

## INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA COMPOSITION EN STEROLS DE *LEPTOSPHAERIA TYPHAE*

J. ALAIS,\* A. LABLACHE-COMBIER,\* L. LACOSTE† et G. VIDAL†

Université de Lille I. \* Laboratoire de Chimie Organique Physique; † Laboratoire de Cryptogamie, B.P. 36 59650 Villeneuve d'Ascq, France

(Revised received 7 July 1975)

**Key Word Index**—*Leptosphaeria typhae*; Ascomycete; fungi; sterols; synthetic medium; cholesterol.

**Abstract**—C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> and C<sub>29</sub> sterols have been isolated from a *Leptosphaeria typhae* culture grown *in vitro* in light on a synthetic medium. These products were characterized by GLC and MS. Saturated and mono-, di- and tri-unsaturated sterols are present, both free and esterified. There are significant differences between these sterols and those in the same fungus grown on "oat water". Unexpectedly, cholesterol was detected in the latter case.

### INTRODUCTION

Lors d'un travail précédent [1], nous avions fait développer l'Ascomycète *L. typhae* sur un milieu semi-naturel constitué par de l'eau d'avoine (20 g/l). Il nous était absolument impossible de connaître la composition exacte de cette solution nutritive; en particulier, même si nous n'y avons jamais décelé de stérols, nous ne pouvons pas affirmer qu'elle ne contenait pas de substance susceptible d'influencer le métabolisme du mycélium et par conséquent de modifier sa composition chimique. Nous ne savions pas non plus si elle était dépourvue de précurseur entraînant la synthèse de métabolites secondaires ne jouant aucun rôle dans le développement du champignon. Enfin, la composition du milieu ne pouvait être constante d'un lot à l'autre.

Afin d'éliminer ces causes d'incertitudes, nous avons mis au point un milieu chimiquement défini ne contenant que le minimum de substances indispensables au développement optimum du microorganisme. La composition de cette solution a été publiée par ailleurs [2]. On obtient par son emploi une croissance mycélienne et une reproduction sexuée très comparables à celles que la décoction d'avoine permet d'observer. Quelques différences apparaissent, malgré tout, entre les deux types de cultures. En particulier, le développement sur le milieu synthétique est retardé de 48 heures par rapport à celui obtenu sur eau d'avoine; par contre, le poids de matière sèche en fin de croissance est plus élevé: 250 mg au lieu de 190 mg pour 100 ml de milieu. La morphologie macroscopique est aussi légèrement modifiée: le mycélium a tendance à prendre une couleur légèrement verdâtre autour des périthèces, au lieu de rester jaune très pale; d'autre part, en début de croissance, il tend à former des îlots au lieu de s'étendre en nappe uniforme à la surface du milieu; ces îlots adhèrent fortement au verre de la boîte de Roux et s'en détachent plus difficilement. Au niveau microscopique, on ne note par contre aucune différence entre les deux types de culture. Le déve-

loppelement des fructifications sexuées et la formation des ascospores se déroulent normalement.

### RESULTATS

Les stérols isolés représentent 0,12% du poids de mycélium sec obtenu sur milieu synthétique, soit une quantité 4 fois plus importante que celle recueillie pour les cultures effectuées sur eau d'avoine (0,03%). Les poids et pourcentages relatifs des stérols libres et estérifiés sont donnés dans le tableau 1 en les comparant à ceux déterminés à partir des cultures effectuées sur eau d'avoine.

Les caractéristiques des stérols isolés dans le champignon *L. typhae* sont données dans le Tableau 2; les identifications reposent sur la valeur des *R<sub>f</sub>* en chromatographie en couche mince (CCM), des temps de rétention en chromatographie gaz-liquide (GCL) [3,4] et des spectres de masse des stérols libres [5,6] ou propionylés, par comparaison avec ceux d'échantillons authentiques.

On constate, comme dans le cas des cultures effectuées sur eau d'avoine, la présence dans les stérols libres et estérifiés d'un stérol en C-29 monoinsaturé ( $M^+ = 414$ ). Ce pic à *m/e* = 414 a été étudié en SM à haute résolution; la masse trouvée (414, 386 10) est identique à moins d'1 ppm de la masse calculée (414, 386 14) de l'éthyl-24 cholestène 5 ol 3  $\beta$ . Par contre, à la différence avec ce qu'on obtient sur le milieu naturel, nous trouvons un stérol en C<sub>27</sub> ( $M^+ = 386$ ). Ses constantes physiques en chromatographie sur couche mince et gaz-liquide, les

Tableau 1. Poids et pourcentages relatifs des stérols contenus dans le mycélium de *L. typhae* (en mg pour 100 g de mycélium sec)

