

INFLUENCE DE LA LUMIÈRE ET DE LA MYCOSPORINE SUR LA COMPOSITION STÉROLIQUE DU *NECTRIA GALLIGENA* AU COURS DE LA MORPHOGENESE SEXUÉE

B. DEHORTER,* M. F. BROCQUET,* L. LACOSTE,* J. ALAIS,† A. LABLACHE-COMBIER,† A. MAQUESTIAU,‡ Y. VAN HARVERBEKE,‡ R. FLAMMANG‡ et H. MISPREUVE‡

* Université de Lille, Laboratoire de Cryptogamie et † Université de Lille, Laboratoire de Chimie Organique Physique, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France; ‡ Université de l'Etat, Laboratoire de Chimie Organique 19, Avenue Maistriau, 7000 Mons, Belgium

(Revisé reçu 21 février 1980)

Key Word Index—*Nectria galligena*; Ascomycetes; fungal reproduction; free sterols; MIKE spectrometry; effect of light; mycosporin.

Abstract—The nature and content of free sterols, analyzed by MIKE spectrometry, were investigated in *in vitro* cultures submitted to different light regimes with or without the addition of exogenous mycosporin. The sterol composition was related to varying degrees of induced sexual morphogenesis, particularly when mycosporin was added to the nutrient medium.

INTRODUCTION

La reproduction sexuée du Champignon, *Nectria galligena* Bres., agent du chancre du pommier, est obtenue *in vitro* [1]. Au laboratoire, dans des conditions nutritives et thermiques optimales, cet organisme ne forme des périthèces qu'en présence de lumière et les exigences lumineuses de la différenciation sexuée ont été précédemment définies [2]. Les éclaircissements, propices à la fructification du *N. galligena*, induisent également la biosynthèse d'un composé mycélien appelé 'P310' [3] ou mycosporine [4]. Cette substance, chimiquement définie [5], additionnée au milieu nutritif, déclenche à l'obscurité constante la reproduction sexuée et donc se substitue au facteur lumineux [6]. Le composé 'P310' semble ainsi représenter un intermédiaire biochimique entre la lumière et la réponse biologique: la production des ascocarpes.

D'une manière analogue à la mycosporine, les stérols ou leurs dérivés peuvent intervenir, d'une façon déterminante dans les phénomènes de reproduction fongique [7], preuve en est faite pour certaines espèces de Phycomycètes: *Pythium* sp. [8], *Achlya bisexualis* [9] et d'Ascomycètes: *Cochliobolus carbonum* [10]. Enfin, chez d'autres Ascomycètes photosensibles, les relations des stérols avec les morphogénèses reproductives suscitent de nombreuses analyses [11, 12].

Chez *N. galligena*, nous avons étudié la composition stérolique des mycéliums prélevés au 7ème et 13ème jours de développement à partir de cultures effectuées soit à l'obscurité, soit à la lumière, soit à l'obscurité en présence de mycosporine introduite dans le milieu nutritif. Ce travail a pour but de faire apparaître l'évolution qualitative et quantitative des stérols en fonction de conditions inductrices—ou non—de la reproduction sexuée du *N. galligena*. De plus, ces analyses stéroliques peuvent nous permettre de préciser une partie du rôle de la mycosporine dans le métabolisme sexué lorsque cette substance remplace la lumière.

RÉSULTATS

Sur le plan biologique, on observe que pour des temps de culture semblables, les masses mycéliennes recueillies sont pratiquement identiques dans les différentes séries expérimentales. La reproduction sexuée se manifeste au 13ème jour, dans les cultures éclairées, sous la forme de très nombreuses ébauches périthéciales visibles à l'œil nu tandis qu'aucune structure sexuée n'est repérable dans les cultures à l'obscurité.

La poursuite de l'expérimentation jusqu'au 30ème jour de culture, terme normal du développement du *Nectria galligena*, démontre le gradient de différenciation suivant: stérilité de l'organisme à l'obscurité, présence de très nombreuses ébauches périthéciales et de quelques périthèces mûrs dans les cultures développées à l'obscurité sur milieu additionné de mycosporine et enfin production maximale d'ascocarpes fertiles par le Champignon éclairé dès l'inoculation ou à partir du 7ème jour de croissance.

