

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL  
FACULTE DES SCIENCES

**Isolément et identification de métabolites secondaires  
phytotoxiques de *Stereum hirsutum*, un des champignons  
impliqués dans une maladie de la vigne, l'ESCA**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par :

**Guy-Marie DUBIN**

Chimiste diplômé de l'Université de Poitiers

Pour l'obtention du titre de

Docteur ès Sciences

des Universités de Neuchâtel et de Poitiers

dans le cadre d'une cotutelle

Institut de Chimie, Université de Neuchâtel, juin 1998

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Isolement et identification de métabolites  
secondaires phytotoxiques de *Stereum hirsutum*,  
un des champignons responsables d'une maladie  
de la vigne, l'ESCA

de M. Guy-Marie Dubin

---

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

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

Mme B. Dubos (Bordeaux) et MM. R. Tabacchi (directeur de  
thèse), A. Ambles (co-directeur de thèse, Poitiers),  
R. Neier, R. Pezet (Changins) et M. Boulay (Epernay)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 29 septembre 1998

Le doyen:

  
F. Stoeckli

à Christine

à mes parents

à Jean-Marie, Myriam

à Katia

à Marjorie, Candice

## Remerciements

Le travail rapporté dans cet ouvrage a été réalisé de juillet 1994 à juin 1998 dans les laboratoires de Chimie Organique Analytique de l'Université de Neuchâtel sous la direction de Monsieur le Professeur Raffaele TABACCHI. Je le remercie de m'avoir accueilli dans son groupe, pour la confiance qu'il m'a accordé et pour l'indépendance qu'il m'a laissé pendant ce travail.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet européen :

Maîtrise de l'esca et respect de l'environnement

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur André AMBLES du laboratoire de Chimie des Produits Naturels et de l'Environnement de l'Université de Poitiers pour avoir accepté d'être co-directeur de thèse et pour toute l'aide qu'il m'a apportée.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail :

Professeur R. Neier (Institut de Chimie de Neuchâtel)

Docteur B. Dubos (INRA de Bordeaux)

Docteur M. Boulay (Laboratoire de recherche LVMH à Epemay)

Docteur R. Pezet (Station fédérale de Changin)

Je remercie également :

Monsieur Pierre Thévenet-Coutos des Laboratoires de LVMH pour la réalisation de tests sur feuilles de vigne.

Monsieur le Professeur Roustan de L'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse pour la réalisation de tests sur cals de vigne.

Le Docteur Abdellatif Fkyerat pour ses conseils ainsi que pour la synthèse de nouveaux produits naturels.

Le Docteur Saturnin Claude pour ses conseils en chromatographie.

Le Docteur Philippe Larignon pour l'obtention de matériel végétal (bois et sève).

Tous les membres du groupe pour leur aide et pour leur joie de vivre. En particulier Mademoiselle Christine Poliart qui a contribué à ce travail lors d'un stage.

Ma famille pour son indispensable soutien.

## Abréviations utilisées

Pour simplifier l'écriture, les abréviations suivantes ont été utilisées :

APCI	ionisation chimique à pression atmosphérique
<sup>13</sup> C-NMR	résonance magnétique nucléaire du carbone
COSY	spectre de corrélation proton-proton
d	doublet
DCI	ionisation chimique par désorption
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfert
EI	ionisation par impact électronique
ESI	ionisation par électrospray
EtOAc	acétate d'éthyle
GC	chromatographie en phase gazeuse
<sup>1</sup> H-NMR	résonance magnétique nucléaire du proton
HETCOR	spectre de corrélation proton-carbone
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
LC	chromatographie liquide
m	multiplet
m/z	rapport masse sur charge
MeOH	méthanol
MS	spectrométrie de masse
PM	poids moléculaire
PDA	agar de dextrose de pommes de terre
q	quadruplet
RP-C18	phase inverse C18
s	singulet
scan	balayage
SIM	détection d'ions sélectionnés
SRM	détection de réactions sélectionnées
t	triplet

# TABLE DES MATIERES

<b>CHAPITRE I</b> .....	1
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
1.1 Les maladies fongiques des plantes .....	1
1.1.1 Les toxines .....	2
1.1.2 Les principales maladies cryptogamiques de la vigne .....	6
1.2 Esca .....	7
1.2.1 Historique .....	7
1.2.2 Symptômes .....	9
1.2.3 Mesures prophylactiques .....	11
1.2.4 Champignons inféodés au syndrome de l'esca .....	11
1.2.5 Biologie de <i>Stereum hirsutum</i> .....	15
1.2.6 Résultats antérieurs .....	17
1.3 Eutypiose .....	18
1.3.1 Champignon responsable de l'eutypiose .....	18
1.3.2 Résultats antérieurs .....	19
1.4 But du travail .....	19
<b>CHAPITRE II</b> .....	21
<b>ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE METABOLITES</b> .....	21
11.1 Matériel de départ .....	21
11.2 Culture sur milieu solide .....	21
11.3 Culture sur milieu liquide .....	22
11.4 Procédure d'extraction .....	22
11.5 Procédure d'isolation .....	25
11.6 Métabolites isolés .....	25
11.6.1 Identification du 2,5-dihydroxy-6-(3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl)- benzaldéhyde .....	27
11.6.2 Identification de l'alcool 2,5-dihydroxy-6-(3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl)- benzylique .....	32
11.6.3 Identification de l'alcool 2-hydroxy-5-métoxy-6-(3-méthyl-but-3-ène-1- ynyl)-benzylique .....	37

II.6.4	Identification du 2,5-dihydroxy-3,6-di-(3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl)-benzaldéhyde.....	40
II.6.5	Identification de l'alcool-2,5-dihydroxy-3,6-di-(3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl)-benzylique.....	45
II.6.6	Identification du 2,5-dihydroxy-3-(3-méthyl-but-2-ène)-6-(3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl)-benzaldéhyde.....	49
II.6.7	Identification du 2,4-dihydroxy-6-méthyl benzoate de [3',4'-dihydroxyméthyl-5'-hydroxy-6'-(3-méthyl-but-2-ényl)-phényle].....	53
II.6.8	Identification du 2,4-dihydroxy-6-méthylbenzoate (orsellinate de méthyle).....	56
<b>CHAPITRE III</b> .....		61
<b>TESTS BIOLOGIQUES</b> .....		61
III.1	Tests sur feuille de plants de vigne <i>in vitro</i> .....	62
III.2	Test comparatif entre la stéréohirsutine et l'eutypine sur tomates.....	63
III.3	Test du méthyl-frustulosinol sur tomates.....	66
III.4	Influence de la stéréohirsutine et de l'eutypine sur la croissance de cals de <i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay.....	66
<b>CHAPITRE IV</b> .....		69
<b>LA SPECTROMETRIE DE MASSE</b> .....		69
IV.1	Principes.....	69
IV.2	La source à impact électronique.....	71
IV.3	L'ionisation chimique.....	72
IV.4	L'analyseur quadripolaire.....	73
IV.5	Spectromètre à plusieurs quadripôles.....	73
IV.6	L'ionisation par électrospray (ESI).....	75
IV.7	L'ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI).....	78
IV.8	La trappe ionique.....	80
IV.9	Exemples d'utilisation de l'ESI.....	83
IV.9.1	MS.....	83
IV.9.2	MS <sup>n</sup> .....	84
IV.10	Utilisation de la LC-MS/MS pour détecter un produit à l'état de trace.....	86

<b>CHAPITRE V</b> .....	89
<b>ETUDE DU MATERIEL VEGETAL</b> .....	89
V.1 Etude du bois malade .....	89
V.1.1 Provenance du bois .....	89
V.1.2 Etude par LC-MS/MS des bruts.....	91
V.1.3 Etude des fractions de l'extrait brut de Vaux Rouillac.....	94
V.2 Etude de la sève malade .....	98
V.2.1 Provenance de la sève .....	98
V.2.2 Etude par LC-MS/MS de la sève .....	99
V.3 Recherche par LC-MS/MS des autres produits.....	99
V.3.1 Dans le bois malade .....	99
V.3.2 Dans la sève malade.....	100
<b>CHAPITRE VI</b> .....	101
<b>DISCUSSION</b> .....	101
VI.1 Métabolisme du champignon.....	101
VI.2 Origine biogénétique des produits isolés .....	103
VI.2.1 Produit 7 .....	103
VI.2.2 Produits 1-3.....	104
VI.2.3 Produits 4-6.....	107
VI.2.4 Cinétique.....	108
VI.3 Toxicité .....	108
VI.4 Matériel végétal.....	109
<b>CHAPITRE VII</b> .....	111
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	111
<b>CHAPITRE VIII</b> .....	115
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	115
VIII.1 Techniques chromatographiques.....	115
VIII.1.1 CCM.....	115
VIII.1.2 LPLC.....	116
VIII.1.3 HPLC .....	116

VIII.1.4 GC.....	116
VIII.2 Méthodes spectroscopiques.....	117
VIII.2.1 $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ -RMN.....	117
VIII.2.2 MS.....	117
VIII.2.2 GC-MS.....	117
VIII.2.4 LC/MS.....	117
VIII.3 Méthodes d'extraction.....	118
VIII.3.1 Extraction des milieux de cultures.....	118
VIII.3.2 Extraction du bois.....	118
VIII.3.3 Extraction de la sève.....	118
<b>CHAPITRE IX.....</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>119</b>

## **CHAPITRE I**

---

### **INTRODUCTION**

#### **1.1 Les maladies fongiques des plantes<sup>[1]</sup>**

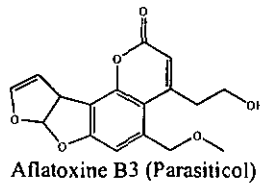
Les dégâts subis par les plantes cultivées et dus aux maladies se chiffrent chaque année en milliards de francs. Ces maladies peuvent aujourd'hui encore être la cause de famines. Même avec une protection appropriée, c'est 10 à 20% des récoltes potentielles qui sont perdues à cause des maladies des plantes. 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 responsables 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.

### I.1.1 Les toxines

Ces cryptogames produisent des toxines. En phytopathologie une pathotoxine est généralement définie comme une substance non enzymatique qui endommage les cellules de la plante-hôte ou perturbe leur métabolisme, participant ainsi à l'invasion du pathogène dans la plante. Ces toxines sont extrêmement nocives et sont efficaces à de très faibles concentrations. Elles agissent dans les cellules-hôtes en inactivant ou en inhibant la synthèse d'enzymes vitales et perturbent, jusqu'à interrompre certaines réactions vitales comme la photosynthèse, l'absorption de l'eau, la respiration cellulaire ou affectent les processus de transcription de l'ADN et de traduction de l'ARN.

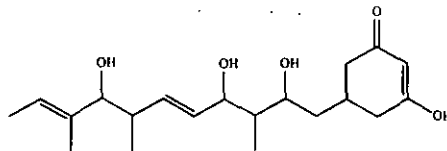
La science de la mycotoxicologie a débuté avec la découverte des aflatoxines isolées d'*Aspergillus flavus* au début des années 60. Ces mycotoxines, provoquant des tumeurs du foie, sont très dangereuses pour les mammifères qui consomment les plantes contaminées. D'où, l'intensification de l'intérêt et de la recherche sur les mycotoxines.

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



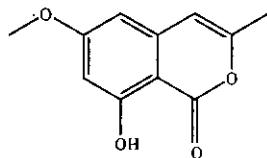
Il n'est pas possible de donner une liste exhaustive des phytotoxines<sup>[2]</sup>, nous citerons que quelques exemples typiques ainsi que des exemples du laboratoire qui travaille depuis plus de 10 ans sur les phytotoxines.

*Alternaria citri*<sup>[3]</sup> produit plusieurs toxines qui endommagent spécifiquement les citronniers. La toxine principale possède la structure suivante :

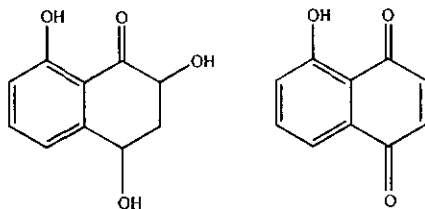


Au laboratoire plusieurs variétés de *Ceratocystis* ont été étudiées :

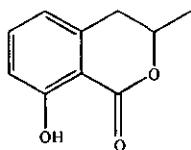
*Ceratocystis fimbriata* var. *coffea* impliqué dans la maladie du chancre du caféier produit des toxines dont l'isocoumarine<sup>[4]</sup> suivante :



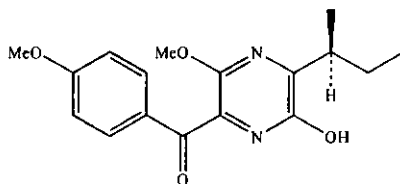
*Ceratocystis fimbriata* sp. *Platanis* est un agent pathogène du platane, dont les deux principales toxines<sup>[5]</sup> sont représentées ci-dessous :



Les crytogames peuvent être également impliqués dans des maladies de céréales. En particulier du blé et du seigle. *Septoria nodorum*<sup>[6]</sup>, est responsable de la septoriose du blé. Il produit un ensemble de pathotoxines dont l'ochracine, puissant inhibiteur de la germination et de la croissance et la septorine, inhibitrice des oxydations phosphorylantes.

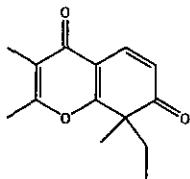


Ochracine



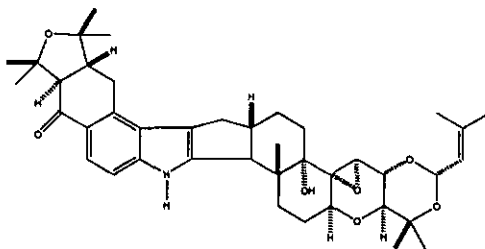
Septorine

*Cochliobolus spicifer*<sup>[7]</sup>, un autre champignon pathogène du blé produit entre autre, la spiciférone A.



Spiciférone A

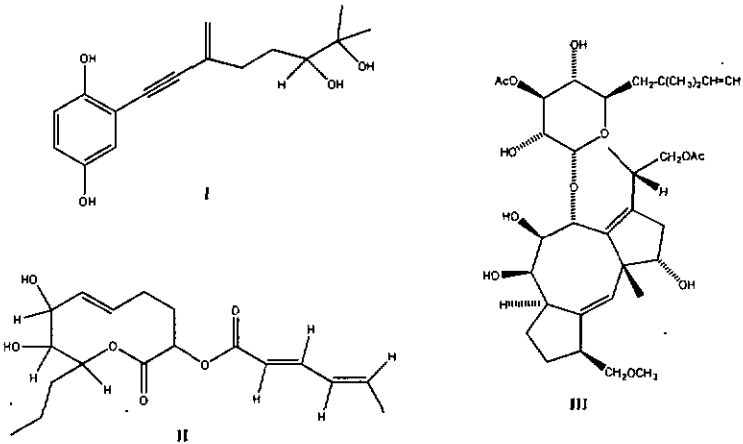
*Acremonium lolii* L.<sup>[8]</sup>, intervient dans une maladie du seigle. Une des toxines produit par ce champignon est le lolitrem B.



Lolitrem B

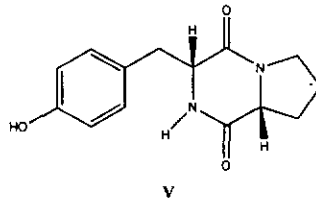
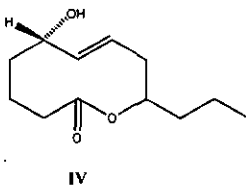
Les cryptogames s'attaquent également aux fruits et aux légumes.

Organisme	nom de la toxine	dommage sur :
<i>Phomopsis foeniculi</i> <sup>[9]</sup>	foeniculoxin (I)	fenouil
<i>Ascochyta pinodes</i> <sup>[10]</sup>	pinolidoxin (II)	pois
<i>Fusicoccum amygdali</i> Del <sup>[11]</sup>	fusicoccin (III)	tomates



Par contre, l'action de certains cryptogames peut être bénéfique, en particulier quand ils sont pathogènes de mauvaises herbes. Ils peuvent être utilisés à la place d'herbicides de synthèse.

Organisme	nom de la toxine	dommage sur :
<i>Phoma putaminum</i> <sup>[12]</sup>	putaminoxin (IV)	Erigeron annuus
<i>Alternaria alternata</i> <sup>[13]</sup>	maculosin (V)	Centaurea maculosa



Actuellement un autre champignon pathogène de mauvaises herbes est étudié dans le laboratoire. Ce cryptogame (*Stagonospora sp.*) s'attaque au liseron des champs (*Convolvulus arvensis*) et au liseron des haies (*Calystegia sepium*).

Comme cela vient d'être décrit les cryptogames sont responsables de nombreuses maladies sur les végétaux. La vigne n'échappe pas à leurs attaques.

### 1.1.2 Les principales maladies cryptogamiques de la vigne<sup>(14)</sup>

- Le mildiou (1878)

Si les conditions climatiques sont favorables le champignon *Plasmopara viticola* peut détruire à la fois les feuilles et les grappes. Malgré les progrès réalisés dans le domaine des techniques de traitement depuis la bouillie bordelaise (découverte en 1885), sa virulence en fait toujours le plus redoutable des parasites. Ce cryptogame est capable en une seule contamination, au moment de la floraison des vignes, de détruire 80% des récoltes potentielles.

- L'oïdium (1850)

Ce champignon (*Uncinula necator*) peut se développer sur les feuilles et les grappes. C'est sur cette dernière partie de la plante qu'il cause le plus de dégâts. En effet, il entraîne une perte de récolte par dessèchement des baies ou sert de point de départ à la "pourriture grise" par les blessures qu'il a provoquées.

- La pourriture grise

*Botrytis cinerea* peut, en quelques jours, provoquer une pourriture des raisins proche de la maturation et diminuer gravement la qualité des raisins quand les automnes sont humides.

- Le black rot

Apparu en France en 1885, lors de la plantation de porte-greffes résistants au phylloxéra, *Guignardia bidwelli*, champignon responsable de cette maladie, attaque les jeunes rameaux, les feuilles et les baies. Un temps doux et humide favorise son développement.

- L'antracnose

Avant l'apparition du mildiou et de l'oïdium, il s'agissait de la plus grave maladie cryptogamique de la vigne. Le champignon responsable de l'antracnose est *Elsinoe ampelina*. D'origine européenne, cette maladie est répandue dans le monde entier, mais elle sévit surtout dans les régions humides. De petites marques noires apparaissent sur les feuilles, puis forment un trou. Ces mêmes taches affectent ensuite les jeunes pousses, les tiges des fleurs et les grains. Aujourd'hui, les fongicides sont assez efficaces contre ce parasite. Les traitements de base contre le mildiou préviennent cette maladie qui n'est visible actuellement que dans les pépinières de porte-greffe.

- Les autres champignons

L'esca et l'eutypiose sont deux maladies cryptogamiques qui s'attaquent au pied de la vigne, entraînant sa mort lente par la désorganisation des tissus végétaux.

## 1.2 Esca

L'esca ou apoplexie est l'une des maladies les plus graves de la vigne puisqu'en l'absence de traitements, les souches atteintes meurent dans un laps de temps plus ou moins long. Ceci entraîne une diminution progressive du nombre de ceps plantés à l'hectare. Les conditions actuelles sont favorables à cette affection connue depuis toujours mais dont la fréquence et la gravité ont augmenté récemment.

### 1.2.1 Historique<sup>[15,16]</sup>

L'esca et sa forme apoplectique existe en Europe depuis longtemps (première description en 1873). Les champignons lignicoles responsables des dégâts pénètrent comme chez les arbres, par les plaies de taille, s'installent dans le tronc et les bras des parties âgées. Les tissus ligneux sont transformés en une substance molle, friable, analogue à de l'amadou (dans le midi « *esq* ») et qui a reçu dans certains pays un nom synonyme *Esca* (en langue d'Oc, dans le sud-est de la France), *Iska* en Grèce, *Yesca* en Espagne, *Black measles* en Amérique, *Escha* en Italie méridionale (province de

Lecce). Dans certaines parties de l'Italie on lui donne le nom de « mal dello spacco » (mal de la fente) parce que le tronc des vignes atteintes présente souvent une fente ou un sillon longitudinal.

En France, le terme d'apoplexie était en usage depuis longtemps pour désigner les souches qui mouraient brusquement. C'est ainsi que Arnaud G. de Roland<sup>[15]</sup> en 1873 a décrit une maladie très ancienne dans l'Aude. L'intérieur du bois était vermoulu à partir des plaies du tronc et l'altération s'étendait vers les racines en diminuant de largeur. La dépression longitudinale dans le bois portait : « une végétation cryptogamique en forme de cornet implanté par la pointe corrodant, avec la puissance destructive que l'on connaît à ces parasites, la matière organique ». A la lumière des connaissances actuelles cette description correspond à la présence de *Stereum hirsutum*.

Quelques années plus tard Ravaz en 1889 indiquait à propos de l'apoplexie : « la présence d'un mycélium dans les parties assez altérées. La relation qui existe entre les altérations d'une année et celles de l'année précédente n'est pas contraire à l'idée d'une cause parasitaire. S'il en est ainsi ce parasite aurait un mode d'action spécial, localisé en quelques points, car on ne la trouve pas dans tous les tissus malades. Il agirait sur la plante en sécrétant une substance qui, transportée par la sève, serait toxique pour les tissus vivants ».

La présence du *Stereum hirsutum* sur les souches atteintes d'apoplexie a été signalée de façon plus précise par Vinet<sup>[17]</sup> en 1909, puis par Rives. Enfin, les relations des champignons de l'esca (*Stereum hirsutum* et *Polyporus igniarius*) avec l'apoplexie ont été étudiées d'une façon plus détaillée dans les années 20 par Gard<sup>[18]</sup>, Rives<sup>[19]</sup>, Viala<sup>[20]</sup>, etc.

Les champignons *Stereum hirsutum* et *Polyporus igniarius* ou *Phellinus igniarius* ne sont pas spécifiques à la vigne. Ils sont déjà connus sur les arbres forestiers. *Stereum hirsutum*, l'une des espèces les plus fréquentes sur la vigne est très polyphage, se retrouve sur les branches mortes des mûriers et des chênes. *Phellinus igniarius*, Patouillard ou faux-amadouvier appartient à la famille des Polyporacées, vivant également sur divers arbres (chênes, ormes, peupliers, érables, oliviers,...).

### 1.2.2 Symptômes<sup>[21,22]</sup>

- Forme lente de la maladie

Les symptômes les plus fréquents de l'esca sont ceux de la forme lente, insidieuse et toujours mortelle à longue échéance. Les premières manifestations se traduisent par un manque de végétation qui s'aggrave d'année en année. Des altérations plus typiques apparaissent ensuite et, dans le cours de la saison, touchent les feuilles. Elles jaunissent ou rougissent à la périphérie ou entre les nervures puis, très rapidement, des nécroses se produisent au niveau des décolorations (Figure I.1). Les zones du limbe les plus éloignées des nervures sont ainsi touchées les premières. Ceci révèle de profondes perturbations dans la circulation de la sève.

Suivant la gravité de la maladie, les feuilles tombent plus ou moins tôt. Toutes ces manifestations qui, en l'absence de traitement, s'aggravent peu à peu, s'accompagnent d'un défaut d'aoûtement des bois et d'une mauvaise maturation de la vendange. Une longue décrépitude s'établit. Celle-ci ne touche souvent que les sarments portés par une branche du cep. Finalement, la souche entière ou un de ses bras meurt.



Figure I.1 : Feuille atteinte d'Esca

- Forme foudroyante de la maladie

Les souches atteintes de l'esca peuvent aussi présenter la forme foudroyante de la maladie : l'apoplexie. Elle se traduit très souvent lors des mêmes conditions climatiques, à la suite de pluies importantes, pendant les périodes chaudes.

Le nom de cette manifestation en évoque bien les symptômes. En effet, principalement sur des souches qui, la plupart du temps, n'avaient encore manifesté aucun symptôme, les feuilles fanent brutalement, se dessèchent et tombent. Les grappes restent sur la souche mais ne peuvent pas mûrir. Aucune végétation ne repart sur le cep foudroyé, sauf, au niveau du sol où le porte-greffe, ou le greffon, peuvent parfois redonner quelques pousses.

- Identification plus précise

Une coupe faite dans le tronc ou les gros rameaux du cep montre les zones de différentes couleurs et de consistances diverses. Au centre, le bois est brunâtre, décomposé, transformé en amadou. La maladie tire son nom de cette particularité.

Autour de cette zone, le bois est également brunâtre mais il conserve sa résistance mécanique. Enfin, à l'extérieur de ces parties atteintes, des taches claires peuvent être observées, révélant les endroits où les tissus sont encore sains.

Tous ces symptômes ne doivent pas être confondus avec ceux de l'eutypiose. Le cryptogame responsable de cette affection détruit le bois de la souche. Celui-ci brunit mais conserve sa résistance mécanique. De plus, la végétation portée par le cep atteint présente des symptômes très différents de ceux que nous avons décrits.

Les désordres provoqués par l'esca s'expliquent par le mode de progression du cryptogame. Ce champignon s'installe au niveau des plaies de taille et de toutes les blessures accidentelles. Le bois noircit puis, progressivement, est digéré par le champignon formant l'amadou.

### 1.2.3 Mesures prophylactiques<sup>[23,24]</sup>

Les mesures prophylactiques consistent à protéger les grosses plaies de taille, les blessures et à arracher puis brûler les souches malades.

La lutte chimique est très efficace, mais le seul produit actif est l'arsenite de sodium. Ce traitement a été découvert de façon fortuite lors de traitements d'hiver contre la pyrale par des sels arséniaux au début du siècle (1920). L'arrêt progressif de l'arsenite de sodium, dû à sa toxicité pour l'homme et pour l'environnement, mais aussi à son prix élevé, a entraîné une recrudescence de la maladie dans les vignobles en particulier français et italien. En Suisse l'arsenite de sodium est interdite depuis de nombreuses années.

L'arsenite de sodium s'emploie à la dose de 1250 grammes de matière active à l'hectolitre. Il convient de bien mouiller le tronc et les bras de souches (400 à 500 litres à l'hectare). Le traitement s'effectuera sur bois ressuyé, pendant le repos complet de la vigne, de préférence, dix jours au moins après la taille et deux ou trois semaines avant le débourrement pour éviter tout risque d'accident végétatif.

Ce traitement s'impose dans toutes les vignes où les symptômes de la maladie sont décelés. La lutte sera poursuivie pendant deux ou trois ans. Un traitement est également recommandé sur des vignes où des plaies importantes (plaies de rajeunissement, transformation des vignes en vue de la vendange mécanique) ont été effectuées.

### 1.2.4 Champignons inféodés au syndrome de l'esca<sup>[24]</sup>

De récentes études<sup>[25]</sup> sur l'esca dans le cadre du projet européen « maîtrise de l'esca et respect de l'environnement », ont mis en évidence la présence de plusieurs champignons. Le prélèvement de 309 échantillons de vignes malades a montré les différentes sortes de nécroses typiques de l'esca :

**Catégorie I :** Le centre du tronc est composé de trois zones distinctes (Fig. 1.2.A). La zone centrale est de couleur claire et sa texture est molle (Fig. 1.2.A-a). Celle-ci est entourée d'une bordure brun noire de largeur irrégulière (Fig. 1.2.A-b) elle-même entourée d'une zone brun rose de consistance dure (Fig. 1.2.A-c). Autour se trouve le bois sain.

**Catégorie II :** Seul le centre du tronc est décoloré (Fig. 1.2.B). Cette nécrose est caractérisée par une couleur brune de consistance dure (Fig. 1.2.B-f) entourée d'une zone de couleur brun rose de consistance dure (Fig. 1.2.B-c).

**Catégorie III :** Cette catégorie montre deux nécroses différentes sur tout le tronc ; une nécrose centrale de couleur claire et de consistance molle (Fig. 1.2.C-a) précédée par une nécrose décrite dans les catégories I et II (Fig. 1.2.C-c, f).

**Catégorie IV :** Cette catégorie montre deux nécroses différentes sur la coupe transversale (Fig. 1.2.D) ; une première nécrose légèrement colorée de consistance molle (Fig. 1.2.D-a, b, c) décrite dans la catégorie I et une deuxième nécrose brune en position sectorielle (Fig 1.2.D-a, e, d). Ce type de nécrose s'étend sur toute la longueur du tronc.

**Catégorie V :** Cette catégorie montre, dans la même coupe transversale, deux nécroses combinées de couleur claire et de consistance molle, décrites dans la catégorie IV. Le centre du tronc est décoloré (Fig. 1.2.E-c, f) et il y a présence d'une nécrose brune en position sectorielle de consistance dure (Fig. 1.2.E-e, d).

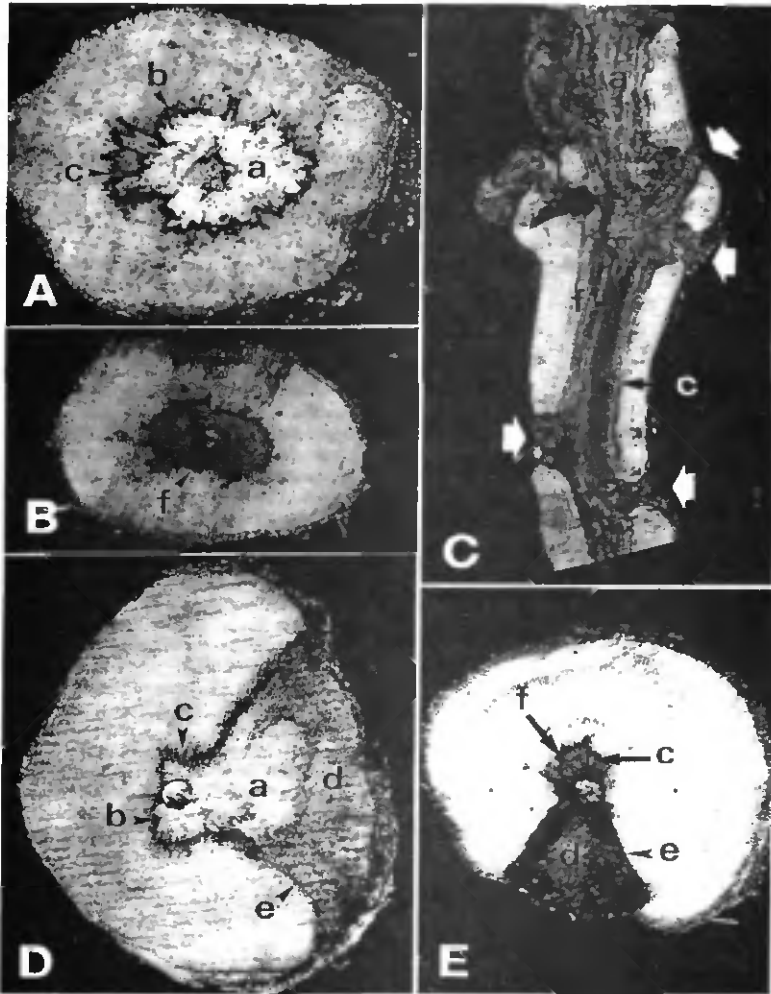


Fig. 1.2 : Coupes transversales (A, B, D, E) et longitudinale (C) de troncs associés aux symptômes typiques de la maladie de l'esca. A : nécrose légèrement colorée de consistance molle au centre entourée par une zone noire (cat. I). B : bois décoloré au centre du tronc (cat. II). C : pourriture centrale du bois précédée par une zone centrale de bois décoloré. La flèche indique l'entrée par laquelle les organismes se sont introduits dans le tronc (cat. III). D : nécroses légères de consistance molle en position centrale et sectorielle (cat. IV). E : nécrose centrale décolorée et nécrose brune en position sectorielle de consistance dure (cat V).

