

COMPOSITION STEROLIQUE ET MORPHOGENESES REPRODUCTRICES CHEZ *GNOMONIA LEPTOSTYLA*

J. FAYRET*, L. LACOSTE†, J. ALAIS†, A. LABLACHE-COMBIER†, A. MAQUESTIAU‡, Y. VAN HARVERBEKE‡, R. FLAMMANG‡
et H. MISPREUVE‡

*Université Paul Sabatier, Laboratoire de Cryptogamie, 31500 Toulouse, France; †Université de Lille I, Laboratoire de Chimie Organique Physique et Laboratoire de Cryptogamie B.P. 36-59650 Villeneuve d'Ascq, France et ‡Université de l'Etat, Laboratoire de Chimie Organique, 19 Avenue Maistriaux 7000 Mons, Belgium

(Revisé reçu le 25 juillet 1978)

Key Word Index—*Gnomonia leptostyla*; Ascomycetes; sterols; free sterols; sterol esters; $\Delta^{5,7}$ and Δ^5 sterols; reproductive morphogenesis; MIKE Spectrometry.

Abstract—Sterol components of *Gnomonia leptostyla* mycelia have been investigated from *in vitro* cultures in which sexual and asexual morphogenesis are induced by temperature and light conditions. The nature and content of free sterols and sterol esters were determined by MIKE spectrometry. Relations between sterol composition (total sterols; $\Delta^{5,7}$ and Δ^5 sterols) and reproductive morphogenesis are discussed, particularly with respect to the degree of sexuality induced.

INTRODUCTION

Le cycle complet de *Gnomonia leptostyla*, champignon Pyrénomycète responsable de l'anthracnose du noyer, a pu être réalisé '*in vitro*' sur des milieux culturels gélosés ou liquides. Les facteurs de l'environnement, notamment la lumière et la température, interviennent de façon déterminante dans l'accomplissement du cycle, c'est-à-dire dans le développement des morphogénèses reproductrices [1–3].

Ainsi, l'éclairement des cultures induit les morphogénèses conidiennes mais dont la nature est régie par le facteur thermique: macroconidiogénèse à 20° et microconidiogénèse à 10°. A l'inverse, la morphogénèse sexuée conduisant à la formation de périthèces est photo-inhibée ce qui constitue un cas très original parmi les Ascomycètes Pyrénomycètes. Si la différenciation des périthèces, à l'obscurité, accepte une gamme de température assez large, par contre leur maturation, caractérisée par la production des ascospores, reste tributaire de l'action du froid: à 20°, les périthèces se forment mais restent stériles; ils mûrissent dans les cultures à 10°.

La possibilité d'obtenir, avec un même milieu culturel liquide chimiquement défini, les différentes morphogénèses reproductrices de façon sélective et pratiquement exclusive grâce à l'action des facteurs température et éclairage, fournit, avec le *Gnomonia leptostyla*, un modèle expérimental intéressant pour l'étude des relations morphogénèse-métabolisme [3].

Dans les phénomènes de reproduction des champignons, il est à présent reconnu que les stérols peuvent jouer un rôle essentiel. Ceci est particulièrement bien établi chez les Pythiaceae qui, incapables d'effectuer la biosynthèse des composés stéroliques, nécessitent un apport de stérols exogènes pour induire les morphogénèses reproductrices sexuées et asexuées [4]. Chez d'autres Phycomycètes, comme l'*Achyla bisexualis*, les stérols sont des précurseurs d'hormones impliquées

dans la reproduction sexuée [5]. Si les analyses de stérols, notamment chez les levures et divers champignons filamenteux [6, 7], ont fait l'objet de nombreux travaux, nos connaissances en ce qui concerne les relations entre ces composés et la différenciation des structures reproductrices chez les Ascomycètes sont encore très limitées [4]. Les possibilités morphogéniques des cultures *in vitro* de *G. leptostyla* ont donc été utilisées pour étudier la composition stérolique du thalle et ses rapports avec l'induction des différents types de reproduction.

