

## LES STÉROLS DE L'ASCOMYCÈTE *LEPTOSPHERIA TYPHAE*

J. ALAIS, A. LABLACHE-COMBIER, L. LACOSTE et B. VANDEWALLE

Université des Sciences et Techniques de Lille, B.P. 36, 59650 Villeneuve D'Ascq, France

(Received 4 March 1974)

**Key Word Index**—*Leptosphaeria typhae*, Ascomycetes, fungi, sterols

**Abstract**—A mixture of  $C_{28}$  and  $C_{29}$  sterols have been isolated from *Leptosphaeria typhae* grown *in vitro* on "oat water" and characterized by GLC and MS. Mono-, di- and tri-unsaturated sterols are present in the extracts of fungi cultivated both in the dark and in the light but the sterol composition is different. The influence of "oat water" on sterol structure has been determined by comparison with the sterols of the same fungus grown on synthetic medium in the dark.

**Résumé**—Un mélange de stérols en  $C_{28}$  et  $C_{29}$  isolé de l'Ascomycète *Leptosphaeria typhae*, cultivé sur eau d'avoine, est caractérisé par CPV et par SM. Des stérols mono, di et tri insaturés sont mis en évidence tant dans l'extrait de champignon cultivé à lumière que dans celui obtenu à l'obscurité. La composition stérolique n'est pas identique dans les deux cas. L'influence de l'eau d'avoine sur la nature des stérols formés a été déterminée par une culture en milieu synthétique.

### INTRODUCTION

LES STÉROLS semblent jouer un rôle essentiel dans la reproduction sexuée des champignons, soit par apport exogène induisant la formation de fructifications sexuées chez les *Phythium*<sup>1</sup> et les *Phytophthora*<sup>2</sup> soit comme précurseurs d'hormones sexuelles, comme l'Antheridiol, hormone de différenciation du spermatocyste d'*Achlya bisexualis*.<sup>3</sup> Par ailleurs la reproduction sexuée des champignons est souvent induite en culture par des conditions d'éclairement qui stimulent les biosynthèses des substances morphogénétiques. Mais les rapports existant au cours de la différenciation sexuée entre la photoinduction et le rôle des stérols sont encore peu connus. Pour aborder ce problème nous avons commencé par isoler et caractériser les stérols du *Leptosphaeria typhae*, ascomycète ascoloculaire de la famille des Pléosporales, au 7ème jour de sa croissance végétative c'est à dire au moment où s'amorce le processus de différenciation sexuée pour les cultures maintenues à la lumière (12 hr par jour). Ces résultats sont comparés à ceux obtenus à partir de cultures maintenues à l'obscurité et par suite stériles.

### RESULTATS ET DISCUSSION

Les stérols présents dans le mycélium sec, provenant de cultures effectuées sur eau d'avoine, à la lumière ou à l'obscurité sont extraits successivement par l'éther de pétrole, par l'éthanol et par l'éther éthylique à l'abri de la lumière et sous atmosphère d'azote.

<sup>1</sup> HASKINS, R. H. et TULLOCH, A. P. (1964) *Can. J. Microbiol.* **10**, 187.

<sup>2</sup> HENDRIX, J. W. (1964) *Science* **144**, 1028.

<sup>3</sup> BARKSALE, A. W. (1969) *Science* **166**, 3907.

L'éther de pétrole extrait préférentiellement des stérols libres accompagnés d'une faible quantité de stérols estérifiés, tandis que les extraits éthanolique et éthylique contiennent principalement des stérols estérifiés. Les stérols libres sont isolés des résidus d'extraction par précipitation directe à la digitonide; les stérols estérifiés sont saponifiés par la potasse méthanolique puis isolés à la digitonide.

Les stérols sont ensuite purifiés par chromatographie sur gel de silice (système de solvants 1).<sup>\*</sup> Les poids et les pourcentages relatifs des stérols libres et estérifiés tant à la lumière qu'à l'obscurité sont donnés dans le Tableau 1.