Cinq champignons ont été isolés des nécroses du bois de la vigne :

1. *Phaeoacremonium chlamydosporum* et *Phaeoacremonium aleophilum* : Ils ont été trouvés dans toutes les nécroses centrales en particulier dans les zones décolorées bordant les surfaces pourries (Fig. 1.2.A-b, c) mais plus rarement dans les zones claires de texture molle (Fig. 1.2.A-a). Dans les nécroses brunes (Fig. 1.2.B-f) et brun rose (Fig. 1.2.B-c) des catégories II et III, ce sont les champignons les plus fréquents.  
Dans les catégories IV et V décrivant les nécroses centrales et sectorielles, ils ont été trouvés dans les zones décolorées bordant le bois pourri (Fig. 1.2.D-b, c) et dans la nécrose brune sectorielle.
2. *Phellinus punctatus* : Il a été trouvé dans le bois pourri des nécroses centrales et sectorielles des catégories I à V (Fig. 1.2.A-a ; 1.2.D-a).
3. *Eutypa lata* : Il a été trouvé dans les nécroses centrales et sectorielles de couleur claire et de textures molles bordant le bois pourri (Fig. 1.2.D-d, e) de la catégorie IV. Il est aussi présent dans les nécroses brunes sectorielles de la catégorie V (Fig. 1.2.E-e, d).
4. *Stereum hirsutum* : Il est généralement isolé du bois pourri. Il n'apparaît pas dans les troncs déjà colonisés par *P. punctatus*. Il est aussi présent dans les zones décolorées bordant le bois pourri et dans les zones décolorées de la nécrose brun.

Des tests de pathogénicité sur bois ont montré que *S. hirsutum* et *P. punctatus* sont responsables du pourrissement du bois. *P. chlamydosporum* et *S. hirsutum* produisent une décoloration centrale du bois similaire à celle trouvée dans les vignes affectées par l'esca. *P. aleophilum* provoque une nécrose sectorielle brunâtre de texture molle. L'esca est une maladie complexe où sont impliqués plusieurs micro-organismes dont les actions sont encore mal connues.

Les souches de *Stereum hirsutum*, *Phellinus punctatus*, *Phaeoacremonium aleophilum* et *P. chlamyosporum* proviennent de l'INRA de Bordeaux. Ces champignons ont été cultivés sur milieux liquides. Ces milieux sont extraits à l'acétate d'éthyle. Des tests de toxicité sur plants de tomates des extraits bruts ont été effectués. Il s'est avéré que l'extrait de *Stereum hirsutum* est parmi les plus toxiques, nous nous sommes consacrés à son étude (voir chapitre II).

#### 1.2.5 Biologie de *Stereum hirsutum*<sup>[14]</sup>

*Stereum hirsutum* (WILLD.) PERSON appartient au groupe des Basidiomycètes de la famille des Théléphoracées.

Le mycélium cotonneux, blanc (Figure I.3) est très peu cloisonné, fin, de 1.7 à 2.3 microns de diamètre, avec des ramifications peu nombreuses. Dans les tissus de la vigne, ces filaments de mycélium ne s'insinuent pas entre les cellules, mais pénètrent les vaisseaux et les cellules des rayons médullaires, perçant même les fibres et les cellules ligneuses. A la limite de la zone noire et du bois encore sain, l'amidon des cellules disparaît progressivement. Il ne reste finalement que les parois.

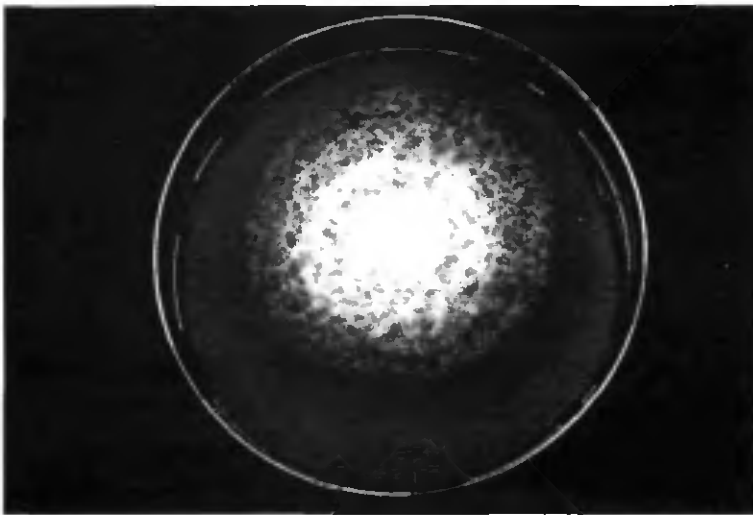


Figure I.3 : Mycélium de *Stereum hirsutum* sur PDA

Les fructifications sont peu fréquentes sur les souches et sont surtout visibles sur les vignes affaiblies, apparaissant en octobre ou au début du printemps.

Ces carpophores ont la forme de coquilles d'huîtres, jaunâtres avec des zones plus foncées, concentriques, relativement minces mais coriaces, insérés par la pointe, sortant perpendiculairement à la tige, parfois en file, de 3 à 5 superposés. La face supérieure est recouverte de poils hirsutes. La face inférieure, fertile, lisse, porte l'hyménium, composé par de nombreuses cellules cylindriques, assez allongées, accolées les unes aux autres. Celles-ci forment comme un mur fructifère et portent parfois, à l'extrémité, quatre pointes ou stérigmates assez longs, sur lesquelles sont insérées les petites basidiospores, ovoïdes, incolores, de 1 à 5 microns. Le filament, issu de la germination de la basidiospore, pénètre dans le bois et s'établit dans les cellules mortes, dont il détruit la lignine, en ne laissant que les constituants celluloseux.

*Stereum hirsutum* comme *Phellinus punctatus* pénètre dans le tronc et les bras par les plaies de tailles, humides, récentes car l'eau est nécessaire (les plaies de taille anciennes, cicatrisées ne s'infectent pas). Ces cryptogames pénètrent grâce aux basidiospores qui germent à la surface des plaies, mais aussi par des débris mycéliens qui peuvent être transportés par les instruments de taille. Souvent, la maladie progresse dans une parcelle de vigne sans qu'on puisse remarquer la présence des fructifications, génératrices des basidiospores. En effet, les fructifications de ces deux champignons apparaissent rarement dans les vignobles. Elles ne peuvent se former à partir du bois nécrosé que lorsque le mycélium atteint la surface du tronc et des bras. La souche meurt généralement avant.

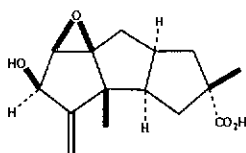
Chaque année, le mycélium progresse longitudinalement et transversalement, détruisant une nouvelle zone, alors que la croissance de la vigne se poursuit en formant un nouvel anneau. Tant que cette croissance est plus rapide que celle du champignon, la tige reste fonctionnelle, ce qui est le cas des jeunes vignes vigoureuses. Par contre, chez les souches âgées, la croissance est plus faible et est dépassée par l'expansion du champignon, réduisant ainsi l'anneau de bois fonctionnel et aboutissant finalement au folletage ou apoplexie.

La mort du cep survient en été lorsque les besoins en eau sont importants. S'il n'y a pas assez de vaisseaux intacts pour faire face à ces besoins, la plante flétrit en totalité ; c'est la forme foudroyante, survenant en quelques heures ou en quelques jours. Au contraire, les formes lentes d'évolution correspondent à une réduction progressive du nombre de vaisseaux du bois sain, entraînant sur les feuilles la dessiccation des parties les plus éloignées des nervures principales.

La maladie ne fait des dégâts que sur souches ayant des plaies de taille importantes pour que les basidiospores du champignon puisse s'y déposer, et y pénétrer, et ayant un certain âge (entre 10 et 15 ans) pour avoir le temps d'évoluer à l'intérieur.

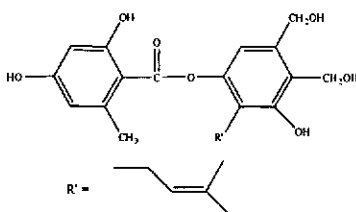
### 1.2.6 Résultats antérieurs

Le premier métabolite isolé de *Stereum hirsutum* en 1947 est l'acide hirsutique<sup>[27]</sup>. Sa structure<sup>[28]</sup> fut établie en 1967. Le champignon libère rapidement dans le milieu de culture un précurseur inactif (acide hirsutique C). Après neuf jours, ce précurseur est transformé en une substance ayant des actions antibactériennes (acide hirsutique N). Cet acide dont la structure n'est pas élucidée, est actif contre *Micrococcus lysodeikticus*, *B. anthracis*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* et *B. subtilis*.

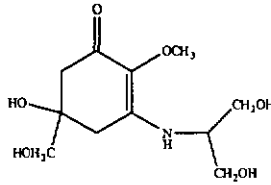


Acide hirsutique C

En 1975 a été isolé et identifié le 2,4-dihydroxy-6-méthyl-benzoate de [3',4'-dihydroxyméthyl]-5'-hydroxy-6'-(3-méthyl-but-2-ényl)-phényle] <sup>[29,30,31]</sup>.



La mycosporine<sup>[32]</sup> a été isolée et identifiée en 1976.



### 1.3 Eutypiose<sup>[33,34]</sup>

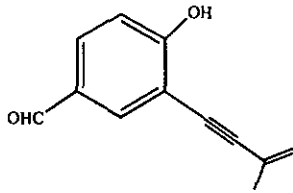
#### 1.3.1 Champignon responsable de l'eutypiose

*Eutypa lata* a été isolé pour la première fois en 1933 sur l'abricotier. Ce champignon est responsable du dépérissement des ceps de vigne, connu sous le nom d'eutypiose. Cette maladie est répandue dans le monde entier. En France ce sont principalement les vignobles charentais et bordelais qui sont affectés (Sauvignon blanc, Cabernet-Sauvignon et Ugni blanc,...). L'eutypiose est aussi une maladie due à un champignon pénétrant par les blessures de taille (comme pour l'esca), se développant ensuite dans les bois du cep. Par son développement lent et ses attaques dispersées, la maladie passe inaperçue au départ mais son évolution n'en est pas moins inexorable sur beaucoup de cépages sensibles.

Les symptômes de cette affection sont divers. Tout d'abord on observe un rabougrissement de la végétation. Les pousses, issues d'un bras infecté, ont une croissance ralentie. Les feuilles, plus petites que la normale, sont de couleur vert pâle et souvent avec des nécroses marginales pouvant se généraliser à l'ensemble du limbe. Les inflorescences, si elles ne se dessèchent pas avant la floraison, présentent un port dressé, puis subissent, en général, une forte coulure. Des coupures dans un tronc ou un bras malade montrent une ou plusieurs nécroses profondes, développées chacune à partir d'une blessure, le plus souvent une plaie de taille. Cette nécrose, très dure, permet de différencier cette maladie de l'esca.

### 1.3.2 Résultats antérieurs

*Eutypa lata* a été étudié en détail dans le département du professeur R. Tabacchi<sup>[35,36,37,38]</sup>. Ses recherches ont abouti à la mise en évidence de plusieurs phytotoxines produites par ce champignon, dont la principale est l'eutypine. Ce produit a également été retrouvé dans le bois malade, les tiges, les inflorescences et la sève<sup>[39]</sup>.



Eutypine : (4-hydroxy-3-(3-méthyle-but-3-ène-1-ynyl) benzaldéhyde)

### 1.4 But du présent travail

L'objectif de ce travail a été l'isolement et l'identification du ou des produits les plus phytotoxiques de *Stereum hirsutum*. En phytopathologie, une toxine est généralement définie comme une substance non enzymatique qui endommage les cellules de la plante-hôte ou interrompt leur métabolisme. Elle endommage sérieusement ou tue les cellules d'une plante.

Une toxine doit satisfaire trois critères :

1. Sa structure chimique doit être établie
2. Elle doit reproduire les mêmes symptômes que la maladie
3. Elle doit se retrouver dans le matériel végétal

Pour rechercher les pathotoxines de ce champignon, nous l'avons mis en culture. Ensuite, la séparation de ce milieu de culture (après filtration et extraction) en différentes fractions et un contrôle de l'activité toxique a permis de mettre en évidence les principes actifs. Des tests biologiques ont été effectués sur les produits isolés.

Pour prouver l'existence d'une pathotoxine, il ne suffit pas de l'isoler et de l'identifier dans le milieu de culture. Ce métabolite doit également être présent dans le matériel végétal infecté et absent dans le sain. Pour étudier des matrices complexes comme le bois malade et la sève infectée où les métabolites sont en concentration très faible, nous avons dû utiliser une méthode très sélective et sensible.

## CHAPITRE II

---

### ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE METABOLITES

#### II.1 Matériel de départ

Comme nous l'avons écrit précédemment nous nous sommes principalement intéressés à *Stereum hirsutum*. Les souches de ce champignon ont été prélevées en 1983 à Cérons (Bordeaux). Ces souches nous ont été fournies par l'INRA de Bordeaux.

#### II.2 Culture sur milieu solide

Le champignon est cultivé dans une boîte de Pétri d'un diamètre de 9 cm sur un milieu P.D.A. (Potato Dextrose Agar). Les souches sont régulièrement repiquées.

### II.3 Culture sur milieu liquide

La composition du milieu de culture utilisé pour la culture de *Stereum hirsutum* est la suivante :

NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0.5 g
Glucose	20 g
KNO <sub>3</sub>	5 g
Solution de micro-éléments	1 ml
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Composition de la solution de micro-éléments :

CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	7.4 g
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0.66 g
MnSO <sub>4</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	0,5 g
CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0.1 g
Acide citrique	0.6 g
FeCl <sub>3</sub>	0.15 ml
Thiamine	0.015 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

### II.4 Procédure d'extraction

Le champignon est inoculé dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 250 ml de milieu de culture précédemment autoclavés à 121 °C. Ils sont agités à 20°C, à l'obscurité pendant 4 semaines, étant la période optimum de culture (cf. Chap. VI. 2.4). Ensuite, le milieu de culture est filtré sur célite et extrait à l'acétate d'éthyle (Schéma II.1).

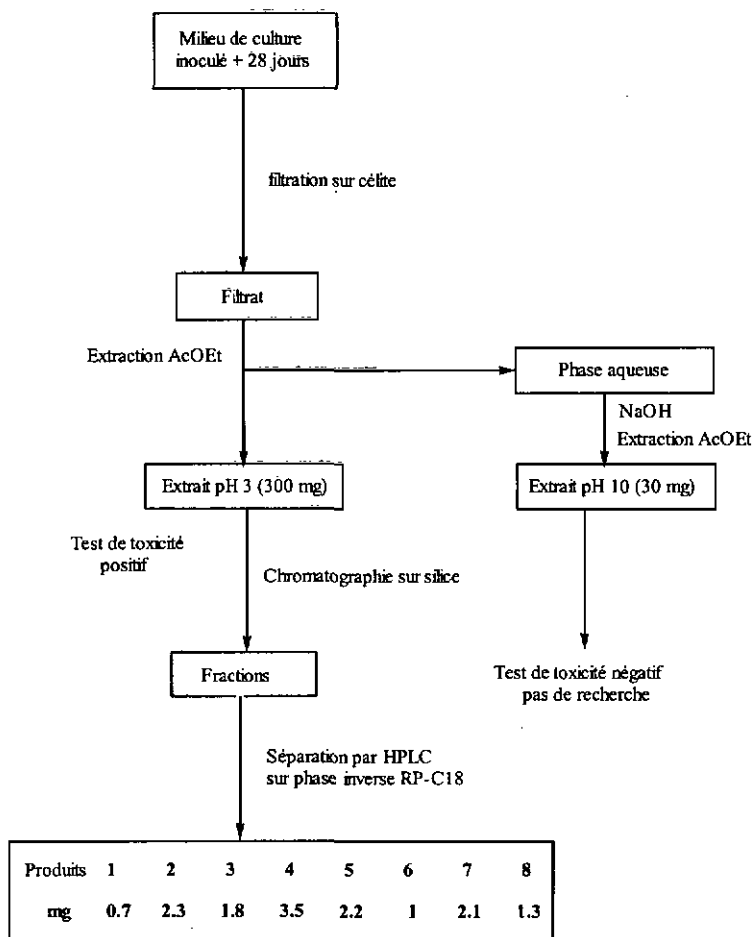


Schéma II.1 : Procédure générale d'extraction des métabolites

Les extraits bruts ainsi récupérés sont systématiquement chromatographiés en HPLC sur phase inverse (RP-C18, 7  $\mu\text{m}$ , 4 mm, 25 cm). Nous remarquons la complexité des extraits sur la figure II.1. L'éluant utilisé est un gradient croissant de méthanol (solvant A) dans l'eau (solvant B). Le gradient utilisé est le suivant : 40% A (10'), de 40% A à 90% A (50'), 90% A à 100% A (5'), 100% A (10').

Les chromatogrammes de tous les extraits bruts sont similaires. Nous pouvons en déduire la reproductibilité des cultures.

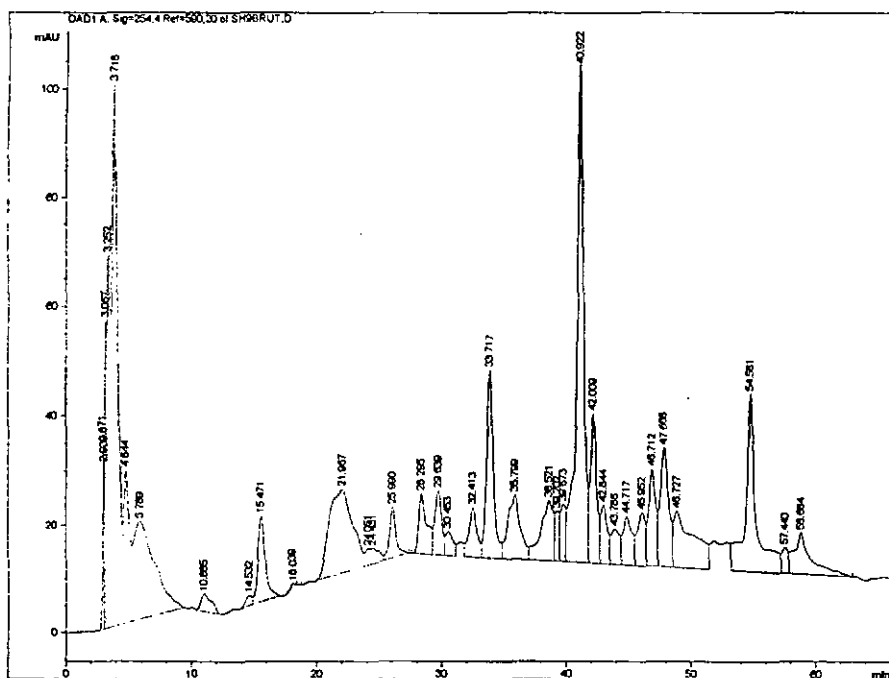


Figure II.1 : HPLC d'un extrait brut de *Stereum hirsutum*

Afin de permettre l'isolement des produits intéressants, l'extrait brut acide (le seul toxique sur plantules de tomate contrairement à l'extrait basique et la phase aqueuse), environ 300 mg pour 10 litres de milieu de culture, a été chromatographié sur gel de silice (70-200 mesh) avec un gradient croissant d'acétate d'éthyle dans l'hexane.

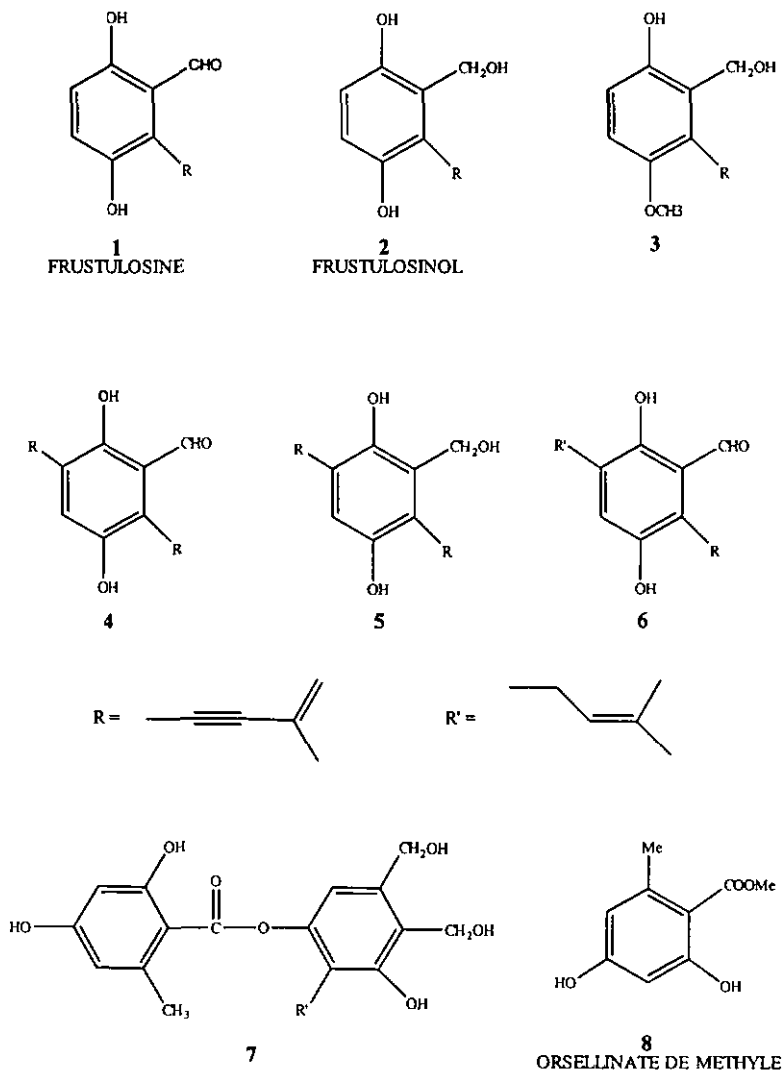
Toutes les fractions obtenues sont testées pour déterminer leur activité phytotoxique. Des plantules de tomate de la variété Bony Best, d'environ 6 à 8 cm, pesant 85 à 100 mg, possédant deux cotylédons ont été utilisées pour évaluer la toxicité des fractions. Ces plantules sont plongées dans des piluliers contenant 1 ml d'eau additionné de 2% de méthanol (cette concentration n'est pas toxique pour les plants de tomate) et d'environ 1 mg de chaque fraction. Sur la base des résultats de ce test nous poursuivrons nos recherches sur les fractions les plus toxiques.

### **II.5 Procédure d'isolation**

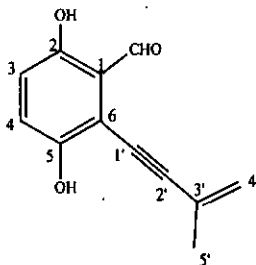
Les fractions obtenues sont chromatographiées en HPLC sur phase inverse (RP-C18) avec le programme utilisé précédemment. Le programme est ensuite optimisé dans chaque cas pour obtenir une séparation plus rapide. Certaines fractions ont été préalablement chromatographiées sur une autre colonne de silice ou sur une plaque préparative.

### **II.6 Métabolites isolés**

Au total 8 produits ont été isolés des milieux de culture de *Stereum hirsutum*. La moitié sont de nouveaux produits naturels (produits 3, 4, 5 et 6). La structure de ces produits isolés en faible quantité (de l'ordre de quelques mg), sont représentés sur le schéma II.2.

Schéma II.2 : Produits isolés de *Stereum hirsutum*

## II.6.1 Identification du 2,5-dihydroxy-6-(3-méthyl-but-3-ène-1-nyl)-benzaldéhyde



Formule brute :  $C_{12}H_{10}O_3$

Poids moléculaire : 202

R<sub>f</sub> = 0.42 dans AcOEt-Hexane (1/2)

0.69 dans 5% de MeOH dans  $CH_2Cl_2$

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH/H<sub>2</sub>O) = 245, 287 et 392 nm

Masse de produit isolé : 0.7 mg

## Analyse

$^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ) : 2.04 (3H, s,  $CH_3$ ), 5.44 et 5.55 (2H, m,  $=CH_2$ ), 6.91 (1H, dd,  $J=9.11$  Hz, ArH), 7.16 (1H, d,  $J=9.12$  Hz, ArH), 10.31 (1H, s, CHO), 11.24 (1H, s, OH).

DEPT 135 (100 MHz,  $CDCl_3$ ) : 23.93 (C-5'), 120.35, 125.10 (C-3 et C-4), 125.14 (C-4'), 196.59 (CHO).

MS, EI, 70 eV (m/z, I%) : 202 ( $M^+$  100), 201 (13), 187 (32), 184 (25), 174 (14), 173 (16), 159 (5), 145 (7), 117 (7), 115 (14), 103 (12), 91 (9), 77 (10).

Le spectre  $^1H$ -RMN (Figure II.2) présente un cycle aromatique tétrasubstitué avec deux protons aromatiques ( $\delta=6.91$  et  $7.16$  ppm) en position ortho ( $J=9.11$  Hz). Il montre également une fonction aldéhyde à  $\delta=10.31$  ppm, confirmée aussi par la  $^{13}C$ -RMN (Figure II.3), et un phénol à  $11.24$  ppm. Ce fort déblindage est dû à une liaison hydrogène, indiquant que l'aldéhyde et le phénol sont adjacents. Le spectre proton présente des signaux à  $5.55$  ppm caractéristiques d'une double liaison et un méthyle à

2.04 ppm couplé aux protons vinyliques d'après le spectre COSY (Figure II.5). Par analogie avec le spectre de l'eutypine<sup>[20,21,22]</sup>, nous pouvons dire qu'il s'agit du groupement 3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl. La position de l'aldéhyde par rapport à l'alcool a été confirmée par le calcul théorique des déplacements chimiques des protons aromatiques (Schéma II.3). La fragmentation du spectre de masse (EI) de la frustulosine<sup>[44]</sup> est représentée sur le schéma II.4. Pour la fragmentation de nos produits nous nous sommes aidés des travaux du Dr. Tsoupras sur l'eutypine<sup>[45]</sup>.

Toutes ces données sont similaires à celles de la frustulosine<sup>[40,41,42,43]</sup> (produit 1). La frustulosine a déjà été isolée de *Stereum frustulosum*. Elle est un antibiotique actif sur plusieurs types de micro-organismes. A une concentration de 16 ppm elle est active contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mycoides* et *B. subtilis*. Elle est également modérément active contre *Vibrio cholera*.

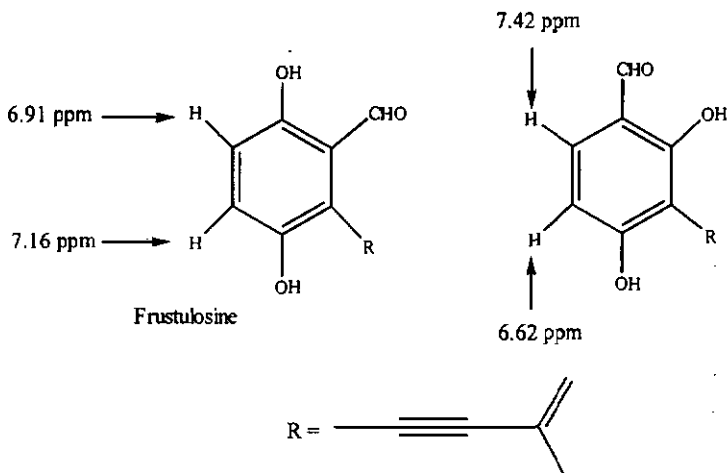


Schéma II.3 : Calcul théorique des déplacements chimiques



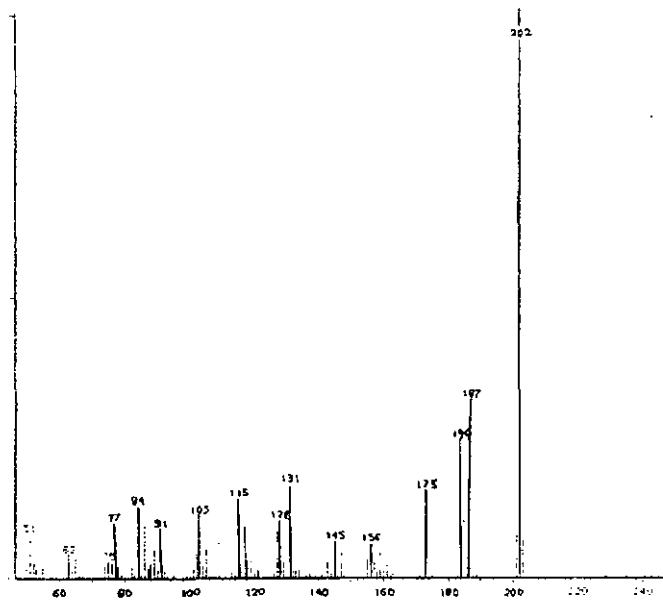
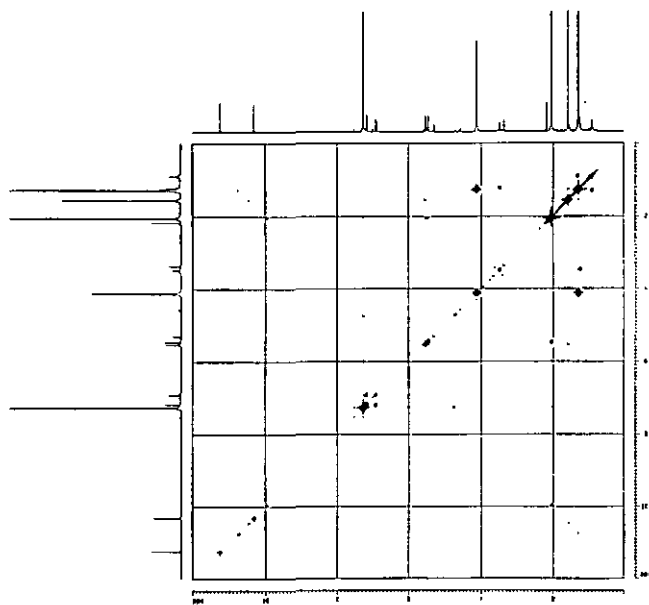


Figure II.4 : Spectre de masse de 1 (EI, 70 eV)

Figure II.5 : COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 1

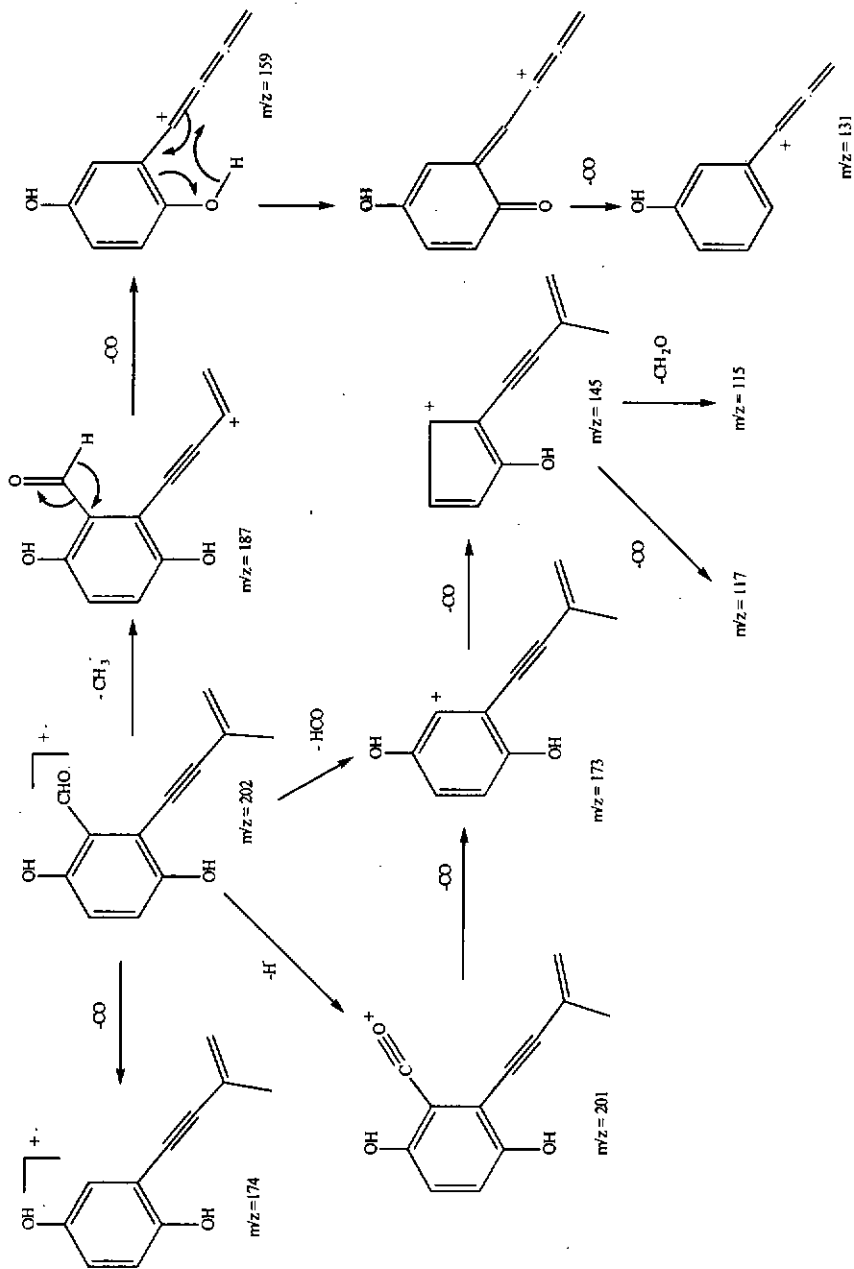
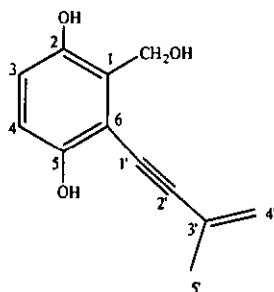


Schéma II.4 : Fragmentation du produit 1

## II.6.2 Identification de l'alcool 2,5-dihydroxy-6-(3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl)benzylique



Formule brute :  $C_{12}H_{12}O_3$

Poids moléculaire : 204

R<sub>f</sub> = 0.20 dans AcOEt-Hexane (1/2)

0.18 dans 5% de MeOH dans  $CH_2Cl_2$

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH/ $H_2O$ ) = 210, 267, 329 nm

Masse de produit isolé : 2.3 mg

### Analyse

$^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ) : 2.02 (3H, dd, J=1.0 et 1.5 Hz,  $CH_3$ ), 5.08 (2H, s,  $Ar-CH_2-OH$ ), 5.38 (1H, m, J=1.50 Hz,  $=CH_2$ ) et 5.44 (1H, m, J=1.0 Hz,  $=CH_2$ ), 6.81 (2H, s, H-Ar), 7.40 (1H, large,  $C_5-OH$ ).