RESULTATS

Les quantités de stérols extraites des cultures de *G. leptostyla* où sont induites, sous l'action des facteurs lumière et température, les différentes morphogénèses reproductrices, sont données dans le Tableau 1. Pour chaque condition de culture sont également indiqués les pourcentages relatifs de stérols libres et de stérols estérifiés.

On constate que les teneurs en stérols totaux augmentent très nettement dans les cultures irradiées: à 20° les poids de stérols à la lumière sont presque deux fois plus élevés qu'à l'obscurité. Si l'accroissement pondéral intéresse à la fois les stérols libres et les stérols estérifiés, il faut remarquer que l'élévation des stérols estérifiés est plus importante dans les cultures éclairées comme le traduisent les variations des pourcentages relatifs.

On notera que la température de culture modifie aussi quantitativement les deux fractions stéroliques; le froid, à la lumière comme à l'obscurité, provoque une augmentation de la teneur en stérols libres et une variation inverse des stérols estérifiés.

La nature et les pourcentages respectifs des différents stérols isolés de *G. leptostyla* sont donnés dans le Tableau 2. Ce tableau montre la grande diversité de ces composés, aussi bien sous formes libres que sous formes estérifiées,

Tableau 1. Quantités de stérols totaux, libres et estérifiés (en mg pour 100 g de mycélium lyophilisé) isolés de *G. leptostyla* aux différentes conditions culturales

Conditions culturales	Stérols totaux	Stérols libres	Stérols estérifiés
20° obscurité	140	132 (94 %)	8 (6 %)
20° lumière	270	230 (85 %)	40 (15 %)
10° obscurité	180	177 (99,5 %)	3 (1,5 %)
10° lumière	260	244 (94 %)	16 (6 %)

Les pourcentages relatifs des stérols libres et estérifiés sont donnés entre parenthèses.

et ceci grâce à l'extrême sensibilité des techniques d'analyse utilisées qui ont permis de doser des constituants très inégalement représentés. Les identifications reposent en partie sur la valeur des R_f en chromatographie sur couche mince (CCM) mais surtout sur les spectres de masse des différents composés, obtenus par une méthode originale utilisant un spectromètre de masse à géométrie inversée [8] (cf. Partie expérimentale).

Les stérols ont été identifiés par leurs fragmentations caractéristiques et pour une Partie d'entre eux par comparaison avec des composés de référence de stéréochimie bien définie: dihydro-5,6 ergostérol, brassicastérol, ergosta-7 ène ol-3 β , campestérol, campestanol, sitostérol, sitostanol. Les caractéristiques en spectrométrie de

Tableau 2. Nature et pourcentages relatifs des stérols libres et estérifiés isolés de *G. leptostyla* aux différentes conditions culturales

		20°*		10°*	
		Obscurité	Lumière	Obscurité	Lumière
STEROLS LIBRES					
Δ_5	—cholestérol† M ⁺ 386	1	—	3	traces
	—méthyl-24 cholesta-5,22 diène ol-3 β † M ⁺ 398	28	33	22	33
	—méthyl-24 cholestène-5 ol-3 β † M ⁺ 400	5	14	3	14
	—stérol en C ₂₉				
	diméthyl-4,24 cholesta-5,22 diène ol-3 β } M ⁺ 412	1	1	1	—
	—éthyl-24 cholestane ol-3 β † M ⁺ 416	1	—	1	<1
	—méthyl-24 cholestane ol-3 β † M ⁺ 402	—	1	—	<1
	—éthyl-24 cholestène 5 ol 3- β †				
	diméthyl-4,24 cholestène 5 ol-3 β † } M ⁺ 414	1§	traces	1	<1
	—stérol en C ₃₀ M ⁺ 426	1	—	—	—
Δ_7	—méthyl-24 cholesta-7,22 diène ol-3 β † M ⁺ 398	3	1	—	<1
	—méthyl-24 cholestène-7 ol-3 β † M ⁺ 400	6	4	2	3
$\Delta_{5,7}$	—ergostérol† M ⁺ 396	49	40	64	45
	—ergostatétraène ol-3 β M ⁺ 394	1	1	1	1
	—éthyl-24 cholesté-5,7,22 triène ol-3 β M ⁺ 410	1	2	1	1
	—ergostatriène ol-3 β M ⁺ 396	2	3	1	1
STEROLS ESTERIFIES					
Δ_5	—cholestérol†	11	6	24	4
	—méthyl-24 cholesta-5,22 diène ol-3 β †	50	41	41	36
	—méthyl-24 cholestène-5 ol-3 β †	24	33	20	28
	—éthyl-24 cholestane ol-3 β †	5	—	2	1
	—méthyl-24 cholestane ol-3 β †	—	—	—	<1
	—éthyl-24 cholestène-5 ol-3 β †	10		13	
	diméthyl-4,24 cholestène-5 ol-3 β †	traces	3	—	2
	—stérol en C ₂₉	—	7	—	—
Δ_7	—méthyl-24 cholesta-7,22 diène ol-3 β †	—	—	—	3
	—méthyl-24 cholestène-7 ol 3- β †	—	—	—	4
$\Delta_{5,7}$	—ergostérol†	—	—	—	16
	—ergostatétraénol 3 β	—	5	—	—
	—éthyl-24 cholesté-5,7,22 triène ol-3 β	—	—	—	1
	—ergostatriène ol-3 β	—	5	—	2
%d'ergostérol dans les stérols totaux (calculé en fonction des % dans les stérols libres et estérifiés)		46	34	63	43

