

$$[\alpha]_{24}^{\lambda} = \frac{589}{-9.8} \frac{578}{-10.4} \frac{546 \text{ nm}}{-13.1} (c = 0.48).$$

4-[1'-Cinnamoyloxy-ethyl]-phenol (6). Farbloses Öl, das nicht rein isoliert werden konnte. Man erwärmte 1 hr in 0.5 ml Ac₂O auf 70° und erhielt nach DC (Ether-Petrol 1:1) 60 mg 7, farbloses Öl, IR cm⁻¹: PhOAc 1770; C=CCO₂R 1720, 1640. MS: M⁺ m/e 310.121 (3%) (ber. für C₁₉H₁₈O₄ 310.121); -Keten 268 (45); -ACOC₆H₄CH=CHCO₂ 121 (100); MeCO⁺ 43 (44).

$$[\alpha]_{24}^{\lambda} = \frac{589}{-9.8} \frac{578}{-10.6} \frac{546 \text{ nm}}{-12.3} (c = 0.53)$$

4-[1'-Methoxy-ethyl]-phenol (8). Farbloses Öl, IR cm⁻¹: OH 3610; Aromat 1620, 1605. MS: M⁺ m/e 152.084 (5%) (ber. für C₉H₁₂O₂ 152.084); -MeOH 120 (100).

1',1'-Bis-[4-ethylphenol]-ether (12). Farbloses Öl, IR cm⁻¹: OH 3600; Aromat 1615. MS: M⁺ m/e 258.126 (22%) (ber. für

C₁₆H₁₈O₃ 258.126); HOC₆H₄CHMe 121 (100). 10 mg 12 überführte man in 0.5 ml Ac₂O durch 3 hr Erwärmen auf 70° in das Diacetat 13, farbloses Öl, IR cm⁻¹: PhOAc 1770. MS: M⁺ m/e 342.147 (1.5%) (ber. für C₂₀H₂₂O₅ 342.147); -Keten 300 (5); HC₆H₄CHMe 121 (100); MeCO⁺ 43 (85).

LITERATUR

1. Herz, W. (1977) in *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Heywood, V. H., Harborne, J. B. und Turner, B. L., eds.). Academic Press, London.
2. Bonner, W. A. (1961) *Tetrahedron Letters* 417.
3. Bohlmann, F. und Grenz, M. (1970) *Chem. Ber.* **103**, 90.
4. Coulthard, C. E., Marshall, J. und Pyman, F. L. (1930) *J. Chem. Soc. (London)* 280.
5. Bohlmann, F., Knauf, W., King, R. M. und Robinson, H. (1979) *Phytochemistry* **18**.

STÉROLS ET REPRODUCTION SEXUÉE DU *LEPTOSHAERIA TYPHAE* EN FONCTION DE LA TENEUR DU MILIEU DE CULTURE EN XYLOSE

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

Université de Lille I, *Laboratoire de Cryptogamie et †Laboratoire de Chimie Organique Physique, B.P. 36-59650 Villeneuve d'Ascq et ‡ Université de l'Etat, Laboratoire de Chimie Organique, 19 Avenue Maistriau, 7000 Mons, Belgium

(Reçu le 6 janvier 1979)

Key Word Index—*Leptosphaeria typhae*; ascomycete; fungal reproduction; cholesterol; ergosterol; effect of xylose on sterol levels.

INTRODUCTION

Le champignon *Leptosphaeria typhae* (Ascomycètes, ordre des Pléosporales, famille des Pleosporaceae), cultivé sur un milieu convenable, produit de grandes quantités de périthèces lorsqu'il est éclairé selon un rythme nycthéméral; maintenu à l'obscurité constante, il demeure stérile et strictement mycélien. Une décoction d'avoine à 20 g/l constitue un excellent milieu de culture pour ce champignon; lorsqu'il se développe sur ce substrat, sa fertilisation est très abondante et rapide; les premiers périthèces apparaissent au 7ème jour du développement. Une étude des stérols des mycéliums fertiles [1] met en évidence le seul ergostérol, alors que les colonies stériles végétant à l'obscurité contiennent une plus grande variété de ces corps. Mais le cholestérol n'est jamais détecté.