$^{13}C$ -RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ ) : 24.11 (C-5'), 63.56 ( $-CH_2-OH$ ), 80.56 (C-1'), 102.45 (C-2'), 108.33 (C-3'), 115.50 (C-4), 119.45 (C-3), 123.87 (C-4'), 125.19 (C-6), 126.57 (C-1), 150.37 (C-5), 150.94 (C-2).

DEPT 135 (100 MHz,  $CDCl_3$ ) : 24.11 (C-5'), 63.55 ( $-CH_2-OH$ ), 115.50 (C-4), 119.45 (C-3), 123.87(C-4').

MS, EI, 70 eV (m/z, I%) : 204 ( $M^+$ , 100), 189 (9), 186 (83.0), 187 (20), 171 (23.9), 158 (28.6), 157 (28.0), 143 (24), 129 (45.0), 115 (47.9), 91 (10.5), 77 (19.8).

Le spectre  $^1\text{H}$ -RMN (Figure II.6) montre la présence de deux protons aromatiques à  $\delta=6.81$  ppm en position ortho. De même que pour la frustulosine nous observons le groupement 3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl fixé sur le cycle. Le DEPT 135 indique un  $\text{CH}_2$  portant une fonction alcool à 63.56 ppm. La présence de l'alcool est également confirmé par le spectre de masse (voir le mécanisme de fragmentation<sup>[33]</sup>). Ces valeurs sont similaires aux données de la littérature<sup>[27,28,29]</sup> pour le frustulosinol (produit 2). Le frustulosinol a également été isolée à partir de *Stereum frustulosum*. A la concentration de 16 ppm il est actif contre *Staphylococcus aureus* et entre 64-256 ppm il agit contre *Mycobacterium smegmatis*.

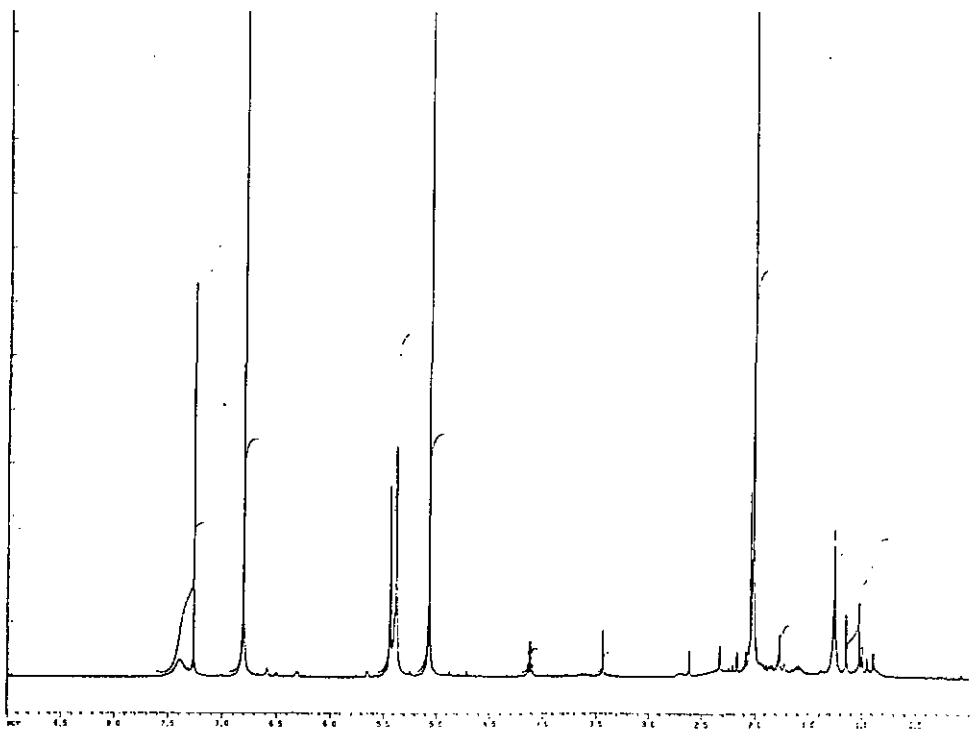


Figure II.6 : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN de 2 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

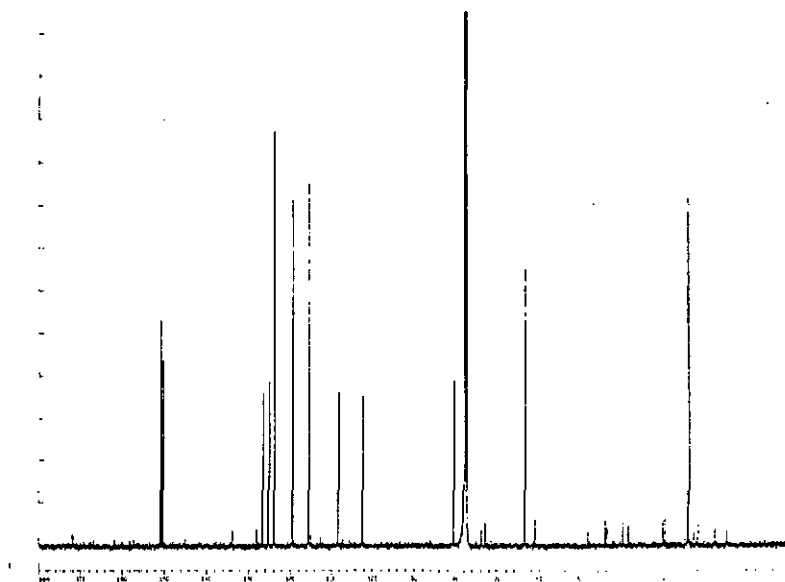


Figure 11.7 :  $^{13}\text{C}$ -RMN du produit 2 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

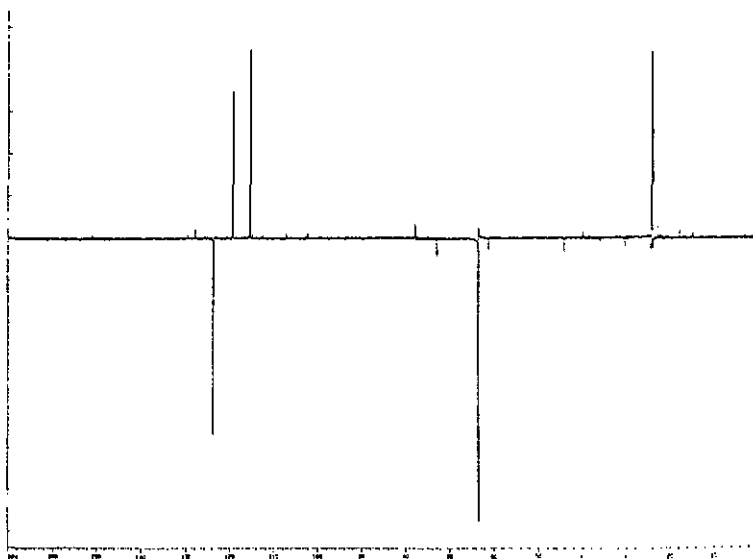


Figure 11.8 : DEPT 135 de 2 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

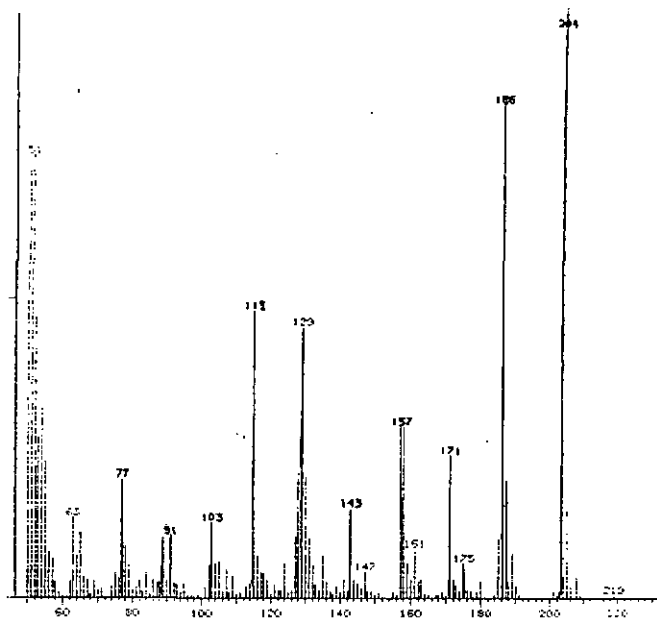
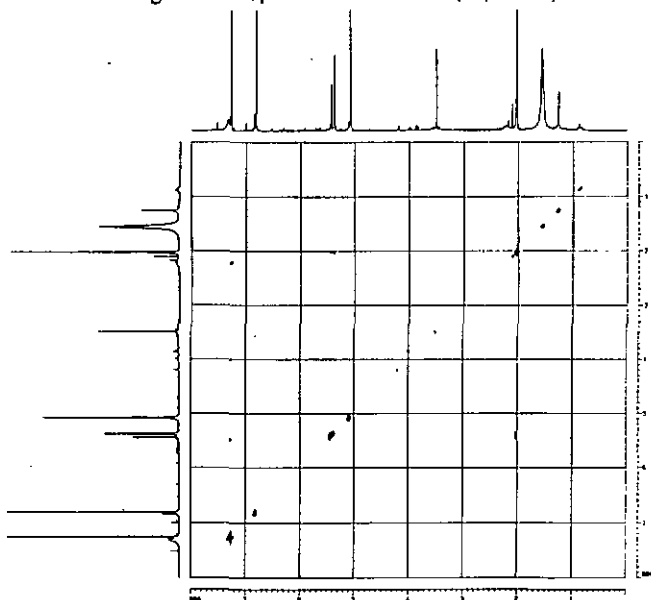


Figure II.9 : Spectre de masse de 2 (EI, 70 eV)

Figure II.10 : COSY (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 2

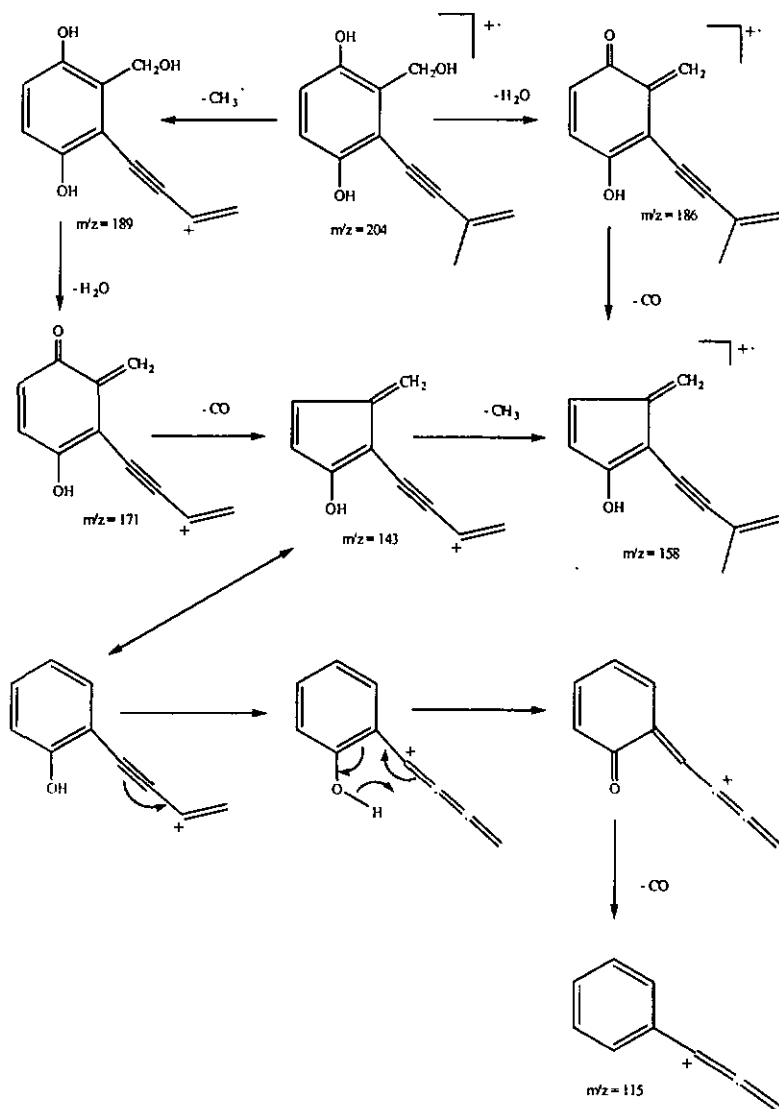
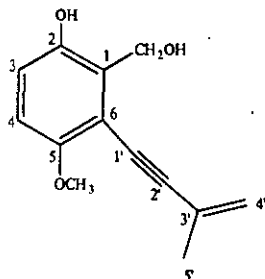


Schéma II.5 : Fragmentation du produit 2

### II.6.3 Identification de l'alcool 2-hydroxy-5-méthoxy-6-(3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl) benzylique



Formule brute :  $C_{13}H_{14}O_3$

Poids moléculaire : 218

Rf = 0.27 dans AcOEt-Hexane (1/2)

0.26 dans 5% de MeOH dans  $CH_2Cl_2$

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH/ $H_2O$ ) = 240, 270 et 330 nm

Masse de produit isolé : 1.8 mg

#### Analyse

$^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ) : 2.01 (3H, dd,  $CH_3$ ), 2.03 (1H, large,  $CH_2OH$ ), 3.82 (3H, s,  $OCH_3$ ), 5.13 (2H, s,  $ArCH_2OH$ ), 5.31 et 5.41 (2H, m,  $=CH_2$ ), 6.72 (1H, d,  $J=8.9$  Hz, ArH), 6.81 (1H, d,  $J=8.9$  Hz, ArH), 7.51 (1H, large, Ar-OH).

$^{13}C$ -RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ ) : 24.18 (C-5'), 57.24 ( $OCH_3$ ), 63.56 ( $CH_2OH$ ), 82.59 (C-1'), 100.21 (C-2'), 111.41 (C-3'), 112.25 (C-4), 118.09 (C-4'), 122.00 (C-3), 127.11 (C-6), 127.45 (C-1), 150.89 (C-2), 154.67 (C-4).

MS, EI, 70 eV (m/z, 1 %) : 218 ( $M^+$  38), 200 (100), 185 (12), 172 (6), 157 (16), 128 (29), 115 (6), 91 (9), 77 (12).

Le spectre  $^1\text{H-RMN}$  (Figure II.12) révèle la présence d'un cycle aromatique tétrasubstitué avec deux protons à  $\delta=6.72$  et  $6.81$  ppm en position ortho ( $J=9.02$  et  $8.95$  Hz). Ce même spectre indique également un groupe méthoxy à  $\delta=3.82$  ppm, une double liaison ( $\delta=5.31$  et  $5.41$  ppm), ainsi qu'un phénol à  $\delta=7.51$  ppm. Par comparaison avec les spectres de l'eutypine, nous observons la présence du groupement 3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl fixé sur le cycle. Le DEPT 135 indique un  $\text{CH}_2$  portant un oxygène ( $\delta=63.50$  ppm), probablement une fonction alcool.

Le spectre de masse (Figure II.11) indique, outre le poids moléculaire de 218, la perte d'une molécule d'eau, perte renseignant sur la position du groupe méthoxy. Ce groupe se trouve en position 5 (voir le mécanisme de fragmentation ci-dessous).

En comparant avec la frustulosine et le frustulosinol nous pouvons proposer la structure du produit 3 décrite précédemment. La synthèse régiosélective<sup>[34]</sup> en 8 étapes à partir du 2,5-diméthylthoxybenzaldéhyde confirme cette structure.

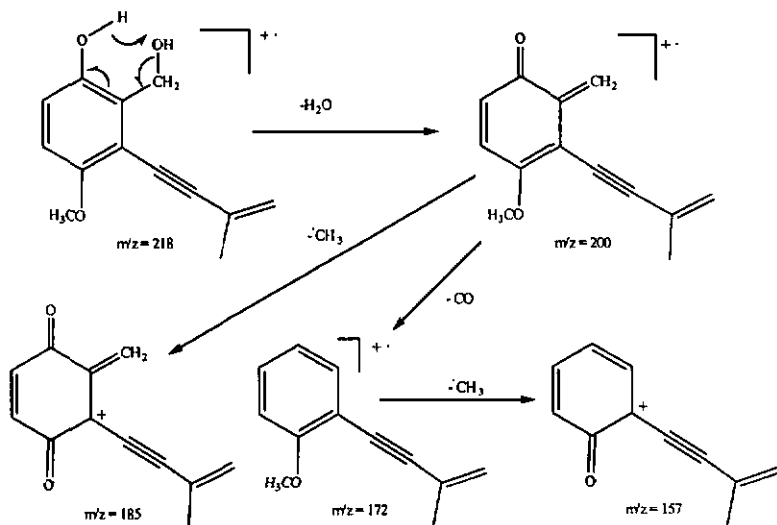


Schéma II.6 : Fragmentation du produit 3

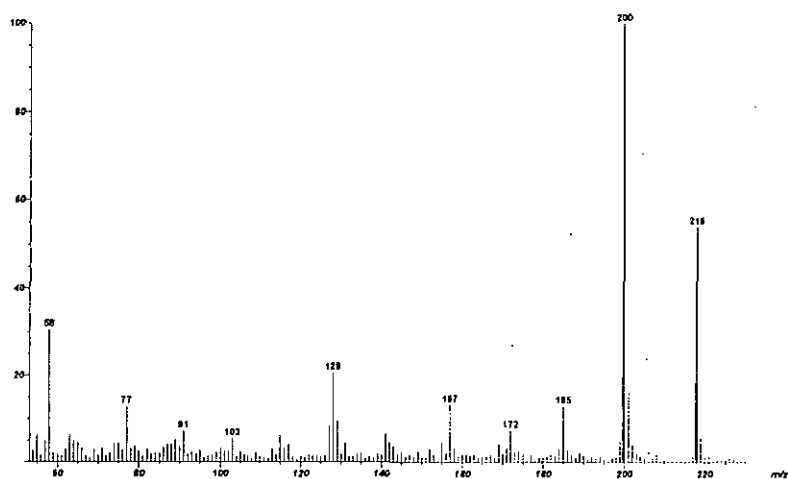
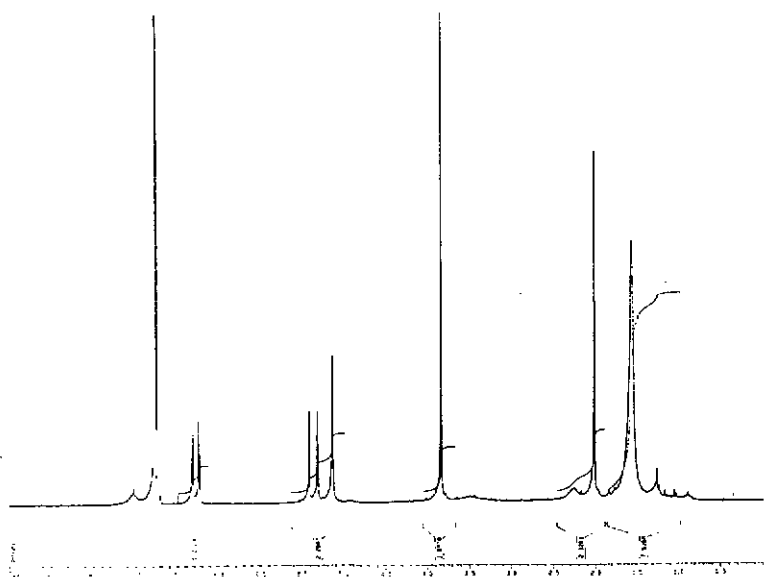


Figure II.11 : Spectre de masse de 3 (EI, 70 eV)

Figure II.12 : Spectre <sup>1</sup>H-RMN de 3 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

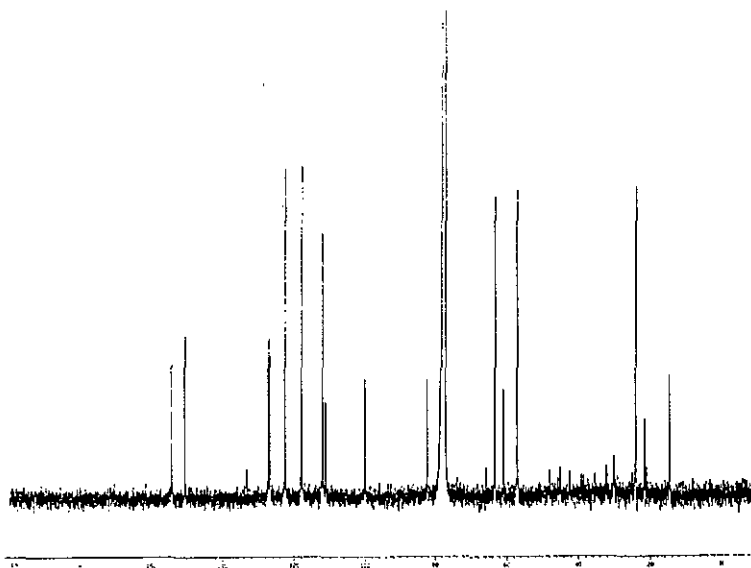
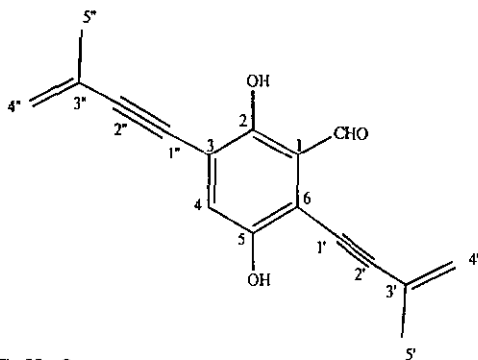


Figure II.13 : Spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN de 3 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

II.6.4 Identification du 2,5-dihydroxy-3,6-di-(3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl)-benzaldéhyde



Formule brute :  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_3$

Poids moléculaire : 266

Rf = 0.46 dans AcOEt-hexane (1/2)

0.72 dans 5% MeOH dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

UV :  $\lambda_{\max}$  (MeOH/H<sub>2</sub>O) = 260, 310 et 425 nm.

Masse de produit isolé : 3.5 mg

#### Analyse

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 2.02 (3H, t, J=1.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 2.06 (3H, t, J= 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 5.37 (2H, m, =CH<sub>2</sub>), 5.52 (2H, m, =CH<sub>2</sub>), 7.27 (1H, s, ArH), 10.3 (1H, s, CHO), 11.7 (1H, s, ArOH).

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 23.86, 23.95 (C-5' et C-5''), 82.91, 98.70 (C-1' et C-1''), 105.90, 111.61 (C-2' et C-2''), 115.43 (C-6), 118.40 (C-3), 124.00, 125.52 (C-4' et C-4''), 126.08 (C-4), 127.17 (C-3 et C-6), 150.22 (C-5), 157.84 (C-2), 196.47 (CHO).

DEPT 135 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 23.86, 23.95 (C-5' et C-5''), 124.00, 125.52 (C-4' et C-4''), 126.08 (C-4), 196.47 (CHO).

MS, EI, 70 eV (m/z, %) : 266 (M<sup>+</sup> 100), 251 (24), 238 (30), 237 (32), 223 (16), 195 (16), 181 (7), 178 (11), 165 (37), 152 (22), 128 (3), 115 (13), 91 (15), 77 (5), 65 (12).

Le spectre <sup>1</sup>H-RMN (Figure II.14) présente deux groupements 3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl, ceci est confirmé par la <sup>13</sup>C-RMN (Figure II.15). Il s'agit d'un cycle pentasubstitué avec un seul proton aromatique à  $\delta=10.27$  ppm. Comme sur le spectre de 1, les fonctions aldéhyde ( $\delta=10.27$  ppm) et phénol ( $\delta=11.70$  ppm) sont présentes. La proximité de l'aldéhyde et de l'alcool explique le fort déblindage dus à des liaisons hydrogènes. Le calcul du déplacement chimique du proton aromatique permet d'avancer l'hypothèse que le second groupement 3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl est en position 3. En effet, dans cette position le déplacement chimique est de 7.19 ppm (7.27 ppm expérimentalement) et 7.10 ppm en position 4. La synthèse régiosélective<sup>1471</sup> en 6 étapes à partir de l'hydroquinone confirme la structure proposée. Comme le produit 4 est un nouveau produit naturel nous proposons de le nommer : stéréohirsutine.

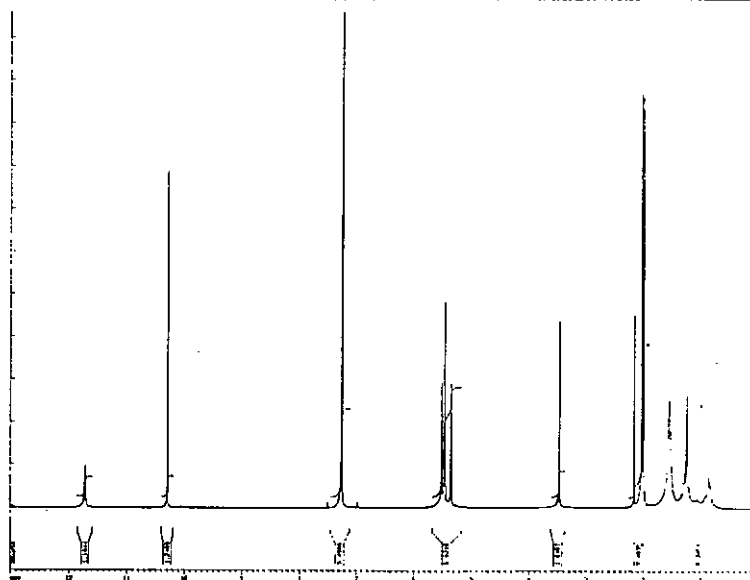


Figure II.14 : Spectre  $^1\text{H-RMN}$  de 4 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

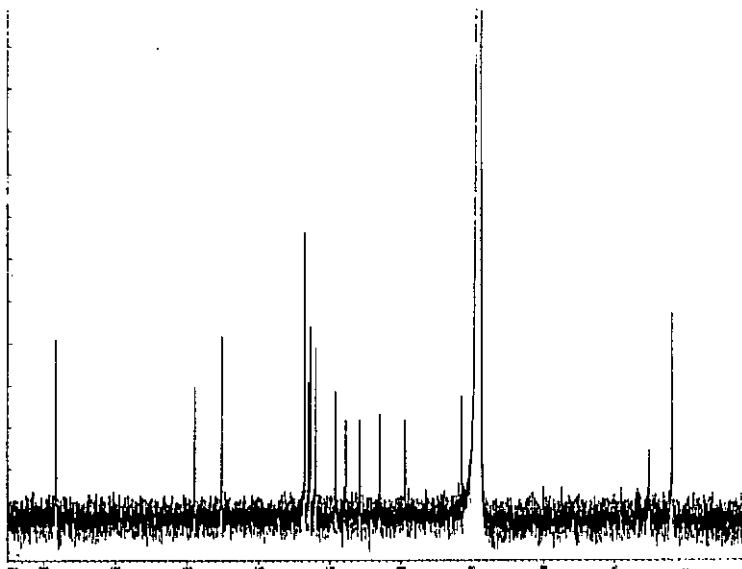


Figure II.15 : Spectre  $^{13}\text{C-RMN}$  de 4 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

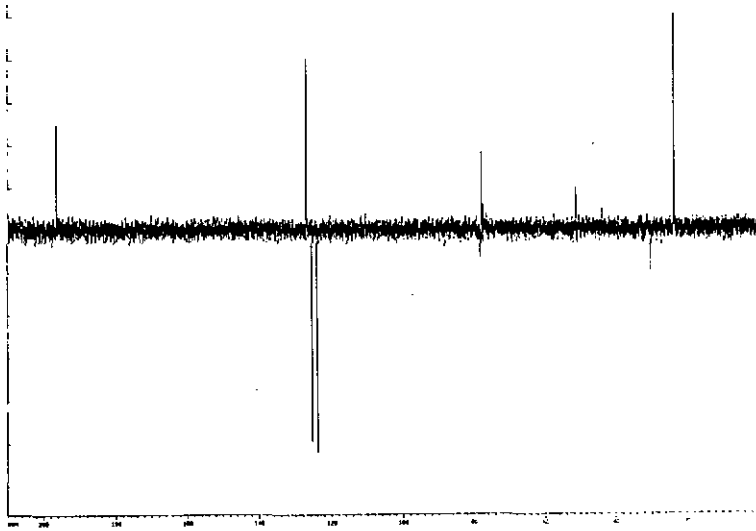
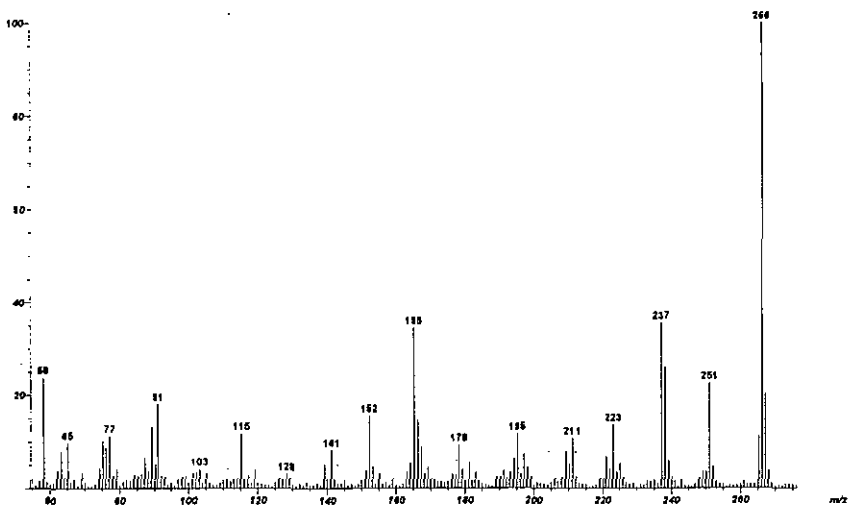
Figure II.16 : DEPT 135 de 4 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Figure II.17 : Spectre de masse de 4 (EI, 70 eV)