* Les pourcentages indiqués correspondent aux intensités relatives des ions moléculaires dans les spectres de masse conventionnels des fractions de chromatographie sur plaque, compte-tenu de leurs poids relatifs; les intensités sont corrigées pour la contribution des pics isotopiques.

† Spectres comparés avec les spectres des produits de référence suivants: cholestérol (386), brassicasterol (398), campestérol (400), β sitostanol (416) β sitostérol (414), campestanol (402), 5,6-dihydroergostérol (398), ergosta-7 ène ol-3 β (400), ergostérol (396).

‡ Mélange possible d'éthyl-24 cholestène-5 ol-3 β et de diméthyl-4,24 cholestène-5 ol-3 β car en plus des fragmentations caractéristiques du β sitostérol on observe un pic assez intense à m/e 287 qui peut correspondre à un squelette stérolique privé de chaîne latérale et méthylé sur le noyau.

§ + éthyl-24 cholestène-7 ol-3 β .

Tableau 3. Principales fragmentations en spectrométrie de masse des stérols isolés de *Gnomonia leptostyla*

Stérols	M ⁺	
—cholestérol	386	368 (M-H ₂ O), 353 (M-H ₂ O-Me), 301 (M-H ₂ O-C ₅ H ₇), 275 (M-H ₂ O-C ₇ H ₉), 255 (M-CL-H ₂ O), 247 (M-H ₂ O-C ₉ H ₁₃), 213 (M-CL-H ₂ O-42)
—méthyl-24 cholesta-5,22 diène ol-3 β	398	380 (M-H ₂ O), 300 (M-partie CL), 271 (M-CL-2H), 255 (M-CL-H ₂ O), 213 (M-CL-H ₂ O-42)
—méthyl-24 cholestène-5 ol-3 β	400	382 (M-H ₂ O), 367 (M-H ₂ O-Me), 315 (M-H ₂ O-C ₅ H ₇), 289 (M-H ₂ O-C ₇ H ₉), 261 (M-H ₂ O-C ₉ H ₁₃), 255 (M-CL-H ₂ O), 213 (M-CL-H ₂ O-42)
—stérol en C ₂₉	412	397 (M-Me), 394 (M-H ₂ O), 341 (M-71), 301, 271 (M-CL-2H)
—diméthyl-4,24 cholesta-5,22 diène ol-3β	412	397 (M-Me), 394 (M-H ₂ O), 314, 287, 285 (M-CL-2H), 269, 227
—éthyl-24 cholestane ol-3 β	416	401 (M-Me), 398 (M-H ₂ O), 257 (M-CL-H ₂ O), 233 (M-CL-42), 215, 290
—méthyl-24 cholestane ol-3 β	402	387 (M-Me), 257 (M-CL-H ₂ O), 233 (M-CL-42), 215, 276
—éthyl-24 cholestène ol-3 β	414	396 (M-H ₂ O), 381 (M-H ₂ O-Me), 329 (M-H ₂ O-C ₅ H ₇), 303 (M-H ₂ O-C ₇ H ₉), 275 (M-H ₂ O-C ₉ H ₁₃), 273 (M-CL), 255 (M-CL-H ₂ O), 213 (M-CL-H ₂ O-42)
—diméthyl-4,24 cholestène-5 ol-3 β	414	399 (M-Me), 396 (M-H ₂ O), 287 (M-CL), 269, 227
—stérol en C ₃₀	426	411 (M-Me), 408 (M-H ₂ O), 383 (M-43), 300, 271 (M-CL-2H), 255, 213
—méthyl-24 cholesta-7,22 diène ol-3 β	398	383 (M-Me), 380 (M-H ₂ O), 355 (M-43), 300, 273, 271 (M-CL-2H), 255, 213
—méthyl-24 cholesta-5,7,22 triène ol-3β (ergostérol)	396	378 (M-H ₂ O), 363 (M-Me-H ₂ O), 337 (M-59), 271 (M-CL) 253 (M-CL-H ₂ O), 211 (M-CL-H ₂ O-42)
—méthyl-24 cholestène-7 ol-3 β	400	385 (M-Me), 382 (M-H ₂ O), 271 (M-CL-2H), 273, 255, 246, 231, 213
—ergostatétraène ol-3 β	394	379 (M-Me), 376 (M-H ₂ O), 361 (M-H ₂ O-Me), 355 (M-59), 271 (M-CL), 269, 253, 251
