jusqu'ici. En effet, elle passe par l'acide mévalonique, puis l'isopentényle pyrophosphate, lequel s'isomérisé en diméthylallyle pyrophosphate, qui est l'élément de base de la synthèse des terpènes [48] (schéma 25).

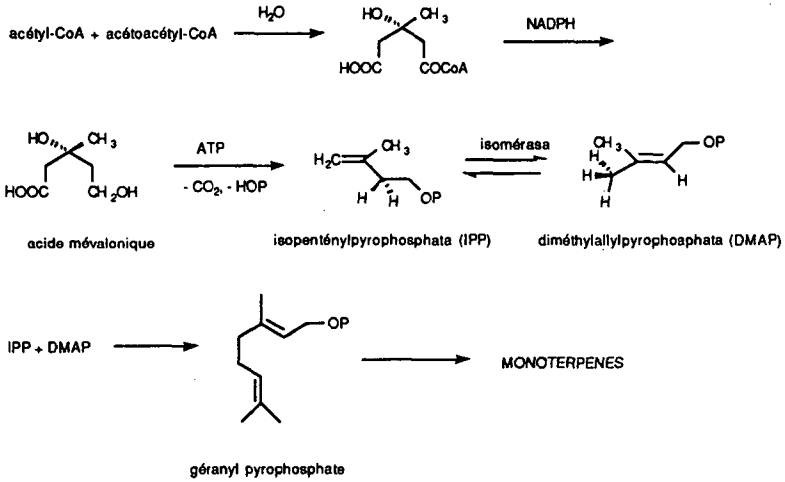


Schéma 25 Biosynthèse des composés du type monoterpènes

## CONCLUSION GENERALE

L'étude du milieu de culture et du mycélium de *C. fimbriata* var *coffea* nous a permis d'identifier 13 métabolites non-volatils (Fig. 88) et une trentaine de métabolites volatils de ce champignon.

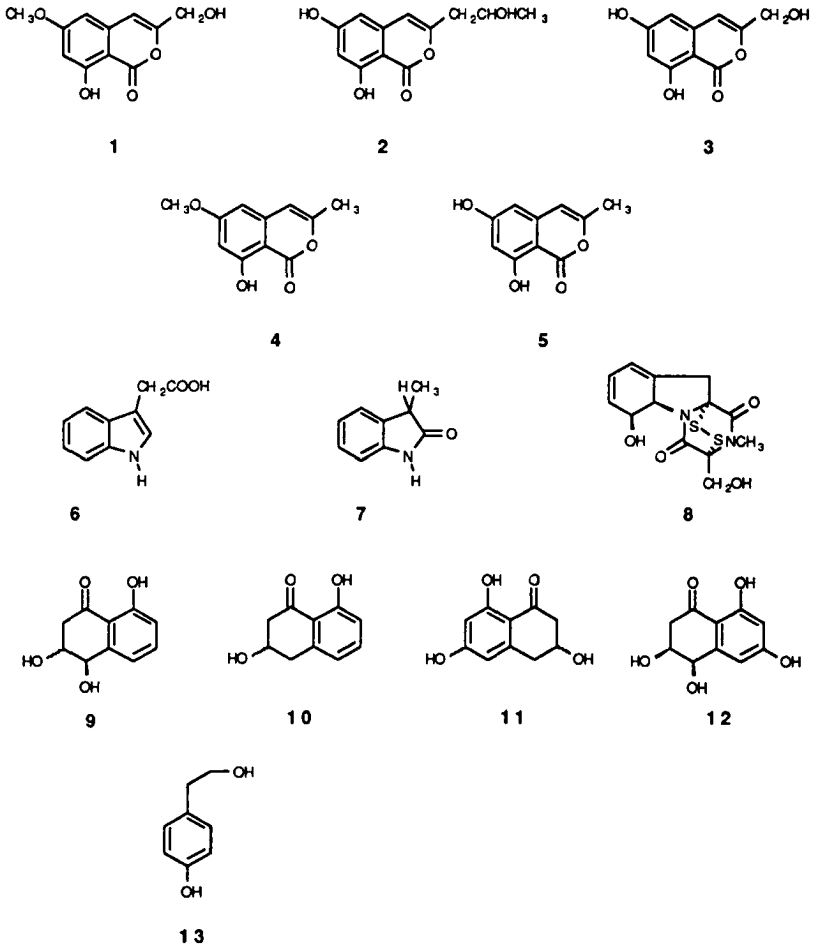


Fig. 88 Principaux métabolites de *C. fimbriata* var. *coffea*

Parmi les métabolites non-volatiles, 7 composés n'ont jamais été décrits dans le genre *Ceratocystis*, et 8 n'ont jamais été décrits dans l'espèce *Ceratocystis fimbriata*. Nous pensons avoir établi une image assez complète de ce que ce champignon pouvait produire *in vitro* au niveau chimique.