Cultivé dans les mêmes conditions sur un milieu chimiquement défini [2, 3] mis au point pour son développement, *Leptosphaeria typhae* est aussi riche en périthèces, mais l'apparition de ceux-ci est retardée de 48 hr. On constate une perturbation de sa composition stérolique, avec en particulier l'apparition de cholestérol.

Dans ce milieu, la meilleure source de carbone est le xylose et celui-ci doit être fourni en faible concentration (2.5 g/l) pour que le champignon soit fertile; si on augmente le taux de glucide, la fertilité se réduit puis disparaît. Dans ce travail, nous avons cherché à connaître l'évolution des stérols mycéliens, et en particulier de l'ergostérol et du cholestérol, lorsque l'on stérilise progressivement *Leptosphaeria typhae* par une élévation de l'apport de xylose. Cette nouvelle expérience, comme les précédentes, est basée sur l'hypothèse que les stérols pourraient jouer un rôle dans le processus de sexualisation des champignons.

RÉSULTATS

Le champignon est sexuellement fertile sur un milieu contenant seulement 2.5 g/l de xylose. A 10 g/l la production de périthèces est fortement réduite; elle devient nulle pour des concentrations en glucides plus élevées. Le poids de matière sèche augmente presque proportionnellement à la teneur du milieu en xylose jusqu'à 20 g/l.

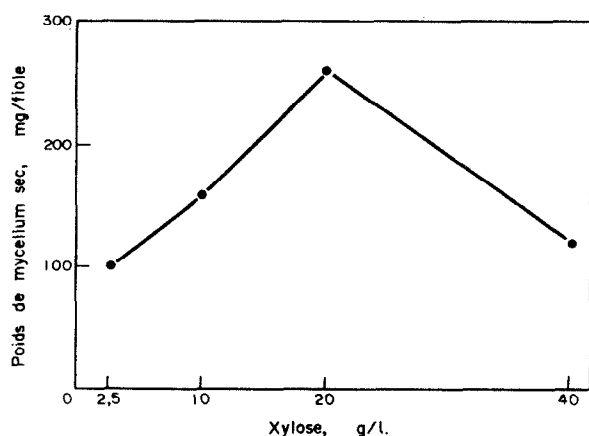


Fig. 1. Evolution du poids de mycélium sec obtenu en fonction de la teneur du milieu en xylose.

Au-delà, la croissance est inhibée et la masse de mycélium est réduite (Fig. 1).

Les quantités de stérols extraites des cultures de *Leptosphaeria typhae* dans les différentes conditions, sont données dans le Tableau 1. Pour chaque condition culturale sont également indiqués les pourcentages relatifs de stérols libres et de stérols estérifiés. On constate une diminution régulière de la quantité de stérols jusqu'à 20 g/l de xylose puis une brusque augmentation lorsque le milieu contient une forte proportion de glucides (40 g/l de xylose).

La nature et les pourcentages respectifs des différents stérols isolés de *L. typhae* sont donnés dans le Tableau 2. Le tableau montre la grande diversité de ces composés,

Tableau 1. Quantités de stérols totaux, libres et estérifiés (en mg pour 100 g de mycélium lyophilisé) isolés de *L. typhae* aux différentes conditions culturales (les pourcentages relatifs des stérols libres et estérifiés sont donnés entre parenthèses)

Conditions culturales	Stérols totaux	Stérols libres	Stérols estérifiés
2.5 g/l xylose	120	109 (91 %)	11 (9 %)
10 g/l xylose	62	60 (97.5 %)	2 (2.5 %)
20 g/l xylose	38	36.5 (96.5 %)	1.5 (3.5 %)
40 g/l xylose	160	149 (98 %)	11 (7 %)

aussi bien sous formes libres que sous formes estérifiées. Les identifications reposent sur la valeur des R_f en chromatographie en couche mince (CCM) des temps de rétention en chromatographie gaz liquide [4, 5] et grâce aux fragmentations caractéristiques des stérols libres [6, 7] ou propionylés en spectrométrie de masse. Certains stérols ont été comparés avec des composés de référence de stéréochimie bien définie: dihydro-5,6 ergostérol, épistérol, cholestérol, campestérol, sitostérol, stigmasterol, sitostanol. Cependant la configuration des groupes éthyle ou méthyle en C-24 ne peut être déduite des résultats obtenus: les isomères 24-*R* et 24-*S* existent tous deux dans les organismes vivants, et ne peuvent pas être séparés par chromatographie dans les conditions dans lesquelles nous travaillons, ni 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