—éthyl-24 cholesta-5,7,22 triène ol-3 β	410	395 (M-Me), 392 (M-H ₂ O), 377 (M-Me-H ₂ O), 351 (M-59), 271 (M-CL), 253, 211
—ergostatriène ol-3 β	392	381 (M-Me), 378 (M-H ₂ O), 300, 269 (M-CL-2H)

CL = Chaîne latérale.

masse des stérols isolés sont données dans le Tableau 3. Cependant, la configuration des groupes éthyl ou méthyl en C₂₄ ne peut pas être déduite des résultats obtenus: isomères 24-R et 24-S existent tous deux dans les organismes vivants, mais ne peuvent pas être séparés par chromatographie dans les conditions dans lesquelles nous travaillons, ou distingués en spectrométrie de masse. La faible quantité de stérols obtenus nous empêche de mesurer les rotations spécifiques, critère physique permettant de désigner la configuration en C-24. Nous adopterons donc, pour les décrire, la nomenclature systématique.

L'ergostérol, le méthyl-24 cholesta-5,22 diène ol-3β et, à un degré moindre, le méthyl-24 cholestène-5 ol-3 β, représentent les principaux stérols libres. Dans les stérols estérifiés la représentation des divers types de stérols est bien différentes: si le méthyl-24 cholesta-5,22 diène ol-3β devient le constituant le plus abondant, l'ergostérol par contre disparaît totalement (à l'exclusion des cultures à 10°, lumière) et on assiste à une élévation très sensible du méthyl-24 cholestène-5 ol-3β ainsi que du cholestérol pour lequel l'action favorisant du facteur obscurité est particulièrement nette; il en est de même de l'éthyl-24 cholestène-5 ol-3β. Dans ce même tableau est également donné le pourcentage d'ergostérol total, c'est-à-dire la teneur des stérols totaux en ergostérol calculée à partir des pourcentages relatifs de stérols libres et de stérols estérifiés.

En ce qui concerne les composés stéroliques mineurs, parmi les stérols libres, le stérol en C₂₉ (M⁺ = 412) qui accompagne le diméthyl 4,24 cholesta 5,22 diène ol-3β pourrait être le diméthyl-23,24-cholesta-5,23 diène ol-3β dont le spectre de masse conventionnel présente un ion de masse m/e = 341 assez intense [9], comme c'est le cas

le spectre du composé isolé. Le stérol en C₃₀ (M⁺ = 426) qui ne se trouve que dans les stérols isolés à partir du champignon cultivé à 20° et à l'obscurité, pourrait être le propyl-24-brassicastérol. Le stérol ayant un ion moléculaire à 410 est un stérol en C₂₉ avec trois doubles liaisons. Le spectre présente des fragmentations identiques à celle de l'ergostérol, mais avec des signaux augmentés de 14 unités de masse pour les masses élevées, ainsi 395 (M-15), 392 (M-18), 377 (M-(15 + 18)), 351 (M-59). Ce dernier fragment est caractéristique du noyau ergostérol, indiquant que le groupe méthyl additionnel est placé sur la chaîne. Le nom de corbistérol a été donné à ce stérol déjà connu [10].

