

## DIHYDROISOCOUMARINES ET ACIDE MYCOPHENOLIQUE DU MILIEU DE CULTURE DU CHAMPIGNON PHYTOPATHOGENE *SEPTORIA NODORUM*

MICHEL DEVYS,\* JEAN-FRANCOIS BOUSQUET,† ALBERT KOLLMANN† et MICHEL BARBIER\*

\* Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France; † Station Centrale de Pathologie Végétale, INRA, 78000 Versailles, France

(Reçu le 4 janvier 1980)

**Key Word Index**—*Septoria nodorum*; fungus; dihydroisocoumarins; mellein; *O*-methylmellein; 4-hydroxymellein; 7-hydroxymellein; mycophenolic acid.

*Septoria nodorum* Berk, champignon responsable de la septoriose du Blé, produit en culture un ensemble de phytotoxines dont les propriétés sont actuellement en cours d'étude. La melleïne 1 (ochracine), puissant inhibiteur de la germination et de la croissance [1, 2], a précédemment été obtenue des cultures de ce parasite. La septorine, inhibitrice des oxydations phosphorylantes [3-5] et son dérivé *N*-méthoxylé [6] ont été également isolés de ce milieu de culture.

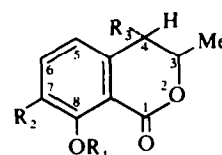
Les activités biologiques intenses montrées par diverses fractions provenant des extraits justifiaient la poursuite de ce travail. Nous reportons maintenant l'identification de trois dihydroisocoumarines du groupe de la melleïne d'une part, et celle de l'acide mycophénolique d'autre part. Rappelons que de nombreux métabolites dérivés de la melleïne ou de l'ochratoxine [7-9] ont été signalés dans des champignons précédemment.

Les divers produits ont été isolés par chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits des filtrats de culture par l'acétate d'éthyle. La melleïne 1 [(3*R*) méthyl-3 hydroxy-8 dihydro-3,4- isocoumarine], a été identifiée par ses constantes, ses spectres de masse et de RMN, ainsi que par la comparaison directe avec un échantillon authentique. Les métabolites ci-après ont de même été identifiés par les analyses spectrales et l'examen des constantes pour les produits déjà connus (voir Partie expérimentale). La (-) 3*R* *O*-méthylmelleïne 2 ne semble pas avoir été décrite comme produit naturel. Les constantes de la substance isolée sont identiques à celles reportées pour un produit obtenu par synthèse par d'autres auteurs [12].

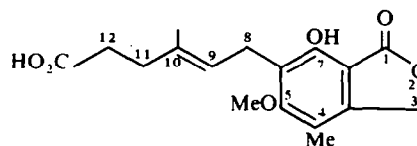
La (-) 3*R*, 4*R* hydroxy-4 (*cis*) melleïne 3 a été signalée [7] dans le champignon *Lasioidiplodia theobromae*; les propriétés reportées sont identiques à celles que nous décrivons dans ce travail. La (-) 3*R* hydroxy-7 melleïne 4 est également une substance non décrite jusqu'à présent. L'acide mycophénolique 5 [10, 11] isolé de *S. nodorum* a été identifié par ses spectres de masse et de RMN, ainsi que par la comparaison des valeurs physiques avec celles fournies par la littérature.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil de Kofler et sont corrigés, les pouvoirs rotatoires sur un Quick Polarimètre Jouan; les spectres de masse ont été obtenus avec un appareil AEI



- 1  $R_1 = R_2 = R_3 = H$  melleïne
- 2  $R_1 = Me, R_2 = R_3 = H$
- 3  $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH$
- 4  $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$



5 acide mycophénolique

MS9 et les spectres de RMN sur des appareils Cameca 250 MHz et Varian T60.

L'extraction du milieu par l'acétate d'éthyle comme déjà reporté [1, 2] conduit à un mélange de métabolites dont certains peuvent être observés en lumière UV ou par révélation par  $FeCl_3$  sur les CCM, ( $SiO_2$ , développement par  $CHCl_3$ - $MeCOEt$ , 5:1, isolement par chromatographies préparatives dans ce même système).

La melleïne 1 ( $R_f$  0,88 violet avec  $FeCl_3$ ) a été identifiée par ses constantes, ses spectres de masse et de RMN, ainsi que par la comparaison directe avec un échantillon isolé précédemment [2].

La (-) 3*R* *O*-méthylmelleïne 2 (3*R* méthyl-3 méthoxy-8 dihydro-3,4 isocoumarine).  $R_f$  0,75. visible en UV ne se révèle pas par  $FeCl_3$ ;  $F$  82-84°,  $[\alpha]_D^{20}$   $CHCl_3 = -218 \pm 3^\circ$ ; ce produit montre deux ions intenses en spectrométrie de masse à  $m/e$  192 ( $M^+$ ) 100% et 148 ( $M - CO_2$ )<sup>+</sup> 92%. Le spectre de RMN ( $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm du TMS) conduit aux résultats suivants:  $OMe$ , s, 3H, 3.85;  $Me$  (C-3), d, 3 H, 1.45 ( $J = 6$  Hz); H (C-3) sext. 1 H, 4.45 ( $J = 6$  Hz);  $CH_2$  (C-4), d, 2 H, 2.80 ( $J = 6$  Hz); H (C-5), d, 1 H, 6.76 ( $J = 8$  Hz); H (C-6) dd, 1 H, 7.28 ( $J_{HC-6,HC-7} = 8$  Hz); H (C-7) d, 1 H, 6.62.