Tableau 2. Nature et pourcentages relatifs des stérols libres et estérifiés isolés de *L. typhae* avec différentes conditions culturales

	2.5 g/l Xylose	10 g/l Xylose	20 g/l Xylose	40 g/l Xylose
Stérols libres				
Ergostérol	62	73	76	61
Méthyl-24 cholestadiène-7,22 ol-3 β	25	15	10	18
Méthylène-24 cholestène-7 ol-3 β	9	9	5	9
Ergostatriène ol-3 β			3	3
Cholestérol	1	2	2.75	3.5
Méthyl-24 cholestène-5 ol-3 β	0.25	0.25	0.25	1
Ethyl-24 cholestène-5 ol-3 β	1	0.75	1.5	1
Ethyl-24 cholestadiène-5,22 ol-3 β			1.5	1.5
Ethyl-24 cholestane ol-3 β	1.75			1
Stérols en C ₂₉ , C ₃₀ mono et diinsaturés 4 α -méthyl			1	1
Stérols estérifiés				
Ergostérol	12		26	
Méthyl-24 cholestadiène-7,22 ol-3 β	25	30	38	25
Méthylène-24 cholestène-7 ol-3 β	32	68	15	50
Cholestérol	7		8	6
Méthyl-24 cholestène-5 ol-3 β				3
Ethyl-24 cholestène-5 ol-3 β	6	1		6
Ethyl-24 cholestane ol-3 β	18			10
Ethyl-24 cholestadiène-5,22 ol-3 β			10	
Méthylène-24 lanostène-8 ol-3 β		1		
Stérol, en C ₂₉ et C ₃₀ mono et diinsaturés, 4 α -méthyl			3	
% D'ergostérol dans les stérols totaux (calculé en fonction des pourcentages dans les stérols libres et estérifiés)	57.5	71	74	56.5
% De cholestérol dans les stérols totaux	1.54	1.95	2.93	3.67
Rapport ergostérol/cholestérol	37.33	36.41	25.25	15.39

Tableau 3. Principales fragmentations en spectrométrie de masse des stérols isolés de *Leptosphaeria typhar**

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) Propionate: 368, 260, 255, 247, 213
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)
Ergostatriène ol-3 β	396	381 (M - Me), 378 (M - H ₂ O), 300, 269 (M - Cl - 2H)
Méthyl-24 cholestadiène-7,22 ol-3 β	398	383 (M - Me), 380 (M - H ₂ O), 355 (M - 43), 300, 273, 271 (M - Cl - 2H), 255, 213 Propionate: 454, 439, 411, 380, 356, 329, 327, 302, 255, 213
Méthylène-24 cholestène-7 ol-3 β	398	383 (M - Me), 314 (M - partie Cl), 271 (M - Cl - 2H), 255 (M - Cl - H ₂ O), 246, 213, 213 (M - Cl - H ₂ O - 42) Propionate: 454, 439, 380, 370, 327
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) Propionate: 382, 274, 255, 261, 213
Ethyl-24 cholestadiène-5,22 ol-3 β	412	397 (M - Me), 394 (M - H ₂ O), 369 (M - Me - H ₂ O), 351 (M - 43 - H ₂ O), 300 (M - partie Cl), 271 (M - Cl - 2H), 255 (M - Cl - H ₂ O), 213 (M - Cl - H ₂ O - 42)
Ethyl-24 cholestène-5 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) Propionate: 396, 288, 275, 255, 213
Ethyl-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 Propionate: 472, 398, 383, 257, 215
Stérols en C ₂₉ , C ₃₀ mono, diinsaturés, 4 α-méthyl	412 414 426 428	394, 396, 408, 410 (M ⁺ - H ₂ O), 285, 287 (M - Cl), 269, 271 (M - Cl - H ₂ O), 227, 229 (M - Cl - H ₂ O - 42)
Méthylène-24 lanostène-8 ol-3 β	440	
		425 (M - Me), 407 (M - Me - H ₂ O), 356 (M - 84), 341 (M - 84 - Me), 323 (M - 84 - Me - H ₂ O), 259 (M - Cl - 56), 241 (M - Cl - 56 - Me) Propionate: 496, 481, 422, 407, 392, 241

* Cl = Chaîne latérale.

nomenclature systématique. Les fragmentations caractéristiques des stérols libres isolés sont données dans le Tableau 3, ainsi que celles des propionates de stérols.