Les quantités de stérols libres extraites des mycéliums du *N. galligena* obtenus dans les six conditions culturelles pratiquées, sont données dans le Tableau 1. Celui-ci ne

Tableau 1. Quantités de stérols libres isolées du *Nectria galligena* dans les différentes conditions culturelles

Série expérimentale n°	Conditions culturelles	Stérols (mg/100 g de mycélium lyophilisé)
1	7 jours obscurité	210
2	7 jours lumière	130
3	13 jours obscurité	270
4	13 jours lumière	140
5	13 jours (7 j. O + 6 j. L)	80
6	13 jours (obscurité + 'P310')	80

rend pas compte des stérols liés qui, chez *N. galligena*, ne représentent souvent qu'une quantité très faible (de l'ordre de 1 p. 100) des stérols totaux et, de ce fait, n'ont pu être analysés, contrairement à *Leptosphaeria typhae* [11] et à *Gnomonia leptostyla* [12] où les stérols liés atteignent parfois 58 p. 100 des stérols totaux.

On constate que les teneurs en stérols des mycéliums irradiés ou cultivés à l'obscurité en présence de mycosporine sont très nettement inférieures à celles existant dans le Champignon maintenu, constamment, à l'obscurité sans P310. En particulier, l'addition de mycosporine et les irradiations tardives survenant après sept jours initiaux d'obscurité abaissent, considérablement, le 'pool' stérolique et le rendent même déficitaire par rapport à celui de cultures normalement éclairées et fertiles. On remarque que le contenu stérolique du Champignon augmente sensiblement, du 7ème au 13ème jour lorsque le Champignon se développe à l'obscurité et, au contraire, qu'il varie peu dans les cultures éclairées.

La nature et les pourcentages respectifs des différents stérols isolés du *N. galligena* figurent dans le Tableau 2. Ce Tableau 2 montre la grande diversité qualitative et

quantitative des stérols, cette mise en évidence est rendue possible grâce à l'extrême sensibilité des techniques d'analyse utilisées. Les identifications reposent sur la valeur des *R_f* en chromatographie sur couche mince (CCM) et surtout sur l'analyse des spectres obtenus en spectrométrie de masse à géométrie inversée.

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. Les caractéristiques en spectrométrie de masse des stérols isolés sont données dans le Tableau 3. Cependant, la configuration des groupes éthyl ou méthyl en C-24 ne peut pas être déduite des résultats obtenus; les 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.

Tableau 2. Nature et pourcentages relatifs des stérols libres isolés du *Nectria galligena* aux différentes conditions culturales

Sterols	M ⁺	7 jours obscurité	7 jours lumière	13 jours obscurité	13 jours lumière	13 jours 7 j.O + 6 j.L	13 jours obsc. + 'P310'
Stérols saturés							
Éthyl-24 cholestane ol-3 β*	416	< 1	1	1	2	—	2
Stérols Δ ₅							
Cholestérol*	386	1	4	2	8	10	4
Ergostatrièn-5,8,22 ol-3 β*	396	14	24	9	17	16	16
Éthyl-24 cholestèn-5 ol-3 β*	414	—	—	< 1	2	1	< 1
Stérols Δ ₇							
Cholestèn-7 ol-3 β*	386	2	2	2	2	5	2
Méthyl-24 cholestadièn-7,22 ol-3 β	398	1	1	< 1	1	2	1
Méthylène-24 cholestèn-7 ol-3 β*	398	2	2	< 1	1	3	2
Méthyl-24 cholestèn-7 ol-3 β	400	< 1	—	—	—	—	—
Stérol Δ ₇ , 4α méthyl	412	< 1	—	—	< 1	—	1
Stérols Δ _{5,7}							
Ergostérol*	396	75	64	80	64	51	64
Ergostatétraène ol-3 β	394	3	2	4	3	10	5
Ergostatrièneol-3 β	396	< 1	—	—	—	1	1
Éthyl-24 cholestatrièn-5,7,22ol-3 β	410	—	—	—	—	—	1
Cholestadièn-5,7 ol-3 β*	384	—	< 1	< 1	—	1	—
° Stérols saturés		< 1	1	1	2	—	2
° Stérols Δ ₅ totaux†		15	28	11	27	27	20
° Stérols Δ ₇ totaux†		5	5	2	4	10	6
° Stérols Δ _{5,7} totaux†		78	66	84	67	63	71
Rapport ergostérol/cholestérol		75	16	40	8	5,1	16

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 de produits de référence suivants: cholestérol (386), cholestèn-7 ol-3 β (386), ergostérol (396), lichestérol (396), 5,6 dihydroergostérol (398), épistérol (398), méthyl-24 cholestèn-7 ol-3 β (400), β sitostérol (414), β sitostanol (416).
† Les différents stérols insaturés isolés ont été classés en trois catégories selon la position des doubles liaisons sur le noyau stérolique, soit C₅-C₆ (Δ₅), soit C₇-C₈ (Δ₇), soit C₅-C₆ et C₇-C₈ (Δ_{5,7}).

