

N° d'ordre 401

50376
1973
189

50376
1973
189

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

par Brigitte VANDEWALLE

*pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE 3° CYCLE*



LES STEROLS

DU LEPTOSPHAERIA TYPHAE (KARSTEN)

Membres du Jury : MM. les Professeurs

<i>M. DURCHON</i>	<i>Président</i>	
<i>L. LACOSTE</i>		} <i>examinateurs</i>
<i>A. LABLACHE-COMBIER</i>		
<i>M. M. BARBIER</i>		} <i>membres invités</i>
<i>Melle L. YVAN</i>		

Soutenue le 3 juillet 1973

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires

de Cryptogamie et de Chimie générale

de l'Université des Sciences et

Techniques de Lille.

- 00 -

à mes Parents

à tous ceux qui me sont chers

en témoignage d'affection

J'adresse mes remerciements :

à

Monsieur LACOSTE

qui a bien voulu me confier le sujet de cette Thèse, et m'a fait l'honneur de veiller avec patience à sa réalisation en m'initiant notamment aux problèmes biologiques.

à

Monsieur LABLACHE-COMBIER

qui m'a aidée efficacement dans mes recherches de chimie expérimentale en me prodiguant son expérience avec bienveillance.

à

Monsieur DURCHON

Directeur de l'U.E.R. de Biologie, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider mon Jury.

à

Monsieur BARBIER

Maître de recherche au Centre du C.N.R.S. de Gif-sur-Yvette, qui, en m'accueillant dans son laboratoire, m'a fait bénéficier avec gentillesse de sa grande compétence dans le domaine des stéroïdes. J'ai reçu auprès de son équipe sympathique de chercheurs, Monsieur DEVYS en particulier, des conseils très précieux.

à

Mademoiselle YVAN

Maître de Conférence à la Faculté de Chimie de Bucarest dont la présence à mes côtés, m'a toujours été d'un grand réconfort et qui, par ses encouragements, et sa grande compréhension m'a stimulée dans la poursuite de ce travail.

à

Monsieur RACADOT

Chef du Laboratoire de la clinique médicale Est de la Cité hospitalière, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance pour l'aide morale qu'il a toujours su me prodiguer ; c'est grâce à la liberté qu'il m'a accordée et aux moyens techniques qu'il a mis à ma disposition, que ce travail a pu être réalisé.

à

Madame ALAIS

j'exprime mes remerciements pour l'aide qu'elle m'a apportée.

à

Mademoiselle CHAUDORGE et à tous mes amis des différents laboratoires dans lesquels j'ai travaillé, j'adresse un grand merci pour la sympathie que j'ai trouvée auprès d'eux ; je les ai souvent mis à contribution , mais ils m'ont toujours aidée avec bonne humeur.

au

Docteur WEILL - RAYNAL de la Société Roussel - Uclaf qui nous a aimablement fourni un échantillon de stérol, j'adresse tous mes remerciements.

I N T R O D U C T I O N .

°°°°_°°_°°_

Pour de nombreux champignons, l'éclairement des cultures in vitro, constitue le facteur inducteur de la fructification sexuée, par son intervention notamment au niveau du métabolisme intermédiaire et par son implication probable dans la formation de substances fertilisantes au sein de l'appareil végétatif.

Par ailleurs chez d'autres champignons, dont la reproduction sexuée n'est pas nécessairement photo-induite, certains stéroïdes ajoutés au milieu de culture stimulent, voire même induisent la formation des organes reproducteurs ; c'est le cas de divers Phycomycètes tels que les *Pythium* et les *Phytophthora*.

OCANA (1970), suggère que ces stéroïdes ajoutés au milieu de culture, n'agiraient pas directement sur les phénomènes de reproduction, mais il laisse entrevoir la possibilité d'une transformation de ces stéroïdes en hormones.