Les Tableaux 2 et 4 classent les différents stérols isolés en 3 catégories, selon la position des doubles liaisons sur le noyau stérolique soit C₅-C₆ (Δ₅), soit C₅-C₆ et C₇-C₈ (Δ_{5,7}), soit C₇-C₈ (Δ₇). Dans ce classement nous n'avons pas tenu compte du stérol dénommé

Tableau 4. Pourcentages relatifs des stérols Δ₇, Δ_{5,7} et Δ₅ dans les stérols libres et estérifiés de *G. leptostyla* en fonction des différentes conditions culturales

Conditions culturales	Stérols	Δ ₇	Δ _{5,7}	Δ ₅
20° obscurité	libres	9	51	38
	estérifiés	—	—	100
20° lumière	libres	5	43	49
	estérifiés	—	5	90
10° obscurité	libres	2	66	31
	estérifiés	—	—	100
10° lumière	libres	3	47	49
	estérifiés	7	17	74

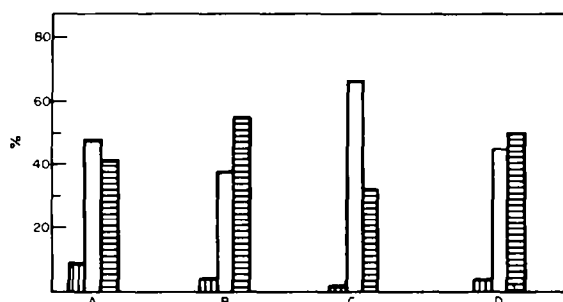


Fig. 1. Pourcentages des stérols Δ_7 (▨), $\Delta_{5,7}$ (□) et Δ_5 (■) dans les stérols totaux de *G. leptostyla* cultivé à 20°. Obscurité (A) 20°. Lumière (B), 10°. Obscurité (C) et lumière (D) 10°.

ergostatriène-ol-3 β de masse 396, isomère de l'ergostérol car nous n'avons pas nettement précisé la position des liaisons présentes; ceci explique pourquoi le total des stérols n'atteint pas 100%. La Fig. 1 et le Tableau 4 montrent que l'éclaircissement des cultures provoque une augmentation globale des stérols Δ_5 : en fait, cette augmentation ne s'observe que dans les stérols libres, la composition de stérols estérifiés étant influencée de façon inverse par le facteur lumineux. Les stérols $\Delta_{5,7}$, constitués essentiellement d'ergostérol, prédominent à l'obscurité et notamment à 10°

DISCUSSION

Les résultats précédents permettent d'abord quelques observations si l'on considère la nature et les pourcentages relatifs des stérols isolés des thalles de *G. leptostyla* (Tableau 2). Ainsi, on note en plus de la richesse en ergostérol, constituant habituel et majeur des stérols fongiques, une teneur élevée en méthyl-24 cholesta-5,22 diène ol-3 β dont la présence en quantités importantes n'a été signalée que chez certains dermatophytes [6]. Le méthyl-24 cholestène-5 ol-3 β est rarement rencontré chez les champignons: il est présent chez *G. leptostyla* et atteint des pourcentages élevés dans les stérols estérifiés. A l'inverse, les fractions stéroliques ne renferment jamais d'épistérol. Ce composé, considéré comme un précurseur de l'ergostérol [11, 12] a, par contre été plusieurs fois identifié chez les Pyrénomycètes [13, 14] et constitue le constituant majeur des stérols de la Mucorale *Phycomyces blakesleanus* [15].