La (-) 3R, 4R hydroxy-4 (cis) melléine 3 (3R, 4R méthyl-3 dihydroxy-4,8 dihydro-3,4 isocoumarine) montre en CCM une tache bleue avec  $\text{FeCl}_3$ ,  $R_f$  0,60. Ce produit fond à 114–115°,  $[\alpha]_D^{20} \text{CHCl}_3 = -41 \pm 3^\circ$  et donne un ion moléculaire en spectrométrie de masse, situé à  $m/e$  194 (100%) avec des pics principaux à 150 (60%), 121 (70%), 122 (72%), 105 (53%) et 43 (71%). RMN ( $\text{CDCl}_3$ ): Me (C-3) *d*, 3 H, 1,55 ( $J = 6$  Hz); H (C-3) *dd*, 1 H 4,56, ( $J = 6$  Hz),  $J_{\text{HC-3,HC-4}} = 2$  Hz; H(C-4) *d*, 1 H, 4,50 ( $J_{\text{HC-4,HC-3}} = 2$  Hz); H (OH en C-4) *s*, large, 3,26; H (C-5) *d*, 1 H, 6,95, ( $J = 4$  Hz); H (C-6) *dd*, 1 H, 7,52 ( $J = 3,5$  et 4 Hz); H (C-7) *d*, 1 H, 6,88 ( $J = 3,5$  Hz); H (OH en C-8) *s*, 1 H, 11 ppm.

(-) 3R Hydroxy-7 melléine 4 (3R méthyl-3 dihydroxy-7,8 dihydro-3,4 isocoumarine). Cette substance est révélée en bleu par  $\text{FeCl}_3$ ,  $R_f$  0,70, F 100–101°,  $[\alpha]_D^{20} \text{CHCl}_3 = -97 \pm 3^\circ$  et fournit un ion moléculaire en spectrométrie de masse situé à  $m/e$  194 (100%) (ions principaux à 176, 165, 148, 122, 120). La RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) permet, en comparant avec les autres dihydroisocoumarines, d'attribuer les divers protons: H (C-3) *sext*, 1 H, 4,75 ( $J = 6$  Hz); Me (C-3) *d*, 3 H, 1,6 ( $J = 6$  Hz); H (C-4) *d*, 2 H, 2,9 ( $J = 6$  Hz); H (C-5) *d*, 1 H, 7,1 ( $J = 8$  Hz); H (C-6) *d*, 1 H, 6,60 ( $J = 8$  Hz); (OH en C-7) *s*, 1 H, 5,63; H (OH en C-8) *s*, 1 H, 11; l'addition de  $\text{D}_2\text{O}$  fait disparaître les signaux dus aux OH en 7 et 8.

L'acide mycophénolique 5,  $R_f$  0,38, coloration mauve avec  $\text{FeCl}_3$ , fond à 140°; sp. de masse:  $m/e$  320 ( $\text{M}^-$ ) 48%, 302 31%, 247 100%, 245 21%, 229 22%, 219 22%, 207 80%. RMN (pyridine- $\text{D}_5$ ):  $\text{H}_2$  (C-3) *s*, 2 H, 5,09; Me (C-4) *s*, 3 H, 2,03; OMe (C-5) *s*, 3 H, 3,77;  $\text{H}_2$  (C-8) *d*, 2 H, 3,69 ( $J = 7$  Hz); H (C-9) *t*, 1 H, 5,74 ( $J = 7$  Hz);  $\text{CH}_3$  (C-10) *s*, 3 H, 1,97;  $\text{H}_2$  (C-12 et C-13) *s*, 4 H, 2,64.

**Remerciements**—Nous remercions le Professeur E. Lederer et le Professeur D. H. R. Barton pour leur intérêt ainsi que pour des discussions.

#### RÉFÉRENCES

1. Bousquet, J. F. et Skajennikoff, M. (1974) *Phytopathol. Z.* **80**, 355.
2. Devys, M., Bousquet, J. F., Skajennikoff, M. et Barbier, M. (1974) *Phytopathol. Z.* **81**, 92.
3. Belhomme de Franqueville, H. (1979) Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Paris VII.
4. Bousquet, J. F., Belhomme de Franqueville, H., Kollmann, A. et Fritz, R. (1980) *Can. J. Bot.* (sous presse).
5. Devys, M., Bousquet, J. F., Kollmann, A. et Barbier, M. (1978) *C. R. Acad. Sci. Ser. C* **286**, 457.
6. Devys, M., Barbier, M., Kollmann, A. et Bousquet, J. F. (1980) (En préparation).
7. Aldridge, D. C., Galt, S., Giles, D. et Turner, W. B. (1971) *J. Chem. Soc. Ser. C* 162.
8. Alvarenga, M. A. de, Braz, F. O. R., Gottlieb, O. R., Dias P. de, Magalhaes, A. F., Magalhaes, E. G., Magalhaes, G. C. de, Magalhaes, M. T., Maia, J. G. S., Marques, R., Marsaioli, A. J., Mesquita, A. A. L., Moraes A. A. de, Oliveira, A. B. de, Oliveira G. G. de, Pedreira, G., Pereira, S. A., Pinho, S. L. V., Sant'ana, A. E. G. et Santos, C. C. (1978) *Phytochemistry* **17**, 511.
9. Steyn, P. S. (1971) in *Microbial Toxins* (Ciegler, A., Kadis, S. et Aji, S., eds.) *Fungal Toxins* Vol. VI, p. 179. Academic Press, London.
10. Logan, W. R. et Newbold, G. T. (1957) *J. Chem. Soc.* 1946.
11. Jones, D. F., Moore, R. H. et Crowley, G. C. (1970) *J. Chem. Soc., Ser. C* 1725.
12. Blair, J. et Newbold, G. T. (1955) *J. Chem. Soc.* 2871.