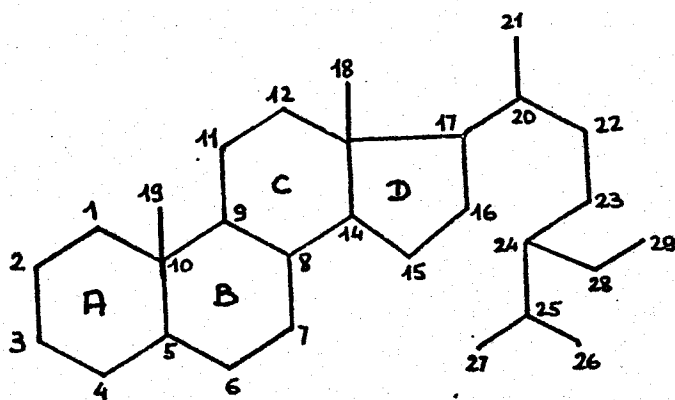
Ce type de substance médiatrice de nature stéroïdique vient récemment d'être découvert chez le Phycomycète *Achlia bisexualis* et commande la différenciation de l'appareil sexuel mâle. Cette substance a reçu le nom d'Antheridiol.

Une question se pose donc : il y a-t-il une relation entre la photoinduction et la différenciation sexuée d'une part et la production de stérol, voire d'hormones, d'autre part.

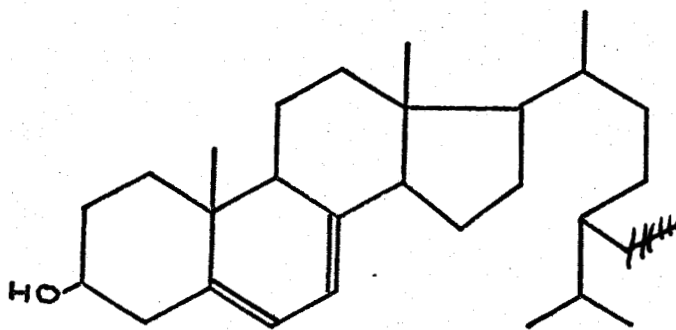
Le but de notre travail a été d'isoler et de caractériser les stérols du Leptosphaeria typhae, Ascomycète ascoloculaire de la famille des Pleosporales, au 7ème jour de sa croissance végétative, c'est à dire, selon les travaux de LACOSTE (1965), au moment où s'amorce le processus de différenciation sexuée pour les cultures effectuées à la lumière, les cultures maintenues à l'obscurité restant toujours stériles.

Il nous a paru intéressant de comparer la composition stérolique du mycélium issu des deux sortes de cultures. L'objectif poursuivi consistera si possible, à établir une relation entre le contenu stérolique et la reproduction sexuelle photo-induite.

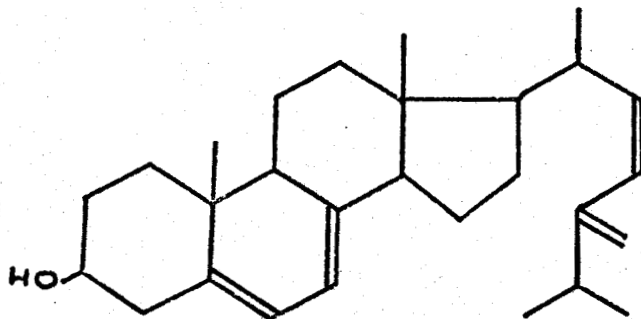
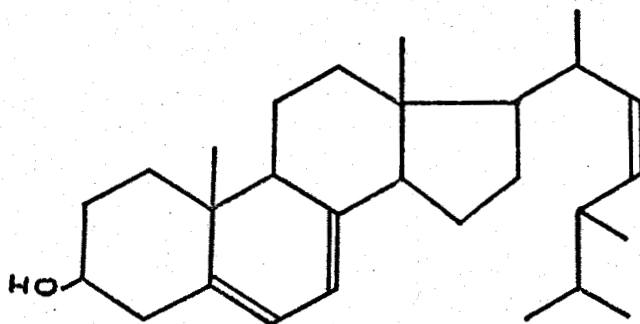
NOMENCLATURE



Squelette stérolique.