La comparaison des teneurs en stérols en fonction des conditions de culture c'est-à-dire dans des thalles où l'on a induit sélectivement les différentes morphogénèses reproductrices caractéristiques de *G. leptostyla*, est également intéressante. L'éclaircissement des cultures, facteur inducteur de la macroconidiogénèse et de la microconidiogénèse, provoque une activation des synthèses stéroliques (Tableau 1) qui est de l'ordre de 40% à 10° et supérieur à 90% à 20°. Avec le *Leptosphaeria typhae* [13], l'irradiation des thalles ne modifie pas de façon pondérale le 'pool' stérolique mais chez ce champignon il n'existe pas de conidiogénèse. Par contre, chez le *Rhizopus arrhizus* [7] la lumière accroît le contenu stérolique dans le mycélium et cette élévation est concomitante des phénomènes de sporulation asexuée. Par ailleurs, il a été démontré que l'apport de stérols exogènes exerçait une stimulation de la production des conidies chez les Duetéromycètes *Stemphylium solani*

[16] et *Phymatotrichum omnivorum* [17]. On peut donc envisager une corrélation entre élévation du contenu stérolique et induction de la conidiogénèse chez *G. leptostyla*.

De même que l'ont montré des analyses de stérols chez diverses espèces d'Ascomycètes [18], les stérols libres représentent la majeure partie des stérols totaux de *G. leptostyla* (Tableau 1). Si le rôle des stérols comme constituants des systèmes membranaires est actuellement bien établi [18], il n'en est pas de même du rôle respectif des stérols libres et des stérols estérifiés [7]. Les esters de stérols pourraient constituer une réserve de stérols et seraient alors associés à une réserve de lipides [19]. Les résultats obtenus avec *Phycomyces blakesleanus* [15] n'ont cependant pas permis de justifier cette hypothèse. Chez *G. leptostyla*, l'éclaircissement des cultures entraîne, à 20° comme à 10°, une élévation plus marquée des quantités d'esters stéroliques que de stérols libres (Tableau 1). Chez ce champignon des résultats antérieurs [3] ont mis en évidence que la lumière réduisait les synthèses lipidiques: les thalles conidiogènes produisent deux fois moins de lipides neutres que les thalles à périthèces développés à l'obscurité. Cette discordance entre les conditions qui favorisent les synthèses lipidiques, glycérides en particulier et les synthèses stéroliques, notamment les formes estérifiées, met en doute le rôle de réserves que pourraient avoir ces substances.

Les morphogénèses reproductrices auxquelles conduisent les conditions d'éclaircissement et de température peuvent être caractérisées par leur degré de sexualisation. Dans les cultures macroconidiogènes toute morphogénèse sexuée est inhibée. Les thalles microconidiogènes sont le siège d'une sexualisation mâle puisque le rôle uniquement spermatogène des microconidies a été démontré [20]. Si l'obscurité induit la différenciation des périthèces, cette morphogénèse femelle ne peut s'exprimer totalement à 20° par suite d'une thermo-inhibition de la maturation des organes sexuels [2, 12]: la sexualisation femelle n'est donc complète qu'à 10° à l'obscurité où l'organogénèse périthéciale parvient à son terme: la formation des asques et des ascospores. On peut donc, selon les conditions culturales, établir un gradient de sexualisation qui peut être schématisé de la façon suivante: macroconidiogénèse (20° lumière) → microconidiogénèse (10° lumière) → périthèces stériles et abortifs (20° obscurité) → périthèces fertiles (10° obscurité). L'élévation du degré de sexualisations s'accompagne d'un enrichissement des stérols totaux en ergostérol dont le pourcentage dépasse 60% dans les cultures à périthèces fertiles (Tableau 2). Ces résultats rejoignent ceux qui ont été obtenus avec *Leptosphaeria typhae* [13a] où dans les thalles sexualisés, c'est-à-dire producteurs de périthèces, le taux d'ergostérol est également plus élevé que dans les thalles stériles.