Le stérol libre le plus abondant sur tous les milieux est l'ergostérol. Sa proportion par rapport aux autres corps déterminés s'élève lorsqu'augmente la teneur en xylose puis diminue au-delà de 20 g/l pour devenir, à 40 g/l, inférieure à ce qu'elle est à 2.5 g/l. Le méthyl-24 cholestadiène-7,22 ol-3 β suit une courbe inverse. Le méthylène-24 cholestène-7 ol-3 β, autre précurseur de l'ergostérol est à peu près constant. Le cholestérol seul voit sa proportion s'élever régulièrement, quand augmente la concentration en xylose (Fig. 2).

Le pourcentage de stérols estérifiés est toujours inférieur à 9%. Ce sont le méthyl-24 cholestadiène-7,22 ol-3 β, et le méthylène-24 cholestène-7 ol-3 β qui en constituent l'essentiel. En ce qui concerne les composés stéroliques mineurs les stérols en C₂₉ (M⁺ 412, 414) et C₃₀ (M⁺ 426, 428) ont un pic important à m/e 285, 287, des fragmentations à m/e 269, 227 ce qui peut indiquer la présence d'un méthyle supplémentaire en position 4α. De plus, parmi les stérols estérifiés isolés de la culture faite sur un milieu contenant 10 g/l de xylose, se trouve un stérol (M⁺ 440) qui présente les mêmes fragmentations caractéristiques que celles données dans la littérature pour le méthylène-24 lanostène-8 ol-3 β [8].

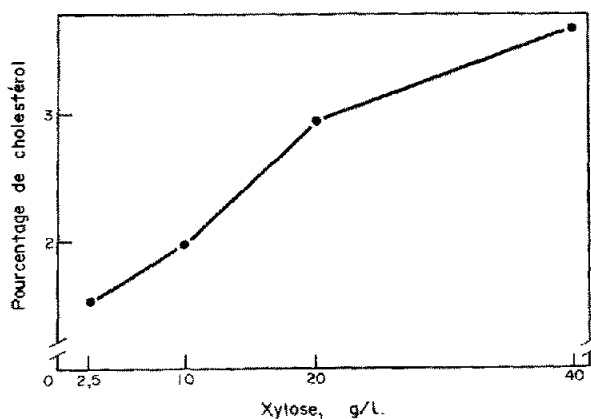


Fig. 2. Proportion de cholestérol par rapport à l'ensemble des stérols.

DISCUSSION

La stérilisation de *Leptosphaeria typhar* par des doses croissantes de xylose, but de l'expérience, s'accompagne jusqu'à 20 g/l d'une stimulation intense de la croissance végétative. Mais un apport de glucides plus abondant entraîne une inhibition drastique du développement, qui

pourrait être due à un 'engorgement métabolique' des cellules ou à l'effet d'une pression osmotique trop élevée gênant la pénétration des nutriments.

Le Tableau 1 montre que la teneur en stérols du champignon s'abaisse au fur et à mesure de sa stérilisation progressive; au contraire, chez *Gnomonia leptostyla* [10] et *Rhizopus arrhizus* [11], à une orientation du développement dans le sens végétatif correspond une augmentation du contenu stérolique. Cette opposition apparente est vraisemblablement due au fait que *Leptosphaeria typhae* a un développement végétatif strictement mycélien alors que les deux autres champignons différencient des spores asexuelles. Par contre, lorsque le milieu contient 40 g/l de xylose, le mycélium de *Leptosphaeria typhae* devient très riche en stérols; il s'agit peut-être d'une réaction cellulaire visant à réduire la perméabilité membranaire pour diminuer les pertes d'eau, comme semble l'indiquer l'élévation de la proportion de cholestérol. On peut considérer que, dans ce milieu, le champignon se développe dans des conditions pathologiques, ainsi que le montre l'abaissement des poids de matière sèche totale.