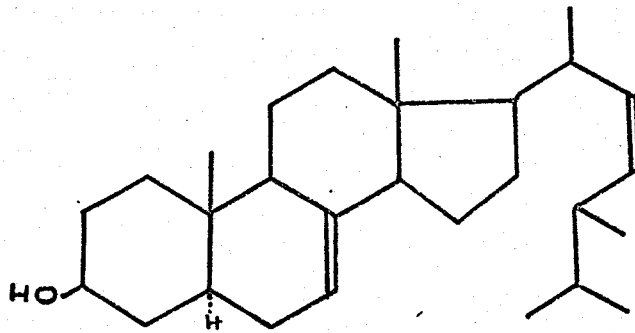
Stérols à doubles liaisons en Δ_5 et Δ_7 

dihydro- 22 ergostérol

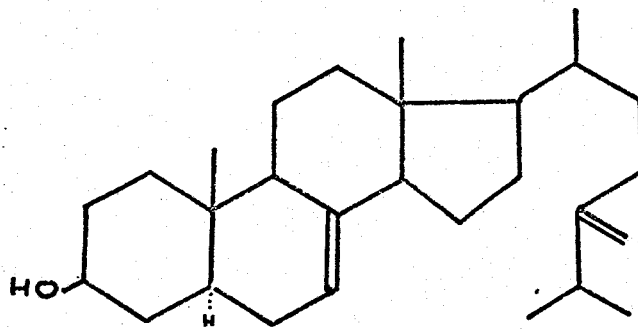
F : 153° $(\alpha)_D = - 109^\circ$ déhydro-24 (28) ergostérol
ou ergostatétraenol.F : 120° $(\alpha)_D = - 78^\circ$ 

Ergostérol

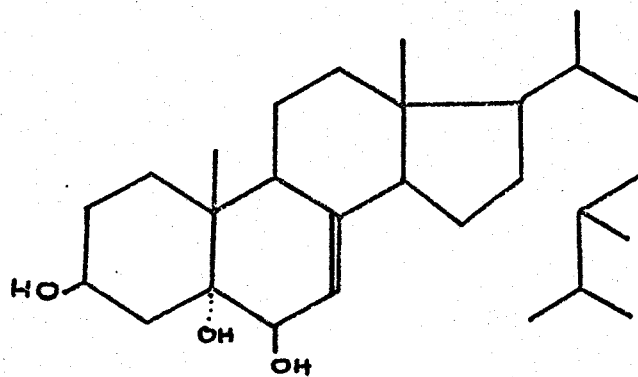
F : 165° $(\alpha)_D = - 135^\circ$ 

Stérols à double liaison en Δ_7 

dihydro-5,6 ergostérol

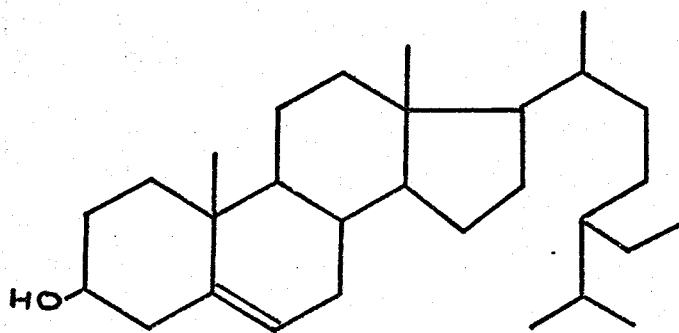
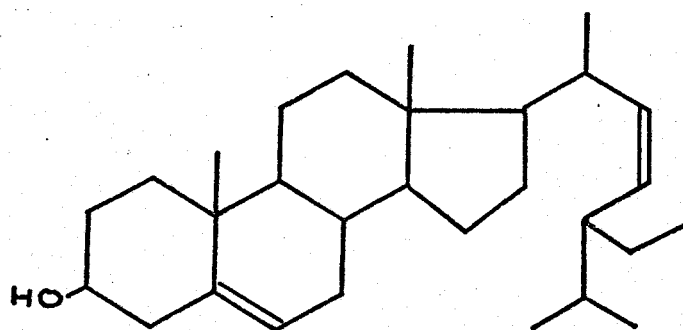
F : 174° $(\alpha)_D = -20^\circ$ 