Il est d'autre part connu que la biosynthèse des stérols $\Delta_{5,7}$ s'effectue à partir des stérols Δ_7 et que ces stérols diinsaturés sur le noyau B de la molécule conduisent ensuite à la biosynthèse des stérols Δ_5 [19]. Ces voies métaboliques $\Delta_7 \rightarrow \Delta_{5,7} \rightarrow \Delta_5$ dans la biosynthèse des composés stéroliques ont également été reconnues chez les champignons [22]. Si l'on suit les variations des pourcentages des stérols $\Delta_{5,7}$ et Δ_5 (Fig. 1 et Tableau 3) lorsque s'élève le degré de sexualisation (cultures à 20° lumière → 10° lumière → 20° obscurité → 10° obscurité), les taux de ces deux groupes de stérols

évoluent en sens inverse on assiste à une élévation des pourcentages des stérols $\Delta_{5,7}$ (dont l'ergostérol est le constituant majeur) et à une diminution des stérols Δ_5 . L'induction des morphogénèses à sexualisation de plus en plus marquée apparaît associée à un ralentissement ou à un blocage partiel de la transformation des stérols $\Delta_{5,7}$ en stérols Δ_5 ce qui pourrait expliquer les teneurs élevées en ergostérol dans les thalles fortement sexualisés.

PARTIE EXPERIMENTALE

Organisme et méthodes de culture. Les souches de *G. leptostyla* proviennent d'isolats monospermes d'ascospores à partir de périthèces formés dans la nature sur feuilles mortes de noyer. Elles sont entretenues sur tranches de carotte en tubes de Roux et sur 'oat meal agar' Difco à 30 g/l. Ces dernières cultures placées à 20° sous photopériodes de 12hr deviennent macroconidiogènes (1) et sont utilisées pour l'inoculation des fioles de culture. Par suite de l'hétérothallisme de *G. leptostyla* [23] cette inoculation est réalisée avec un mélange de macroconidies de souches A et a. Le milieu cultural qui sert à la production du matériel végétal pour les analyses de stérols a la composition suivante: KH_2PO_4 : 0.8 g; $\text{Ca}(\text{PO}_3\text{H}_2)_2$, $2\text{H}_2\text{O}$: 0.2 g; MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g; MnSO_4 , H_2O : 0.01 g; ZnSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$: 0.01 g; CuSO_4 , $5\text{H}_2\text{O}$: 0.005 g; FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$: 0.001 g; D-glucose: 5 g; L- α -alanine: 0.15875 g; L-sérine: 0.1875 g; thiamine: 100 μg ; biotine: 5 μg ; eau distillée: 1000 ml q.s.p.: pH 6. Ce milieu est réparti par fractions de 100 ml, en fioles de Roux de 1 l. Les cultures en fioles placées à la lumière reçoivent un flux énergétique moyen de 400 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Quatre séries de culture différentes, définies par les conditions de température et d'éclairement, permettent d'obtenir de façon sélective les morphogénèses reproductrices suivantes: macroconidiogénèse à 20° lumière, microconidiogénèse à 10° lumière, périthèces stériles et abortifs à 20° obscurité, périthèces fertiles à 10° obscurité. La vitesse de croissance étant influencée par les conditions culturales, les récoltes sont effectuées lorsque le rendement pondéral devient maximum soit au 20^{ème} jour à 20° lumière, 21^{ème} jour à 20° obscurité, 25^{ème} jour à 10° lumière et 28^{ème} jour à 10° obscurité. Le mycélium est recueilli par filtration sur verre fritté, lavé à l'eau distillée et lyophilisé. Les lyophilisats sont conservés à -20° jusqu'à l'analyse.

Extraction et identification des stérols. Les lipides sont extraits au Soxhlet sous atmosphère d'azote, à l'aide d'acétone et du mélange CHCl_3 -MeOH (2:1). Les stérols libres sont précipités par la digitonine: les stérols estérifiés sont saponifiés par la potasse méthanolique à 10% et précipités. La purification des stérols s'effectue sur silice G (2 mn) en utilisant le solvant C_6H_6 -EtOAc (5:1). Ils sont ensuite fractionnés par CCM Al_2O_3 - AgNO_3 utilisant le solvant CHCl_3 -éther de pétrole-acétone (6:3:1) [13a]. On sépare ainsi l'ergostérol (R_f 0.08) des stérols en Δ_5 (R_f 0.50) et des stérols en Δ_7 (R_f 0.65). Chaque groupe de stérols est ensuite analysé par spectrométrie de masse en utilisant un spectromètre à géométrie inversée [8] (Varian Mat 311 A), les constituants étant caractérisés par leurs spectres MIKE (mass analysed ion kinetic energy spectra) [24]. Cette technique qui permet l'analyse de mélanges complexes de