Tableau 3. Principales fragmentations en spectrométrie de masse des stérols isolés du *Nectria galligena*

Stérols	M ⁺
Cholesta 5,7 diène ol 3 β	384 369 (M - Me), 366 (M - H ₂ O), 299 (M - H ₂ O - C ₅ H ₇), 271 (M - CL)
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)
Cholestène-7 ol 3 β	386 371 (M - Me), 368 (M - H ₂ O), 273 (M - CL), 255 (M - CL - H ₂ O), 246 (M - CL - 27), 231 (M - CL - 42), 213 (M - CL - 42 - H ₂ O)
Ergostatétraène ol 3 β	394 379 (M - Me), 376 (M - H ₂ O), 361 (M - Me - H ₂ O), 335 (M - 59), 271 (M - CL), 269, 253, 251
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)
Ergosta 5,8,22 triène ol 3 β	396 378 (M - H ₂ O), 363 (M - Me - H ₂ O), 337 (M - 59), 271 (M - CL), 253 (M - CL - H ₂ O), 217, 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 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
Méthylène 24 cholestane 7 ol 3 β	398 383 (M - Me), 314 (M - partie CL), 271 (M - CL - 2H) - 255 (M - CL - H ₂ O), 246, 231, 213 (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 - H ₂ O), 260, 255, 246, 231
Méthyl 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
Stérol en C ₂₉	412 397 (M - Me), 394 (M - H ₂ O), 285 (M - CL - 2H), 269, 227
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)
Ethyl 24 cholestane 5 ol 3 β	416 401 (M - Me), 398 (M - H ₂ O), 257 (M - CL - H ₂ O), 233 (M - CL - 42), 215, 290

CL = chaîne latérale.

De tous les stérols isolés du mycélium du *N. galligena*, l'ergostérol en premier lieu puis l'ergostatriène-5,8,22 ol-3 β (lichestérol), le cholestérol et l'ergostatétraène ol 3 β sont les plus abondants. Dans tous les cas, l'ergostérol représente plus de la moitié du 'pool' stérolique et sa teneur est nettement plus élevée dans le mycélium stérile développé à l'obscurité sans apport de P310 que dans les autres cultures potentiellement fertiles. Inversement, on constate que l'éclairement du mycélium ou l'introduction de la mycosporine dans le milieu favorisent la biosynthèse du lichestérol et du cholestérol qui sont en plus grande quantité que dans l'organisme stérile non irradié.

Parmi les stérols mineurs, trois composés ont été décelés uniquement dans le mycélium cultivé durant sept jours à l'obscurité, il s'agit du méthyl-24 cholestène-7 ol 3 β (M⁺400), stérol Δ 7,4 α méthyl (M⁺412) et enfin de l'éthyl-24 cholestatriène-5,7,22 ol-3 β (M⁺410) ce dernier est encore appelé corbistérol [13].

De tous les stérols isolés, seul l'ergostatétraène ol 3 β oppose, entre elles, les cultures potentiellement fertiles. En effet, la teneur de ce stérol dans le mycélium éclairé initialement est inférieure à celle observée dans toutes les autres séries expérimentales: obscurité avec ou sans P310 et éclairage tardif. Enfin, le Tableau 2 montre que des conditions inductrices de la morphogenèse sexuée provoquent une élévation globale très nette du pool des stérols Δ_5 et à un degré moindre des stérols Δ_7 , tandis que les

stérols $\Delta_{5,7}$, l'ergostérol notamment, prédominent à l'obscurité le mycélium demeurant stérile.

DISCUSSION

La comparaison des quantités de stérols totaux obtenues chez *N. galligena* dans différentes conditions et celles présentes chez d'autres espèces fongiques [11, 12] semble démontrer que la concentration globale de ces composés est en étroite relation avec les potentialités reproductrices de l'organisme considéré. En effet, chez *N. galligena*, la lumière ou un facteur photomimétique comme la mycosporine induisent la reproduction sexuée et provoquent une diminution des stérols totaux, tandis que, chez *Gnomonia leptostyla* [12], les irradiations, inhibitrices de la formation des périthèces, augmentent le contenu stérolique du Champignon. Enfin, d'une manière analogue, une très forte concentration en xylose du milieu cultural empêche la morphogenèse sexuée du *Leptosphaeria typhae* [14] et conduit à un léger accroissement du pool stérolique. Il semble donc que les stérols, dans leur totalité, ne dépendent des facteurs externes que dans la mesure où ceux-ci affectent la fertilité du Champignon.