Par un test biologique, nous avons pu démontrer que six de ces composés ont une activité toxique évidente envers la plante hôte, le caféier de la variété *arabica*. Il est clair que ces métabolites jouent un rôle dans le développement de la maladie du chancre du caféier en tant que toxines non-spécifiques. Cependant, le fait que nous n'ayons pas trouvé un composé nettement plus toxique que les autres nous suggère plusieurs réflexions. Premièrement, il est difficile de savoir dans quelle mesure ces composés sont responsables de la totalité ou seulement d'une partie de l'action pathogène observée. Il se pourrait que cette action soit due à un effet cumulatif de plusieurs produits, ou à un phénomène de synergie. Deuxièmement, si la nécrose observée à l'endroit de l'infection provient vraisemblablement de l'action d'un ou de plusieurs des composés isolés, le flétrissement général observé sur la plante pourrait en revanche être dû à un blocage mécanique du transport de la sève. Ce blocage serait provoqué par l'envahissement des vaisseaux transporteurs de sève par les hyphes du parasite. Néanmoins, ce flétrissement pourrait aussi provenir de la perturbation des concentrations d'auxine provoquée par le champignon.

Toutes les fractions produites lors de l'extraction et des différentes étapes de purification des extraits ayant été testées au niveau de leur activité biologique, nous considérons qu'une étude plus approfondie de la chimie de ce champignon ne présenterait que peu d'intérêt. Cependant, dans une recherche ultérieure, il serait intéressant et utile d'approfondir la question des essais biologiques, en introduisant d'autres tests, qui soient plus sensibles et plus quantitatifs. Il serait également intéressant d'inoculer sur un arbre adulte les toxines isolées, en prenant soin de se rapprocher au maximum des conditions naturelles (faibles concentrations sur une longue période). L'étiologie de cette maladie mériterait également une étude biologique plus poussée.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### 12 Techniques chromatographiques

#### 12.1 CCM

Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de silicagel 60 F<sub>254</sub> (E. Merck, Darmstadt) de 0,1mm d'épaisseur sur feuilles d'aluminium. Pour les composés spécialement polaires, nous avons utilisé avec succès la cellulose Polygram CEL-300 (Macherey-Nagel, Düren) de 0,1 mm d'épaisseur sur feuilles de polyester ou plaques de verre. Le verre est utilisé comme support lorsque l'on travaille dans un but préparatif. Des quantités de l'ordre de 1-5 mg peuvent être séparées assez facilement sur une plaques de 0.1mm d'épaisseur. Lorsque les quantités l'exigeaient nous avons travaillé avec des plaques de gel de silice de 1 ou 2 mm d'épaisseur LS<sub>254</sub> (Schleicher & Schuell, Dassel).

#### 12.2 Révélateurs pour la CCM [81]

Les plaques sont systématiquement examinées sous une lampe UV à 254 et 366 nm. Lorsque la plaque est faite dans le seul but analytique, nous utilisons des réactifs spécifiques qui permettent de mettre en évidence certains groupes fonctionnels, notamment les phénols, et plus rarement les cétones.

##### La *p*-nitroaniline diazotée (réactif des phénols)

A une solution 0.5 % de *p*-nitroaniline dans l'HCl 2N, on ajoute une solution aqueuse à 5% de nitrite de sodium jusqu'à décoloration. Ce mélange est sprayé uniformément sur les plaques de couche mince. On spraye ensuite une solution aqueuse à 5% de carbonate de sodium. Les produits phénoliques réagissent en formant des taches colorées allant du rouge-orangé au brun foncé, suivant le nombre de phénols placés sur la molécule. Le schéma 26 explique la réaction produite par les phénols.

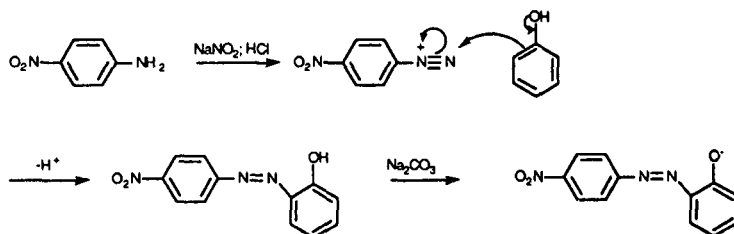


Schéma 26 Réaction des phénols avec la *p*-nitroaniline diazotée

La réaction peut aussi avoir lieu en para. On remarque que ce couplage peut aussi se produire avec les amines. Ce test n'est donc pas entièrement spécifique. Cependant la couleur obtenue avec les amines est légèrement différente (rose-rouge).

### 2,4 dinitrophénylhydrazine (réactif des cétones et aldéhydes)

Les plaques de couche mince sont sprayées avec une solution à 0.4% de 2,4 dinitrophénylhydrazine dans l'HCl 2N. Les composés cétoniques réagissent en produisant une coloration jaune à rouge-orangée. Il est parfois nécessaire de chauffer quelques minutes à l'étuve (110°C). Le schéma 27 illustre la réaction produite.