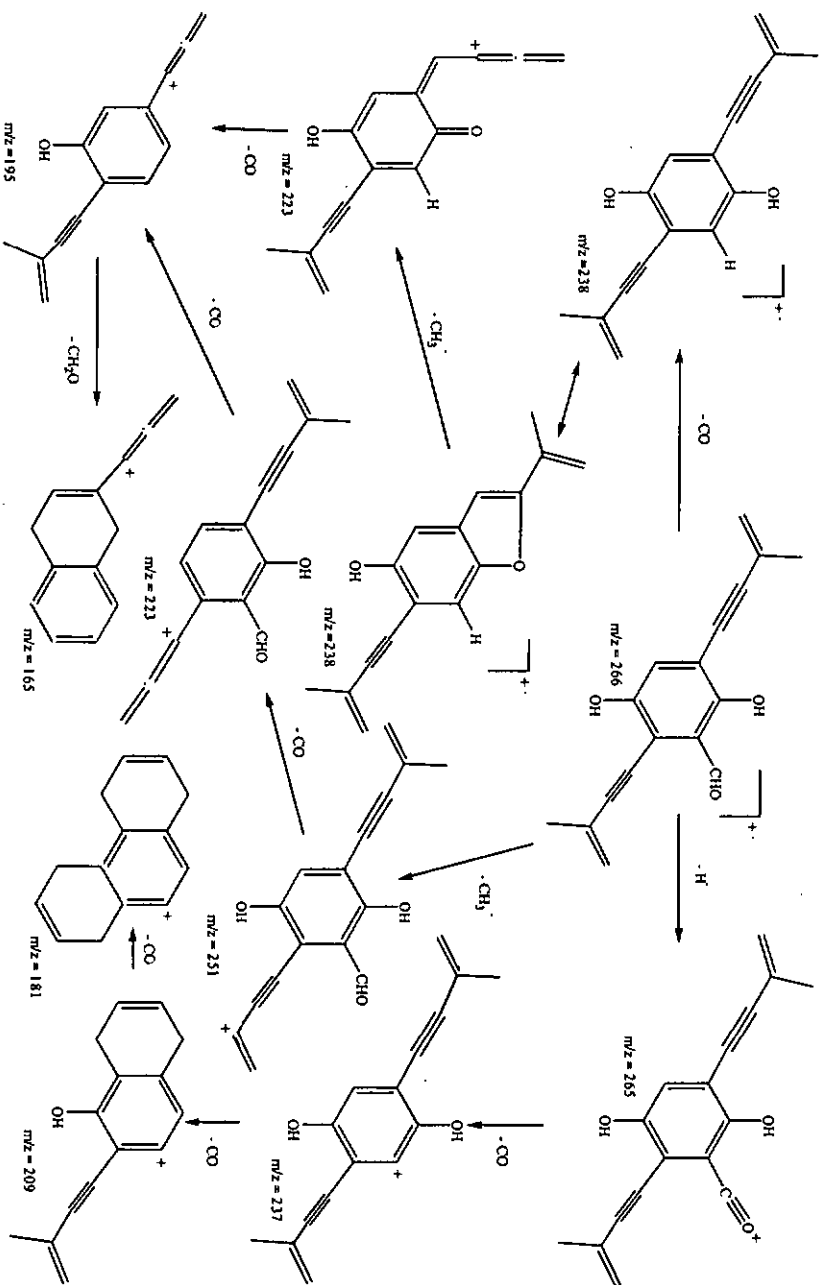
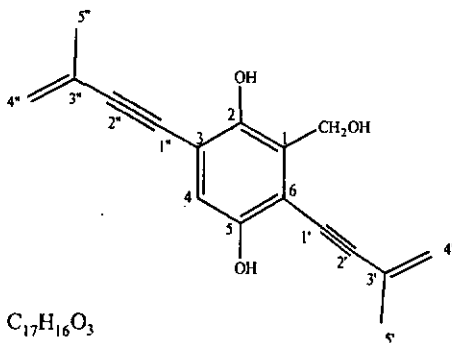


Schéma II.7 : Fragmentation du produit 4

### 11.6.5 Identification de l'alcool-2,5-dihydroxy-3,6-di-(3-méthyl-but-3-ène-1-nyl)-benzylique



Formule brute :  $C_{17}H_{16}O_3$

Poids moléculaire : 268

Rf = 0.30 dans AcOEt-Hexane (1/2)

0.47 dans 5% MeOH dans  $CH_2Cl_2$

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH/ $H_2O$ ) = 218, 296 et 355 nm

Masse de produit isolé : 2.2 mg

Analyse :

$^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ) : 2.02 (6H, s,  $CH_3$ ), 2.41 (1H, t,  $J=6.4$  Hz,  $-CH_2-OH$ ), 4.91 (2H, d,  $J=6.3$  Hz,  $-CH_2-OH$ ), 5.38 (2H, m,  $-C=CH_2$ ), 5.60 (2H, m,  $-C=CH_2$ ), 6.32 (1H, s, Ar-OH), 6.91 (1H, s, Ar-H).

$^{13}C$ -RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ ) : 23.28 (C-5' et C-5''), 60.66 ( $CH_2OH$ ), 79.83, 82.06 (C-1' et C-1''), 98.49, 102.75 (C-2' et C-2''), 110.26, 111.74 (C-3' et C-3''), 116.30 (C-4), 123.31, 123.63 (C-4' et C-4''), 125.75, 126.03, 126.31 (C-1, C-3 et C-6), 148.98 et 149.70 (C-2, C-5).

DEPT 135 (100 MHz,  $CDCl_3$ ) : 23.28 (C-5' et C-5''), 60.66 ( $CH_2OH$ ), 116.30 (C-4), 123.31, 123.63 (C-4' et C-4'').

MS, EI, 70 eV (m/z, %) : 268 ( $M^+$  54), 250 (100), 235 (7), 221 (7), 207 (8), 193 (6), 179 (25), 178 (32).

Le spectre proton (Figure II.18) de ce produit ressemble à celui de la stéréohirsutine. L'aldéhyde à 11.7 ppm et le phénol à 10.3 ppm ne sont plus observés. Par contre, nous constatons une fonction alcool à 2.41 ppm portée par un  $\text{CH}_2$  à 4.91 ppm, couplés ( $J=6.30$  Hz). Par conséquent, nous pouvons confirmer la structure déjà proposée sur la schéma II.2. Ci-dessous quelques fragments du spectre de masse de ce composé. Ce produit sera appelé stéréohirsutinol.

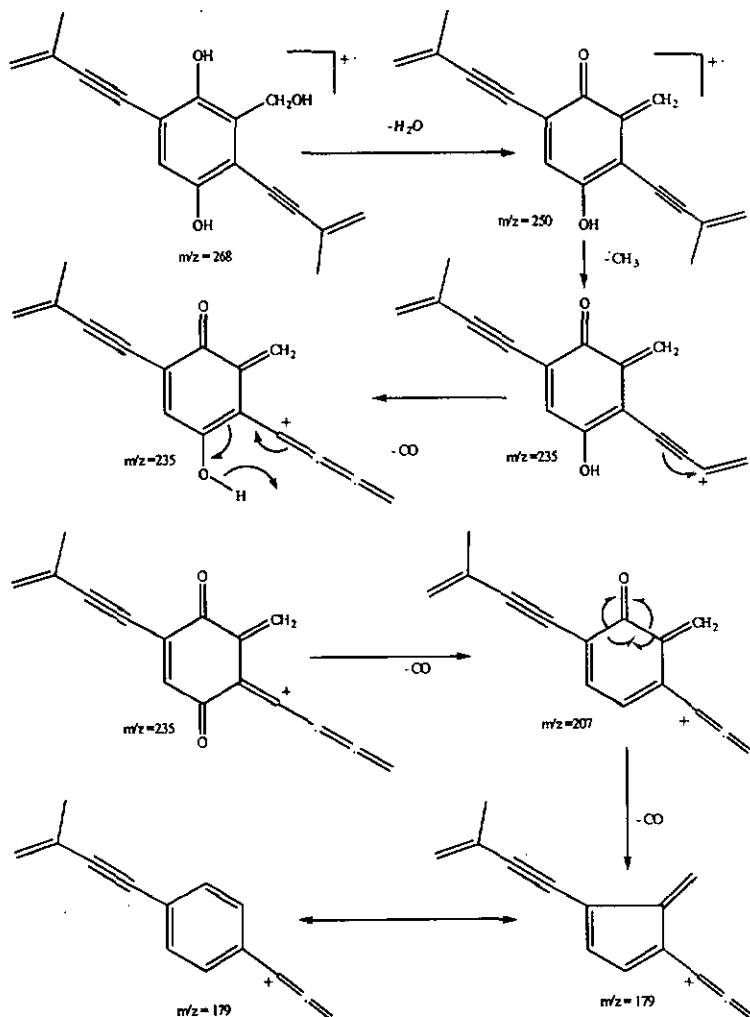
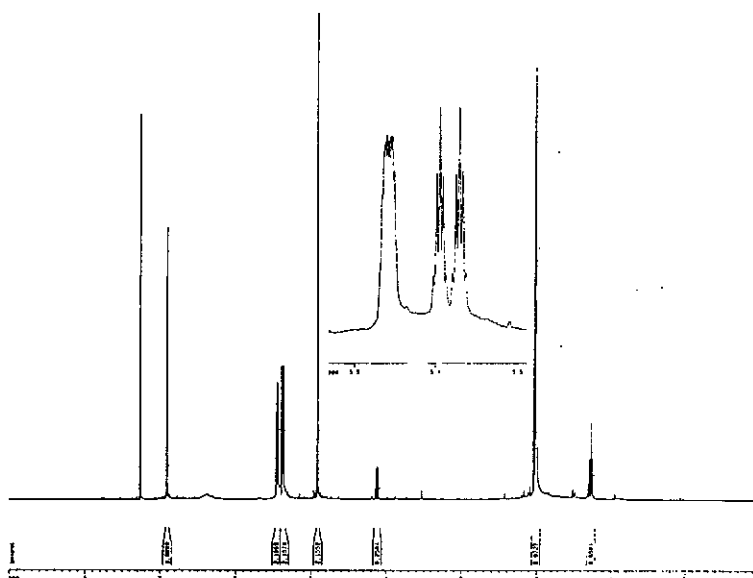
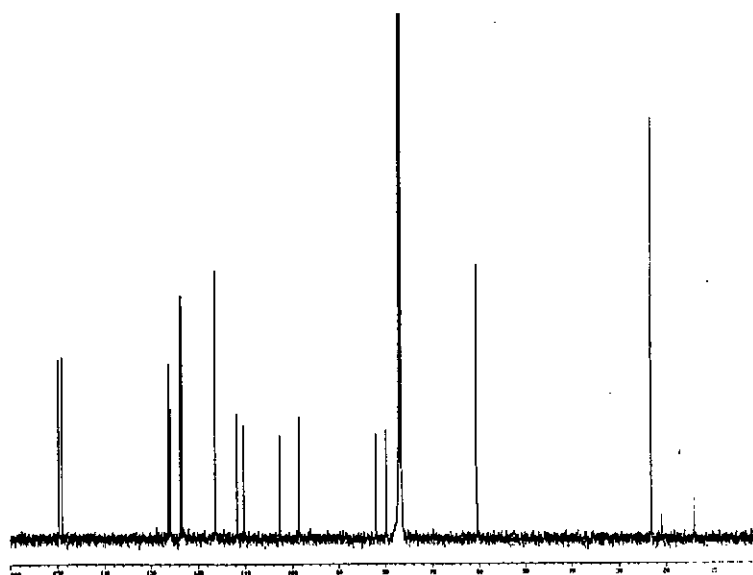


Schéma II.8 : Fragmentation du produit 5

Figure II.18 : Spectre  $^1\text{H-RMN}$  de 5 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )Figure II.19 : Spectre  $^{13}\text{C-RMN}$  de 5 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

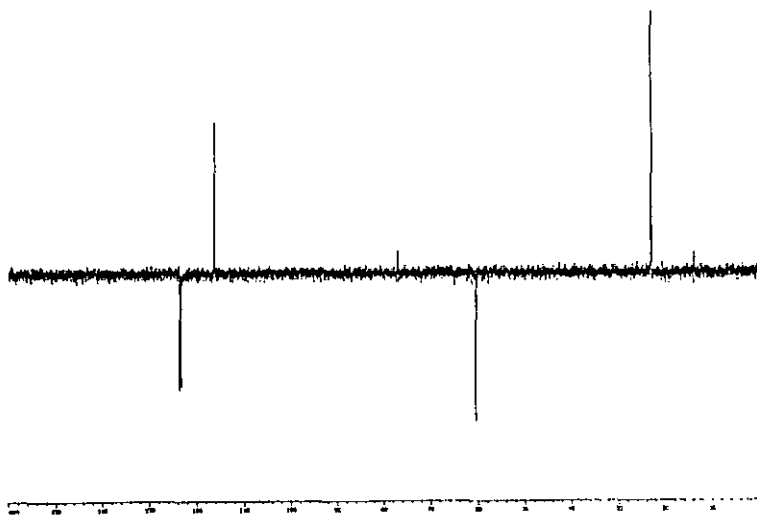
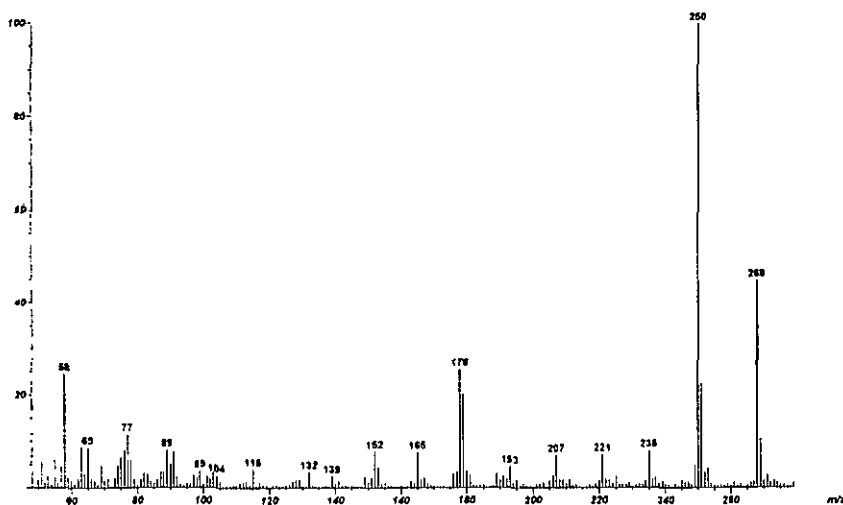
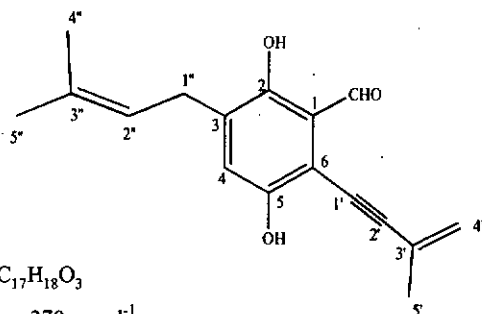
Figure II.20 : DEPT 135 de 5 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Figure II.21 : Spectre de masse de 5 (EI, 70 eV)

### II.6.6 Identification du 2,5-dihydroxy-3-(3-méthyl-but-2-ène)-6-(3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl)-benzaldéhyde



Formule brute :  $C_{17}H_{18}O_3$

Poids moléculaire : 270  $g \cdot mol^{-1}$

Rf = 0.26 dans AcOEt-Hexane (1/2)

0.76 dans 5% MeOH dans  $CH_2Cl_2$

UV :  $\lambda_{max}$  (MeOH/ $H_2O$ ) = 248, 290 et 405 nm

Masse de produit isolé : 1 mg

#### Analyse

$^1H$ -RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ ) : 1.76 (3H, s,  $CH_3$ ), 1.77 (3H, s,  $CH_3$ ), 2.03 (3H, t,  $J=1.4$  Hz,  $CH_3$ ), 3.32 (2H, d,  $J=7.4$  Hz,  $CH_2$ ), 5.28 (1H, m,  $J=1.4$  et 7.4 Hz,  $(CH_3)_2=CH-$ ), 5.46 (2H, m,  $CH_3-C=CH_2$ ), 7.06 (1H, s, ArH), 10.29 (1H, s, ArOH), 11.59 (1H, s, CHO).

DEPT 135 (100 MHz,  $CDCl_3$ ) : 18.5 (C-4''), 24.01 (C-5''), 26.50 (C-5'''), 28.16 (C-1''), 121.06 (C-2'') 124.53 (C-4), 124.60 (C-4'), 196.81 (CHO).

MS, EI, 70 eV ( $m/z$ , I %) : 270 ( $M^+$  75), 255 (18), 227 (16), 215 (4), 199 (15), 187 (27), 186 (74), 128 (22), 115 (19), 91 (15), 81 (66), 83 (100), 77 (7), 65 (5).

Le spectre  $^1H$ -RMN (Figure 11.23) indique comme pour les autres produits un groupement 3-méthyl-but-3-ène-1-ynyl, ainsi qu'une fonction aldéhyde à  $\delta=11.59$  ppm et une fonction phénol à  $\delta=10.29$  ppm. Le cycle aromatique est pentasubstitué, un seul proton à  $\delta=7.06$  ppm est présent. D'autre part, nous observons la présence d'un

groupement isoprényle<sup>[48,49]</sup>. Sur le spectre COSY, les couplages entre le proton vinylique à  $\delta=5.28$  ppm et les deux méthyles ( $\delta=1.76$  et  $1.77$  ppm) ainsi qu'avec le  $\text{CH}_2$  à  $\delta=3.32$  ppm sont présents. Tous ces éléments sont confirmés par la  $^{13}\text{C}$ -RMN et en particulier par le DEPT 135 (Figure II.24).

Ces informations et l'analogie avec les spectres de la stéréohirsutine nous conduisent à la structure du produit 6 représenté sur le schéma II.2.

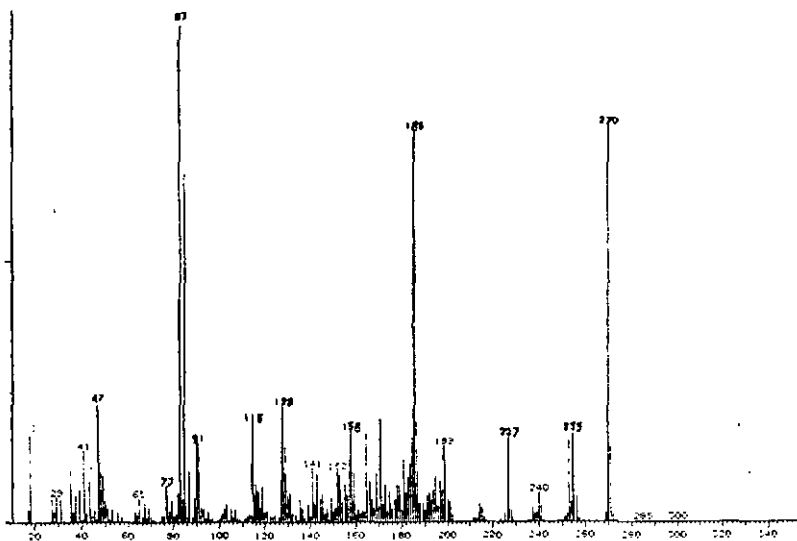


Figure II.22 : Spectre de masse de 6 (EI, 70 eV)

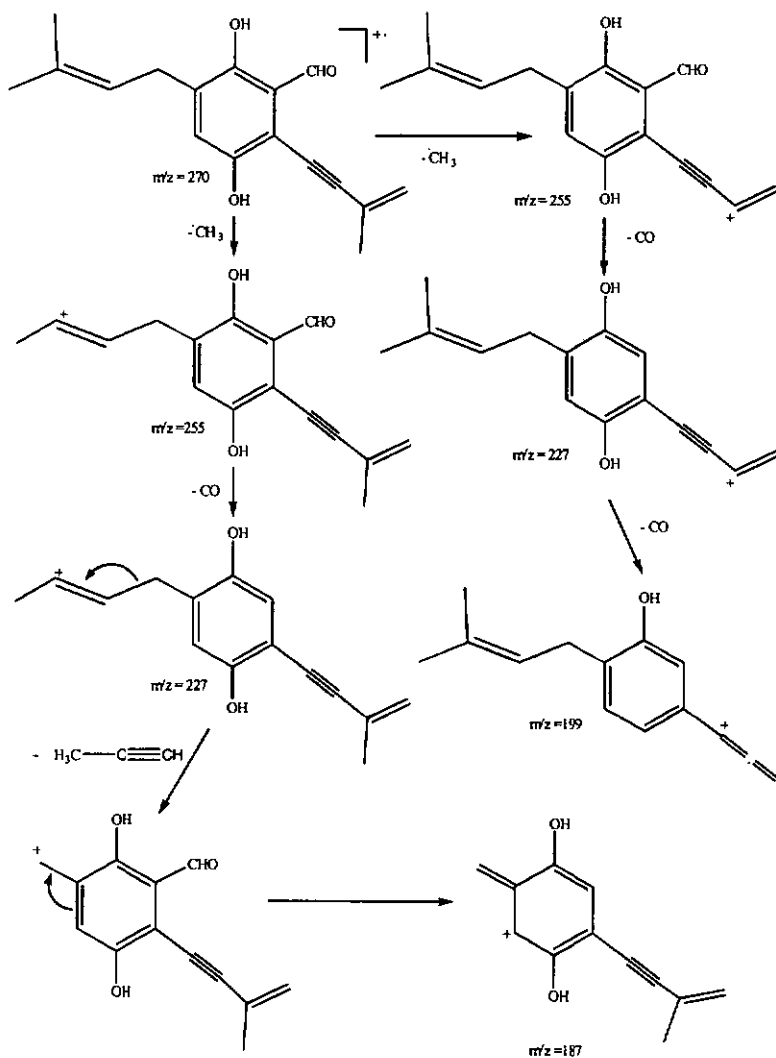


Schéma II.9 : Fragmentation du produit 6

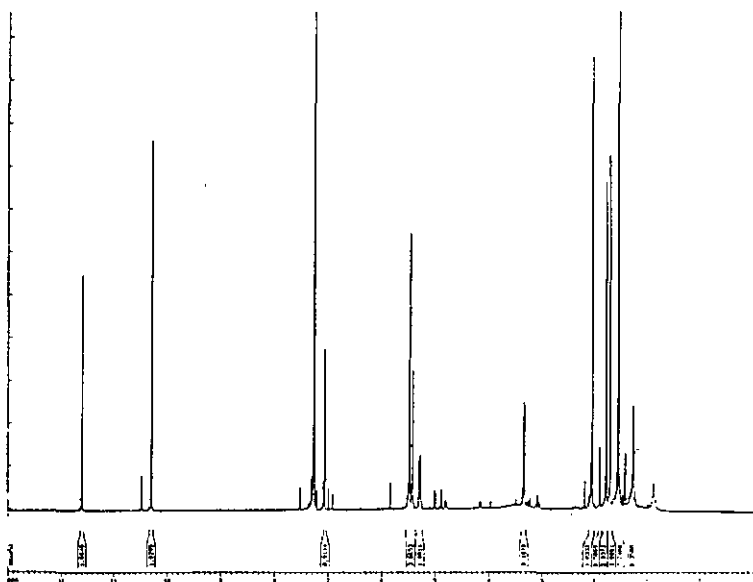


Figure II.23 : Spectre  $^1\text{H-RMN}$  de 6 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

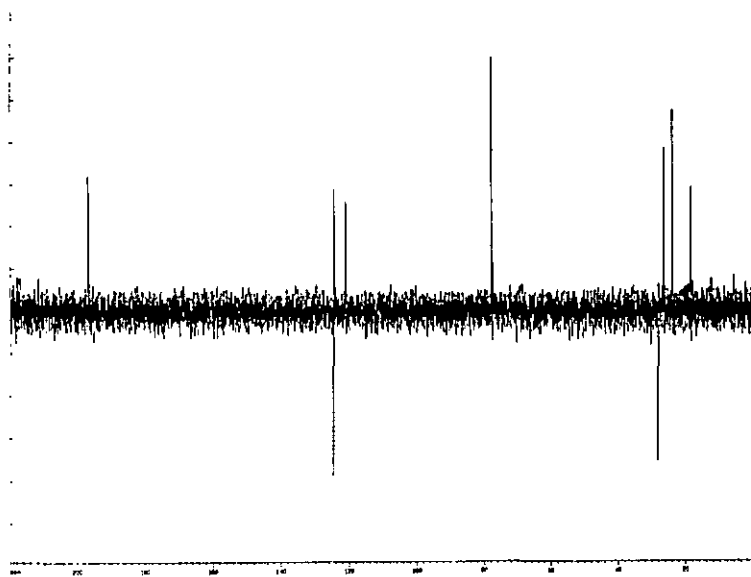
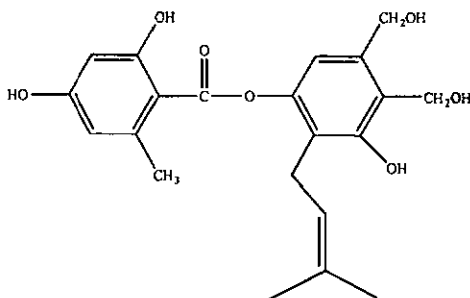


Figure II.24 : DEPT 135 de 6 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

II.6.7 Identification du 2,4-dihydroxy-6-méthyl benzoate de [3',4'-dihydroxyméthyl-5'-hydroxy-6'-(3-méthyl-but-2-ényl)-phényl]



Formule brute :  $C_{21}H_{24}O_7$

Poids moléculaire : 338

Rf = 0.68 dans AcOEt-Hexane (1/1)

0.35 dans AcOEt- $CH_2Cl_2$  (1/1)

UV :  $\lambda_{max}(MeOH/H_2O) = 270$  et  $305$  nm

Masse de produit isolé : 2.1 mg

Analyse :

$^1H$ -RMN (400 MHz, acétone- $d_6$ ) : 1.67 (3H, s) et 1.68 (3H, s) deux méthyles ( $(CH_3)_2C=CH-$ ), 2.74 (3H, s, Ar- $CH_3$ ), 3.41 (2H, d,  $J=6.9$  Hz, Ar- $CH_2-CH=$ ), 4.33 (1H, t,  $J=5.6$  Hz,  $-CH_2-OH$ ), 4.68 (2H, d,  $J=5.6$  Hz, Ar- $CH_2-OH$ ), 5.12 (2H, d,  $J=5.00$  Hz, Ar- $CH_2-OH$ ), 5.20 (1H, m,  $-CH_2-CH=C$ ), 5.47 (1H, t,  $J=5.00$  Hz,  $-CH_2-OH$ ), 6.41 (1H, d,  $J=2.40$  Hz, Ar- $H$ ), 6.51 (1H, d,  $J=2.40$  Hz, Ar- $H$ ), 6.85 (1H, s, Ar- $H$ ), 9.39 (1H, s, Ar- $OH$ ), 9.44 (1H, s, Ar- $OH$ ), 11.57 (1H, s, Ar- $OH$ ).

MS, EI, 70 eV ( $m/z$ , I%) : 388 (2,  $M^+$ ), 236 (13), 200 (16), 150 (46), 124 (100), 110 (45).

$^{13}C$ -RMN (100 MHz, acétone  $d_6$ ) : 17.03 ( $CH_3$ -Ar), 23.17, 23.95, 29.94 ( $-CH_3$ ), 59.68 et 62.07 ( $-CH_2OH$ ), 101.17, 112.15, 133.33, 120.81, 122.54, 131.12, 144.20, 148.52, 156.39, 163.35, 166.39, 170.77 ( $-COO-$ ).

Le spectre  $^1\text{H-RMN}$  (Figure II.25) présente trois signaux correspondant à des méthyles dont deux appartiennent au groupe isoprényle. Il montre également deux protons aromatiques en position méta ( $J = 2.40 \text{ Hz}$ ) à  $\delta = 6.41$  et  $6.51 \text{ ppm}$ . Il indique aussi un troisième proton aromatique ( $\delta = 6.85 \text{ ppm}$ ) provenant d'un second cycle aromatique. Le produit 7 possède trois fonctions phénols ( $9.39, 9.44$  et  $11.57 \text{ ppm}$ ) et deux groupements  $-\text{CH}_2\text{OH}$ . Le spectre  $^{13}\text{C-RMN}$  (Figure II.26) indique la présence de 21 atomes de carbone. Ces valeurs correspondent aux données de la littérature<sup>[16,17,18]</sup>. Ce composé a déjà été isolé de *Stereum hirsutum*, il a des activités anti-tumorales. Il inhibe les cellules *Yoshida sarcoma*. Par contre il n'est pas actif contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micobacterium* et *Candida albicans*.