epistérol

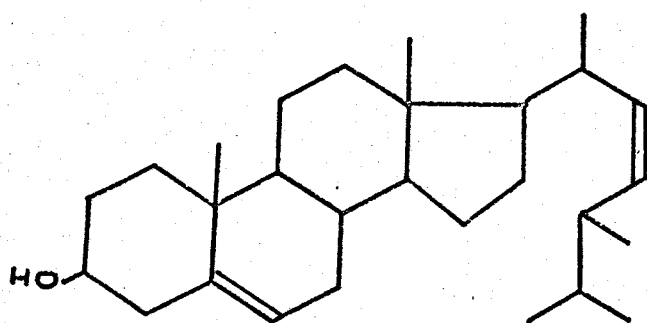
F : 151° $(\alpha)_D = -5^\circ$ 

cérevistérol

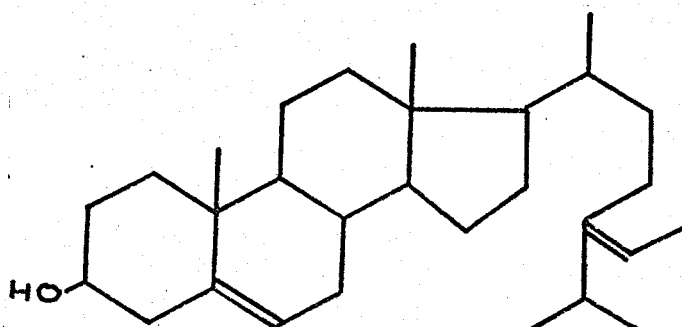
F : 256° $(\alpha)_D = -88^\circ$ 

Stérols à double liaison en Δ_5 . β sitostérolF : 140° $(\alpha)_D = -37^\circ$ 

stigmasterol

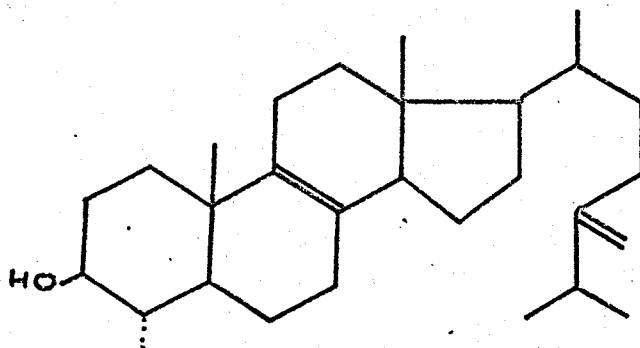
F : 170° $(\alpha)_D = -51^\circ$ 

brassicastérol

F : 148° $(\alpha)_D = -64^\circ$ 

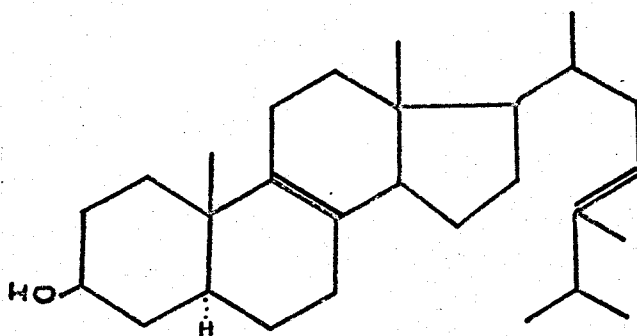
fucostérol

F : 124° $(\alpha)_D = -40^\circ$ 

Stérols à double liaison en $\Delta 8$.