composés organiques sans séparation physique poussée des constituants a fait l'objet d'une revue récente [25]. En résumé, la méthode consiste à comparer le spectre MIKE d'un ion moléculaire à identifier à ceux de substances référence. Lorsque ces dernières ne sont pas accessibles, on peut dégager les principales caractéristiques structurales des produits à analyser en se basant sur les fragmentations observées dans les spectres d'énergie cinétique. En effet, ces fragmentations sont, dans la plupart des cas, comparables à celles décrites dans la littérature, en spectrométrie de masse conventionnelle. Il est à constater que les pourcentages relatifs des stérols obtenus par analyse de spectres de masse du mélange global, sont identiques à ceux calculés grâce aux masses pondérales des différents stérols (ergostérol, Δ_5 , Δ_7) isolés par CCM. Ceci confirme la très grande précision de cette méthode d'analyse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fayret, J. (1967) *C. R. Acad. Sci., Sér. D* **265**, 1887.
2. Fayret, J. (1974) *C. R. Acad. Sci., Sér. D* **278**, 2909.
3. Fayret, J. (1975) Thèse Doctorat d'Etat Toulouse No. 689.
4. Hendrix, J. W. (1970) *Annu. Rev. Phytopathol.* **8**, 111.
5. Barksdale, A. W. (1969) *Science* **166**, 3907.
6. Weete, J. D. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1843.
7. Weete, J. D. (1974) *Fungal Lipid Biochemistry*. Plenum Press, New York.
8. Maquestiau, A., Van Harverbeke, Y., Flammang, R., Mispereuve, H., Kaisin, M., Braekman, J. C., Daloze, D. et Tursch, B. (1978) *Steroids* **31**, 31.
9. Kanazawa A., Ando, T. Teshima, S. (1977) *Bull. Jpn Soc. Sci Fis.* **43**, 83.
10. Belanger, P., Zintel, J. A., Van den Heuvel, W. J. A. et Smith, J. L. (1973) *Can. J. Chem.* **51**, 3294.
11. Goulston, G., Mercer, E. I. et Goad, L. J. (1975) *Phytochemistry* **14**, 457.
12. Mercer, E. I. et Russell, S. M. (1975) *Phytochemistry* **14**, 445.
- 13a. Alais, J., Lablache-Combiér, A., Lacoste, L. et Vandewalle, B. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2833.
- 13b. Alais, J., Lablache-Combiér, A., Lacoste, L. et Vidal, G. (1976) *Phytochemistry* **15**, 49.
14. Renaud, R., Safe, S. et Subden, R. (1976) *Phytochemistry* **15**, 977.
15. Barlett, K. et Mercer, E. I. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1115.
16. Sproston, T. et Setlow, R. B. (1968) *Mycologia* **60**, 104.
17. Baniecki, J. F. et Bloss, H. E. (1969) *Phytopathology* **59**, 680.
18. Olsen, R. A. (1973) *Physiol. Plant.* **28**, 507.
19. Brandt, R. D., Pryce, R. J., Anding, C. et Ourisson, G. (1970) *Eur. J. Biochem.* **17**, 344.
20. Fayret, J. (1971) *C. R. Acad. Sci., Sér. D* **273**, 940.
21. Fayret, J. et Parguey-Leduc, A. (1976) *Rev. Mycol.* **40**, 245.
22. Knights, B. A. et Elliott, C. G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **441**, 341.
23. Fayret, J. (1970) *C. R. Acad. Sci., Sér. D* **270**, 1776.
24. Beynon, J. H., Cooks, R. G., Amy, J. W., Baitinger, W. E. et Ridley, T. Y. (1973) *Analyt. Chem.* **45**, 1023 A.
25. Cooks, R. G. et Kondrat, R. W. (1978) *Analyt. Chem.* **50**, 81 A.