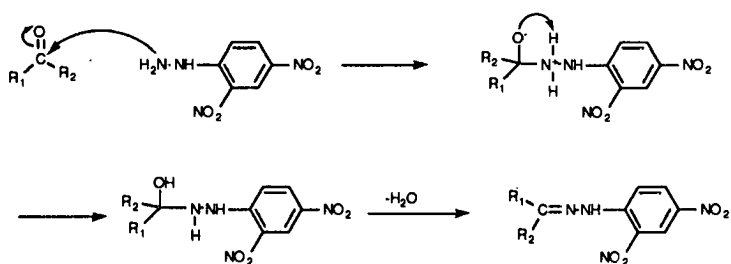


Schéma 27 Réaction des cétones avec la 2,4 dinitrophénylhydrazine

## 12.3 HPLC

La dernière étape de purification de certains composés a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Nous avons utilisé un système de pompes Perkin-Elmer série 3 couplé avec un détecteur UV. Deux types de détecteurs ont été utilisés pendant ce travail. Pour les séparations effectuées dans un but purement analytique, nous nous sommes servis d'un détecteur à barrette de diode (DAD) Hewlett-Packard 1040A. Pour les séparations préparatives, un détecteur Perkin-Elmer LC-75 réglé sur 254 nm a été utilisé. La phase utilisée est une phase inverse RP-18, diamètre des particules 7  $\mu m$  (Bischoff). La colonne est une semi-préparative de 8 x 250 mm munie d'une précolonne de 30 mm. Comme solvants, nous avons utilisé exclusivement du méthanol qualité HPLC (Maecheler Frères) et de l'eau bidistillée, parfois additionnée d'un peu d'acide phosphorique. L'eau est filtrée avant usage sur membrane millipore 0.45  $\mu m$ , le méthanol est filtré par le fournisseur sur membrane 0.32  $\mu m$ . Les solvants sont dégazés à l'hélium avant et pendant leur utilisation.

## 12.4 LPLC

Les chromatographies liquides à basse pression sont faites sur une colonne en verre de 30 cm x 1 cm munie d'un robinet en téflon. Le diamètre des particules de silicagel est de 0,015-0,040 mm (E. Merck, Darmstadt). Le remplissage se fait par voie humide. Le silicagel est mis en suspension dans de l'hexane, puis est versé à l'intérieur de la colonne. On passe ensuite le solvant d'éluotion.

## 12.5 GC

Des essais de séparations sont d'abord faits sur GC avant de passer à la GC-MS. Nous avons utilisé pour cela un chromatographe DANI 3900 équipé d'un détecteur FID et muni d'une colonne capillaire en verre revêtue d'un film de polymère de type OV-1 (diméthyle-polysiloxane). La longueur de la colonne est 30 m et le diamètre interne 0.32 mm, l'épaisseur du film de polymère est 0.3  $\mu$ m. Le système d'injection est réglé sur un rapport de split 1/30.

## 13 Méthodes spectroscopiques

### 13.1 $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ -RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été mesurés sur trois appareils différents, Les spectres à 200 MHz sont mesurés sur un appareil Varian Gemini-200, les spectres à 400 MHz sur un appareil Brucker AMX-400, Les spectres à 600 MHz sont mesurés sur un appareil Brucker AMX2-600.

On utilise en général les solvants les plus apolaires possibles, cela afin d'éliminer au maximum les problèmes liés au pic de l'eau. Nous avons utilisé principalement l'acétone- $\text{D}_6$ , le  $\text{CDCl}_3$  et le  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Les échantillons sont placés dans des tubes haute précision de 5 mm de diamètre. Des micro-tubes de 2 mm de diamètre sont couramment utilisés lorsque qu'il s'agit d'augmenter la concentration des échantillons, ce qui a été un problème constant au long de ce travail. Lorsque c'est nécessaire, les échantillons sont filtrés sur un petit tampon de papier filtre tassé à l'intérieur d'une pipette pasteur. Aucun standard interne n'est utilisé, le pic du solvant sert de référence.

### 13.2 IR

Tous les spectres sont mesurés sur un spectrophotomètre FT-IR Perkin-Elmer 1720X. Une solution étherée ou éthanolique du produit est déposée sur une plaque de NaCl puis évaporée au moyen d'un foehn. Le résidu sec est ensuite mesuré sur un domaine allant en général de 800-4000  $\text{cm}^{-1}$  et on lui soustrait le spectre de la plaque seule. Cette technique présente l'avantage de permettre la récupération du produit par lavage de la plaque de NaCl avec un solvant approprié.

### 13.3 MS et MS-MS

Les spectres de masse sont mesurés sur un appareil Delsi-Nermag R30-10 à triple quadropôle. Les valeurs sont indiquées en  $m/z$  (%). Les échantillons sont introduits par GC pour les échantillons vaporisables, ou de manière directe pour les solides. La tension d'accélération des électrons ionisants est de 70 eV. Dans le cas des ionisations chimiques (DCI), l'échantillon est déposé sur un filament de tungstène que l'on porte en quelques secondes à des températures supérieures à 1000 °C. Le gaz utilisé pour l'ionisation est toujours l'ammoniac. Lorsque l'on fait de la MS-MS le gaz de collision est toujours l'argon ( $0.5-1.0 \cdot 10^{-1}$  Atm). L'énergie de collision est de 20-40 eV. Chaque fois que c'est possible, les spectres de produits inconnus font l'objet d'une recherche dans la librairie de spectres "Wiley".

### 13.4 GC-MS

Le spectromètre de masse est couplé avec un chromatographe en phase gazeuse Dani 6500 équipé d'une colonne capillaire de type OV-73 (5% phényl, 95% méthyl) de 25 m de longueur et 0.32 mm de diamètre. Le débit d'hélium est d'environ 1ml/min. Cette colonne présente un important bleeding aux températures plus élevées que 250°C. Les conditions utilisées pour l'analyse GC-MS des fractions hexane mycélium, AcOEt mycélium et étherée non-volatile sont les mêmes. L'injecteur et l'interface sont réglés sur 300°C. Le programme est un gradient linéaire de température, 80° - 300° (5°/min), puis 300°-320° (10°/min.).