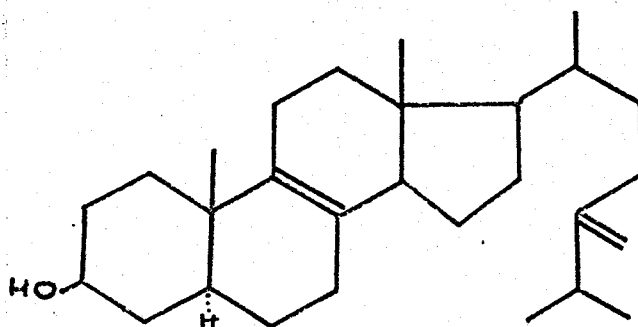
méthyl-4 α méthylène-24 (28)
dihydro-25 zymostérol

F : 144° $(\alpha)_D = + 55^\circ$



Ascostérol

F : 142° $(\alpha)_D = + 45^\circ$



Fécostérol

F = 162° $(\alpha)_D = + 42^\circ$



CHAPITRE I

LES STEROLS DES CHAMPIGNONS.

..°°_°°_°°_°°_°°_°°_

I. - GENERALITES.

Le nom de stérol (du grec stereos = solide) a été donné à l'origine aux alcools solides que l'on obtenait des insaponifiables d'extraits lipidiques tissulaires. Les stérols sont des 3 monohydroxystéroïdes qui possèdent 27, 28 ou 29 atomes de carbone ; tous les composés naturels ont un hydroxyle 3 β et presque tous une ou plusieurs doubles liaisons, qui se trouvent habituellement aux positions 5, 22 ou 7.

Une classification grossière des stérols a été établie comme suit :

- stérols animaux ou zoostérols représentés par le *cholestérol*, molécule à 27 atomes de carbone ;
- stérols végétaux ou phytostérols représentés par le β *sitostérol* qui possède 29 atomes de carbone ;
- stérols fongiques ou mycostérols représentés par l'*ergostérol* à 28 atomes de carbone.

L'*ergostérol* a été isolé pour la première fois par TANRET (1) à partir de l'ergot de seigle, Claviceps purpurea ; c'est le stérol le plus répandu chez les champignons : chez 14 dermatophytes des genres : Epidermophyton, Microsporum, Microphyton, BLANK (2) a montré qu'il représentait 0,016 à 1,5 % du poids sec. Cependant avant d'énumérer les stérols

déjà trouvés chez les Ascomycètes il faut souligner que des études plus récentes ont montré qu'il y avait de grandes interpénétrations entre les différentes classes de stérols :

- le *cholestérol* a ainsi été isolé des algues rouges (3) (4), des plantes supérieures (5) (6) et aussi des champignons (7).

- le β *sitostérol* a également été détecté dans certains champignons (8) et l'*ergostérol* chez les algues (9) (10) et chez les mollusques (11).

On ne s'étonnera donc pas de trouver chez les champignons des stérols dont la structure s'éloigne un peu de celle de l'*ergostérol*.

II. - STEROLS CONNUS CHEZ LES CHAMPIGNONS.

L'*ergostérol*, représentant principal, peut être trouvé à la fois à l'état libre et estérifié. Examinant par chromatographie sur couche mince les stérols des levures, MAUGENET et MORFAUX (12) constatent que l'*ergostérol* se trouve en partie estérifié par les acides gras qui préexistent dans les lipides de la levure : palmitate, oleate, mais ne trouvent pas de stérols mineurs.

Cependant chez d'autres espèces, des stérols différents de l'*ergostérol* en quantité non négligeable ont été cités. Chez 3 dermatophytes BLANK (13) a mentionné la présence de *brassicastérol* avec une teneur variant de 0,01 à 0,039 % du poids sec. Le même auteur a également retrouvé chez *Trichophyton schönleini* (14) un composé dont l'origine est très controversée : le *peroxyde d'ergostérol*. Ce composé synthétisé par WINDAUS (15) avait déjà été signalé chez les espèces suivantes : *Daedalea quercina* (16), *Aspergillus flavus* (17), *Fusarium oxysporum* (18), *Penicillium sclerotigerum* (19).