Stérols	Libres	Estérifiés
Sur milieu synthétique	103 (91%)	10 (9%)
Sur eau d'avoine	16 (52%)	15 (48%)

Tableau 2. Caractéristiques des stérols chez *L. typhae*

	$R_f \times 100^*$ stérol propionate		Temps de rétention CPV† stérol propionate	Principales fragmentations en S.M.‡
Méthyl 24 cholesté 5,7,22 triène ol 3 $\beta$ (ergostérol)	8		2,14	stérol 396(100) 378(5) 363(93) 337(25) 271(7) 253(15) 211(10)
Méthylène 24 cholestène 7 ol 3 $\beta$ (épistérol)	53	62	2,49	stérol 398(26) 383(22) 314(32) 271(100) 255(24) 246(10) 231(20) 213(26) propionate 454(15) 439(10) 380(5) 370(29) 327(100)
Cholestérol			3,30	propionate 368(100) 260(18) 255(15) 247(20) 213(15)
24 méthyl cholestène 5 ol 3 $\beta$	53	57	4,30	382(100) 274(11) 255(10) 261(10) 213(8)
24 éthyl cholestène 5 ol 3 $\beta$			5,70	396(100) 288(13) 255(10) 275(14) 213(10)
Méthyl 24 chesta 7-22 diène ol 3 $\beta$ (5-6 dihydroergostérol)	62	44	2,18	stérol 383(20) 355(15) 300(22) 273(58) 271(100) 255(50) 246(30) 231(15) 213(18) propionate 454(70) 439(16) 411(7) 380(5) 356(18) 329(20) 327(100) 302(20) 255(90) 213(30)
24 éthyl cholestane ol 3 $\beta$	68	70	5,82	propionate 472(46) 398(77) 257(20) 240(40) 215(100)

\* Sur alumine imprégnée de 33%  $\text{NO}_3\text{Ag}$  stérol: solvant 2 propionate: solvant 3.† Sur 3% SE 30 à 225° temps de rétention du 5 $\alpha$  cholestane = 1,000. ‡ Les intensités relatives des ions  $m/e$  sont données entre parenthèses.

spectres de masse du stérol libre ou propionylé, à basse ou haute résolution ( $M$  calculée: 368, 35485;  $M$  trouvée: 386, 35649), permettent de l'identifier au cholestérol.

Le tableau 3 donne la nature des stérols isolés, avec comparaison avec ceux trouvés précédemment pour les cultures effectuées sur eau d'avoine, afin de montrer la grande différence de composition stérolique lors de la culture du champignon *L. typhae* sur deux milieux: l'un naturel, l'autre synthétique, très différents mais donnant au point de vue biologique des résultats sensiblement identiques.

### DISCUSSION

On notera tout d'abord que les stérols biosynthétisés en présence du milieu synthétique sont 4 fois plus abondants qu'à partir d'un milieu à base d'eau d'avoine. Au niveau de la répartition entre stérols libres et stérols estérifiés, la proportion sur milieu synthétique entre stérols libres (91%) et stérols estérifiés (9%) est très différente de celle obtenue sur eau d'avoine, respectivement 52 et 48%.

Le composé en  $C_{29}$  (sitostérol ou son isomère en 24) découvert dans les cultures sur eau d'avoine est retrouvé en plus grande quantité sur un milieu synthétique et consti-

tue donc un stérol d'origine fongique. Il faut noter de plus, qu'en présence du milieu synthétique il y a production de cholestérol tant libre (1%) qu'estérifié (7%). Ce fait constitue un résultat intéressant car le cholestérol, stérol présent dans les Algues rouges [7] et les plantes supérieures [8], a été trouvé chez *Penicillium funiculosum* [9], Ascomycète imparfait. Cependant McCorkindale et al. [10], dans une étude sur la composition en stérols de diverses espèces de Phycomycètes, ont trouvé une relation empirique entre cette composition et celle des parois cellulaires. Les espèces présentant une paroi cellulosique (Saprolégiales, Leptomitales) synthétisent du cholestérol tandis que les Mucorales qui ont des parois constituées par de la chitine produisent principalement de l'ergostérol, à l'exception de deux espèces où l'on trouve de faibles quantités de cholestérol sous forme libre. Mercer et Bartlett [11], en trouvant des esters de cholestérol dans *Phycomyces blakesleeanus* (autre Mucorale), émettent des doutes sur ces relations entre la nature des parois et celle des stérols trouvés; ces auteurs pensent que le cholestérol est plus largement répandu chez les champignons, ce qui semble être confirmé par les résultats que nous rapportons ici. Il apparaît donc que la biosynthèse du cholestérol soit davantage en rapport avec la nature du milieu de culture qu'avec la constitution