TABLEAU 1. POIDS ET POURCENTAGES RELATIFS DE STÉROLS CONTENUS DANS LE MYCÉLIUM DE *L. tephale* (EN G/100 G DE MYCÉLIUM)

Sterols	Libres	Esterifiés
Lumière*	16 (52%)	15 (48%)
Obscurité	14 (42%)	19,2 (58%)

\* Éclairement 12 hr de lumière blanche par jour

Le fractionnement des stérols est effectué sur alumine imprégnée de nitrate d'argent (système de solvants 2).<sup>\*</sup> L'identification des stérols est faite par CPV et par SM.<sup>4-5</sup> Les caractéristiques et la nature des stérols isolés sont donnés dans les Tableaux 2 et 3. L'ergostérol a été identifié par comparaison de ses spectres de RMN, UV, masse, son  $R_f$  en CCM, et en CPV avec ceux d'un échantillon authentique. L'identité des caractéristiques en CCM et en SM entre le stérol *c* et un échantillon de dihydro-5,6-ergostérol de synthèse<sup>†</sup> indiquent que le stérol isolé est bien le dihydro-5,6-ergostérol.

L'analyse des SM du diène *c* et de son acétate (Pour le diène *c*, l'intensité importante de l'ion à  $m/e = 271$  ainsi que la présence de l'ion à  $m/e = 314$  sont des caractéristiques des  $\Delta_7$  stérols possédant un groupe méthylène en C-24.<sup>5</sup> Pour l'acétate la présence du pic parent à  $m/e = 440$  est également caractéristique des  $\Delta_7$  stérols) ainsi que le test de Moore et Bauman positif<sup>6</sup> nous conduisent à penser que l'on a le méthylène-24 cholestène-7-ol-3 $\beta$  ou épistérol, stérol déjà trouvé chez les champignons et les levures.<sup>7-8</sup>

La comparaison du SM, du temps de rétention en CPV de l'isomère de l'ergostérol, (isolé à la lumière) avec ceux donnés par J. Goad et T. W. Goodwin<sup>9-11</sup> pour le lichesterol (isolé des cultures du mycobionte de lichen *Xanthoria parietina*) et l'absence d'UV montrant l'absorption caractéristique de diènes conjugués permettent de penser que cet isomère est l'ergosta-5, 8, 22-triene ol-3 $\beta$ .

Par analogie avec ce qui a été observé dans d'autres champignons<sup>12,13</sup> on peut penser

\* Voir partie expérimentale

† Nous remercions le Laboratoire Roussel-Uclaf pour le don de ce produit

<sup>4</sup> KNIGHTS, B. A. (1967). *J. Gas Chromatogr.* **273**.

<sup>5</sup> WILLI, S. G. et DURASSI, C. (1968). *J. Org. Chem.* **33**, 305.

<sup>6</sup> MOORE, F. R. et BAUMAN, C. A. (1952). *J. Biol. Chem.* **195**, 615.

<sup>7</sup> BECKET, R. D., FRYCE, R. F., ANDONG, C. et GUSSONS, G. (1970). *European J. Biochem.* **17**, 344.

<sup>8</sup> LONGLEY, R. P., ROSE, A. H. et KNIGHTS, B. A. (1968). *Biochem. J.* **108**, 49.

<sup>9</sup> LINTON, J. R., GOAD, L. J. et GOODWIN, T. W. (1973). *Phytochemistry* **12**, 1135.

<sup>10</sup> WOJCICHOWSKI, Z. A., GOAD, L. J. et GOODWIN, T. W. (1973). *Phytochemistry* **12**, 1433.

<sup>11</sup> LINTON, J. A., GOAD, L. J. et GOODWIN, T. W. (1973). *Phytochemistry* **12**, 2249.