Cette dernière relation est infirmée, sur le plan qualitatif, par les résultats obtenus chez *L. typhae* [15] où, pour un même degré de fertilité du Champignon, la nature

des stérols était très différente selon la composition du milieu cultural. Chez *N. galligena*, on note que la présence qualitative et quantitative du lichestérol (ergostatrien-5,8,22 ol-3 β) est remarquable dans tous les cas expérimentaux alors que ce composé isolé également du mycélium du *L. typhae*, est par contre, absent chez *G. leptostyla*. Le Tableau 2 démontre la variété des stérols Δ_7 et leur faible teneur par rapport aux deux autres classes de stérols Δ_5 et $\Delta_{5,7}$ présents chez *N. galligena*.

Lorsque les conditions environnantes sont favorables à la morphogenèse sexuée du *N. galligena*, l'ensemble des stérols Δ_5 , comprenant essentiellement le lichestérol et le cholestérol, augmente alors qu'inversement, les stérols $\Delta_{5,7}$ notamment l'ergostérol, diminuent. Ces résultats s'opposent à ceux obtenus pour *L. typhae* et surtout pour *G. leptostyla* dans la mesure où l'évolution également inverse du taux de ces deux classes de stérols se traduit par une régression des stérols Δ_5 et une élévation des pourcentages des stérols $\Delta_{5,7}$ en fonction de l'accroissement du degré de sexualisation. La relative faiblesse de la teneur en ergostérol ainsi que l'abaissement du rapport ergostérol: cholestérol dans les mycéliums fructifères du *N. galligena* différencient encore ce Champignon des deux espèces précédentes.

Enfin l'introduction de mycosporine dans le milieu nutritif induit une évolution du contenu stérolique quantitativement très différente de celle observée pour le Champignon gardé à l'obscurité mais parallèle à celle des cultures éclairées. Sur le plan stérolique, la mycosporine semble donc exercer le rôle d'intermédiaire biochimique entre la lumière et la réponse biologique: la morphogenèse sexuée.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Organisme et conditions culturales. La souche du *Nectria galligena* Bres. provient du développement, *in vitro*, d'un asque isolé d'un périthèce prélevé dans la nature sur chancre de pommier. Les inoculums sont constitués de fragments mycéliens obtenus de cultures maintenues à l'obscurité continue pendant 10 jours, sur milieu synthétique liquide à la température de 18°. Après ensemencement, le Champignon se développe constamment à 18° sur le substrat synthétique liquide composé comme suit: KH_2PO_4 : 800 mg— $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 250 mg— NaH_2PO_4 , H_2O : 100 mg— CaCl_2 : 50 mg— $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 15 mg/EDTA: 10 mg— $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 15 mg— MnSO_4 , H_2O : 5 mg— BO_3H_3 : 3 mg— $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1 mg— $\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1 mg—dichlorure de thiamine: 0,2 mg—hydroxychlorure de pyridoxine: 0,2 mg—biotine (D+): 0,01 mg—acide L-glutamique: 352 mg—L-alanine: 212 mg—L-asparagine, H_2O : 162 mg—maltose (D+): 4800 mg—eau distillée: 1000 ml q.s.p., pH 5,5. Ce milieu est réparti en boîte de Roux de 1 l. à raison de 100 ml par boîte.

Pour les expériences réalisées en lumière blanche l'éclairement des boîtes de culture est assuré par des tubes fluorescents lumière de jour (Sylvania-daylight F40T12), il a une valeur moyenne de $750 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ et une durée quotidienne de 12 hr. Lorsque les cultures se développent à l'obscurité en présence de mycosporine, celle-ci provient du mycélium irradié et fertile du *N. galligena* dont elle a été extraite puis purifiée selon la méthode décrite par Arpin *et al.* [4]. La mycosporine, ainsi obtenue, a été introduite, préalablement à l'ensemencement, à raison de 15 mg par litre de milieu synthétique, cette concentration correspond à la teneur optimale de P310 déterminée précédemment par l'un de nous [6].