Tableau 3. Nature des stérols isolés chez *L. typhae* (Les pourcentages sont donnés entre parenthèses)

Eau d'avoine (Lumière*) libres estérifiés	Eau d'avoine (Obscurité) libres estérifiés	Milieu synthétique (Lumière*) libres estérifiés		
ergostérol (100%) cholestérol (20%) épistérol (21%) 24 éthyl cholestène 5 ol 3 $\beta$ (1%)	ergostérol (86%) épistérol (9,8%) 24 éthyl cholestène 5 ol 3 $\beta$ (0,2%) Dihydro 5-6 ergo- stérol (4%)	ergostérol (54%) épistérol (12%) mélange de stérols en $C_{29}$ et $C_{30}$ mono- et di insaturés (25%)	ergostérol (62%) épistérol (9%) 5,6 dihydro ergo- stérol (25%) cholestérol (1%) 24 éthyl cholestène 5 ol 3 $\beta$ (1%) 24 éthyl cholestane ol 3 $\beta$ (1,75%) 24 méthyl cholestène 5 ol 3 $\beta$ (0,25%)	ergostérol (12%) épistérol (32%) 5,6 dihydro ergo- stérol (25%) cholestérol (7%) 24 éthyl cholestène 5 ol 3 $\beta$ (6%) 24 éthyl cholestane ol 3 $\beta$ (18%)

\* Eclairage 12 hr de lumière blanche par jour.

chimique de la paroi cellulaire. Pour Gottlieb [12] les stérols seraient impliqués dans la constitution des membranes et joueraient un rôle dans la perméabilité cellulaire; ceci permettrait d'expliquer que l'utilisation de substrats variés entraîne une modification de la structure des membranes et par conséquent des différences dans la composition en stérols du mycélium.

Enfin, nous noterons que la comparaison des stérols produits par *L. typhae* cultivé soit sur milieu synthétique, soit sur milieu naturel, n'a été établie, qu'en un seul moment au cours du développement du champignon, à l'apparition des premiers périthèces, c'est-à-dire au 7ème jour pour les cultures effectuées sur eau d'avoine, et 10ème jour pour les cultures effectuées sur milieu synthétique, toutes conditions égales par ailleurs. Il semble donc qu'il convienne, pour une meilleure connaissance de la biosynthèse des stérols, d'envisager une étude cinétique de l'évolution des stérols au cours du développement.

En fait, la composition stérolique du *Leptosphaeria typhae*, décrite après culture sur milieu synthétique en présence de lumière, présente plus d'analogie avec celle obtenue après culture sur eau d'avoine mais maintenue à l'obscurité. Sur milieu naturel, en présence de lumière, l'ergostérol est le seul stérol libre décelable, alors qu'à l'obscurité il est accompagné de 14% de stérols secondaires. Sur milieu synthétique à la lumière, la proportion d'ergostérol libre n'est plus de 100% mais seulement de 62%, de nombreux stérols secondaires étant décelables et tout particulièrement le cholestérol. Donc, sur le milieu synthétique utilisé en présence de lumière—facteur indispensable à la sexualisation—le champignon fructifie mais présente une biosynthèse stérolique très différente de celle qui intervient en culture sur eau d'avoine, milieu très favorable au développement de l'organisme en expérience.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

*Cultures et extraction.* Le champignon *L. typhae* est cultivé en fiole de Roux de 1 l. contenant 100 ml de milieu synthétique, à 18°, sous un éclairement de 2000 ergs  $\text{cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$ , selon un rythme de 12 hr lumière et 12 hr obscurité. Après 10 jours, c'est-à-dire à l'apparition des premiers périthèces, le mycélium est recueilli, centrifugé et stabilisé par lyophilisation. Il est extrait par l'éther de pétrole, l'éthanol et l'éther éthylique en extracteur de Soxhlet à l'abri de la lumière et sous atmosphère d'azote.

*Isolation et fractionnement des stérols.* Les stérols libres sont précipités à la digitonide. Les stérols estérifiés sont saponifiés par la potasse méthanolique à 10% et précipités. Les stérols sont purifiés sur silice G (solvant 1:  $\text{C}_6\text{H}_6$ —EtOAc, 5:1). Un premier fractionnement est obtenu par CCM  $\text{Al}_2\text{O}_3$ —AgNO<sub>3</sub> (solvant 2 CHCl<sub>3</sub>—pétrole—Me<sub>2</sub>CO, 6:3:1). Après propionylation, chaque famille de stérols est de nouveau séparée par CCM  $\text{Al}_2\text{O}_3$ —AgNO<sub>3</sub> (solvant 3 hexane—C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, 4:1) [13]. La chromatographie gaz—liquide a été réalisée sur colonne de 3% SE 30 sur chromosorb W 100—120 traité HMDS à 225°, le débit d'azote étant de 40 ml/min. Les spectres de masse sont

mesurés sur appareil MS 12 à basse résolution et sur MS 9 (14000) à haute résolution.