Le *zymosterol*, le *dihydro-5 ergostérol*, toujours trouvés dans l'*ergosterol* commercial, sont considérés comme des constituants non négligeables des levures (20) (21) (22). En 1930, WIELAND et coll. (23) ont caractérisé en plus des stérols mineurs : l'*acosterol*, l'*anasterol*, l'*episterol*, le *fecosterol*, l'*hyposterol*. Pour la première fois, en 1932 HONEYWELL et BILLS (24) ont isolé un nouveau stérol mineur : le *cerevistérol* dont la molécule possède 3 fonctions alcool mais il s'agirait peut être d'un produit d'oxydation de l'*ergostérol*.

En 1957 (25) fut découvert dans la levure de brasserie un nouveau stérol qui s'y trouve en quantité importante: (20 % du contenu stérolique): le *dehydro-24 (28) ergostérol* ou *ergostatétraenol* puis quelques autres stérols mineurs : le *dehydro-22 ergosterol*, le *fungisterol* le *dehydro-14 ergosterol*, l'*ergostatétraenol* 4, 6, 8 (14), 22 one 3.

En 1970, le *dehydro-7 clionasterol* fut isolé de Fusarium roseum par TILLMAN (26). Enfin GOULSTON (27) a isolé de Aspergillus fumigatus et de Phycomyces blakesleeanus toute une série de stérols et méthyl stérols qui pourraient constituer des intermédiaires de la transformation du lanostérol en stérol.

Ce sont le *lanosterol*, le *dimethyl-44 zymosterol*, le *methyl-4 α zymostérol* et le *méthyl-4 αméthylène-24 (28) dihydro-zymostérol* (28).

En conclusion, on peut dire que tous les stérols isolés des Ascomycètes possèdent une chaîne latérale analogue à celle du cholestérol ou à celle de l'*ergostérol*, ce qui peut rapprocher du point de vue biogénétique les levures des tissus animaux.

Une classification d'après le pouvoir rotatoire des stérols, a été proposée en 1961 par BERGMANN (29).

- Double liaison en 8 : type *zymostérol* .

$$(\alpha)_D = + 40 \text{ à } 70^\circ.$$

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| - <i>zymostérol</i> | - <i>fécostérol</i> |
| - <i>méthylzymostérol</i> | - <i>lanostérol</i> . |

- Double liaison en 7 : type *dihydro-5 α ergostérol* .

$$(\alpha)_D = 0 \text{ à } -20^\circ.$$

- | | |
|---|------------------------|
| - <i>dihydro-5 α ergostérol</i> | - <i>fungistérol</i> |
| - <i>épistérol</i> | - <i>spinastérol</i> . |

- Double liaison en 5 : type *cholestérol*

$$(\alpha)_D = -30 \text{ à } -70^\circ.$$

- | | |
|----------------------|---------------------------|
| - <i>cholestérol</i> | - <i>stigmastérol</i> |
| - <i>campestérol</i> | - <i>brassicastérol</i> . |

- Deux doubles liaisons en 5 et 7 : type *ergostérol* .

$$(\alpha)_D = -100 \text{ à } -400^\circ.$$

- | | |
|--------------------------------|----------------------------------|
| - <i>ergostérol</i> | - <i>dehydro-14 ergostérol</i> . |
| - <i>dihydro-22 ergostérol</i> | |

En terminant cette énumération il faut noter que l'obtention de stérols purs pose un problème très délicat : on sait en effet qu'ils cristallisent facilement soit seul, soit en mélange intime avec d'autres, il convient donc de citer tous ces composés avec circonspection.

CHAPITRE II

ROLE DES STEROLS CHEZ LES CHAMPIGNONS.

..°°_°°_°°_°°_°°_°°_

Presque tous les organismes contiennent des stérols. Seuls les eubactéries et quelques autres organismes primitifs parmi les proto-cariotes en sont généralement dépourvus.

Les champignons, en majorité, ont par contre la faculté de synthétiser des stérols, quelques espèces de *Pythium* seulement font l'exception. Mais le fait que dans tous les cas, l'apport exogène de stérols au milieu de culture modifie les phénomènes de croissance, de reproduction, de respiration nous incite à préciser le rôle des stérols.