<sup>12</sup> ESCOFFIER, B. G., LAKE, J. H., MCCLOSKEY, V. A. et LUDWIG, E. (1965). *Biochemistry* **4**, 347.

<sup>13</sup> VANDERWALT, E., POLONSKY, J., LACOSTE-BERNADET, N. et LACOSTE, B. (1970). *Biochimie* **53**, 283.

TABLEAU 2 CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES DES STÉROLS ISOLÉS CHEZ *L. typhae*

	$R_f \times 100^*$	Temps de rétention CPV†	Spectres de masse‡
(a) Méthyl-24 cholesta-5, 7, 22-triene ol-3 $\beta$ (ergosterol)	22	2,28	396 (100), 378 (5), 363 (93), 337 (25), 271 (7), 253 (13), 211 (10)
(b) Isomère ergostérol ergosta-5, 8, 22-triene-ol-3 $\beta$	50	2,05	396 (73), 378 (10), 363 (100), 337 (7), 271 (15), 252 (12), 217 (6), 211 (9)
(c) Méthylène-24 cholestene-7-ol-3 $\beta$ (epistérol) (d) éthyl-24 cholestene-5-ol-3 $\beta$ (trace)	60	2,63	414 (3), 398 (20), 383 (22), 314 (32), 271 (100), 255 (24), 246 (10), 231 (20), 213 (26)
			Acétate 440 (22), 425 (23), 380 (10), 365 (16), 356 (40), 313 (100), 255 (40), 213 (46)
(e) Méthyl-24 cholesta-7, 22-diene-ol-3 $\beta$ dihydro-5-6 ergostérol	75	2,33	398 (57), 383 (20), 355 (11), 300 (22), 273 (58), 271 (100), 255 (50), 246 (30), 231 (25), 213 (18)
(f) Mélange de stérols en C <sub>29</sub> et C <sub>30</sub>	85	pic élargi à 2,7	428 (56), 426 (41), 414 (67), 412 (63), 399 (30), 396 (50), 394 (66), 381 (30), 329 (30), 303 (40), 273 (40), 271 (100), 269 (81), 255 (92), 231 (50), 213 (74)

\* Sur alumine imprégnée de 33% NO<sub>3</sub>Ag. Système de solvants 2† Sur 1% SE 30 à 240°, temps de rétention du 5 $\alpha$  cholestane = 1,00‡ Les intensités relatives des ions *m/e* sont données entre parenthèses

que l'épistérol est un intermédiaire de la biosynthèse des stérols alkylés en C-24 tels l'ergostérol et le lichestérol.

La présence d'un stérol mineur en C-29 ( $M^+ = 414$ ) élué avec l'épistérol, pourrait être attribué aux stérols présents dans l'avoine;<sup>14,15</sup> Pour le contrôler, nous avons vérifié qu'un

TABLEAU 3 NATURE DES STÉROLS ISOLÉS CHEZ *L. typhae* (LES POURCENTAGES SONT DONNÉS ENTRE PARENTHÈSES)

Libres	Lumière* Estérifiés	Libres	Obscurité Estérifiés
Ergostérol (100%)†	Ergostérol† (58%) Lichestérol‡ (20%) Epistérol‡ (21%)  Sterol en C <sub>29</sub> mono-insaturé‡ (1%)	Ergostérol† (86%) Epistérol‡ (9,8%) Stérol en C <sub>29</sub> mono-insaturé‡ (0,2%) Dihydro 5-6 ergosterol† (4%)	Ergosterol† (54%) Episterol‡ (21%) Mélange de stérols en C <sub>29</sub> et C <sub>30</sub> Mono et di insatures§ (25%)