*Evaluation des pourcentages relatifs des différents stérols.* La lecture du tableau 2 montre que les stérols sont séparés en 4 zones par chromatographie en couche mince préparative. Les poids des stérols ainsi isolés permettent d'évaluer les proportions relatives entre l'ergostérol ( $R_f$ , 0,08), le mélange d'épistérol et de stérols monoinsaturés ( $R_f$ , 0,53) le 5,6 dehydro ergostérol ( $R_f$ , 0,62) et le 24 éthyl cholestane ( $R_f$ , 0,68). La comparaison des hauteurs des pics de base de l'épistérol et des stérols  $\Delta_5$  dans le spectre de masse du mélange permet d'évaluer les proportions relatives entre les stérols mono et di insaturés. Nous prenons comme hypothèse que ces proportions relatives seraient égales si les intensités de ces pics de base étaient identiques. Ces pourcentages sont confirmés par l'analyse pondérale des propionates de l'épistérol et des stérols  $\Delta_5$  mono insaturés. L'analyse de ce dernier mélange est conduite sur les propionates. La comparaison des hauteurs des pics des ions à  $m/e = M-74$  (perte d'acide propionique) permet d'évaluer la composition du mélange (13), en se basant sur la même hypothèse que précédemment. La chromatographie en phase gazeuse a vérifié cette évaluation.

*Milieu synthétique.* H<sub>2</sub>O 994 ml, xylose 2,5 g, sérine 188 mg, glycocolle 134 mg, biotine 10 y, thiamine 200 y, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 0,2 g (PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Ca, 2H<sub>2</sub>O 0,1 g, SO<sub>4</sub>Mg, 7H<sub>2</sub>O 6,25 mg, SO<sub>4</sub>Mn, 5H<sub>2</sub>O 2,5 mg, SO<sub>4</sub>Zn, 7H<sub>2</sub>O 2,5 mg, SO<sub>4</sub>Cu, 5H<sub>2</sub>O 1,25 mg. On ajoute 5 ml d'une solution d'EDTA constituée comme suit: SO<sub>4</sub>Fe, H<sub>2</sub>O 0,1 g, EDTA Na<sub>2</sub> 1,325 g dans 11. H<sub>2</sub>O, et 1 ml d'une solution contenant: H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0,1 MO<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na 0,2 g, Cl<sub>2</sub>CO, 6H<sub>2</sub>O 0,2 g, SO<sub>4</sub>Cd, 8H<sub>2</sub>O 0,2 g, Cl<sub>2</sub>Ni, 6H<sub>2</sub>O 0,03 g pour 11. H<sub>2</sub>O.

*Remerciements*—Nous remercions Mlle N. Chaudorge du Laboratoire de Cryptogamie pour son aide dans la culture du champignon, ainsi que M. G. Bourgeois de l'Université de Bordeaux I pour l'enregistrement des spectres de masse.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. Alais, J., Lablache-Combier, A., Lacoste, L. et Vandewalle, B. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2833.
2. Lacoste, L., Lebbe, T. et Vidal, G. (1975) *Rev. Mycol.* **39**, 43.
3. Patterson, G. W. (1971) *Anal. Chem.* **43**, 1165.
4. Idler, D. R. et Wiseman, P. (1971) *Comp. Biochem. Physiol.* **38A**, 581.
5. Knights, B. A. (1967) *J. Gas Chromatog.* 273.
6. Willie, S. G. et Djerassi, G. (1968) *J. Org. Chem.* **33**, 305.
7. Idler, D. R. et Wiseman, P. (1970) *Comp. Biochem. Physiol.* **35**, 679; Ferezou, J. P., Devys, M., Allais, J. P. et Barbier, M. (1974) *Phytochemistry* **13**, 593.
8. Djerassi, C., Knight, J. C. et Brockmann, H. (1964) *Chem. Ber.* **97**, 3118.
9. Chen, Y. S. et Haskins, B. H. (1963) *Can. J. Chem.* **41**, 1647.
10. McCorkindale, N. J., Hutchinson, S. A., Pursey, B. A., Scott, W. T. et Wheller, R. (1969) *Phytochemistry* **8**, 861.
11. Mercer, E. I. et Bartlett, K. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1099.
12. Gottlieb, D. (1971) in S. Akai and S. Ouchi, *Morphological and Biochemical Events in Plant-Parasite Interaction*, pp. 153—179.
13. Devys, M., Alcaide, A. et Barbier, M. (1968) *Bull. Soc. Chem. Biol.* **50**, 1751.