La fraction étherée volatile a été analysée sur un GC-MS Hewlett-Packard HP 5890 série II couplé à un HP 5971A Mass Selective Detector. La colonne du GC est une HP1 (diméthyle-polysiloxane) de 25 m, diamètre 0.2 mm, film 0.5  $\mu\text{m}$ . Le débit d'hélium est 0.8-0.7 ml/min. Nous avons utilisé le programme suivant: 50° (3min.), 50° - 100° (5°/min.).

### 13.5 Rotation spécifique $[\alpha]_D$

Toutes les valeurs de polarimétrie proviennent d'un appareil Perkin-Elmer 241. Nous avons généralement utilisé une cuve de 1 dm de longueur et 1 mm de diamètre (volume environ 1 ml). Quelques mesures ont cependant été faites dans une cuve de 1 cm de longueur et 1 cm de diamètre. Nous avons calculé l'erreur sur la mesure de l' $\alpha$  à l'aide de la formule suivante:

$$\Delta \bar{x} = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} (\Sigma x_i^2) - N\bar{x}^2}$$

Le tableau 22 donne un exemple pris sur les mesures de l' $\alpha$  du composé 12.

	$\alpha$ mesuré	$\alpha^2$
	-0.112	0.0125
	-0.113	0.0127
	-0.101	0.0102
	-0.104	0.0108
	-0.090	0.0081
	-0.084	0.0070
N = 13	-0.104	0.0108
	-0.101	0.0102
	-0.102	0.0104
	-0.111	0.0123
	-0.108	0.0116
	-0.096	0.0092
	-0.101	0.0102
	$\bar{\alpha} = -0.102$	$\Sigma \alpha_i^2 = 0.136$

Tableau 22 Mesures de  $\alpha$  pour le composé 12

En remplaçant les valeurs dans l'équation, on obtient un  $\Delta \alpha = 0.0026$ . On voit donc que les valeurs de  $\alpha$  en dessous de 0.0026 ne sont pas fiables car comprises dans l'erreur expérimentale. L'erreur sur la pesée est estimée à  $\Delta m = \text{env. } 50 \mu\text{g}$ . Les pesées également posent donc problème lorsque l'on a que quelques centaines de  $\mu\text{g}$ . L'erreur expérimentale relative sur  $[\alpha]_D$ , donc  $\Delta[\alpha]_D/[\alpha]_D$  est égale à la somme des erreurs relatives sur la masse, qui vaut  $(\Delta m/m)$  et sur l' $\alpha$ , qui vaut  $(\Delta \alpha/\alpha)$ . Donc pour le cas de 12, où la masse vaut 4.9 mg et l' $[\alpha]_D$  vaut  $21^\circ$ , on aura une erreur absolue  $\Delta[\alpha]_D = 0.7^\circ$ .

### 13.6 UV

Les spectres UV sont mesurés sur un spectrophotomètre UV-VIS HP 8452A muni d'un détecteur à barrette de diodes (DAD). Toutes les mesures sont faites dans une cuve de quartz de 1 cm de longueur. Le solvant généralement utilisé est le méthanol. Le domaine de mesure est de 200 à 500 nm. Certains spectres sont cependant mesurés dans la cellule de mesure du HPLC-UV(DAD) Perkin-Elmer. Ces appareils sont équipés d'un détecteur à barrettes de diode (DAD) qui permet de mesurer de multiples longueur d'ondes simultanément, et donc d'avoir à chaque moment de l'évolution du processus chromatographique, une image précise du spectre des produits purs ou des mélanges de produits qui défilent dans la cellule de mesure.

## 14 Technique de culture du champignon

Toutes les cultures et les manipulations se font dans des conditions stériles. Nous utilisons le milieu de culture synthétique ZMA, de composition parfaitement définie et qui avait été testé avec succès par S. Witt [82] dans le cadre d'un travail de diplôme sur le champignon *Ceratocystis fimbriata f. sp. platani*. Sa composition pour 1 l d'eau bidistillée est: Glucose anhydre (18,2 g), L-asparaginemonohydrate (1.0 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.5 g),  $\text{MgSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$  (0.5 g), Aneurine (vit. B1) (2.0 mg), solution d'éléments de trace (0.2 ml). La solution d'éléments de trace est préparée par dissolution de  $\text{FeCl}_3(\text{H}_2\text{O})_6$  (0.4 g), une goutte d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  95%,  $\text{ZnSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$  (0.45 g),  $\text{MnSO}_4(\text{H}_2\text{O})_5$  (25 mg),  $\text{CuSO}_4(\text{H}_2\text{O})$  (25 mg) dans 1 l d'eau bidistillée. Ce milieu est versé dans des Erlenmeyers de 500 ml à "chicane". Dans chaque récipient, 200 - 250 ml de milieu ZMA sont placés. On ferme les Erlenmeyers par un tampon d'ouate hydrophobe (Flawa). Le col est ensuite recouvert d'une feuille d'aluminium et les Erlenmeyers sont autoclavés à 120° pendant 20 minutes. Un nombre de 24 ou 48 Erlenmeyers sont ensuite inoculés avec 1 ml d'une suspension d'ascospores, de mycélium et de périthèces. Pour obtenir cette suspension, la couche supérieure d'une culture sur gélose (PDA) de *C. fimbriata* est grattée et on transfère les lambeaux obtenus dans une bouteille contenant 55 ml d'eau distillée stérile ainsi que des petites billes de verre. Le tout est agité quelques instants afin de désagréger les lambeaux d'Agar. Des cultures sur PDA âgées d'environ 1 mois sont utilisées pour les inoculations.