Les analyses des stérols ont été pratiquées sur des mycéliums du *N. galligena* récoltés après 7 ou 13 jours de développement: soit

après 7 et 13 jours d'obscurité continue, soit après 7 et 13 jours de lumière à raison de 12 hr d'éclairement journalier, soit après 13 jours d'obscurité en présence de mycosporine dans le milieu nutritif, soit, enfin, après 13 jours dont 7 initiaux à l'obscurité et 6 finaux à la lumière à raison de 12 hr quotidiennes. Ces diverses conditions correspondent, respectivement, aux séries expérimentales n° 1, 3, 2, 4, 6 et 5 du Tableau 1. Pour chaque condition expérimentale, 4 à 5 lots culturaux de 120 boîtes de Roux chacun sont réalisés successivement et permettent, après regroupement des mycéliums récoltés, d'obtenir, indépendamment de la durée de la série expérimentale, des masses mycéliennes quantitativement très voisines (100 g de mycélium lyophilisé) et qualitativement très homogènes. Dans tous les cas 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). Après évaporation, les stérols libres sont précipités par la digitonine, le complexe ainsi formé est coupé par la pyridine et les stérols libérés sont recueillis et pesés. La purification des stérols s'effectue sur silice G (2 mm) 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- Me_2CO (6:3:1) [11]. On sépare ainsi l'ergostérol (R_f 0,08), le lichestérol (R_f 0,20), les stérols en Δ_5 (R_f 0,50) et les stérols en Δ_7 (R_f 0,65).

Chaque groupe de stérols est ensuite analysé par spectrométrie de masse grâce à un spectromètre de masse à géométrie inversée [16] (Varian Mat 311 A), les constituants étant caractérisés par leurs spectres MIKE (mass analysed ion kinetic energy spectra) [17]. Cette technique [18] qui permet l'analyse de mélanges complexes de composés organiques évite la séparation physique par chromatographie en phase vapeur nécessitant la préparation de dérivés silylés. En résumé, la méthode consiste à comparer le spectre MIKE de l'ion moléculaire à identifier à ceux de substances de 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.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lacoste, L. et Dehorter, B. (1973) *Ann. Sci. Nat. Bot.* **12**, 87.
2. Dehorter, B. (1972) Thèse Doctorat 3ème Cycle Lille n° 351.
3. Leach, C. M. (1965) *Can. J. Botany* **43**, 187.
4. Arpin, N., Thivend, S. et Favre-Bonvin, J. (1977) *Bull. Soc. Mycol. Fr.* **93**, 39.
5. Favre-Bonvin, J., Arpin, N. et Brevard, C. (1976) *Can. J. Chem.* **54**, 1105.
6. Dehorter, B. (1976) *Can. J. Botany* **54**, 600.
7. Elliott, C. G. (1977) *Adv. Microbiol. Physiol.* **15**, 121.
8. Hendrix, J. W. (1970) *Annu. Rev. Phytopathol.* **8**, 111.
9. Barksdale, A. W. (1969) *Science* **166**, 3907.
10. Nelson, R. R. (1971) in *Morphological and Biochemical Events in Plant Parasite Interactions* (Akai, S. and Ouchi, S., eds.) p. 181. Phytopathol. Jpn. Soc.
11. Alais, J., Lablache-Combier, A., Lacoste, L. et Vandewalle, B. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2833.
12. Fayret, J., Lacoste, L., Alais, J., Lablache-Combier, A., Maquestiau, A., Van Harverbeke, Y., Flammang, R. et Mispreuve, H. (1979) *Phytochemistry* **18**, 431.

13. Belanger, P., Zintel, J. A., Van Den Heuvel, W. J. A. et Smith, J. L. (1973) *Can. J. Chem.* **51**, 3294.
14. Vidal, G., Lacoste, L., Alais, J., Lablache-Combier, A., Maquestiau, A., Van Harverbeke, Y., Flammang, R. et Mispreve, H. (1979) *Phytochemistry* **18**, 1405.
15. Alais, J., Lablache-Combier, A., Lacoste, L. et Vidal, G. (1976) *Phytochemistry* **15**, 49.
16. Maquestiau, A., Van Harverbeke, Y., Flammang, R., Mispreve, H., Kaisin, M., Braekman, J. C., Daloze, D. et Tursch, B. (1978) *Steroids* **31**, 31.
17. Beynon, J. H., Cooks, R. G., Amy, J. W., Baitinger, W. E. et Ridley, T. Y. (1973) *Analyt. Chem.* **45**, 1023A.
18. Cooks, R. G. et Kondrat, R. W. (1978) *Analyt. Chem.* **50**, 81A.