\* Éclairement 12 hr de lumière blanche par jour

† Structure certaine

‡ Structure très probable

§ Il est possible que ce mélange contienne le  $\beta$  sitostérol, le stigmasterol le méthyl-4 stigma-7 ene ol 3 $\beta$ , le méthyl-4 stigma-7, 22 diene ol 3 $\beta$ <sup>14</sup> KNIGHTS, B. A. (1965) *Phytochemistry* **4**, 857<sup>15</sup> KNIGHTS, B. A. (1967) *Phytochemistry* **6**, 407

lyophilisat d'eau d'avoine ne contient pas de stérols décéllables à la réaction de Liebermann-Burchard. Nous avons de plus, effectué une série de cultures sur milieu synthétique,<sup>16</sup> maintenu à l'obscurité, après avoir déterminé que le xylose présent dans ce milieu ne contenait pas de stérols, on constate comme précédemment, parmi les stérols isolés dans ces conditions, la présence d'un stérol en C-29 ( $M^+ = 414$ ) accompagnant en faible quantité (3%) l'épistérol. Ce pic à  $m/e = 414$  a été étudié en SM à haute résolution.

La masse trouvée (414, 38527) est identique à 2 ppm de la masse calculée (414, 386, 147) de l'éthyl-24 cholestène-5 ol 3 $\beta$ . Ce stérol en C-29 monoinsaturé est donc un stérol présent dans le *Leptosphaeria typhae*. Ce doit être vraisemblablement le  $\beta$ -sitostérol bien que les isomères 24-*R* et 24-*S* se trouvent dans les organismes vivants et qu'ils ne peuvent être distingués par SM.

Par contre nous n'avons pas décelé la présence de stérols en C-30 ( $M^+ = 428$  et 426) ni de pic à  $m/e = 412$ . Ces derniers stérols ne sont mis en évidence que lorsque la culture est effectuée sur eau d'avoine; ils proviennent probablement de ce milieu. Nous remarquons d'autre part que le peroxyde d'ergostérol, longtemps considéré comme un composé naturel des champignons<sup>17-19</sup> semble être un artéfact<sup>20</sup> formé à partir de l'ergostérol durant les extractions faites sans précautions particulières. Lorsque les extractions sont faites à l'air du peroxyde d'ergostérol caractérisé par ses SM, RMN, se forme. De plus l'ergostérol traité dans nos strictes conditions d'extractions, ne se dégrade pas.

Cette étude montre que la composition stérolique n'est pas identique suivant que la culture est effectuée à la lumière ou à l'obscurité, ce qui suggère qu'il pourrait exister une relation entre la fructification sexuée et les stérols biosynthétisés par le champignon.

## EXPERIMENTAL

**Procédes généraux.** La CPV est effectuée sur colonne de 1% SE30 sur chromosorb W 100-200 à 240° le débit d'azote étant de 25 ml/min. La purification des stérols est effectuée par chromatographie sur couche mince de silice G en utilisant le solvant Pentane-EtOAc (7/3) (système 1), le fractionnement des stérols est effectué par CCM d'alumine imprégnée de NO<sub>3</sub>Ag. On utilise un mélange de 30 g alumine 10 g NO<sub>3</sub>Ag 5 g plâtre et on développe par le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-pétrole-Me<sub>2</sub>CO (7/3/1) solvant 2), les plaques sont examinées en lumière UV (254 nm) après aspersion d'une solution de dichlorofluoresceine dans EtOH à 0.1%, et les stérols sont elués à Et<sub>2</sub>O.

**Cultures et extraction.** Le champignon *Leptosphaeria typhae*, est cultivé sur eau d'avoine (20 g/l). L'ensemencement est réalisé à partir d'un prélèvement de 2 à 3 perithecies effectuée sur une colonie âgée de 10 jours et issu de même milieu mais gelose. Une première série culturale est placée à 18° et reçoit un éclaircissement de 2000 ergs cm<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> selon un rythme de 12 hr de lumière et 12 hr d'obscurité. La seconde série maintenue à la même température demeure à l'obscurité. Après 7 jours le mycélium est recueilli, centrifugé et stabilisé par lyophilisation. Dans chaque cas le mycélium (100 g) est extrait dans un Soxhlet, à l'obscurité et sous azote par éther de pétrole (4 l/24 hr)-EtOH (4 l/24 hr)-Et<sub>2</sub>O (4 l/24 hr). Nous avons également effectuée une extraction par H<sub>2</sub>O selon la méthode décrite par Ourisson.<sup>7</sup> Nous n'avons pas récupéré de stérols dans ce cas.