Les Erlenmeyers sont ensuite incubés pendant 21 jours à température ambiante sur un agitateur rotatif à 135 tours/min. Après 5 jours, la culture montre une couleur blanche à rosée. Après 10-12 jours, elle vire au vert et commence à produire une agréable odeur de banane mûre. Après 21 jours, la culture apparaît noire. Le pH du milieu de culture avant inoculation est de 6.0, le pH à la fin de la culture varie de 4.0-6.0 suivant la culture. La lumière ne joue aucun rôle apparent dans la croissance et par conséquent, nos cultures sont placées en lumière naturelle. Malgré une répétition scrupuleuse du mode opératoire de la culture, nous observons des variations importantes au niveau du rendement en extrait brut ainsi qu'en mycélium, les deux étant évidemment liés (tableau 23).

	volume de la culture	poids frais mycélium	poids extrait brut	pH final	période de culture
meilleure culture	4 litres	237 g	550 mg	5.0	mai-juin
pire culture	8 litres	84 g	61 mg	4.8	mars-avril

Tableau 23 Rendements des cultures

Nous pensons que ces différences peuvent être attribuées au moins en partie au cycle des saisons. En effet, le champignon pousse de manière nettement plus vigoureuse pendant le printemps que pendant le reste de l'année. Ainsi, un des pires résultats provient d'une culture effectuée au mois de mars. A l'opposé, le meilleur rendement provient d'une culture débutée au mois de mai.

## 15 Traitements préliminaires

A la fin de la période de culture les Erlenmeyers sont débouchés et le milieu est filtré. Suivant la nature du mycélium, des filtres en papier ou en laine de verre sont utilisés. Le filtrat est récupéré ainsi que le mycélium. Ce dernier est désinfecté par immersion dans l'éthanol, puis lyophilisé pendant 2-3 jours sur un appareil Secroid et réduit en poudre à l'aide d'un mixer. Le poids sec après lyophilisation représente moins de 10% du poids frais. La poudre est transvasée dans un Erlenmeyer puis extraite à l'hexane pendant quatre heures sous agitation magnétique. Le résidu est filtré puis encore extrait pendant quatre heures à l'acétate d'éthyle.

Le filtrat du milieu de culture est transvasé dans deux extracteurs en continu de type Kutscher-Stuedel d'une capacité de 2l. Le solvant d'extraction est de l'éther bidistillé. Tous les rodages de l'appareil sont recouverts de manchettes de téflon afin d'assurer une parfaite étanchéité. A la fin du processus, tout le matériel est désinfecté avec une solution aqueuse 1/10 de formaldéhyde commercial. Les surfaces de travail sont nettoyées à l'éthanol.

## 16 Test de toxicité

Notre test consiste en l'observation de la nécrose induite sur les feuilles par l'absorption d'une solution de la toxine à tester. Les feuilles de caféier utilisées pour le test sont choisies parmi les dernières poussées et mesurent environ deux centimètres. Elles sont coupées soigneusement à leur base avec une lame de rasoir puis sont plongées dans une solution aqueuse des composés à tester. Ces solutions ont un volume de 1 ml ou 0.5 ml suivant la

quantité de produit à disposition et sont déposées dans des flacons de 6 ml. Afin de limiter les changements de concentration provenant d'une évaporation de la solution, les flacons sont fermés au moyen d'une feuille d'aluminium. 2-3 gouttes d'acétone (parfaitement toléré à ces concentrations) sont additionnées afin de faciliter la solubilisation. Un essai à blanc (eau + acétone) est toujours préparé dans les mêmes conditions. Le test se déroule sur une période de 72 heures. Aucun éclairage artificiel n'est utilisé. La toxicité est ensuite évaluée par la mesure de la zone nécrosée. - = le pétiole reste vert, + = nécrose de 0.1 - 1 mm, ++ = nécrose 1-3 mm.

## 17 Synthèse de 5

Nous avons suivis le mode opératoire proposé par Kendall *et al.*[60].

### *acide 3-(3,5-diméthoxyphényl)-2-méthylpropénoïque (51)*

53,5 g (0.32 mol) de 3,5 diméthoxybenzaldéhyde purum (Aldrich) sont mélangés avec 43,2 g (0.32 mol) d'anhydride propionique et 31,9 g (0.32 mol) de propionate de sodium. Le mélange est chauffé à 155°C pendant 20 h sous agitation magnétique. Après retour à température ambiante 150 ml d'eau sont ajoutés et le précipité est filtré sur Büchner. Le solide brun-clair obtenu est redissout dans 150 ml de NaOH 2N. Cette phase aqueuse est lavée avec 4 x 130 ml d'éther. Les phases étherées sont encore réextraites avec 150 ml de NaHCO<sub>3</sub> 10%. Les phases basiques sont rassemblées et ramenées à pH1 avec de l'HCl 5N. Le solide obtenu est filtré sur Büchner est mis au dessiccateur sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Rendement 50,2 g soit 70,2% ([60] 74%).