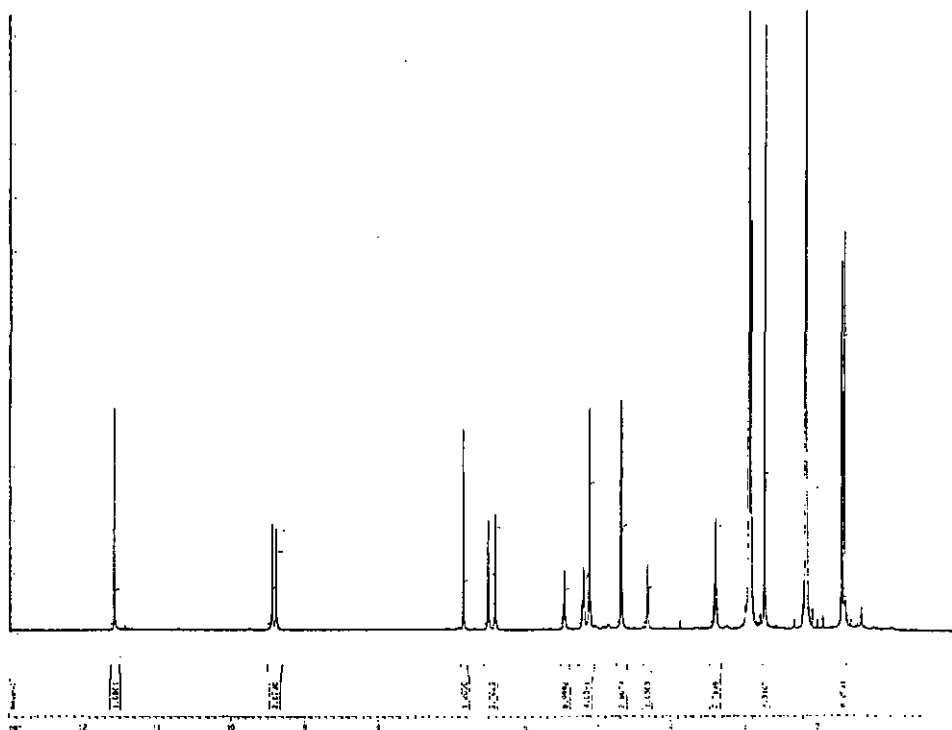


Figure II.25 :  $^1\text{H-RMN}$  de 7 (400 MHz, acétone- $\text{d}_6$ )

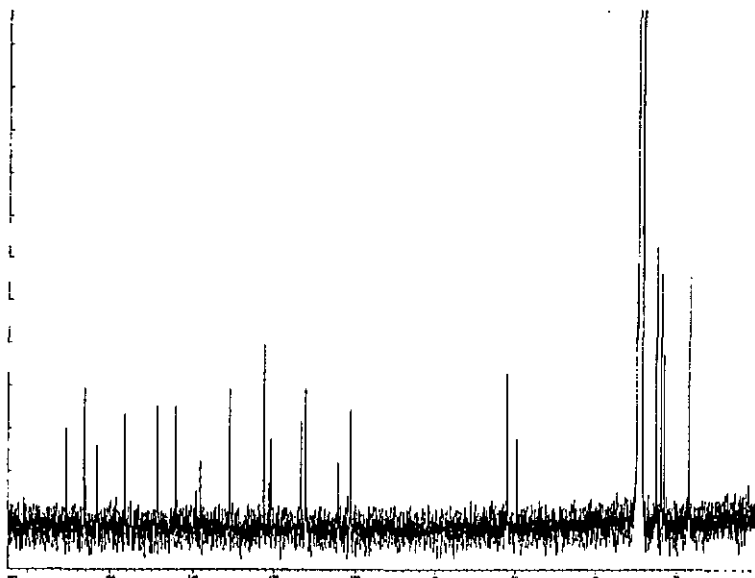
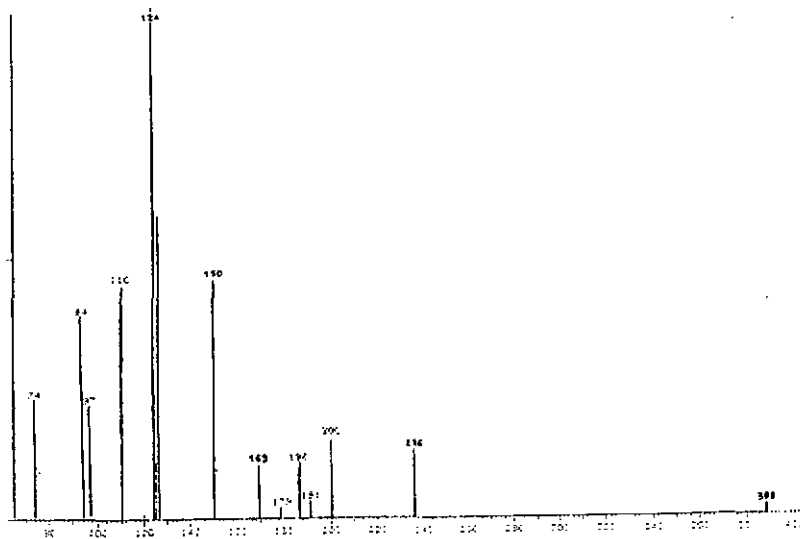
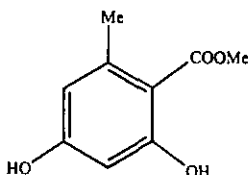
Figure II.26 : Spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN de 7 (100 MHz, acétone- $\text{d}_6$ )

Figure II.27 : Spectre de masse de 7 (EI, 70 eV)

## II.6.8 Identification du 2,4-dihydroxy-6-méthylbenzoate (orsellinate de méthyle)



Formule brute :  $C_9H_{10}O_4$

Poids moléculaire : 182

Rf = 0.37 dans AcOEt-Hexane (1/1)

0.36 dans AcOEt- $CH_2Cl_2$  (1/1)

UV :  $\lambda_{max}$ (MeOH/ $H_2O$ ) = 214, 252 et 298 nm

Masse de produit isolé : 1.3 mg

Analyse :

$^1H$ -RMN (400 MHz, acétone- $d_6$ ) : 2.57 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 4.03 (3H, s, -COOCH<sub>3</sub>), 6.35 (1H, d, J=2.49 Hz, Ar-H), 6.41 (1H, m, J=2.49 et 0.80 Hz, Ar-H), 9.28 (1H, bosse, OH), 11.72 (1H, s, OH).

DEPT 135 (100 MHz, acétone- $d_6$ ) : 23.61 (CH<sub>3</sub>-Ar), 51.55 (-COOCH<sub>3</sub>), 101.01 (C<sub>3</sub>), 111.71 (C<sub>5</sub>).

$^{13}C$ -RMN (100 MHz, acétone- $d_6$ ) : 23.61 (CH<sub>3</sub>-Ar), 51.55 (-COOCH<sub>3</sub>), 101.01 (C<sub>3</sub>), 104.74 (C<sub>1</sub>), 111.71 (C<sub>5</sub>), 143.72 (C<sub>6</sub>), 162.72 (C<sub>2</sub>), 165.68 (C<sub>4</sub>), 172.36 (-COOCH<sub>3</sub>).

MS, EI, 70 eV (m/z, 1%) : 182 (43, M<sup>+</sup>), 151 (25), 150 (100), 122 (55), 94 (20).

Le spectre  $^1H$ -RMN (Figure II.28) indique deux protons aromatiques à 6.35 et 6.41 ppm en position méta (J = 2.49 Hz). Le produit 8 possède également deux fonctions phénoliques, un groupe méthyle et un ester. La comparaison de ces valeurs avec celles de la littérature<sup>[37]</sup> confirme la structure proposée. Il s'agit de l'orsellinate de méthyle.

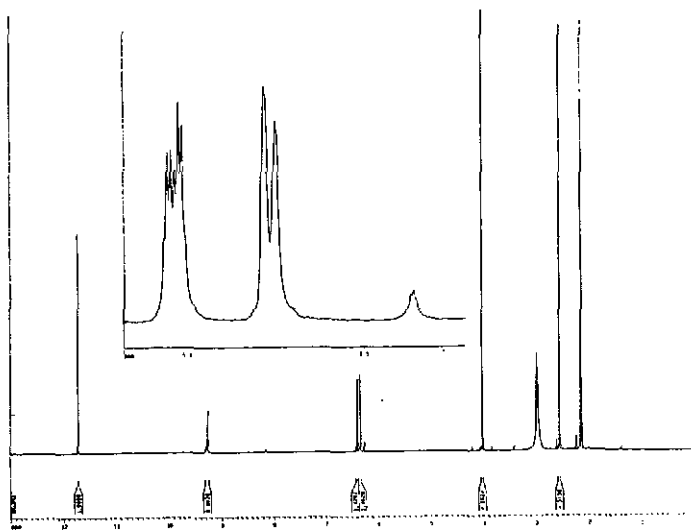


Figure II.28 : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN de 8 (400 MHz, acétone- $\text{d}_6$ )

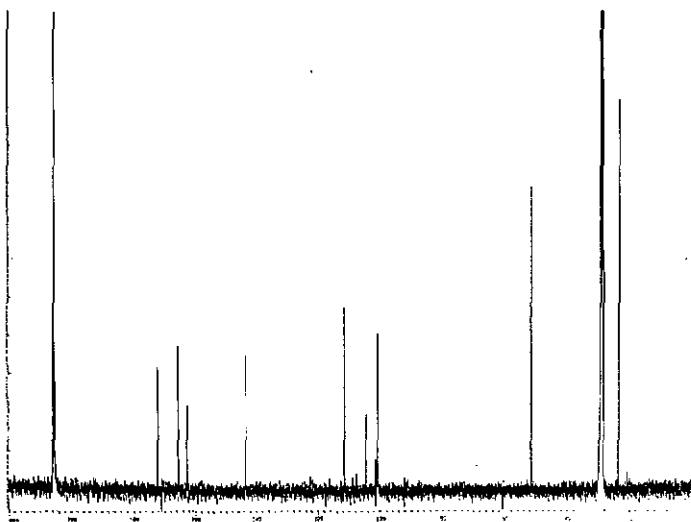


Figure II.29 : Spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN de 8 (100 MHz, acétone- $\text{d}_6$ )

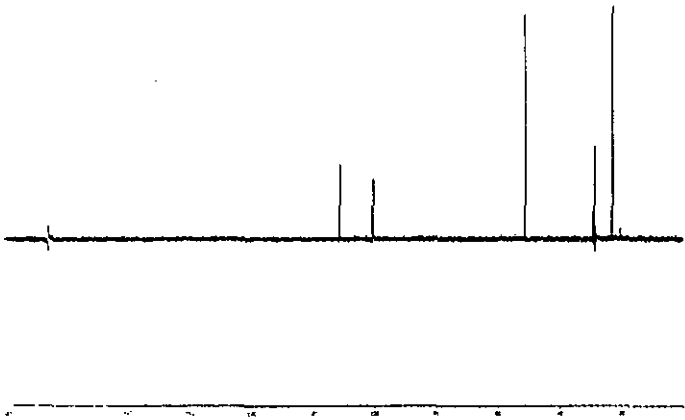


Figure II.30 : DEPT 135 de **8** (100 MHz, acétone- $d_6$ )

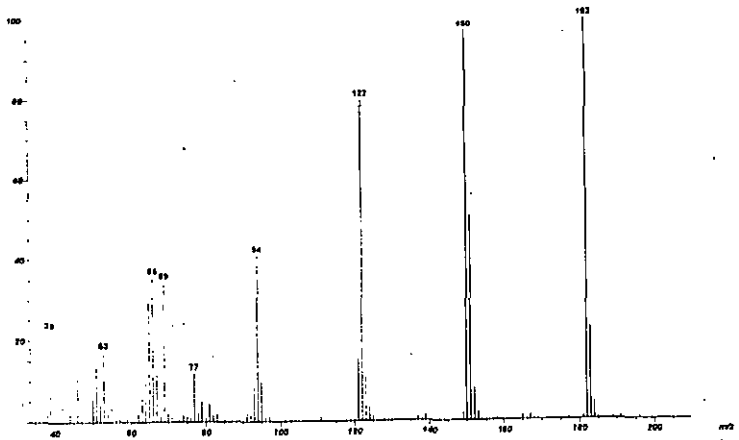


Figure II.31 : Spectre de masse de **8** (EI, 70 EV)

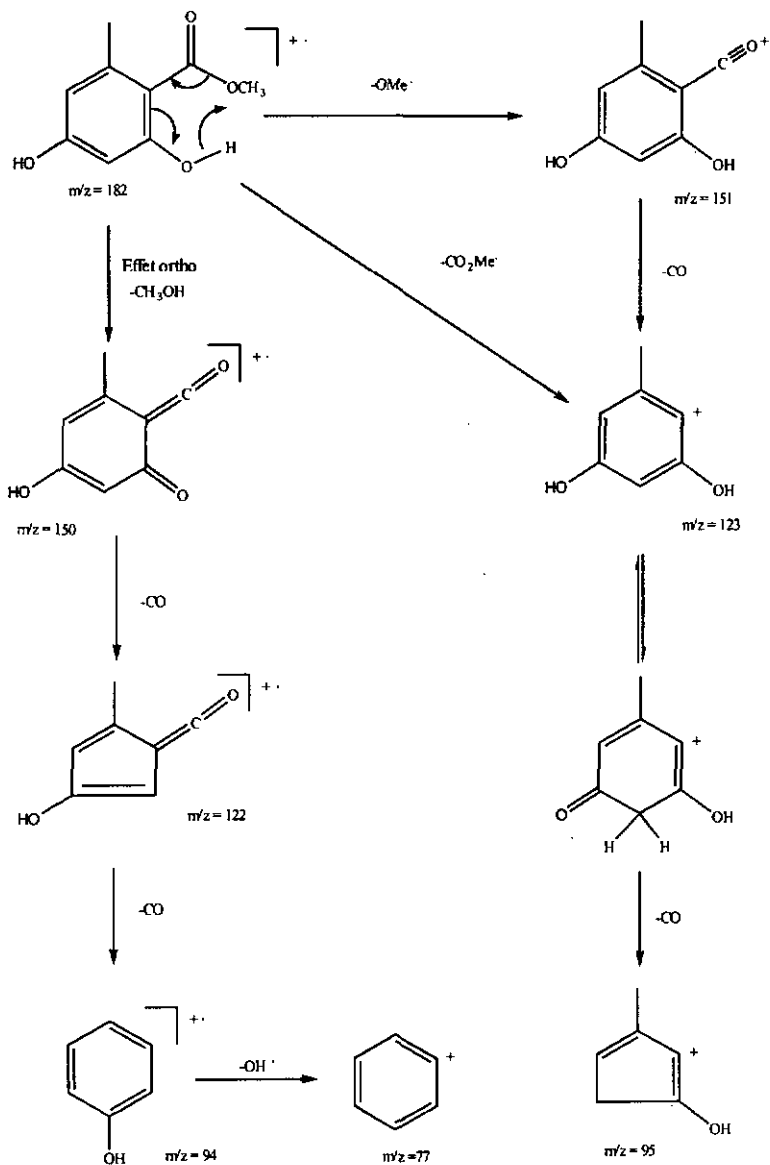


Schéma II.10 : Fragmentation du produit 8

Quelques caractéristiques des produits isolés de *Stereum hirsutum* sont récapitulées sur le tableau II.1.

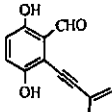
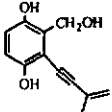
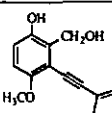
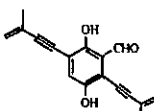
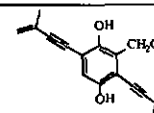
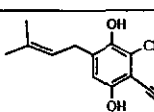
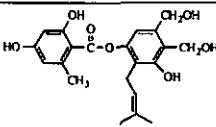
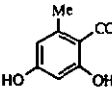
	Poids Moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Rf AcOet/Hexane 1/2	Rf 5% MeOH dans CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	RT HPLC (minutes)
	202	0.42	0.69	39.2
	204	0.20	0.18	15.0
	218	0.27	0.26	27.7
	266	0.46	0.72	54.5
	268	0.30	0.47	38.4
	270	0.53	0.76	58.7
	388	AcOet/Hexane 1/1 0.68	AcOet/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1/1 0.35	40.6
	182	AcOet/Hexane 1/1 0.37	AcOet/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1/1 0.36	27.2

Tableau II.1 : Quelques caractéristiques pour les produits isolés de *Stereum hirsutum*

## CHAPITRE III

---

### TESTS BIOLOGIQUES

Dans le chapitre précédent nous avons isolé et identifié les produits des fractions les plus toxiques. Les tests ont été effectués sur plantules de tomate de l'espèce Bony-Best. Cet organisme test a été choisi en raison de sa sensibilité très élevée aux toxines. L'échantillon à tester est séché sous courant d'azote, pesé puis dissout dans de l'eau distillée additionnée de 2% de méthanol. Les plantules sont mises en contact avec les solutions de produit à tester. Le comportement de la plantule (flétrissement de la feuille, nécrose de la tige) est observé au cours du temps. Nous avons remarqué que les composés possédant une fonction aldéhyde (principalement les produits 1 et 4) sont issus des fractions les plus toxiques. Outre ce test, différents autres tests ont été utilisés pour évaluer la toxicité de nos produits.

### III.1 Tests sur feuilles de plants de vigne *in vitro*

Nous avons isolé de faibles quantités (1 à 3 mg) de produits. Afin d'évaluer la toxicité de nos produits purs nous les avons confiés au laboratoire de LVMH un de nos partenaire dans ce projet européen. Les tests sont réalisés sur feuilles de plants de vigne d'Ugni blanc, cultivé *in vitro*.

Chaque produit a été repris dans l'acétone puis dilué avec de l'eau pour arriver à une solution mère de 10 mM environ pour 1% d'acétone.

Des dilutions ont été faites ensuite pour chaque produit pour obtenir des solutions à 1 mM et 0.1 mM.

Un aliquot de 20  $\mu$ l de chaque solution a été disposé sur les trois plus jeunes feuilles de plants d'Ugni blanc cultivées *in vitro*. Pour chaque produit le test a donc été fait pour des quantités de substances équivalentes à :

200 nmoles    20 nmoles    2 nmoles

Une quantité supérieure à 400 nmoles a aussi été testée pour l'eutypine intégrée dans le test comme substance de référence.

#### MATERIEL VEGETAL

Des plants enracinés d'Ugni blanc *in vitro* (stade de trois feuilles) ont été repiqués en boîtes de culture Magenta (doubles) à raison d'une plante par boîte. Après un mois de culture (23°C jour, 18 °C nuit, 16 heures de lumière) les plants atteignant les deux tiers de la boîte ont été traités par dépôt de 20  $\mu$ l de solution sur les trois plus jeunes feuilles non blessées (une inoculation de 40  $\mu$ l a été ajoutée pour l'eutypine). Une observation macroscopique a été faite à l'oeil nu et à la loupe binoculaire afin de compter les éventuelles nécroses sur feuilles et les modifications de croissances. Trois témoins traités de façon identique ont été réalisés avec une solution à 1% d'acétone dans l'eau.

Seul le frustulosinol a montré, pour la plus forte concentration, une apparition de nécrose caractéristique sur les deux plus jeunes feuilles. La nécrose a une surface de l'ordre de 5 mm équivalente à la zone de dépôt de la solution.

L'eutypine, phytotoxine de l'eutypiose ne provoque pas de nécrose. Ce test ne met pas en évidence l'activité de notre produit de référence. D'autres tests doivent être mis en oeuvre pour caractériser l'activité toxique de nos produits.

### III. 2 Test comparatif entre la stéréohirsutine et l'eutypine sur tomates

La stéréohirsutine (produit 4) ayant été synthétisée nous avons pu réaliser des tests comparatifs avec l'eutypine. Ces deux produits sont repris dans du méthanol puis dilués dans de l'eau pour arriver à des concentrations de 1 à 0.5 mg.ml<sup>-1</sup> et inférieures à 0.5 mg.ml<sup>-1</sup> pour la stéréohirsutine. Le témoin consiste en une solution de 2% de méthanol dans l'eau.

Les tests sont réalisés avec des plantules possédant 2 cotylédons, mesurant 6 à 8 cm et pesant de 85 à 100 mg. Les résultats obtenus sont regroupés sur le tableau III.1.

	Concentration mg.ml <sup>-1</sup>	5 heures	19 heures	26 heures	40 heures
EUTYPINE	1	-	+	+++	+++
	1	-	+++	+++	+++
	0.5	+	+++	+++	+++
	0.5	+	+	++	+++
STEREO HIRSUTINE	1	-	+ / *	+ / **	++ / **
	0.5	-	-	- / *	+ / **
	<0.5	-	-	-	- / *
	<0.5	-	-	-	- / *
BLANC	Témoin I	-	-	-	-
	Témoin I	-	-	-	-
	Témoin I	-	-	-	-

Tableau III.1 : Activité comparative entre l'eutypine et la stéréohirsutine.

#### Symboles

- (-) Aucun flétrissement
- (+) Léger flétrissement
- (++) Flétrissement marqué des feuilles
- (+++) Flétrissement très marqué de toute la plante
- (\*) Légère nécrose de la tige
- (\*\*) nécrose marquée de la tige

Des résultats de ce test nous pouvons remarquer :

- L'eutypine provoque un flétrissement entraînant la mort du plant de tomate plus rapidement que pour la stéréohirsutine.
- Elle n'entraîne pas de nécrose, contrairement à la stéréohirsutine (Figure III.1).
- La nécrose de la tige semble responsable du flétrissement des cotylédons pour la stéréohirsutine (Figure III.2).

Nous pouvons déduire de ces observations que les deux phytotoxines ont deux modes d'actions différents. L'eutypine est probablement transportée dans les cotylédons entraînant leurs flétrissements. Par contre la stéréohirsutine semble détruire les cellules de la tige. La nécrose de la tige a pour conséquence inéluctable le flétrissement des cotylédons. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la stéréohirsutine est plus toxique que l'eutypine car elle provoque une nécrose de la tige contrairement à l'eutypine.

Des tests effectués à Toulouse<sup>[51]</sup>, sur feuilles excisées de vitroplants d'une variété sensible, immergées dans des solutions d'eutypine permettent d'affirmer que l'eutypine reproduit des symptômes caractéristiques de la maladie. La présence de l'eutypine dans le cep malade, mais également dans la sève brute et plusieurs organes herbacés démontre qu'elle migre du tronc, où elle est synthétisée, vers les inflorescences et les feuilles. Donc, l'eutypine est transportée par la sève dans les différents organes du cep.

D'autres tests ont été effectués dans les laboratoires de LVMH sur plants de vigne. Malheureusement aucun n'a donné de résultats, même l'eutypine n'a pas provoqué de réaction toxique. Ceci montre que des tests plus spécifiques doivent être mis au point. Des tests sur protoplastes de vigne vont prochainement être mis en oeuvre. Ces tests sur protoplastes ont donné de très bons résultats avec l'eutypine. Etant donné que *Stereum hirsutum* comme *Phellinus punctatus* sont des champignons polyphages il serait peut être intéressant de faire des tests sur du bois de vigne.

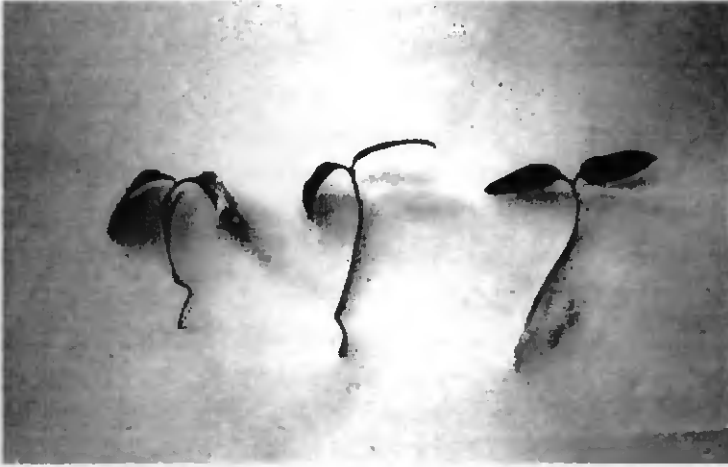


Figure III.1 : plants de tomate après 40 heures de test.  
De gauche à droite : concentration en stéréohirsutine de 1, 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>, blanc.



Figure III.2 : plants de tomate dans piluliers après 40 heures de test.  
De gauche à droite : concentration en stéréohirsutine de 1, 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>, blanc.

### III. 3 Test du méthyl-frustulosinol sur tomates

La synthèse du méthyl-frustulosinol (produit 3) ayant été effectuée, nous avons pu réaliser des tests sur plantules de tomate. Ce produit est repris dans du méthanol puis dilué dans de l'eau pour arriver à des concentration de  $0.5 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Le témoin consiste en une solution de 2% de méthanol dans l'eau.

Sur les deux essais nous observons un début de flétrissement de la tige après 30 heures d'immersion. Ensuite, comme pour la stéréohirsutine, la plante flétrit après 50 heures.

De ce nouveau test sur plants de tomate nous pouvons déduire que nos produits provoquent d'abord une nécrose de la tige entraînant le flétrissement des cotylédons. Ceci avait déjà été observé lors de nos tests sur certaines fractions toxiques.

Du résultat de l'activité toxique du méthyl-frustulosinol nous pouvons penser que la frustulosine et le frustulosinol sont toxiques. En effet, ces deux produits ont été isolés de fractions toxiques. D'autre part, il a été démontré<sup>[52]</sup> que l'eutypine est beaucoup plus active que la méthyl-eutypine. Ceci pourra être prouvé quand la frustulosine et le frustulosinol seront synthétisés.

### III. 4 Influence de la stéréohirsutine et l'eutypine sur la croissance de cals de *Vitis vinifera* cv. Gamay.

Les cals de *Vitis vinifera* cv. Gamay sont cultivés sur le milieu de culture standard en présence de stéréohirsutine et d'eutypine apportées à des concentrations allant de 0 à  $500 \mu\text{M}$ . Après 28 jours de culture, la croissance des tissus est estimée en déterminant la masse des cals.

La croissance est exprimée en pourcentage par rapport au tissu témoin cultivé en absence de toxine. Les résultats sont rapportés sur le tableau suivant.

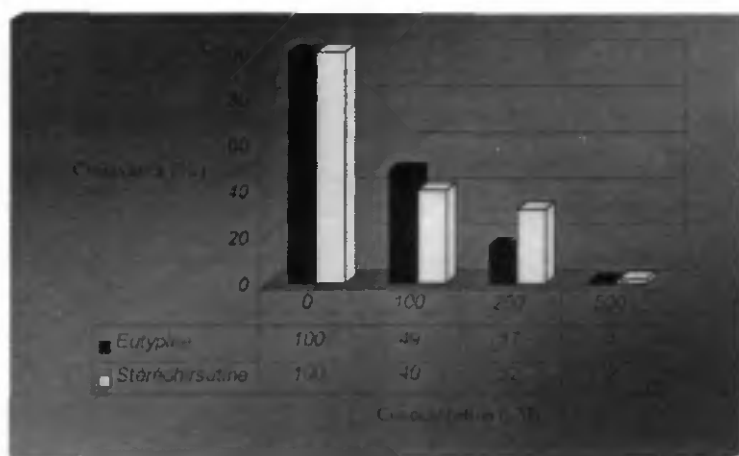


Tableau III.2 : Influence de l'eutypine et de la stéréohirsutine sur la croissance des cals de *Vitis vinifera* cv. Gamay.

La stéréohirsutine inhibe fortement la croissance des cals de vigne. En présence de 100 µM de la toxine la croissance est réduite de 50% environ. Elle est totalement inhibée lorsque sa teneur atteint 500 µM.

Les effets de la stéréohirsutine sur la croissance des cals de vigne sont semblables à ceux induits par l'eutypine. D'autres tests sont actuellement en cours, ils semblent montrer que la stéréohirsutine soit plus toxique que l'eutypine.

Nous avons isolé et identifié des métabolites secondaires de *Stereum hirsutum*. Certains d'entre eux et particulièrement la stéréohirsutine sont toxiques sur plants de tomate et surtout sur cals de vigne. Il reste maintenant à retrouver leurs présences dans le matériel végétal (bois et sève).

## CHAPITRE IV

---

### LA SPECTROMETRIE DE MASSE

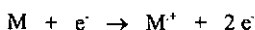
Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : sensibilité et limite de détection inégalées. Cette sensibilité compense l'aspect destructif de la méthode (contrairement à IR, UV, RMN). Cette technique permet l'analyse qualitative et quantitative, soit de mélanges, soit de produits purs. Ses domaines d'application sont nombreux : synthèse, biosynthèse, environnement, contrôle de qualité, pétrochimie, pharmaco-cinétique, etc.

#### IV.1 Principes<sup>[53,54]</sup>

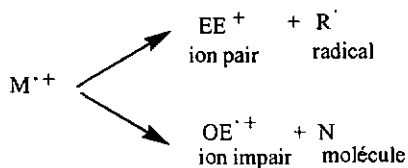
Plusieurs méthodes plus ou moins douces sont utilisées pour passer de l'échantillon initial neutre à l'échantillon ionique en phase gazeuse. L'ionisation par

impact électronique est la plus ancienne et la plus utilisée. Il existe cependant de nombreuses autres méthodes d'ionisation plus récentes telles que l'électrospray.

En impact électronique, le produit est volatilisé dans la chambre d'ionisation et les particules sont soumises au bombardement électronique et transformées en ions positifs :



En général, le potentiel d'ionisation des molécules organiques est de l'ordre de 10 à 12 eV. Autour d'une énergie de 70 eV, le rendement de l'ionisation est maximum. Si l'énergie des électrons est supérieure à l'énergie d'ionisation de la molécule, l'ion moléculaire va se fragmenter. On remarquera qu'il se forme d'abord un radical-cation, à nombre impair d'électrons. Celui-ci pourra donner comme fragment soit un radical et un ion à nombre pair d'électrons, soit une molécule neutre et un nouveau radical-cation.



Les ions ainsi obtenus sont ensuite séparés d'après leur masse, et détectés en proportion de leur nombre. On obtient ainsi le spectre de masse de la molécule, qui peut être présenté sous forme de tableau, ou sous forme graphique.

Les ions fournissent des informations sur la nature et la structure de la molécule origine. Dans le spectre d'une substance pure, l'ion moléculaire, s'il est présent, sera le dernier du spectre, suivi toutefois de pics correspondants à la présence d'isotopes, et donnera la masse moléculaire de la substance.

Un spectromètre de masse doit effectuer les opérations suivantes :

- 1- Produire des ions à partir de l'échantillon à analyser (source).
- 2- Séparer ces ions en fonction de leur rapport masse sur charge (analyseur).
- 3- Eventuellement, fragmenter les ions par collision et analyser les fragments dans un second analyseur.
- 4- Détecter les ions sortant du dernier analyseur et en fournir la masse et la quantité (détecteur).
- 5- Traiter les données par informatique.

#### IV.2 La source à impact électronique

La source est destinée à ioniser les substances à analyser dans le spectromètre. La source à impact électronique a été inventée par Dempster et perfectionnée par Bleakney et par Nier. Comme montré schématiquement sur le schéma IV.1, elle est constituée d'un filament en Rhénium ou en Tungstène chauffé qui émet les électrons. Ceux-ci sont accélérés vers une anode, et "entrent en collision" avec les molécules gazeuses de la source. Ce processus crée des ions qui sont ensuite accélérés et focalisés par des lentilles électrostatiques.

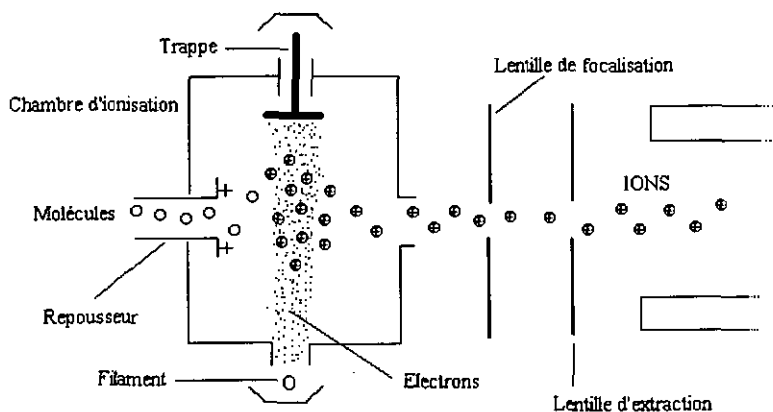


Schéma IV.1 : Source à impact électronique (D'après documentation Nermag)

L'ionisation par impact électronique produit des fragmentations de l'ion moléculaire d'où, parfois, des difficultés à le reconnaître. Afin de reconnaître facilement l'ion moléculaire nous pouvons avoir recours à l'ionisation chimique.

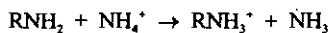
### IV.3 L'ionisation chimique

L'ionisation chimique, plus douce que l'impact électronique, consiste à produire des ions par collision de la molécule à ioniser avec des ions primaires déjà présents dans la source. On cherchera donc à provoquer des collisions ions-molécules dans une partie délimitée de la source.

Pour ce faire il faudra avoir localement une pression telle que les collisions soient fréquentes. L'échantillon est introduit dans la source soit par l'extrémité d'un capillaire aboutissant à un chromatographe, soit déposé sur un filament de tungstène ou de rhénium. Dans le dernier cas, on parlera d'ionisation chimique par désorption (DCI).

Les principaux gaz ionisants utilisés sont : Le méthane, l'iso-butane et l'ammoniac. Nous avons plus particulièrement utilisé ce dernier.

Avec ce gaz, le mode d'ionisation dépendra de la nature de l'échantillon. Les molécules basiques, les amines principalement, s'ioniseront par transfert d'un proton :



Les molécules polaires et celles susceptibles de former des liaisons hydrogène, mais peu ou pas basiques, formeront un adduit. Dans les cas intermédiaires, on observera les deux ions pseudo-moléculaires  $(M+1)^+$  et  $(M+18)^+$ . Les substances ne répondant pas aux critères ci-dessus, les hydrocarbures par exemple ne seront pas efficacement ionisés. Les alcanes, les aromatiques, les éthers et les composés nitrés seront très peu ionisés.