L'extrait Et<sub>2</sub>O-EtOH après évaporation est saponifié par KOH méthanolique 2 N dans C<sub>18</sub>H<sub>6</sub> (1/1) durant 3 hr sous atmosphère N<sub>2</sub>. Les stérols libérés sont alors extraits à Et<sub>2</sub>O.

**Isolément et fractionnement des stérols.** Les stérols sont isolés des résidus huileux d'extractions par précipitation à la digitonide et purifiés par chromatographie sur silice G. Ils ont tous le même  $R_f$  que l'ergostérol soit 0.45. À la lumière on recueille 16 mg de stérols libres et 15 mg de stérols précédemment estérifiés soit 0.031% du poids de mycélium sec. À l'obscurité les quantités obtenues sont 14 mg et 19.2 mg soit 0.034% du poids de mycélium. Les stérols sont séparés par chromatographie sur alumine imprégnée NO<sub>3</sub>Ag et chaque fraction isolée est examinée en CPV et SM (voir résultats Tableau 2).

<sup>16</sup> Voir partie expérimentale.

<sup>17</sup> BOUSLANGH, G., J. ST. G. et BLANK, F. (1964) *Nature* **202**, 1218.

<sup>18</sup> TANAHASHI, Y. et TAKAHASHI, T. (1966) *Bull. Chem. Soc. Japan* **39**, 848.

<sup>19</sup> CLARKE, S. M. et MCKENZIE, M. (1967) *Nature* **213**, 504.

<sup>20</sup> VACHIRON, M. F. et MICHEL, G. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1675.

*Préparation du milieu synthétique* \* Pour la culture du champignon  $\text{H}_2\text{O}$  994 ml, xylose 2,5 g, serine 188 mg, glycocholle 134 mg, biotine 10 $\gamma$ , thiamine 200 $\gamma$ ,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  0,2 g— $(\text{PO}_4\text{H}_2)_2\text{Ca}$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$  0,1 g— $\text{SO}_4\text{Mg}$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$  6,25 mg— $\text{SO}_4\text{Mn}$ ,  $5\text{H}_2\text{O}$  2,5 mg— $\text{SO}_4\text{Zn}$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$  2 5 mg— $\text{SO}_4\text{Cu}$ ,  $5\text{H}_2\text{O}$  1,25 mg On ajoute 5 ml d'une soln d'EDTA constituée comme suit  $\text{SO}_4\text{Fe}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  0,1 g, EDTA  $\text{Na}_2$  1,325 g dans 1 l  $\text{H}_2\text{O}$  et 1 ml d'une soln contenant  $\text{H}_3\text{BO}_4$  0,1 g— $\text{Mo}_7\text{O}_{27}\text{Na}$  0,2 g  $\text{Cl}_2\text{Co}$ ,  $6\text{H}_2\text{O}$  0,2 g— $\text{SO}_4\text{Cd}$ ,  $8\text{H}_2\text{O}$  0,2 g— $\text{Cl}_2\text{Ni}$ ,  $6\text{H}_2\text{O}$  0,03 g pour 1 l  $\text{H}_2\text{O}$

*Remerciements*—Nous remercions Monsieur M Barbier de l'Institut des substances naturelles de Gif-Sur-Yvette, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour les discussions fructueuses que nous avons eu avec lui ainsi que Monsieur G Bourgeois, de l'Université de Bordeaux, pour l'enregistrement des SM

\* Milieu mis au point par G Vidal Communication verbale