### *acide 3-(3,5-diméthoxyphényl)-2-méthylpropanoïque (52)*

25 g (0.11 mol) de 51 en suspension dans 500 ml d'acétate d'éthyle sont hydrogénés sous pression de 4 bars, en présence de 1.5 g de Pd/C 10% pendant 20 h sous agitation mécanique constante. Après filtration sur membrane millipore et évaporation du solvant sous pression réduite à 10 mmHg, on obtient 27.4 g d'huile jaune. Cette huile cristallise au frigo sous forme de longues aiguilles. Le reste de 51 est engagé dans les mêmes conditions. Le rendement total atteint 50.2 g soit 99.6% ([60] 100%).

### *5,7-diméthoxy-2 méthylindane-1-one (53)*

50.2 g (0.22 mol) de 52 sont mélangés avec 250 g de PPA à 90°C. Après 7 min. d'agitation manuelle, on rajoute 150 g de PPA à 90°C et on agite encore 5 min. puis on ajoute 650 ml d'eau et on agite mécaniquement pendant la nuit. Le mélange réactionnel est extrait avec 4 x 150 ml de CHCl<sub>3</sub>. Cette phase organique est ensuite lavée avec 100 ml de NaHCO<sub>3</sub> et 200 ml d'eau puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après filtration et évaporation, le résidu est distillé

sur Claisen Vigreux à 165°C/0.8 mmHg. Le liquide obtenu cristallise et on récolte 38.5 g d'un solide blanc fondant à 78°C ([60] 76-77), soit 83% de rendement ([60] 88%).

#### *4,6 diméthoxy-2-méthylindène-3-yl-trifluoracétate (54)*

8.5 g (0.041 mol) de 53 sont agités pendant 1.5 h avec 50 ml d'anhydride trifluoracétique. La solution devient bleue marine après 30 sec. et noire après quelques minutes. Le TFFA en excès est évaporé à l'évaporateur rotatif. L'huile noire résiduelle est distillée au Claisen sans colonne. On obtient 1.8 g d'huile visqueuse distillant entre 100-150°C/0.2 mmHg. Cette huile est un mélange complexe que nous séparons sur colonne de silicagel avec l'éluant AcOEt/hexane (1:2). Un spectre de masse des différentes fractions est mesuré. Il s'avère que le produit recherché est largement minoritaire. Nous refaisons donc la réaction avec 10.0 g (0.048 mol) et 80 ml de TFAA en réduisant le temps à 30 min. Le produit souhaité est formé très majoritairement et est engagé dans les étapes suivantes sans distillation. Rendement 14.4 g soit 98 % ([60] 88%).

#### *6,8-diméthoxy-3-méthylisocoumarine (55)*

0.5 g (1.6 mmol) de 54 dans 70 ml d'acétate d'éthyle sont ozonolysés pendant environ 20 min. à -55°C. La réaction est stoppée dès que l'effluent du milieu réactionnel fait virer au brun une solution aqueuse de KI. Dès ce moment, le milieu réactionnel cesse de réduire l'ozone, prouvant que la fin de la réaction est atteinte. 1 ml de diméthyl sulfite sont ajoutés et le mélange est laissé se réchauffer jusqu'à température ambiante. Après lavage avec NaHCO<sub>3</sub> 10%, HCl 2N et NaCl sat., la phase organique est filtrée sur silicagel pour la désodoriser, puis évaporée. Le résidu est une huile jaune que l'on analyse par MS. Cette huile contient le produit désiré ainsi que des impuretés de plus haut PM. Le reste de 54 (3 g) est traité comme ci-dessus et le produit obtenu est mélangé avec le premier essai. 55 est obtenu pur par chromatographie sur colonne de silice avec l'éluant AcOEt/hexane (10:5), R<sub>f</sub> = 0.33. le rendement est 400 mg soit 16% ([60] 61%). F = 153.5°C ([60] F = 154-156°C).

#### *6,8-Dihydroxy-3-méthylisocoumarine (5)*

A 200 mg (0.9 mmol) de 55 dans 30 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à -70°C, on additionne goutte-à-goutte et sous agitation magnétique constante 1ml de BBr<sub>3</sub> sur une période de 30 min. Le mélange est encore agité toute la nuit à température ambiante, puis 40 ml d'éther sont ajoutés. La phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur CaSO<sub>4</sub> et évaporée. A la fin de la réaction on obtient un mélange des isocoumarines 4 (15-20%) et 5 (80-85%). Cela provient d'une déméthylation incomplète. Ces produits sont séparés sur silicagel avec l'éluant toluène/acide acétique (25:5). Le reste de 55 (180 mg) est traité dans les mêmes conditions. Le rendement moyen est de 63 % ([60] 87%).