On voit tout le parti qui peut être tiré de la comparaison des spectres pris avec divers gaz ionisants, telle que par exemple la détection sélective dans des hydrocarbures saturés d'autres molécules susceptibles d'être ionisées.

Après avoir produit les ions, il faut les séparer d'après leur masse et leur charge, qu'il faudra simultanément déterminer. Tout comme il existe une grande variété de sources, il existe beaucoup d'analyseurs différents. Celui que nous avons utilisé est un analyseur quadripolaire.

#### IV.4 L'analyseur quadripolaire

Parmi les analyseurs, les quadripolaires sont les plus utilisés. Ils sont constitués de quatre barres ayant idéalement une section hyperbolique. Un ion positif pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. Le principe du quadripôle a été décrit par Paul et Steinenwegen, de l'université de Bonn en 1953.

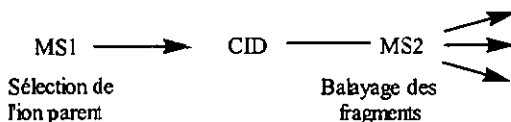
La gamme de masse maximum couverte est de 4000 daltons, et la résolution de l'ordre de 3000. En pratique, la résolution atteinte n'est jamais suffisante pour déduire l'analyse élémentaire, de sorte que l'on travaille habituellement "à résolution unitaire", c'est-à-dire en séparant les ions qui diffèrent d'une unité de masse.

Les analyseurs ne permettant pas d'obtenir des résolutions suffisantes pour en déduire des compositions élémentaires sont des appareils à basse résolution.

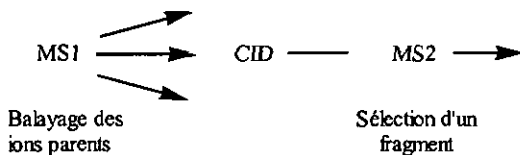
#### IV.5 Spectromètre à plusieurs quadripôles

La figure IV.1 montre le schéma de principe d'un triple quadripôle. Dans le quadripôle central, on peut introduire un gaz de collision (l'argon par exemple), à une pression telle qu'un ion entrant dans le quadripôle subira une ou plusieurs collisions. L'ion se fragmentera et les fragments seront analysés par le quadripôle Q3.

## BALAYAGE DES IONS FILS OU IONS FRAGMENTS



## BALAYAGE DES PARENTS OU DES PRECURSEURS



## BALAYAGE DE PERTE DE NEUTRE CONSTANT

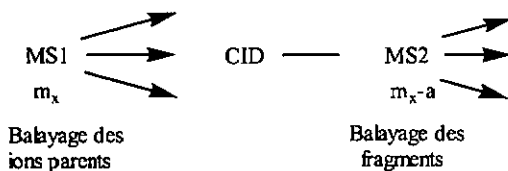


Figure IV.1 : Différents modes de balayage en spectrométrie tandem.

- Principes de base de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Le premier mode de balayage consiste à focaliser un ion d'une masse choisie dans le premier spectromètre. Cet ion subit des collisions dans le quadripôle central et réagit ou se fragmente. Les produits de réaction sont analysés par le second spectromètre de masse. C'est un balayage des ions fils du premier sélectionné, ou « daughter scan ».

Le second mode consiste à focaliser le second spectromètre (Q3) sur un ion sélectionné, et à balayer en masse avec le premier spectromètre (Q1). Dans ce cas, on

détectera tous les ions qui, en réagissant ou en se fragmentant, produisent l'ion de masse sélectionné. On dira qu'on détecte les ions parents de l'ion sélectionné.

Le troisième mode consiste à balayer en parallèle avec le premier et le second spectromètre, mais en imposant entre les deux un décalage de masse. On détectera ainsi tous les ions qui en se fragmentant perdent un neutre de masse constante, égal à la différence de masse entre les deux spectromètres.

#### IV.6 L'ionisation par électrospray (ESI)

L'ionisation par électrospray transforme des ions en solution en des ions en phase gazeuse<sup>[55,56]</sup>. De nombreux produits tels que les composés thermolabiles ou à hauts poids moléculaires peuvent être analysés par cette méthode. L'ESI peut être utilisée pour analyser des composés qui ont des ions préformés en solution. Le terme préformé induit également les adduits.

L'ESI est spécialement utilisé pour l'analyse des polymères biologiques (par exemple : protéines, peptides, glycoprotéines, nucléotides), des produits pharmaceutiques et de leurs métabolites et des polymères industriels.

Le schéma d'une source électrospray est représenté sur la figure IV.2.

En ESI, les ions sont produits et analysés comme suit :

1. Le liquide soumis à l'action d'un champ électrique sort d'un capillaire sous la forme d'un spray. Le débit dans le capillaire est de l'ordre de 1-10  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ .
2. Les gouttelettes sont chargées électriquement et se dirigent, sous l'action du champ électrique, vers l'extrémité du capillaire.
3. L'évaporation du solvant contenu dans les gouttelettes augmente la densité de charge électrique à la surface des gouttelettes.

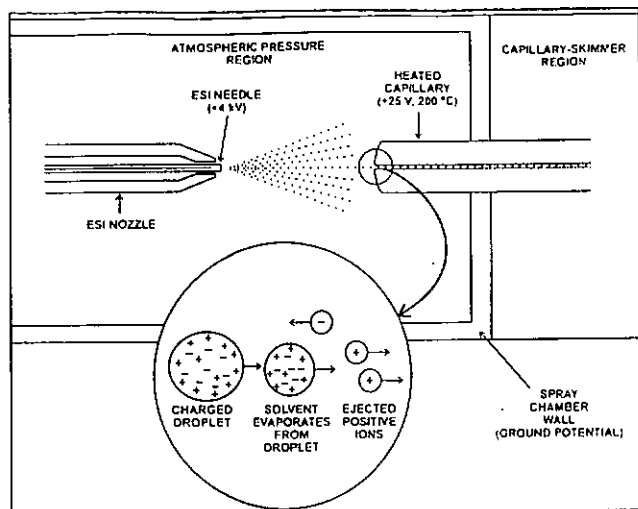


Figure IV.2 : Schéma d'une source électrospray (Documentation Finnigan)

- La densité de charge électrique à la surface des gouttelettes augmente jusqu'à un point critique (connue comme la limite de stabilité de Rayleigh). L'évaporation du solvant provoque le rétrécissement des gouttelettes jusqu'au moment où les forces coulombiennes répulsives vont approcher le niveau des forces de cohésion de celles-ci en provoquant leur explosion.
- Les gouttelettes subissent alors une cascade de fissions (Figure IV.3) donnant des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique à leur surface devienne suffisant pour provoquer la désorption des ions. Ces ions ainsi produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables sur la molécule. L'ESI est également applicable à des molécules ne possédant aucun site ionisable grâce à la formation d'adduits sodique, potassique, ammonium ou autres.

6. Les ions de l'échantillon entrent dans le détecteur de masse et sont analysés.

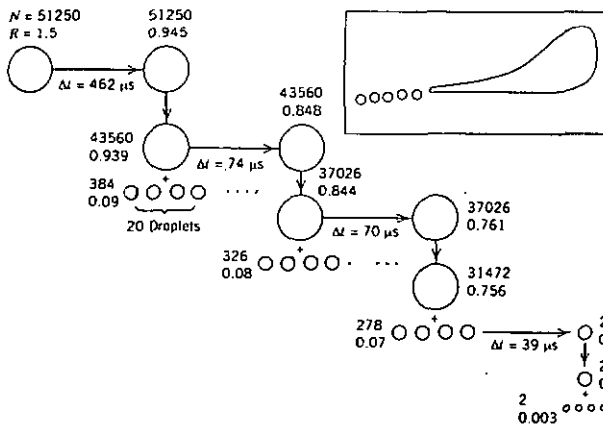


Figure IV.3 : Représentation schématique au cours du temps de gouttelettes « parents » et de celles « enfants »<sup>[57]</sup>.

$N$  : Nombre de charges élémentaires sur la gouttelette

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

Les valeurs  $\Delta t$  correspondent aux temps requis pour que la gouttelette atteigne par évaporation la taille requise pour qu'une fission ait lieu.

L'ESI peut être utilisée en mode positif ou négatif. Le mode de polarisation est déterminé par les ions préformés en solution : les molécules acides forment des ions négatifs en solution, et les molécules basiques forment des ions positifs. L'éjection des gouttelettes des ions de l'échantillon est facilitée si la charge ionique et la charge à la surface des gouttelettes sont de même polarité. Donc un potentiel positif est appliqué entre le capillaire et la contre-électrode pour analyser des ions positifs et inversement un potentiel négatif pour des ions négatifs.

Les ions peuvent être mono ou multi-chargés. Le nombre de charges porté par les ions dépend de la structure de l'analyte et du solvant qui le porte. En ESI le tampon et la force du tampon ont un effet notable sur la sensibilité. Donc, il est important de choisir cette variable correctement. Dans le cas d'une molécule à haut poids moléculaire, protéines ou peptides, le spectre de masse consiste typiquement en une série de pics correspondant à la distribution des ions multichargés de l'analyte.

#### IV.7 L'Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI)<sup>[58]</sup>

L'APCI est une technique douce d'ionisation, mais moins douce que l'ESI. L'APCI est utilisée pour analyser des produits de polarité moyenne. Les ions sont produits et analysés comme suit :

1. L'échantillon en solution est nébulisé en fines gouttelettes.
2. Les gouttelettes sont vaporisées dans un tube à haute température (vaporisateur).
3. Une haute tension est appliquée à l'aiguille près de la sortie du tube. La haute tension crée une décharge corona qui forme des ions réactifs par une série de réactions chimiques avec des molécules de solvant et d'azote.
4. Les ions réagissent avec les molécules de l'échantillon pour former les ions de l'échantillon.
5. Les ions de l'échantillon entrent dans le détecteur de masse et sont analysés.

La figure IV.4 montre le principe de l'APCI pour la formation d'un ion positif.

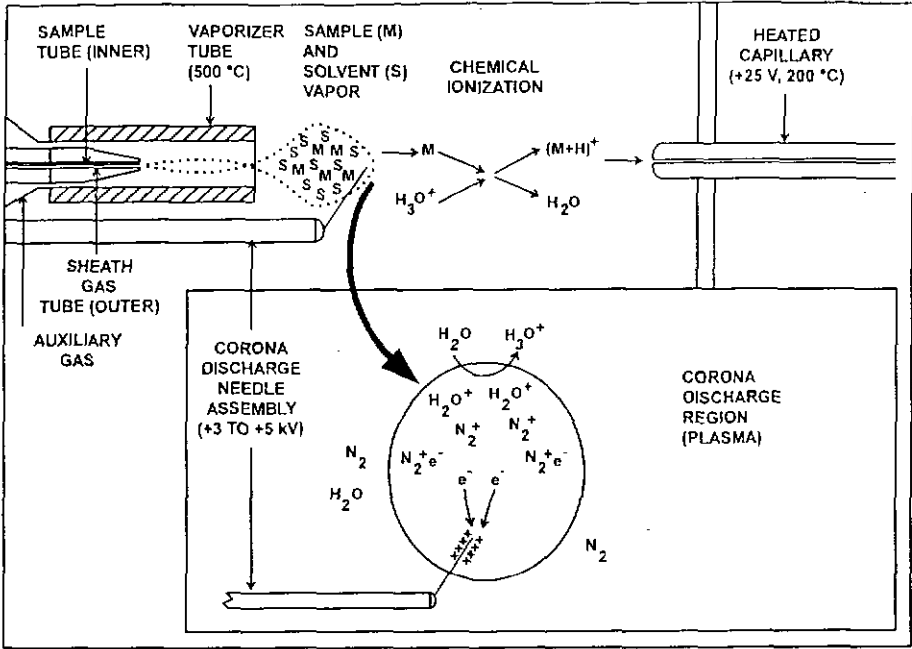
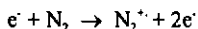


Figure IV.4 : Processus de formation d'un ion positif en APCI (Documentation Finnigan)

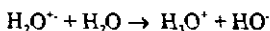
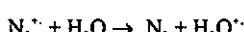
L'APCI est une technique d'ionisation en phase gazeuse. L'acidité et la basicité de la phase gazeuse de l'analyte et de la vapeur du solvant jouent un rôle important dans le processus de l'APCI.

En mode positif, l'ionisation de l'échantillon produit une série de réactions qui commence avec un électron qui initie la formation d'un cation. Un exemple de la formation des ions primaires, secondaires et de l'adduit est montré ci-dessous :

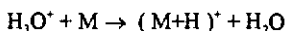
Formation de l'ion primaire



Formation de l'ion secondaire



Transfert de proton



En mode négatif,  $(M-H)^-$  est typiquement formé par l'arrachement d'un proton par  $OH^-$ .

L'APCI est typiquement utilisé pour analyser des petites molécules avec un poids moléculaire d'environ 2000 uma. Cette méthode n'est pas affectée par des changements mineurs de la majorité des variables comme le changement du tampon ou de la force du tampon.

On peut utiliser l'APCI en mode positif ou négatif. Pour de nombreuses molécules, le mode positif produit un fort courant ionique. Ceci est spécialement vrai pour des molécules contenant un ou plusieurs azotes basiques, ou autre atome basique. Font exception à cette règle générale les molécules ayant des sites acides, tels que les acides carboxyliques et les alcools acides. Dans ce cas le nombre d'ions négatifs est supérieur à celui des positifs.

Bien qu'en général, moins d'ions négatifs sont produits que d'ions positifs, l'ionisation négative est quelquefois le mode de choix. En effet le mode négatif génère parfois moins de bruit de fond que le mode positif. Donc, la sélectivité peut être meilleure dans le mode négatif que dans le mode positif.

#### IV.8 La trappe ionique<sup>(59,60)</sup>

Cet analyseur de masse est constitué de trois électrodes en inox : une d'entrée, une de sortie et une circulaire. La surface intérieure des électrodes est hyperbolique. Ensemble, elles forment une cavité dans laquelle l'analyse de masse se produit (Figure IV.5, page 76).

La superposition de tensions continues et alternatives appliquées aux trois électrodes permet d'obtenir une sorte de « quadripôle à trois dimensions » dans lesquels les ions sont gardés captifs (« trappés »).

Les ions se repoussent mutuellement et de ce fait ont tendance à accroître le volume qu'ils occupent par un accroissement du rayon de la trajectoire. De ce fait, cette méthode impose de garder dans l'analyseur une pression de gaz inerte, de l'hélium en général, de manière à constamment « freiner » les ions pour qu'ils restent sur une trajectoire de petite dimension.

Les ions peuvent être sélectionnés individuellement et éjectés de la trappe suivant leur rapport masse sur charge.

Lors du déplacement dans la trappe, les ions subissent des collisions avec les molécules neutres (He). L'énergie cinétique est convertie en énergie d'excitation. Si la valeur de cette dernière est supérieure à l'énergie de dissociation, l'ion se décompose et la trappe va accumuler les fils ainsi formés. Ceci permet d'utiliser les techniques d'analyse SRM, CRM ou MS<sup>n</sup>. De cette façon, en utilisant la MS<sup>n</sup>, nous pouvons connaître les fragments d'un pic parent comme pour la MS/MS sur le triple quadripôle. Mais avec la trappe ionique nous pouvons effectuer de la MS<sup>n</sup>, n pouvant aller jusqu'à 10.

En résumé les processus qui se produisent dans l'analyseur de masse peuvent se décomposer en quatre étapes :

- Stockage des ions.
- Isolement des ions [ SIM, SRM, CRM et MS<sup>n</sup>].
- Collision induisant les dissociations [ SRM, CRM et MS<sup>n</sup>].
- Détection des ions.

- **Mode SRM (Selected Reaction Monitoring)**

Dans la première phase de l'analyse de masse, les ions formés dans la source sont stockés. Les ions parents sont sélectionnés et les autres ions sont éjectés de l'analyseur. Ensuite, les ions parents sont excités en augmentant l'énergie des électrodes de 0 à 5 V (cette énergie de collision est exprimée en %) et entrent en collision avec le gaz présent dans l'analyseur. Les collisions des ions parents produisent des fragments.

Dans la deuxième phase de l'analyse, les ions produits sont stockés. Les ions fragments sont sélectionnés et les autres sont éjectés. Ensuite, les ions fragments sélectionnés sont scanner séquentiellement pour produire le spectre SRM.

Comme la SIM, la SRM permet une analyse rapide de trace dans les mélanges complexes. Cependant, parce qu'on suit une paire d'ion (un ion produit pour chaque ion parent), la spécificité obtenue en SRM peut être beaucoup plus grande que celle obtenue en SIM.

Donc, nous avons très peu de chance d'obtenir un résultat erroné en SRM. Pour obtenir un faux résultat, le composé interférant doit remplir les deux conditions suivantes :

1. Il doit former un ion parent de même poids que l'ion parent sélectionné comme cible.
2. Il doit aussi former les mêmes fragments que le produit sélectionné comme cible.

- **CRM (Consecutive Reaction Monitoring)**

Même principe que le mode SRM, sauf que l'on suit des fragmentations successives. C'est à dire que l'ion fragment devient à son tour l'ion parent et ainsi de suite.

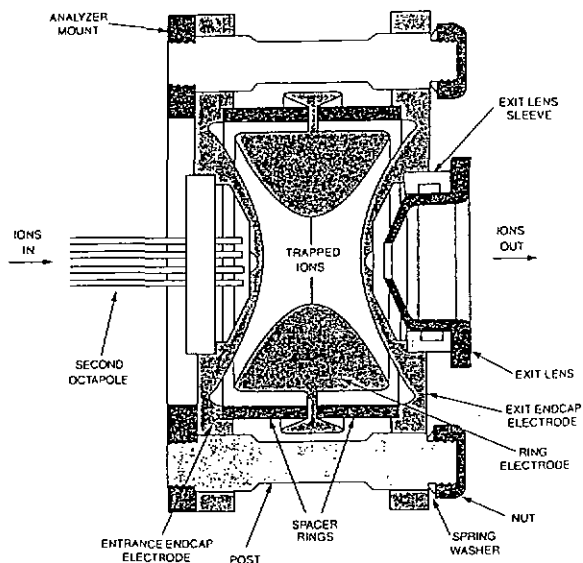


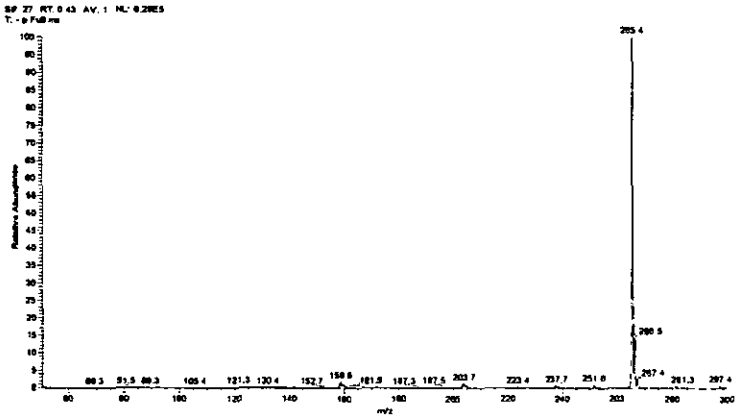
Figure IV.5 : Schéma d'une trappe ionique (Documentation Finnigan)

## IV. 9 Exemples d'utilisation de l'ESI

### IV. 9. 1 MS

- Etude de la fragmentation de la stéréohirsutine, en ESI en mode négatif.

En MS simple nous observons le pic moléculaire moins une unité de masse, soit à 265 uma. Sur la figure IV.6 est représenté le spectre MS en ESI de la stéréohirsutine.

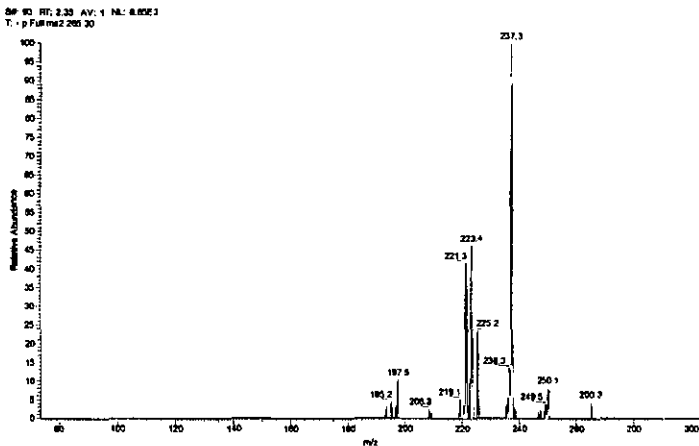


#### IV.9.2 MS<sup>n</sup>

Pour mieux connaître les fragments de la stéréohirsutine, nous allons chercher ces fragments à l'aide de la MS/MS.

- Fils du pic à 265 uma, énergie relative de collision 23 %

L'ion fils majoritaire est l'ion à 237 uma. Les principaux autres fragments fils sont à 250, 225, 223, 221, 197 et 195 uma.



- Fragmentation de l'ion à 237 provenant de l'ion à 265 uma

Energie relative de collision sur l'ion à 265 : 23 %

Energie relative de collision sur l'ion à 237 : 20 %

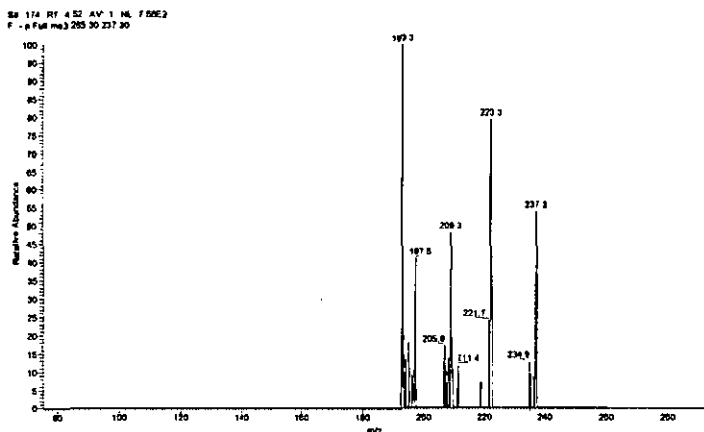


Figure IV.8 : Fils de l'ion à 237 uma

- Fragmentation de l'ion à 250 uma provenant de l'ion à 265 uma

Energie relative de collision sur l'ion à 265 : 23 %

Energie relative de collision sur l'ion à 250 : 20 %

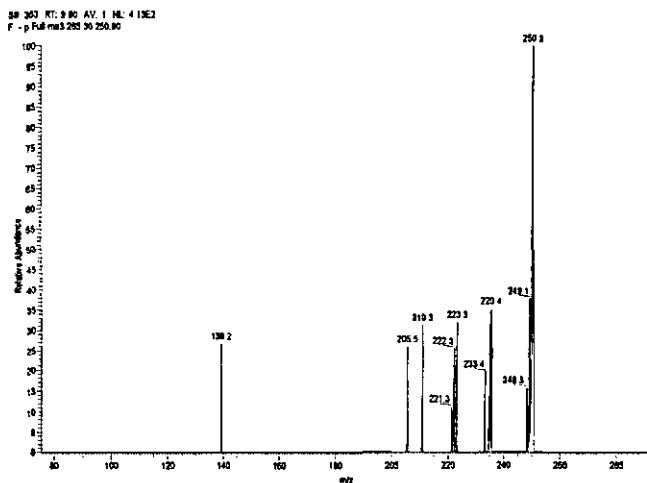


Figure IV.9 : Fils de l'ion à 250 uma

Avec ces renseignements sur la fragmentation de la stéréohirsutine (Schéma IV.6), nous pourrions plus facilement repérer ce composé en LC-MS/MS.

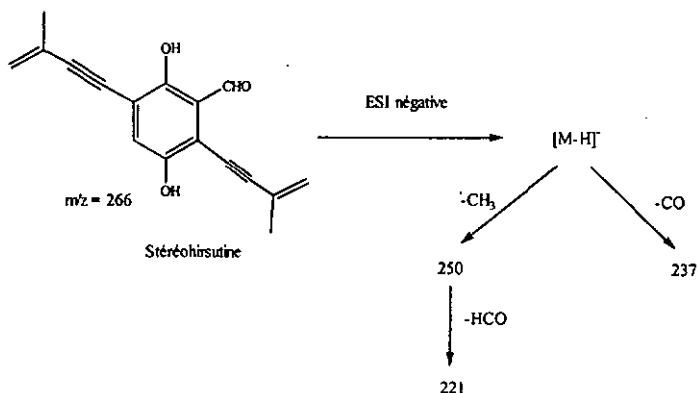


Schéma IV.6 : Fragmentation de la stéréohirsutine en ESI négatif

#### IV.10 Utilisation de la LC-MS/MS pour détecter un produit à l'état de trace

- Essai avec la stéréohirsutine

Nous injectons la stéréohirsutine sur la même colonne que celle utilisée pour isoler les produits. Outre le courant ionique total, nous recherchons également en mode SRM, les fils de l'ion à 265 uma (avec une énergie relative de collision de 22%). Nous pouvons exécuter les deux expériences simultanément. Un scan sur deux est consacré à chaque expérience. En mode SRM nous recherchons les fils de 265 uma à 250, 237 et 221 uma.

Nous utilisons la source ESI en mode négatif, avec un flux de gaz principal de 80 ( $1.2 \text{ L.min}^{-1}$ ) et de gaz auxiliaire de 20 (unité relative,  $6 \text{ L.min}^{-1}$ ). La température du filament est montée à  $260^\circ\text{C}$ .

Les conditions chromatographiques sont les mêmes que celle utilisées tout le long de ce travail. Un gradient croissant de méthanol dans l'eau. Le débit employé est de  $1 \text{ ml.min}^{-1}$ .

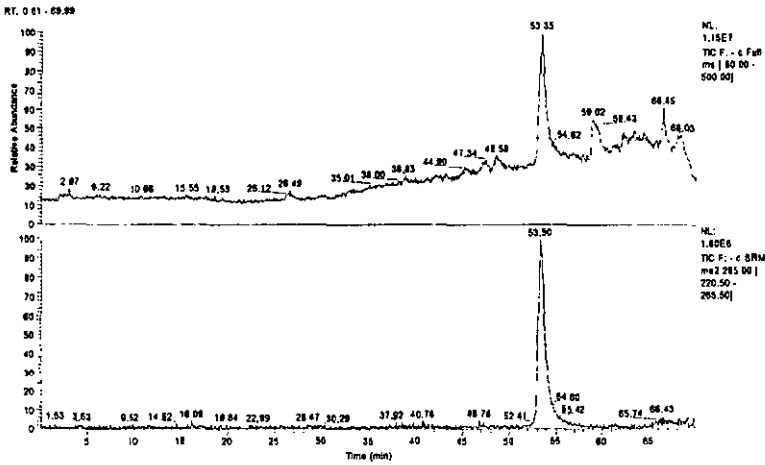


Figure IV.10 : Courant ionique total (en haut), SRM de l'ion à 265 uma (en bas)

Sur le courant ionique total (Figure IV.10) nous observons le pic de la stéréohirsutine au temps de rétention de 53.35 minutes. La SRM, recherche d'ions sélectionnés issus de l'ion 265 uma, nous montre un pic à un temps de rétention (53.30 minutes) similaire à celui de la stéréohirsutine.

Les spectres correspondants à ces deux expériences sont représentés sur les figures IV.11, IV.12. Sur la figure IV.12 correspondant au spectre obtenu en SRM de l'ion 265 uma, nous obtenons trois de ses fils.

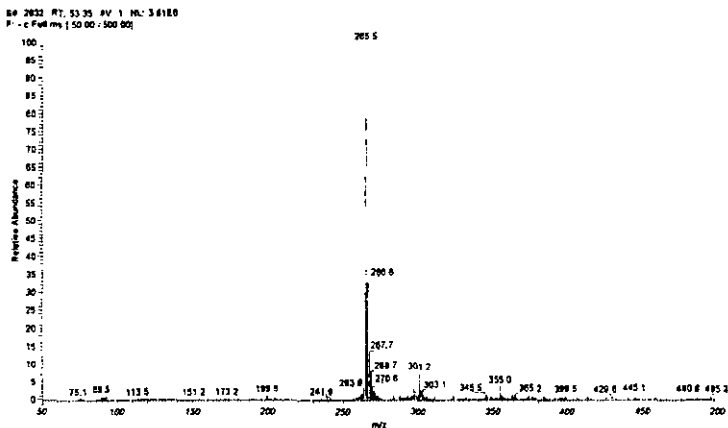


Figure IV.11: Spectre ESI du pic à 53.35 minutes dans le courant ionique total.

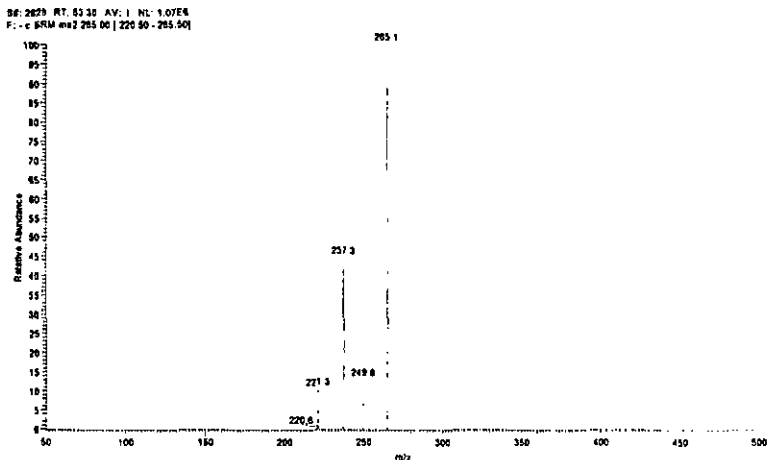


Figure IV.12 : SRM ms2 de l'ion à 265 uma à 53.30 minutes.

Le pic de la stéréohirsutine dans les conditions précédemment décrites est observé au temps de rétention de 53.30 minutes. La SRM de l'ion 265 nous montre la présence des ions fils à 250, 237 (-CO) et 221 uma

Par les mêmes expériences que celles décrites précédemment nous allons rechercher la présence de nos produits à l'état de trace dans le matériel végétal (bois et sève malade). Si nous observons le pic de la stéréohirsutine au environ de 53.30 minutes dans le courant ionique total, et si nous retrouvons des ions fils identiques en SRM à la fragmentation de l'ion 265, nous pourrions en déduire la présence de ce composé dans le matériel végétal.

## CHAPITRE V

---

### ETUDE DU MATERIEL VEGETAL

#### V.1 Etude du bois malade

##### V.1.1 Provenance du bois

Le bois malade provient de différents vignobles charentais. Nous avons reçu des ceps de Vaux-Rouillac, de Boufferand, de Montguyon et de la Fondation Fougerat. Tous sont de cépage Ugni blanc. Sur certains de ces pieds de vigne, *Stereum hirsutum* était présent. Nous avons également étudié des échantillons de bois de vigne provenant de Bouqueyran dans le médoc, cépage : Cabernet-sauvignon.

Les cepts sont réduits en sciure puis extraits à l'éther dans un soxhlet. Les bruts ainsi que les fractions sont chromatographiés en HPLC puis injectés en LC-MS/MS.

Afin de détecter la stéréohirsutine, nous avons injecté en LC-MS/MS les extraits bruts et les fractions. Nous avons étudié les extraits de trois bois et les fractions de Vaux Rouillac ayant des polarités voisines de celle de la stéréohirsutine. Toute cette procédure est résumée sur le schéma V.1.