L'ergostérol est considéré chez *Gnomonia leptostyla* comme une sorte d'indicateur de l'état de sexualisation du champignon: plus la proportion de ce corps est élevée dans l'ensemble des stérols, plus la différenciation sexuée est complète. Les résultats regroupés dans le Tableau 2 paraissent exprimer que cette hypothèse n'est pas valable pour *Leptosphaeria typhae*. Mais le Tableau 1 montre que la teneur mycélienne globale en stérols s'abaisse quand croît la richesse du milieu en xylose et donc se réduit la fertilité sexuelle du champignon, ce qui entraîne un appauvrissement des cellules en ergostérol. On remarque aussi une élévation de la proportion de cholestérol (Fig. 2). En effet, le cholestérol, que le champignon ne synthétise pas lorsqu'il se développe sur eau d'avoine [1], milieu très favorable à sa reproduction sexuée, apparaît ici en quantités de plus en plus élevées lorsque le taux de xylose augmente. La Fig. 3 indique que le rapport ergostérol/cholestérol s'abaisse au fur et à mesure que la fertilité sexuelle diminue. Le cholestérol semble être chez *Leptosphaeria typhae* un indice de la

stérilité, ce qui recoupe l'idée suggérée par les résultats obtenus chez *Gnomonia leptostyla* [10], selon laquelle la sexualisation s'accompagnerait d'un ralentissement de la transformation des stérols Δ^5 , ici essentiellement représentés par l'ergostérol, en stérols Δ^7 dont le plus important est chez *Leptosphaeria typhae* le cholestérol. Cette transformation semble accélérée chez notre champignon lors du processus de stérilisation.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Cultures. Les cultures de *L. typhae* se développent dans des fioles de Roux de 1 l. contenant 100 ml de milieu synthétique liquide [3]. Elles subissent un éclaircissement de 2000 ergs $\text{cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$, provenant de tubes fluorescents 'blanc brillant de luxe', selon un rythme de 12 hr lumière et 12 hr obscurité. Après 10 jours, on recueille le mycélium par centrifugation à 0°, puis on le fixe par l'azote liquide et on le lyophilise.

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 min) 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 -pétrole- Me_2CO (6:3:1) [3]. On sépare ainsi l'ergostérol (R_f 0.08), des stérols Δ^5 et épistérol (R_f 0.53), des stérols en Δ^7 (R_f 0.62) et de l'ethyl-24 cholestan ol-3 β (R_f 0.68). Après propionylation, chaque famille de stérols est de nouveau séparée par CCM Al_2O_3 - AgNO_3 (solvant hexane- C_6H_6 , 4:1) [9]. Les spectres de masses sont mesurés sur appareil MS-12; l'évaluation des pourcentages relatifs des différents stérols est faite selon la méthode déjà publiée [3].

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-Combiér, A., Lacoste, L. et Vandewalle, B. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2833.
2. Vidal, G., Lebbe, T. et Lacoste, L. (1975) *Rev. Mycol.* **39**, 43.
3. Alais, J., Lablache-Combiér, A., Lacoste, L. et Vidal, G. (1976) *Phytochemistry* **15**, 49.
4. Patterson, G. W. (1971) *Analyt. Chem.* **43**, 1165.
5. Idler, D. R. et Wiseman, P. (1971) *Comp. Biochem. Physiol.* **38A**, 581.
6. Knights, B. A. (1967) *J. Gas Chromatogr.* 273
7. Willie, S. G. et Djerassi, G. (1968) *J. Org. Chem.* **33**, 305.
8. Mercer, E. I. et Bartlett, K. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1099.
9. Devys, M., Alcaide, A. et Barbier, M. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 1751.
10. Fayret, J., Lacoste, L., Alais, J., Lablache-Combiér, A., et Maquestiau, A. (1979) *Phytochemistry* (sous presse).
11. Weete, J. D. (1974) *Fungal Lipid Biochemistry*. Plenum Press, New York.

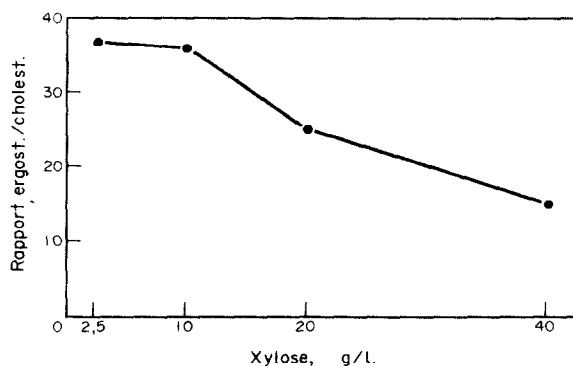


Fig. 3. Variation du rapport ergostérol/cholestérol dans le mycélium.