## 18 Synthèse d'un dérivé méthylé de 12

Nous avons travaillé par analogie avec le mode opératoire décrit pour la méthylation de la Scytalone [67]. 7.85 mg (0.037 mmol) de 12 dans 5 ml d'acétone sont mélangés avec 174 mg (1.4 mmol) de diméthylsulfate et 255 mg (1.8 mmol) de  $K_2CO_3$  anhydre. Le mélange est chauffé pendant 18 h à reflux sous agitation magnétique. Après ce temps le produit de départ a disparu. Le mélange est ramené à température ambiante et l'acétone évaporé. Le résidu est dilué dans de l'eau et le produit méthylé extrait dans le chloroforme. Après séchage sur  $CaSO_4$ , la phase organique est filtrée et évaporée, Rf (AcOEt, Silice) = 0.6. Le produit obtenu est analysé par spectrométrie de masse et  $^1H$ -RMN.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1] A. Zimmermann, *Buitenzorg* 1900, IV, 18.
- 2] R. E. Pontis, *Phytopathology* 1951, 41, 178.
- 3] J. Chevaugéon, *Supplément colonial à la revue de mycologie* 1957, XXII, 45.
- 4] J. W. Moller, J. E. De Vay, *Phytopathology* 1968, 58, 1499.
- 5] M. Szkolnik, *Plant Disease Reporter* 1951, 35, 500.
- 6] J. Z. Castillo, G. H. Quiceno, 'Comparacion de lineas de *Coffea arabica* L. por su resistencia a *Ceratocystis fimbriata* (Ell. et Halst.) Hunt', Cenicafé, Chinchina (Colombia), 1970. p. 95.
- 7] J. J. Castano, 'La Llaga Macana o Cancer del Tronco y de los Tallos del Cafeto', Cenicafé, Chinchina (Colombia), 1952. p. 1.
- 8] B. D. Halsted, *New Jersey Agr. Expt. Sta. Bull.* 1890, 76, 32.
- 9] P. A. Saccardo, *Syll. Fung.* 1892, 10, 215.
- 10] J. A. Elliot, *Phytopathology* 1923, 13, 56.
- 11] J. A. Elliot, *Phytopathology* 1925, 15, 417.
- 12] E. Melin, J. A. Nannfeldt, *Sv. Skogsvardsf. Tidskr.* 1934, 3-4, 397.
- 13] R. V. Davidson, *J. Agr. Res.* 1935, 50, 789.
- 14] B. K. Bakshi, *Brit. Mycol. Soc. Trans.* 1950, 33, 111.
- 15] J. Hunt, *Lloydia* 1956, 19, 1.
- 16] W. Martin, *J. U. S. D. A.* 1949, circular 798,
- 17] E. Schieber, O. N. Sosa, *Plant Disease Reporter* 1960, 44, 672.
- 18] L. J. Crone, 'Ph. Thesis', Dept. of Plant Pathology, New Brunswick, New Jersey, 1962.
- 19] A. S. Costa, H. P. Krug, *Phytopath. Z.* 1935, Z.8, 507.
- 20] G. Malaguti, *Agron. Trop. Maracay Venezuela* 1952, 4, 287.
- 21] R. N. Campbell, *Plant Disease Reporter* 1960, 44, 625.

- 22] J. E. De Vay, F. L. Lukezic, H. English, K. Uriu, *Calif. Agr.* 1962, 16, 2.
- 23] B. D. Halsted, D. G. Fairchild, *J. Mycol.* 1891, 7, 1.
- 24] B. D. Webster, E. E. Butler, *Can. J. Botany* 1967, 45, 1457.
- 25] E. O. Olson, W. J. Martin, *Phytopathology* 1949, 39, 17. (Abstract)
- 26] K. Yasuda, M. Kojima, *Agric. Biol. Chem.* 1986, 50, 1839.
- 27] H. P. Hanssen, E. Sprecher, *Z. Naturforsch. C. Biosci.* 1981, 36c, 1075.
- 28] R. P. Collins, A. F. Halim, *Lloydia* 1970, 33, 481.
- 29] R. P. Collins, M. E. Morgan, *Phytopathology* 1961, 52, 407.
- 30] E. Sprecher, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 1964, LXXVII, (150).
- 31] R. F. Curtis, *Experientia* 1968, 24, 1187.
- 32] A. Stoessl, *Biochem. and Biophys. Res.* 1969, 35, 186.
- 33] K. Dörffling, W. Petersen, *Z. Naturforsch.* 1984, 39c, 683.
- 34] P. Normand, P. Simonet, L. Giasson, P. Ravel-Chapius, J. -A. Fortin, M. Lalonde, *Curr. Genet.* 1987, 11, 335.
- 35] S. Ake, H. Darbon, L. Grillet, L. Lambert, *Phytochemistry* 1992, 31, 1199.
- 36] R. P. Collins, A. F. Halim, *Mycologia* 1977, 69, 1129.
- 37] E. Sprecher, K. -H. Kubeczka, M. Ratschko, *Arch. Pharm.* 1975, 308, 843.
- 38] E. Lanza, J. K. Palmer, *Phytochemistry* 1977, 16, 1555.
- 39] H. P. Hanssen, W. -R Abraham, *Tetrahedron* 1988, 44, 2175.
- 40] N. Claydon, J. F. Grove, M. Hosken, *Phytochemistry* 1974, 13, 2567.
- 41] J. D. De Angelis, J. D. Hodges, T. E. Nebeker, *Can. J. Botany* 1985, 64, 151.
- 42] W. A. Ayer, S. K. Attah-Poku, L. M. Browne, H. Orszanska, *Can. J. Chem.* 1987, 65, 765.
- 43] V. A. Adisa, *J. Basic. Microbiol.* 1987, 27, 411.