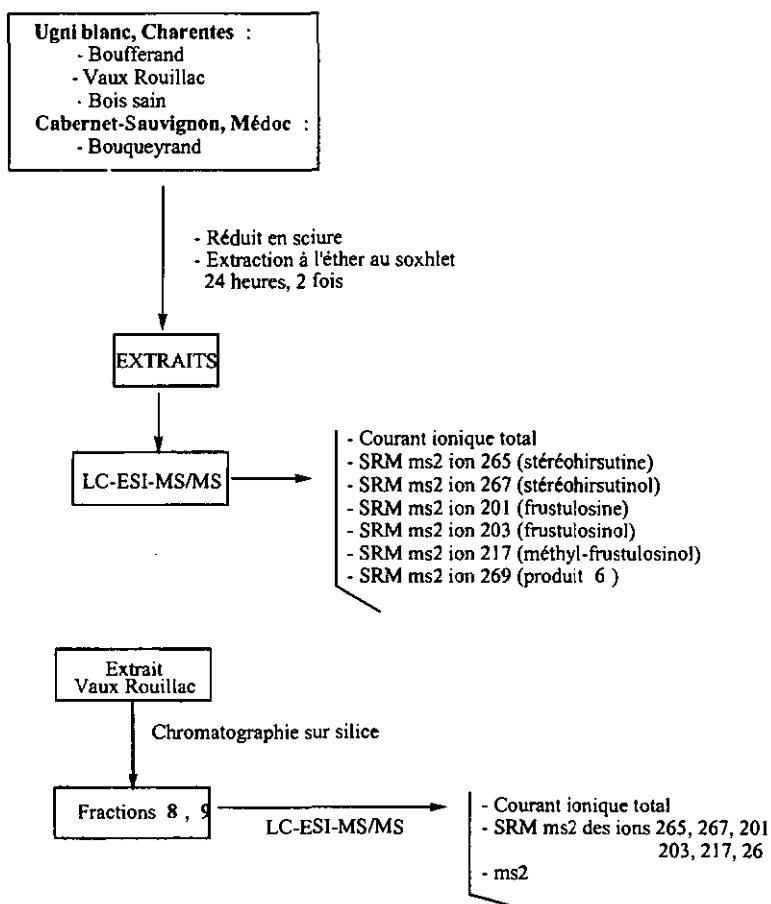


Schéma VI.1 : Procédure d'extraction et d'analyse du bois

V.1.2 Etude en LC-MS/MS des bruts

- Ceps de Boufferand

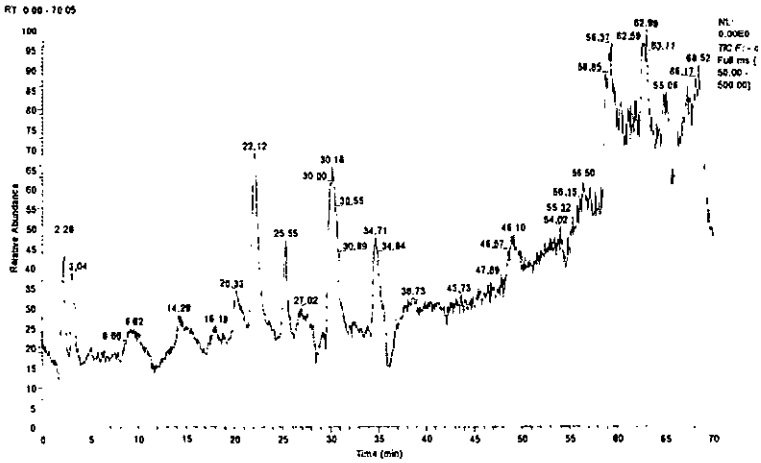


Figure V.1 : Courant ionique total du brut de Boufferand

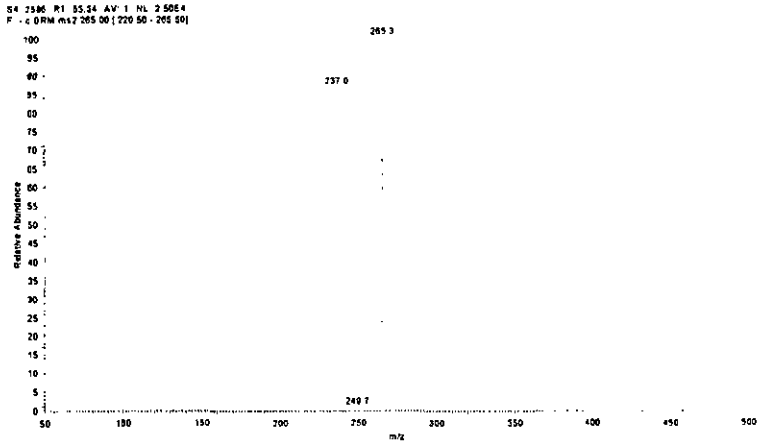


Figure V.2 : SRM ms2 de l'ion à 265 uma à 53.34 minutes

Dans l'extrait brut des ceps de vigne de Boufferand, le pic à 265 uma n'est pas observable dans le courant ionique total. La stéréohirsutine est en trop faible quantité. La fragmentation de l'ion 265 conduit à deux de ses fils à 250 et 237 uma. Dans ce cas le fils à 221 uma n'est pas présent. Les pics ont des temps de rétention similaires à ceux observés dans le cas du produit pur.

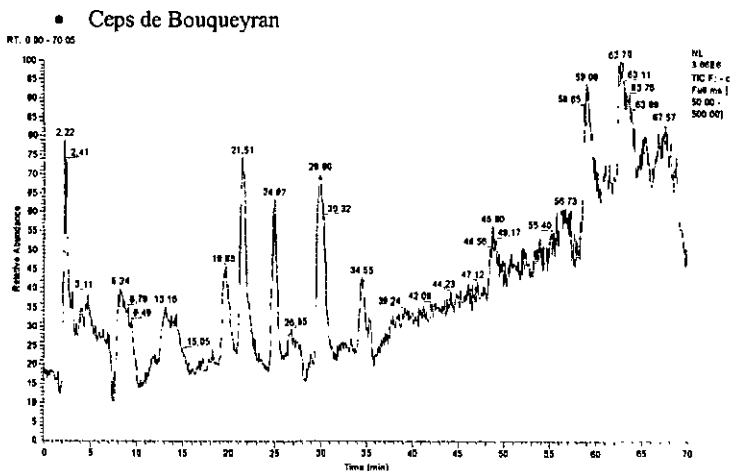


Figure V.3 : Courant ionique total du brut de Bouqueyran

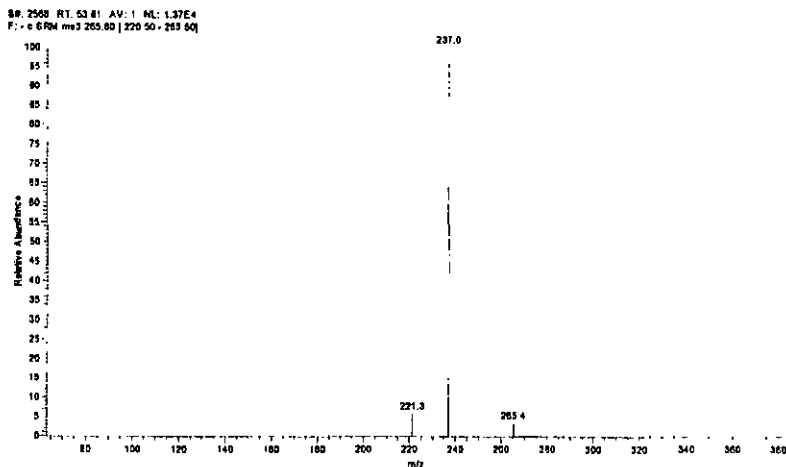


Figure V.4 : SRM ms2 de l'ion à 265 uma à 53.81 minutes

Les fils à 237 et 221 sont présent pour la SRM de la fragmentation de l'ion 265. Ces pics ont un temps de rétention très proche de celui du produit de référence.

• Ceps de Vaux Rouillac

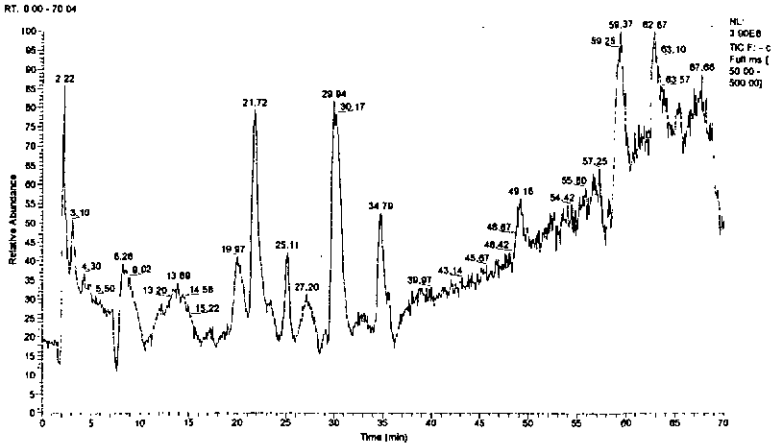


Figure V.5 : Courant ionique total du brut de Vaux Rouillac

SW 2568 RT: 53.73 Av: 1 NL: 1.28E4  
 F1 - c SRM ms2 265.00 [ 220.50 - 296.50]

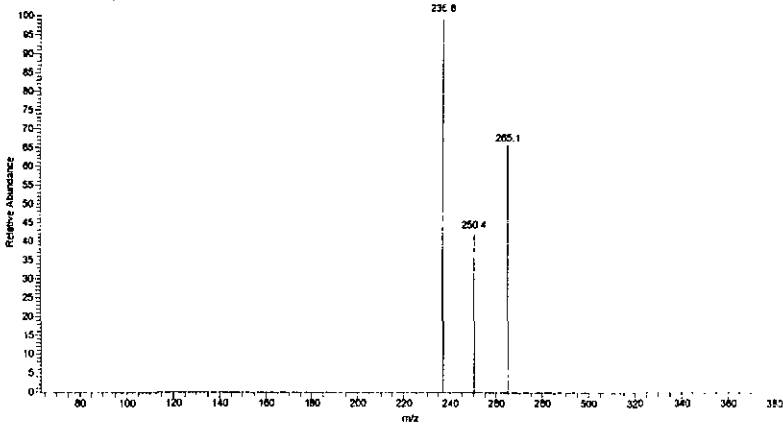


Figure V.6 : SRM ms2 de l'ion à 265 uma à 53.73 minutes

Comme pour les deux bruts de bois malade précédents nous remarquons la présence de certains des fils en SRM ms2 de l'ion 265. Ces pics se retrouvent également à des temps de rétentions similaires à ceux déjà observés. Le bois de la fondation Fougerat à également été étudié. Les résultats sont équivalents à ceux décrits pour les autres extraits bruts. Seuls les ceps de Montguyon n'ont pas été étudiés.

Les bruts des extraits contiennent de nombreux composés. Afin, de réduire la complexité du mélange nous avons fractionné l'extrait brut de Vaux Rouillac. Il sera ainsi plus facile de localiser la présence de ce produit dans le bois malade. La chromatographie a été faite sur colonne de silice avec un gradient croissant d'acétate d'éthyle dans l'hexane. Les fractions ayant une polarité voisine de celle du produit à identifier sont injectées en LC-MS/MS. Deux fractions ont été sélectionnées. Il s'agit des fractions 8 et 9.

### V.1.3 Etude des fractions de l'extrait brut de Vaux Rouillac

- Fraction 8

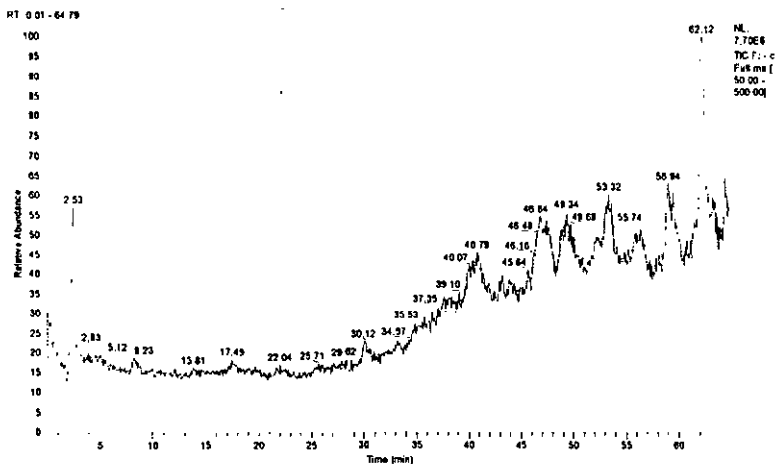


Figure V.7 : Courant ionique total de la fraction 8

SRM 2555 RT: 53.48 AV: 1 NL: 2 61E4  
 F: -c SRM ms2 205 00 | 229.50 - 265.50]

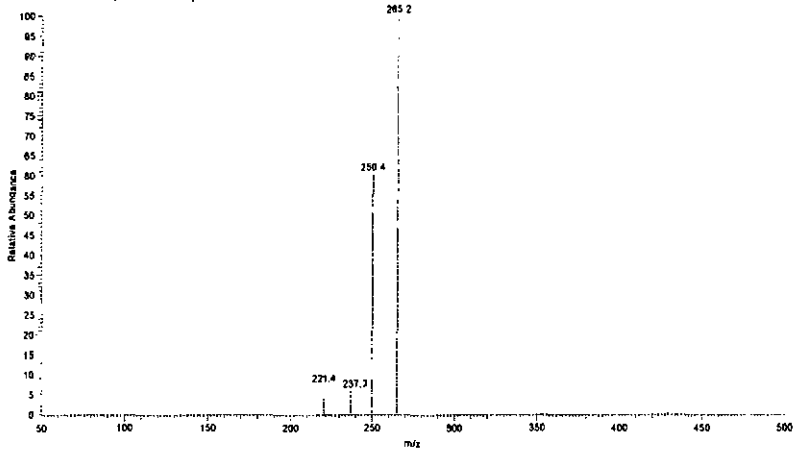


Figure V.8 : SRM ms2 de l'ion à 265 à 53.48 minutes

Comme pour les extraits bruts de bois malade nous remarquons la présence des mêmes pics à des temps de rétentions similaires. Trois des fils (237, 250, 221) de l'ion moléculaire sont présents.

- Fraction 9

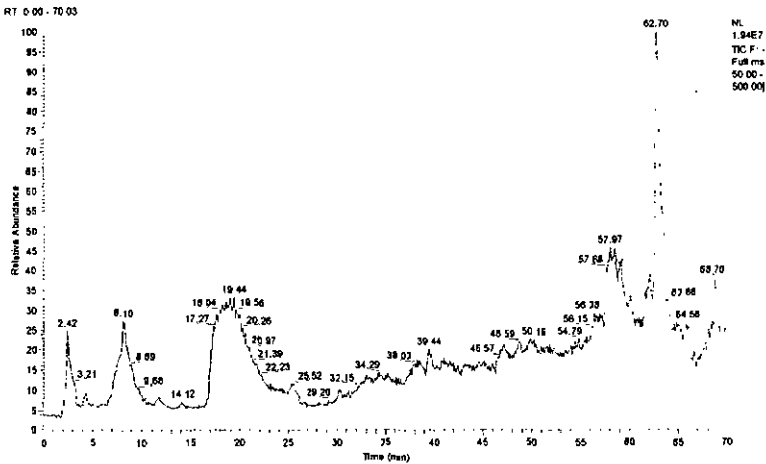


Figure V.9 : Courant ionique total de la fraction 9

SP: 2631 RT: 52.94 AV: 1 NL: 3.41E4  
 F: - c SRM ms2 263 00 [ 220 30 - 295 50]

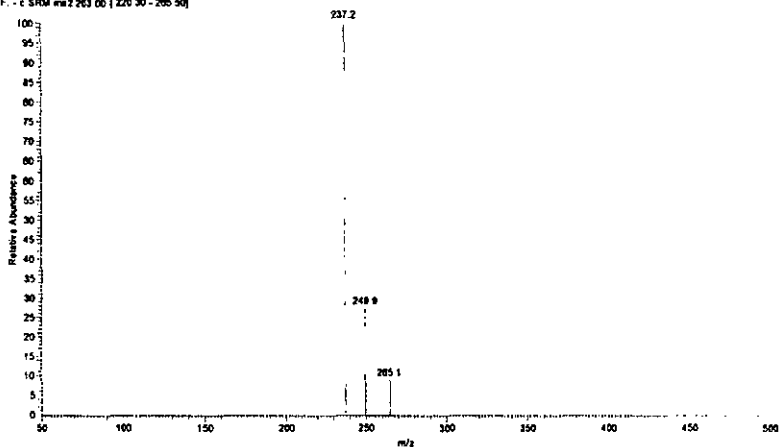


Figure V.10 : SRM ms2 de l'ion à 265 uma à 52.94 minutes

Sur cette fraction une autre expérience a été réalisée. Outre la recherche en SRM de certains fils de l'ion moléculaire, sa fragmentation a également été réalisée en appliquant une énergie relative de collision de 22%. Les spectres de cette expérience sont illustrés sur les figures V.11 et V.12.

SP: 2513 RT: 53.00 AV: 1 NL: 1.58E4  
 F: - c Full ms2 265 00 [ 70 00 - 500 00]

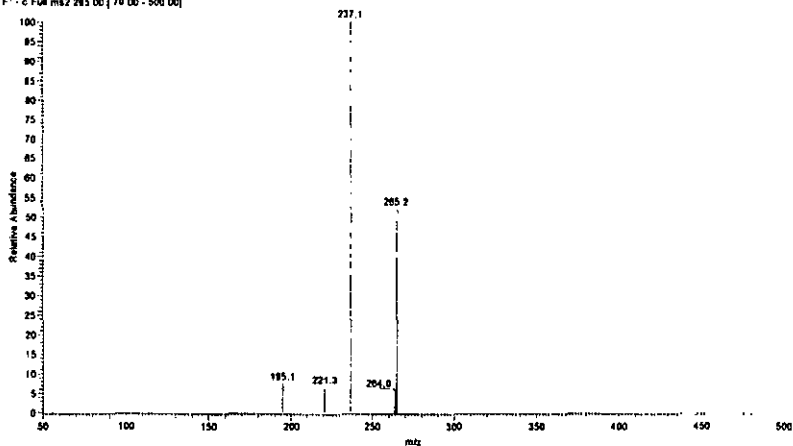


Figure V.11 : ms2 de l'ion 265 à 53.08 minutes

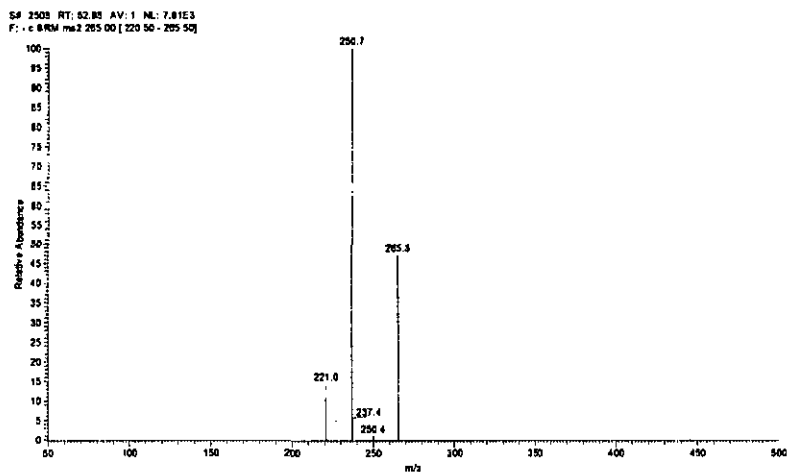


Figure V.12 : SRM ms2 de l'ion 265 à 52.98 minutes

Trois des fils (237, 221 et 195 uma) de l'ion moléculaire apparaissent en MS/MS. Ces fragments sont observés au temps de rétention de 53.08 minutes. De même la SMR ms2 de l'ion moléculaire conduit à trois de ses fils (250, 237 et 221 uma). Ces fils sortent à 52.98 minutes.

De l'étude des différents bois malades d'origine et de cépage différents nous pouvons remarquer :

1. Quelle que soit l'expérience utilisée (SRM ms2 de l'ion moléculaire ou pour une ms2), les pics apparaissent à des temps de rétention similaires à ceux obtenus pour le produit de référence.
2. En SRM ms2 du pic moléculaire nous observons toujours deux ou trois des principaux fils (250, 237 et 221 uma).
3. La présence de trois des fils de l'ion moléculaire est également observée en ms2.

La stéréohirsutine isolé du milieu de culture de *Stereum hirsutum* possède une activité toxique. Cette activité a été démontrée dans le chapitre III. La présence de ce produit dans divers ceps de vigne infectés par la maladie de l'esca vient d'être démontrée par LC-ESI-MS/MS. La stéréohirsutine n'a pas été retrouvé dans le bois sain. Un courant ionique du bois sain est présenté sur la figure V.13. Maintenant, nous allons essayer de déterminer la présence de cette phytotoxine dans la sève malade.

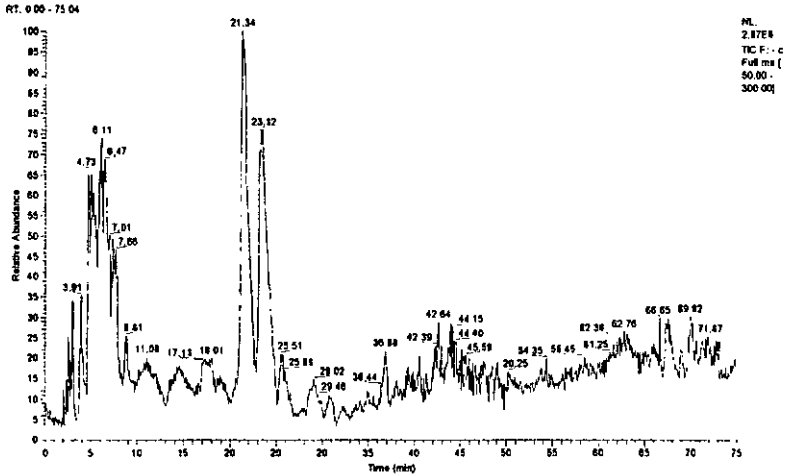


Figure V.13 : Courant ionique total d'un extrait brut de bois sain

## V.2 Etude de la sève malade

### V.2.1 Provenance de la sève

La sève provient de pieds de vigne malade de cépage Ugni blanc. Son origine est charentaise. Les prélèvements ont été effectués aux printemps. *Stereum hirsutum* a été retrouvé sur certains de ces pieds.

### V.2.2 Etude par LC-MS/MS de la sève

La sève est extraite à l'éther. L'extrait brut est chromatographié en HPLC, puis injecté en LC-MS/MS. Les mêmes expériences que celles réalisées sur le bois malade vont être appliquées sur les extraits bruts de sève malade. Deux échantillons de sève ont été étudiés (151 R5 et 161 R4).

Dans ces deux échantillons nous n'observons pas la présence des fragments caractéristiques de la stéréohirsutine au temps de rétention de 53 minutes.

Pour simplifier l'étude du brut nous allons extraire les phénols de la sève. L'échantillon 161 R4 est traité de la façon suivante<sup>[51]</sup>. La sève est extraite à l'éther (2 x 50 cl). La phase étherée est débarrassée des acides forts par une solution de  $\text{KHCO}_3$  1% (2 x 20 cl). Ensuite, elle est extraite par une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1% (2 x 20 cl). La phase aqueuse  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  contenant les phénols est acidifiée à pH 5.3 puis extraite à l'éther (2 x 20 cl).

Cet extrait a été analysé en LC-MS/MS. Dans cet échantillon les fragments caractéristiques de la stéréohirsutine n'ont pas été retrouvés.

L'étude de deux échantillons de sève et d'un extrait phénolique n'a pas permis de mettre en évidence la présence de la stéréohirsutine dans la sève infectée.

### V.3 Recherche par LC-MS/MS des autres produits

#### V.3.1 Dans le bois malade

La frustulosine, le frustulosinol ainsi que les produits 3 et 5 ont été recherchés dans les bruts des bois de Vaux Rouillac et de Boufferand. Pour chaque composé nous avons étudié la fragmentation de l'ion moléculaire ainsi que la recherche de ses fragments par SRM. Aucune des expériences réalisées n'a permis de mettre en évidence la présence des produits recherchés.

Le bois malade ne contient pas ces produits ou alors en quantité trop faible pour être détectés. Des cinq produits recherchés dans le bois malade seul la stéréohirsutine a été identifiée.

## V.3.2 Dans la sève malade

Une recherche similaire à celle effectuée dans le bois malade a été réalisée sur les échantillons de sève S151 R5 et S161 R4 ainsi que sur la fraction phénolique de S161 R4. Les traces des produits 1, 2, 3 et 5 ont été recherchées. La présence de ces produits n'a pas non plus été observée, toutes les expériences réalisées sur la sève sont regroupées sur le schéma V.2.

Ces produits ne sont pas détectables dans la sève soit parce qu'ils sont absents ou présents en quantité insuffisante pour être détectés. Il faut également signaler que la sève a été prélevée au printemps. A cette période les symptômes de l'esca ne sont pas encore apparus, ils surviennent seulement de la fin de juillet à la mi-septembre. Il serait intéressant d'étudier de la sève prélevée à ce moment là.

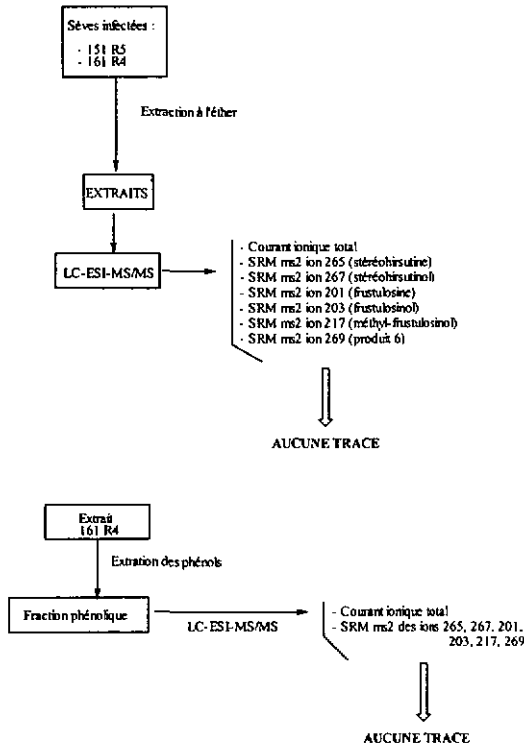


Schéma V.2 : Procédure d'extraction et d'analyse de la sève.

## CHAPITRE VI

---

### DISCUSSION

#### VI.1 Métabolites du champignon

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

Une autre voie, à partir du triose est la conversion en pyruvate, puis en acétyl-coenzyme-A qui est l'intermédiaire le plus important dans le métabolisme secondaire du champignon. Une carboxylation de l'acétyl-CoA donne le malonyl-CoA, puis une

condensation d'acétyl-CoA avec plusieurs molécules de malonyl-CoA conduit soit aux polyketides, les plus nombreux métabolites secondaires des champignons, soit aux acides gras qui à leur tour conduisent aussi à d'autres métabolites. Alternativement, une condensation de trois molécules d'acétyl-CoA donne l'acide mévalonique, intermédiaire clé pour la biosynthèse des terpènes et des stéroïdes.

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

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

- Par oxydation et réduction, surtout dans la chaîne respiratoire
- Par méthylation biologique
- Par halogénéation (quelques métabolites secondaires des champignons contiennent des atomes de chlore).

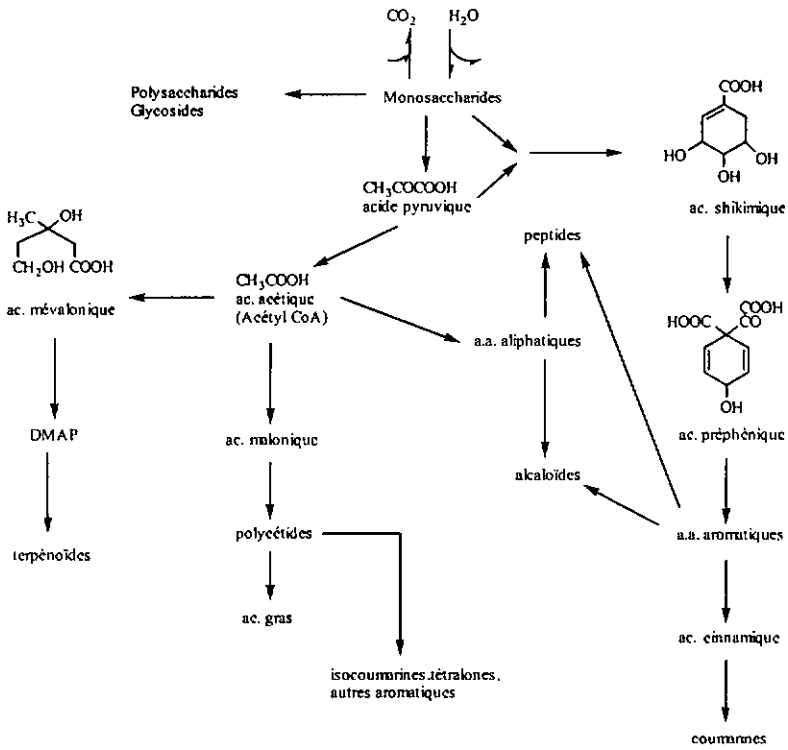
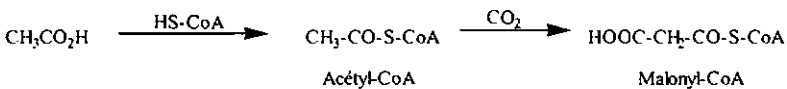


Schéma VI.1 : Principales voies du métabolisme secondaire

## VI.2 Origine biogénétique des produits isolés

### VI.2.1 Produit 7

La molécule d'acide acétique est activée par estérification avec le groupe thiol du coenzyme A ( $\text{HS-CoA}$ ). Le méthyle du thiol-ester formé, l'acétyl-CoA, est très réactif, et peut aisément être carboné par  $\text{CO}_2$  pour donner une molécule encore plus réactive, le malonyl-CoA.



L'acide acétique, sous forme d'acétyl-CoA, peut se condenser avec le malonyl-CoA pour donner l'acétylacétyl-CoA  $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COSR}$ , qui intervient dans la synthèse des acides gras. Par continuation de ce processus, on obtient de longues chaînes linéaires  $\beta$ -polycétoniques. Par des cyclisations de type aldolique, ces dernières peuvent produire une grande variété de produits naturels aromatiques et notamment des phénols. Les substances dérivant de l'acide acétique par ce processus général sont appelées des acétogénines. La formation de l'acide orsellinique et de l'orsellinate de méthyle est résumé ci-dessous.

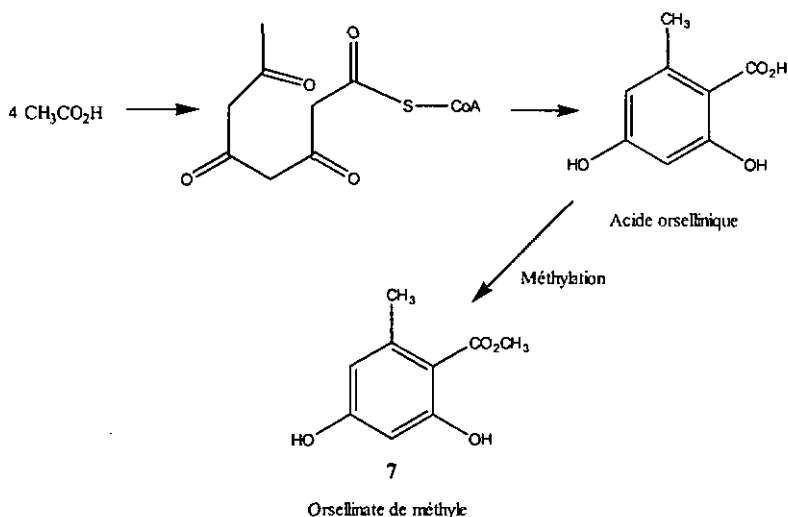


Schéma VI.2 : Formation de l'acide orsellinique et de l'orsellinate de méthyle

### VI.2.2 Produits 1-3

Nair<sup>[41]</sup> envisage la formation du frustulosinol (2) à partir d'une double source :

- La chaîne latérale proviendrait de l'acide mévalonique
- Le reste de la molécule serait issu de la voie de l'acide shikimique

Le frustulosinol et l'alcool gentisyl ne diffèrent que par la chaîne latérale (Schéma VI.3), d'où l'hypothèse de Nair. L'alcool gentisyl peut provenir soit de la voie de l'acide shikimique, soit de l'acétate.