- 44] H. P. Hanssen, E. Sprecher, in 'Flavour'81', Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1981, p. 547.
- 45] E. Sprecher, H. P. Hanssen, *Planta Medica* **1982**, *44*, 41.
- 46] E. Sprecher, H. P. Hanssen, *Antonie van Leeuwenhoek* **1983**, *49*, 493.
- 47] E. Müller, W. Loeffler, 'Mycologie', 4th Ed., Thieme Verlag, Stuttgart, 1982.
- 48] B. G. Torsell, 'Natural Product Chemistry', John Wiley & Sons, Chichester, 1983.
- 49] G. N. Agrios, 'Plant pathology', 3rd Ed., Academic Press, San Diego, 1988.
- 50] G. A. Strobel, *Agronomie* **1984**, *4*, 687.
- 51] R. J. Cole, R. H. Cox, 'Handbook of toxic fungal metabolites', Academic Press, San Diego, 1981.
- 52] K. Hostetmann, 'Methods in plant biochemistry', Academic Press, London, 1991.
- 53] K. Borgschulte, J. Pinon, D. Schomburg, W. Trowitsch-Kienast, S. Rebuffat, B. Bodo, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8351.
- 54] H. Kumagai, T. Masuda, M. Ohsono, S. Hattori, H. Naganawa, T. Sawa, M. Hamada, M. Ishisuka, T. Takeuchi, *J. Antibiotics* **1990**, *XLIII*, 1505.
- 55] E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon, 'Tables of Spectral data for Determination of Organic Compounds', 2nd Ed., Springer Verlag, Berlin, 1983.
- 56] G. W. Mc Graw, R. W. Hemingway, *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1315.
- 57] Y. Furutani, H. Naganawa, T. Takeuchi, H. Umezawa, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 1179.
- 58] Y. F. Hallock, J. Clardy, D. S. Kenfield, G. Strobel, *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3123.
- 59] E. Hardegger, W. Rieder, A. Walsler, F. Kugler, *Helv. Chim. Acta* **1966**, *49*, 1283.
- 60] K. J. Kendall, T. H. Fisher, H. P. Schultz, T. P. Schultz, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4218.
- 61] R. H. Hamilton, H. E. Meyer, R. E. Burke, C. S. Feung, R. O. Mumma, *Plant Physiol.* **1976**, *58*, 77.

- 62] R. Weindling, O. H. Emerson, *Phytopathology* 1936, 26, 1068.
- 63] S. Iwasaki, H. Muro, S. Nozoe, S. Okuda, *Tet. Lett.* 1972, 1, 13.
- 64] R. D. Stipanovic, A. A. Bell, *J. Org. Chem.* 1976, 41, 2468.
- 65] T. Morita, H. Aoki, *Agric. Biol. Chem.* 1974, 38, 1501.
- 66] J. A. Findlay, D. Kwan, *Can. J. Chem.* 1973, 51, 1617.
- 67] A. A. Bell, R. D. Stipanovic, J. E. Puhalla, *Tetrahedron* 1976, 32, 1353.
- 68] U. Sankawa, H. Shimada, T. Sato, T. Kinoshita, K. Yamasaki, *Chem. Pharm. Bull.* 1981, 29, 3536.
- 69] S. Iwasaki, H. Muro, K. Sasaki, S. Nozoe, S. Okuda, *Tet. Lett.* 1973, 37, 3537.
- 70] A. Derome, 'Modern NMR Techniques for Chemistry Research', 3rd Ed., Pergamon Press, New York, 1987.
- 71] J. A. Findlay, D. Kwan, *Can. J. Chem.* 1973, 51, 3299.
- 72] W. A. Ayer, L. M. Browne, M. -C. Feng, H. Orzanska, H. Saeedi-Ghomi, *Can. J. Chem.* 1986, 64, 904.
- 73] K. Kameda, H. Aoki, H. Tanaka, M. Namiki, *Agr. Biol. Chem.*, 1973, 37, 2137.
- 74] J. R. Johnson, W. F. Bruce, J. D. Dutcher, *J. A. C. S.* 1943, 65, 2005.
- 75] R. P. Mull, R. W. Townley, C. R. Scholz, *J. A. C. S.* 1945, 67, 1626.
- 76] Waksman and Woodruff, *J. Bact.* 1942, 44, 373.
- 77] M. H. Wheeler, R. D. Stipanovic, *Exp. Myc.* 1979, 3, 340.
- 78] A. Stoessl, 'Toxins in Plant disease', R. B. Durbin, New-York, 1981. p. 116.
- 79] R. D. Barry, *Chem. Review* 1964, 64, 229.
- 80] G. A. Greenblatt, M. H. Wheeler, *J. Liq. Chromatogr* 1986, 9, 971.
- 81] Eastman TLC visualization reagents and chromatographic solvents', Eastman Kodak Company, New-York, 1973.
- 82] S. Witt, 'Untersuchungen über das Wachstum von *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* und Toxinproduktion in einem Bioreaktor, Diplomarbeit', ETHZ, Zürich, 1990.

- [83] E. Chalutz, J. E. Devay, *Phytopathology* 1969, 59, 750.
- [84] W. G. Koch, V. Sinnwell, *Z. Naturforsch. C: Biosci.* 1987, 42, 159.
- [85] R. P. Collins, K. Karlis, *Mycologia* 1969, 41, 645.
- [86] S. L. Lee, C. C. Chou, C. M. Wu, *Zhon Gguo Nongye Hau Xue* 1991, 29  
43.
- [87] R. P. Collins, K. Karlis, *Mycopathol. Mycol. App.* 1968, 36, 214.