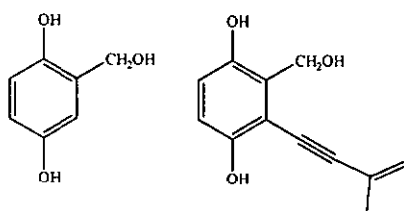


Schéma VI.3 : Structure chimique de l'alcool gentisyl et du frustulosinol

Un autre produit ayant des similitudes avec la frustulosine (**I**) est l'eutypine. L'unité « isoprénique » est connue comme étant l'isopentényl pyrophosphate, formé à partir de l'acétate via le mévalonate. L'acide mévalonique est formé par condensation de trois molécules d'acétyl-coenzyme-A.

Pascal de Angelis<sup>[34]</sup> a étudié l'insertion de la chaîne méthyl-vinyl-acétylénique provenant de l'acide mévalonique sur le para-hydroxybenzaldéhyde. Pour cela il a marqué au carbone 14 le carbone en position 2 de l'acide mévalonique. Celui-ci est activé enzymatiquement par phosphorylation. Une élimination avec décarboxylation donne le pyrophosphate d'isopentèn-3-yle **I** qui s'isomérisé en pyrophosphate d'isopentèn-2-yle **II**. Ce mécanisme est illustré sur le schéma VI.4. Compte tenu de l'équilibre entre les isomères **I** et **II**, le produit **II** peut redonner l'isomère **III** où la double liaison prend place à une position telle que le carbone marqué se retrouve sur le carbone porteur du groupe méthyle.

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

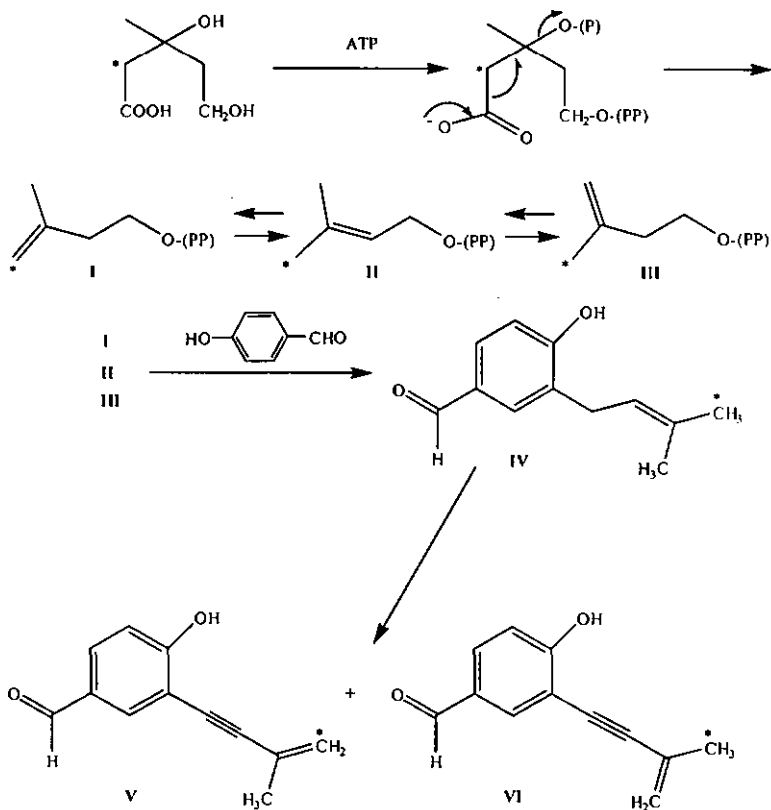


Schéma VI.4 : Voie biogénétique de l'eutypine

Des hypothèses de Nair sur les origines du frustulosinol et des résultats de Pascal de Angelis sur l'eutypine par marquage au carbone-14, nous pouvons effectivement admettre que la frustulosinol provient de la fixation de l'unité « isoprényle » via l'acide mévalonique sur l'alcool gentisyl issu de la voie de l'acide shikimique.

### VI.2.3 Produits 4-6

Des résultats énoncés ci-dessus nous pouvons émettre l'hypothèse sur l'origine biogénétique des produits 4-6 en supposant la fixation d'une deuxième unité isoprénique sur la frustulosine (1).

Comme dans le cas de l'eutypine, les isomères I, II et III réagissent sur la frustulosine pour donner 6. Après nouvelle isomérisation nous obtenons 4 (Schéma VI.5). La stéréohirsutine est ensuite réduite pour donner l'alcool 5.

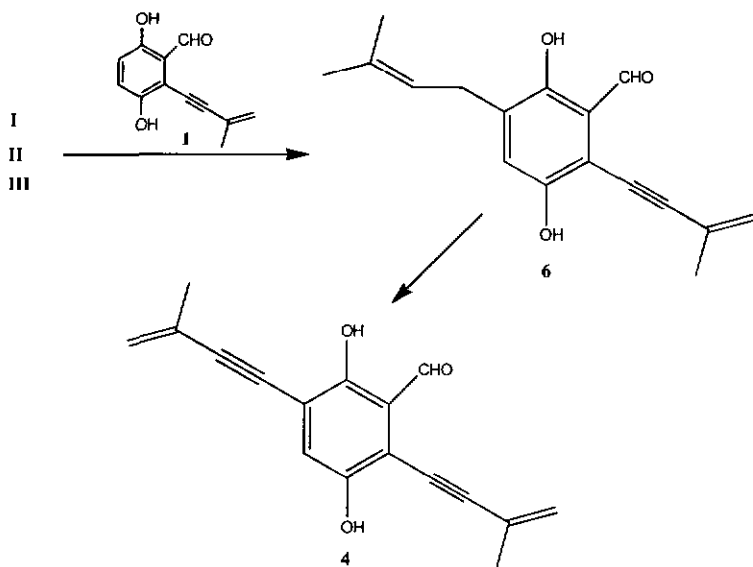


Schéma 5 : Voie biogénétique des produits 4 et 6

### VI.2.4 Cinétique

Pour essayer de confirmer les hypothèses sur le processus de formation des produits, deux cinétiques ont été effectuées. Pour les cinétiques nous avons utilisé la même méthode que celle utilisée pour la culture du champignon. Une culture de *Stereum hirsutum* a été réalisée préalablement dans un erlenmeyer. Chaque erlenmeyer contenant un volume de 250 ml de milieu de culture, est inoculé par 2 ml d'une culture âgée de 6 jours. Tous les deux jours et pendant 40 jours un erlenmeyer est filtré et extrait deux fois à l'acétate d'éthyle (200 ml). Malgré les précautions apportées à la réalisation de ces cinétiques, la croissance dans les erlenmeyers n'est pas similaire. Par conséquent, nous ne pouvons déduire de ces deux cinétiques que des résultats qualitatifs et ne dégager qu'une tendance générale.

L'ordre de production des produits ne contredit pas les hypothèses sur la biosynthèse. Dans un premier temps nous observons la formation de la frustulosine, du frustulosinol (en plus faible quantité) et d'un peu de 6. Entre 16 et 26 jours la stéréohirsutine est le produit majoritaire par rapport à tous les composés isolés. Avec l'apparition de la stéréohirsutine nous observons la présence de l'alcool 5 en plus faible quantité. Quatre semaines de culture semblent une période optimale pour la culture de *Stereum hirsutum*. En effet, après cette période la production de tous les produits diminue.

### VI.3 toxicité

Faute de quantité de produits suffisante et de tests fiables tous les produits isolés n'ont pu être testés efficacement. La stéréohirsutine a été comparée à l'eutypine. Ce test montre que l'eutypine et la stéréohirsutine sont tous les deux toxiques sur plants de tomate, mais possèdent deux modes d'actions différents. En effet, l'eutypine provoque un flétrissement de la plante entraînant sa mort, tandis que la stéréohirsutine provoque une nécrose de la tige entraînant le flétrissement du plant, puis la mort de la plante. L'eutypine est transportée dans les feuilles par la sève, par contre la stéréohirsutine semble détruire les cellules de la tige provoquant sa nécrose. Il est probable que le flétrissement des cotylédons et la mort du plant proviennent de la destruction des cellules de la tige. La stéréohirsutine semble plus toxique que

l'eutypine car elle provoque une nécrose de la tige des plants de tomate, ainsi que certains autres de nos produits isolés, contrairement à l'eutypine.

Un autre test réalisé sur des cals de vigne, nous donne plus de précisions sur l'activité de la stéréohirsutine. En effet, l'influence de la stéréohirsutine et de l'eutypine sur des cals de vigne a été comparée. Ces deux toxines ont un effet inhibiteur sur la croissance des cals à peu près identique. Quoique d'autres tests en cours semblent montrer que l'activité de la stéréohirsutine est plus grande que celle de l'eutypine.

#### VI.4 Matériel végétal

L'étude du bois malade a permis de retrouver la stéréohirsutine dans des cepes de cépages et d'origines différents. Seul ce produit a été identifié dans le bois. La recherche des composés isolés de *Stereum hirsutum* dans la sève n'a pas permis de prouver leur présence. Le fait de ne pas retrouver les métabolites dans le matériel végétal ne signifie pas forcément qu'ils sont absents. Il est possible que les produits soient présents en trop faible quantité. Une autre raison de l'absence de nos produits dans la sève infectée est la période de prélèvement de celle-ci. En effet, la sève a été prélevée au printemps. En cette saison les symptômes de l'esca ne sont pas encore apparus, ils se manifestent seulement entre la fin juillet et la mi-septembre. Il serait intéressant d'étudier de la sève prélevée à cette période.

La stéréohirsutine a été identifiée dans le bois malade mais pas dans la sève infectée. Ce métabolite n'a probablement pas besoin d'être transporté par la sève pour provoquer le flétrissement des feuilles et la mort du plant, d'où son absence dans la sève. Ce produit détruit rapidement les cellules de la tige dans un plant de tomate. Il agit peut être de la même façon dans le bois du cep, d'où sa présence dans le bois malade. Il faut aussi remarquer que dans le processus de l'esca, *Stereum hirsutum* ne semble pas intervenir en premier. Les champignons précurseurs sont *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium chlamydosporum* ainsi qu'*Eutypa lata*. Après l'intervention de ces champignons *Stereum hirsutum* et *Phellinus* sp. peuvent s'installer dans le cep. Ces deux champignons s'attaquent principalement au bois.

Il a été démontré que l'eutypine se retrouve dans le bois malade ainsi que dans la sève infectée. Elle a également été identifiée dans les feuilles et les inflorescences de la vigne. L'eutypine est assimilée par les cellules par un mécanisme de diffusion passive et non pas transportée par l'intermédiaire de protéines<sup>[61]</sup>. L'eutypine peut exercer son action toxique par au moins deux mécanismes différents.

Premièrement, le fait qu'à basse concentration l'eutypine stimule la consommation d'oxygène par la cellule suggère que l'eutypine par altération de la perméabilité de la membrane aux protons, provoque le découplage entre le transfert d'électron et la phosphorylation oxydative dans la membrane interne de la mitochondrie. De ce procédé de découplage résulte une diminution de l'énergie dans les cellules. Ceci conduit à un ralentissement du métabolisme de la cellule entraînant les symptômes observés sur les feuilles dans la maladie.

Deuxièmement, quand la concentration en eutypine est supérieure à 60  $\mu\text{mol/l}$ , le second mécanisme de toxicité s'établit dans la chaîne de respiration produisant une réduction de la consommation d'oxygène dans les cellules de la vigne.

Nous avons remarqué que l'eutypine provoque le flétrissement d'une plantule de tomate entraînant sa mort. Par contre la stéréohirsutine provoque la nécrose du pied du plant. Ceci nous conduit à penser que les deux toxines agissent différemment sur les cellules de la plante. Il est très difficile d'émettre des hypothèses sur un mode d'action pour ce produit. Les mécanismes du mode d'action de la stéréohirsutine aux niveaux physiologique et cytologique devront être étudiés plus précisément.

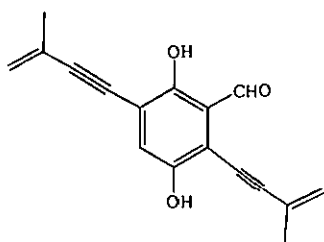
## CHAPITRE VII

---

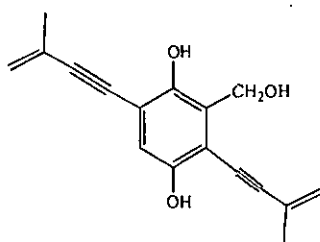
### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'analyse du milieu de culture de *Stereum hirsutum* nous a permis d'isoler et d'identifier 8 métabolites, dont la moitié n'ont jamais été décrits à ce jour. Ces 4 nouveaux composés ont une structure semblables à l'eutypine, une des phytotoxines de l'eutypiose. Les autres métabolites n'ont jamais été isolés de *Stereum hirsutum* (sauf le produit 7). Les produits 1 et 2 ont été identifiés du champignon, *Stereum frustulosum*. Les produits 1, 2 et 7 ont des activités biologiques (voir chapitre II).

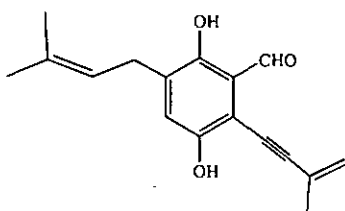
- Nouveaux produits isolés de *Stereum hirsutum*



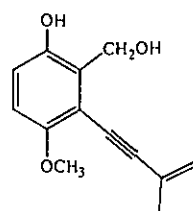
STEREOHIRSUTINE (4)



STEREOHIRSUTINOL (5)

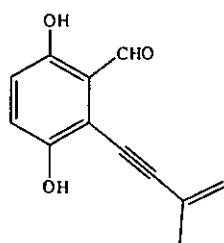


6

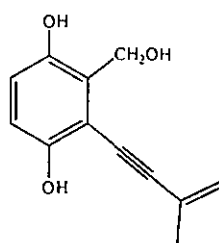


METHYL FRUSTULOSINOL (3)

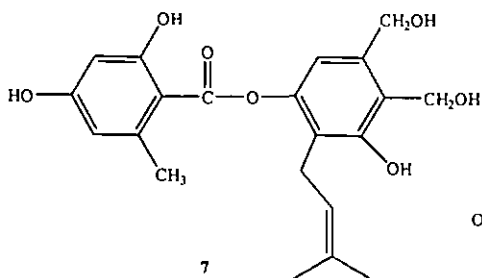
- Autres produits



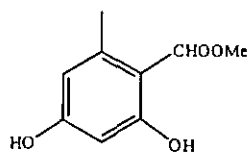
FRUSTULOSINE (1)



FRUSTULOSINOL (2)



7



ORSELLINATE DE METHYLE (8)

L'objectif de ce travail était d'isoler et d'identifier les métabolites pathotoxiques de *Stereum hirsutum*. La majorité des produits isolés montrent une toxicité sur plantules de tomate. En phytopathologie, une toxine est généralement définie comme une substance non enzymatique qui endommage ou tue les cellules de la plante-hôte ou perturbe leur métabolisme.

Une toxine doit satisfaire trois critères :

1. Sa structure chimique doit être établie
2. Elle doit reproduire les mêmes symptômes que la maladie
3. Elle doit se retrouver dans le matériel végétal

Les structures des produits isolés sont clairement établies. *Stereum hirsutum* inoculé sur des bûchettes de bois reproduit les mêmes nécroses que celles observées dans le syndrome de l'esca. Certains de nos produits créent une détérioration cellulaire sur plantules de tomate. D'autre part, la présence d'un des métabolites, la stéréohirsutine, a été montrée dans différents bois malades. Par contre, elle semble absente de la sève. Les autres métabolites isolés n'ont pas été observés dans le matériel végétal (bois ou sève). D'autre part, la stéréohirsutine inhibe la croissance de cals de vigne. Sa toxicité est égale voir supérieure à celle de l'eutypine. Par conséquent la stéréohirsutine est bien une phytotoxine produite par *Stereum hirsutum*.

Dans l'avenir il reste à effectuer d'autres tests plus sélectifs et plus spécifiques pour pouvoir déterminer l'activité toxique de tous les produits et aussi pour confirmer la reproduction des symptômes de la maladie en utilisant des protoplastes de vigne, par exemples.

Il est possible d'élaborer des molécules (pseudotoxines) susceptible d'élaborer des anti-corps au sein d'un lapin. Leurs structures ressemblent à la stéréohirsutine sur lesquelles on fixe un espaceur neutre terminé par une fonction carboxylique pouvant former une liaison peptidique avec la fonction amine d'une protéine.

Les anti-corps ainsi formés, seraient capables de reconnaître la stéréohirsutine. Dès lors il est possible d'envisager des réactions anti-corps / anti-gènes qui pourrait faire office de test sensibles et spécifique pour diagnostiquer la maladie, par immunofluorescence.

Une étude du mode d'action de la stéréohirsutine ainsi que des changements qu'elle provoque dans la cellule serait intéressante. Il serait également souhaitable d'étudier différentes sortes de matériaux végétaux, du cep de vigne aux feuilles en passant par les tiges, les inflorescences et la sève pour évaluer la progression de la stéréohirsutine. Les prélèvements devront être effectués pendant les périodes où se manifestent les symptômes de l'esca.

Il serait également intéressant de confirmer l'origine biogénétique des produits isolés de *Stereum hirsutum*, bien que nos hypothèses soient solides. Pour cela, le marquage de la frustulosine au carbone-14 pourrait être utilisé. Le produit marqué serait introduit dans le milieu de culture en présence du champignon. Une cinétique de la transformation de ce produit pourra être réalisée. Un prélèvement de quelques ml de milieu de culture à intervalle régulier serait effectué. Après filtration et extraction l'extrait serait suivi par GC/MS<sup>(62)</sup> ou par LC/MS.

En partant d'une quantité connue au départ nous pourrions suivre la transformation de la frustulosine. Ainsi, nous pourrions connaître l'ordre de formation de 6 et de l'hirsutine, ou, surtout, confirmer si ces produits proviennent de la frustulosine.

Pour confirmer l'hypothèse de la formation de la stéréohirsutine à partir de 6, nous pourrions recommencer l'expérience précédente en marquant le produit 6.

A part l'arsenite de sodium il n'existe pas de fongicide contre l'esca. Nous avons d'ailleurs vérifié le pouvoir fongique de l'arsenite de sodium sur *Stereum hirsutum*. En effet, à la concentration de 1mg.l<sup>-1</sup> la croissance d'un inoculat de *Stereum hirsutum* dans 200 ml de milieu de culture est totalement inhibée. Par contre la croissance semble normale pour une concentration de 0.1 mg.l<sup>-1</sup>. Il serait intéressant d'établir la concentration minimale d'inhibition de la croissance. L'inoculat utilisé pour le test à la concentration de 1mg.l<sup>-1</sup> a été récupéré et remis en culture dans une boîte de Pétri. La croissance du champignon n'a pas repris. L'arsenite est aussi un fongicide contre *Stereum hirsutum*.

Plutôt que d'utiliser un moyen de lutte dangereux après l'installation de la maladie dans le cep, il serait intéressant d'intervenir avant. En particulier en sélectionnant des plants résistant à l'esca. Des tests sont actuellement en cours sur la réduction par une enzyme de la stéréohirsutine en son alcool, le stéréohirsutinol. S'il s'avère que cet enzyme réduit la stéréohirsutine et que le stéréohirsutinol est peu ou faiblement toxique, la sélection génétique de cépages pour l'obtention de plants résistants au *Stereum hirsutum* serait un moyen de lutte efficace contre ce champignon.

## **CHAPITRE VIII**

---

### **PARTIE EXPERIMENTALE**

#### **VIII.1 Techniques chromatographiques**

##### **VIII.1.1 CCM**

Les chromatographies sur couches mince ont été effectuées sur des plaques de silicagel 60 F254 (E. Merck, Darmstadt) de 0.1 mm d'épaisseur sur feuilles d'aluminium.

### VIII.1.2 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 0.015-0.40 mm (E. Merck, Darmstadt). Le remplissage se fait par voie sèche. On remplit la colonne de silice, puis on dépose le produit et ensuite on élue avec le solvant : principalement un mélange croissant d'acétate d'éthyle dans l'hexane.

### VIII.1.3 HPLC

Les extraits bruts, les fractions ainsi que la purification des produits ont été effectués par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur un appareil Hewlett-Packard 1050, couplé à un détecteur à barrette de diodes (DAD) Hewlett-Packard 1040A. La colonne analytique utilisée est une colonne (Bischoff) en phase inverse RP-C18, diamètre des particules 7  $\mu\text{m}$ , longueur de la colonne 25 cm, diamètre intérieure 4 mm. Les solvants employés sont du méthanol qualité HPLC et de l'eau bidistillée. Les solvants sont filtrés sur membranes millipore (0.45  $\mu\text{m}$  x 47 mm) puis dégazés à l'hélium en continu.

### VIII.1.4 GC

Le chromatographe utilisé est un DANI 3900 équipé d'un détecteur FID et d'une colonne capillaire en verre revêtue d'un film de polymère de type OV-1 (diméthyle-polysiloxane, support apolaire). La colonne mesure 30 m, son diamètre intérieur 0.32 mm et l'épaisseur du film 0.3  $\mu\text{m}$ , split 1/30, température de l'injecteur 180 °C, température du détecteur 220 °C.

## VIII.2 Méthodes spectroscopiques

### VIII.2.1 $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ -RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été mesurés à 400 MHz sur un appareil Bruker AMX-400. Les principaux solvants deutérés utilisés sont le chloroforme, l'acétone et le méthanol.

### VIII.2.2 MS

Les spectres de masse sont mesurés sur un appareil Delsi-Nermag R30-10 à triple quadripôle. La tension d'accélération des électrons est de 70 eV. Dans le cas des ionisations chimiques (DCI), l'échantillon est déposé sur un filament en tungstène que l'on porte en quelques secondes à des températures supérieures à 600°C. Dans notre cas, le gaz utilisé pour l'ionisation est toujours l'ammoniac.

### VIII.2.3 GC-MS

Le spectromètre de masse est couplé avec un chromatographe en phase gazeuse Dani 6500 équipé d'une colonne capillaire de type OV-1 de 25 m de long et 0.32 de diamètre. Le débit d'hélium est de 1 ml/min.

### VIII.2.4 LC/MS

L'appareil utilisé est un LCQ Finnigan couplé à une pompe Rhéos 4000 ou un appareil HPLC Hewlett-Packard 1100. Le LCQ est équipé d'une source APCI et d'une source ESI. Dans nos recherches, la principale source utilisée est la source ESI à pression atmosphérique.

### VIII.3 Méthodes d'extraction

#### VIII.3.1 Extraction des milieux cultures

Après quatre semaines de culture les milieux de culture sont filtrés sur célite. Le filtrat est extrait deux fois à l'acétate d'éthyle. Les filtrations et les extractions sont effectuées sous flux laminaire. Le mycélium récupéré par filtration est détruit par autoclavage.

#### VIII.3.2 Extraction du bois

Le bois est préalablement réduit en sciure. 100 grammes de bois réduit sont introduits dans une cartouche et extrait avec de l'éther dans un soxhlet pendant 24 heures. Chaque bois est extrait deux fois successivement.

#### VIII.3.3 Extraction de la sève

La sève est extraite à l'éther (2 x 50 cl). La phase étherée est débarrassée des acides forts par une solution de  $\text{KHCO}_3$  1% (2 x 20 cl). Ensuite, elle est extraite par une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1% (2 x 20 cl). La phase aqueuse  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  contenant les phénols est acidifiée à pH 5.3 puis extraite à l'éther (2 x 20 cl).

## CHAPITRE IX

---

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. Muller, W. Loeffler, *Mycology*, 4<sup>th</sup> Ed., Thieme verlag, Suttgart, (1982)
- [2] R.J. Cole, R.H. Cox, *Handbook of Toxin Fungal Metabolites*, Academic Press, (1981)
- [3] J.M. Gardner, Y. Konv, J.H. Tatum, Y. Suzuki, S. Takeuchi, *Phytochemistry*, **24**, 2861-2867 (1994)
- [4] G. Gremaud, R. Tabacchi, *Natural Product Letters*, **5**, 95-103 (1994)
- [5] Nicolas Burki, thèse de doctorat, Neuchâtel (1996)

- [6] M. Devys, J.F. Bousquet, A. Kollmann, M. Barbier, *Phytochemistry*, **30**, 2221-2222 (1980)
- [7] H. Nakajima, T. Hamasaki, M.A. Kohno, Y. Kimura, *Phytochemistry*, **30**, 8, 2563-2565 (1991)
- [8] S.C. Munday-Finch, C.O. Miles, A.L. Wilkins, A.D. Hawkes, *J. Agric. Food. Chem.*, **43**, 1283-1288 (1995)
- [9] A. Evidente, R. Lanzetta, M.A. Abouzeid, M.M. Corsaro, L. Mugnai, G. Surico, *Tetrahedron*, **50**, 34, 10371-10378 (1994)
- [10] A. Evidente, R. Lanzetta, R. Capasso, M. Vurro, A. Bottllico, *Phytochemistry*, **34**, 4, 999-1003 (1993)
- [11] A. Ballio, M. Burfani, C.G. Casinori, S. Cerrini, N. Fedeli, R. Pellicciari, B. Santurbano, A. Vaciago, *Experientia*, **24**, 6, 631-635 (1968)
- [12] A. Evidente, R. Lanzetta, R. Capasso, M. Vurro, A. Bottllico, A. Andolfi, M. Chiara Zonno, *Phytochemistry*, **40**, 6, 1637-1641 (1995)
- [13] S. Ho Park, A. Stieck, G.A. Strobel, *Phytochemistry*, **35**, 1, 101-106 (1994)
- [14] P. Galet, Précis de pathologie viticole, Imprimerie Dehan, Montpellier (1991)
- [15] Arnaud G. et Arnaud M., Traité de pathologie végétale, Le chevalier (Ed.), Vol.I, 428-444 (1931)
- [16] Galet P., Les maladies et les parasites de la vigne., *Imp. Paysan du midi*, Vol. I, 409-430 (1977)
- [17] E. Vinet, *Revue Viticulture*, **32**, 676-681 (1909)

- [18] M. Gard, *Bull. Soc. Pathol. France*, 9, 22-28 (1922)
- [19] Rives, Travail de thèse, Toulouse (1926)
- [20] L. Viala, *Rev. Viticult.*, 69, 229-235 (1928)
- [22] R. Geoffrion, *Phytoma.*, 293, 3-5 (1977)
- [23] R. Geoffrion, *Phytoma.*, 335, 25-26 (1982)
- [24] B. Dubos, Compte rendu sur les maladies de dépérissement de la vigne, INRA, Bordeaux, 135-140 (1986)
- [25] P. Larignon, *Viticulture*, 151, 56-57
- [12] P. Larignon, travail de thèse, Bordeaux (1990)
- [26] P. Larignon, *Europ., J. Plant. Pathol.*, 103, 147-157 (1997)
- [27] N. G. Heatley, M.A. Jenning, H. W. Florey, *Brit. J. Exp. Pathology*, 28, 35-46 (1947)
- [28] F. W. Comer, F. Mc Capra, I. H. Qureshi and A. I. Scott, *Tetrahedron*, 23, 4761-4768 (1967)
- [29] S. Kurasawa, T. Takeuchi and H. Umezawa, *Agr. Biol. Chem.*, 39, (10), 2003-2008, (1975)
- [30] S. Kurasawa, H. Naganawa, T. Takeuchi and H. Umezawa, *Agr. Biol. Chem.*, 39, (10), 2009-2014, (1975)
- [31] H. Nakamura, Y. Iitaka, S. Kurasawa, T. Takeuchi and H. Umezawa, *Agr. Biol. Chem.*, 40, (9), 1781-1784 (1976)

- [32] J. Favre-Bonvin, N. Arpin, *Can. J. Chem.*, **54**, 1105 (1976)
- [33] J.-M. Renaud, travail de thèse, Neuchâtel (1985)
- [34] Pascal De Angelis, travail de thèse, Neuchâtel (1990)
- [35] E. Defrancq, T. Zesiger, R. Tabacchi, *Helv. Chim. Acta*, **76**, 425-430 (1993)
- [36] J.-M. Renaud, G. Tsoupras, H. Stoeckli-Evans and R. Tabacchi, *Helv. Chim. Acta*, **72**, 1262-1266 (1989)
- [37] J.-M. Renaud, G. Tsoupras and R. Tabacchi, *Helv. Chim. Acta*, **72**, 929-932 (1989)
- [38] P. Tey-Ruth, I. Philippe, J.-M. Renaud, G. Tsoupras, P. De Angelis, J. Fallot and R. Tabacchi, *Phytochemistry*, **30** (2), 471-473 (1991)
- [39] E. Defrancq, J. Gordon, A. Brodard and R. Tabacchi, *Helv. Chim. Acta*, **75**, 276-281 (1992)
- [40] M. S. R. Nair, M. Anchel, *Tet. Let.*, **31**, 2641-2642 (1975)
- [41] M. S. R. Nair, M. Anchel, *Phytochem.*, **16**, 390-392 (1977)
- [42] A. F. Orr, *J. C. S. Chem. Comm.*, 40-41 (1979)
- [43] R. C. Ronald, J.-M. Lansinger, T. S. Lillie, C. J. Wheeler, *J. Org. Chem.*, **47**, 2541-2549, (1982)
- [44] Budzikiewicz, Djerassi, Williams, *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, Holden-Day, Inc (1967)

- [45] G. Tsoupras, S.G. Claude, R. Tabacchi, *Advances in Mass Spectrometry*, Vol. 11B, 1506-1507 (1988)
- [46] J. S. Shannon, *Austral. J. Chem.*, **15**, 265-277 (1962)
- [47] A. Fkyerat, G.-M. Dubin, R. Tabacchi, publication à paraître
- [48] K. Likhitwitayawuid, T. Phadungcharoen, C. Mahidol, S. Ruchirawat, *Phytochemistry*, **45**, (6), 1299-1301 (1997)
- [49] A. I. Hamed, I. Springuel, N. A. El-Emary, H. Mitome, Y. Yamada, *Phytochemistry*, **45**, (6), 1257-1261 (1997)
- [50] W. S. G. Maass, *Can. J. Bot. Vol.*, **53**, 1031-1039 (1975)
- [51] I. Philippe, travail de thèse, Toulouse (1991)
- [52] C. Deswarte, J. Eychenne, J.D. de Virville, J.P. Roustand, F. Moreau, J. Fallot, *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, **334**, N° 2, 200-205 (1996)
- [53] E. de Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant, Spectrométrie de masse, Masson (1994)
- [54] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, *Mass Spectrom. Reviews*, **9**, 37 (1990)
- [55] M. G. Ikonomou, A. T. Blades, P. Kebarle, *Anal. Chem.*, **63**, 1989-1998 (1991)
- [56] R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, *Anal. Chem.*, **62**, 882-899 (1990)
- [57] P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.*, **65**, 972 A (1993)

- [58] Finnigan, LCQ Hardware Manual (1997)
- [59] Busch, Glish, Mc Luckey, mass spectrometry, technique and applications of tandem Mass Spectrometry, CVH (1988)
- [60] R. B. Cole, Electrospray ionisation mass spectrometry, John Wiley, Interscience (1989)
- [61] C. Deswarte, H. Canut, A. Klæbe, J.P. Roustand, J. Fallot, *J. Plant Physiol.*, **149**, 336-342 (1996)
- [62] C. Ambid, M. Moisseeff, J. Fallot, *Physiol. Vég.*, **21** (1), 87-92 (1983)