A. - ROLE DES STEROLS DANS LA CROISSANCE.

On sait à la suite des travaux de ANDREASSEN (30), que la levure *Saccharomyces cerevisiae*, synthétise de l'ergostérol en milieu aérobie par contre en milieu strictement anaérobie sa croissance est presque nulle, l'apport de petites quantités d'ergostérol permet d'obtenir alors un développement égal aux deux tiers de celui obtenu en vie aérobie. Des études complémentaires de PROUDLOCK (31) montrent qu'en fait cette souche n'est pas exigeante quant à la structure de la molécule de stérol :

Une souche de *Saccharomyces cerevisiae* a été vidée de ses stérols endogènes par une culture anaérobie sur un milieu pauvre en stérols, puis

a été ensemencée sur un milieu synthétique auquel on a ajouté différentes molécules de stérols pour tester leur efficacité sur la croissance en milieu anaérobie.

On remarque que le champignon répond selon la loi du "tout ou rien", c'est à dire que certaines molécules sont tout à fait inactives, les molécules actives ont toutes en commun le fait :

- d'être plane : c'est à dire qu'elles ont une configuration α sur le carbone 5 ;
- de posséder une longue chaîne alkyl sur le carbone 17 ;
- d'avoir un groupe hydroxyle sur le carbone 3 : si on oxyde cet hydroxyle en cétone, on constate une diminution de l'activité.

D'autres souches ont par contre, selon ELLIOT (32), des besoins plus précis quant à la structure de la molécule de stérol. Ces travaux permettent de conclure que l'action des stérols sur la croissance est liée à des aspects structuraux de la molécule, en contraste avec des rôles plus compliqués de ceux-ci comme composants des membranes, ou pré-curseurs d'hormones.

B. - ROLE DES STEROLS DANS LA REPRODUCTION.

Depuis 1964 il apparaît que les stérols végétaux pourraient être impliqués dans les phénomènes métaboliques de la reproduction sexuée. Toute une série d'expériences de stimulation de la reproduction par apport exogène de stérols semble confirmer cette hypothèse, notamment chez les champignons.

HASKINS (33) qui travaillait sur un Pythium parasite d'un Fusarium, avait constaté des différences marquées dans la teneur en lipide des deux

mycélium. Or le Pythium se reproduisait sexuellement en présence du Fusarium, mais si on le séparait de son hôte il devenait stérile. Les extraits lipidiques du Fusarium rétablissaient par contre la reproduction. Ce chercheur eut l'idée d'utiliser diverses huiles comme substances stimulatrices et s'aperçut que certaines parties de l'insaponifiable étaient très actives, essayant alors une série de 40 stérols et stéroïdes, il s'aperçut que le β sitostérol et l'ergostérol stimulaient et activaient fortement la formation des organes reproducteurs.

Peu après ce premier travail, HENDRIX (34) publia à son tour une note sur l'induction de la reproduction par apport exogène de stérols chez trois espèces de Phytophthora ; LEAL (35), ELLIOT (32) arrivèrent aux mêmes conclusions en utilisant des extraits stéroliques de petits pois et d'avoine.

Le Phycomycète homothallique Phytophthora cactorum est cultivé sur avoine : sur ce milieu il se forme des oospores, par contre sur milieu synthétique composé de glucose, d'asparagine, de sels minéraux et de thiamine, sa croissance végétative est ralentie et il n'y a pas production d'oospores. L'addition d'extraits aqueux d'avoine au milieu synthétique stimule un peu la croissance mais n'induit pas la reproduction, mais par contre l'addition de 500 mg/l d'extrait d'avoine à l'éther de pétrole augmente à la fois la croissance en vitesse et en quantité, et induit la formation d'oospores. L'étude de ces extraits actifs a montré qu'ils étaient composés d'un mélange de stérols tels que le sitostérol, le cholestérol, le Δ^7 stigmastérol, le brassicastérol, l'ergostérol... Tout ceci a été confirmé par l'utilisation d'échantillons standards de stérols.

Il apparaît donc que l'absence de stérols bloque une ou plusieurs étapes de la synthèse des molécules impliquées dans la différenciation des

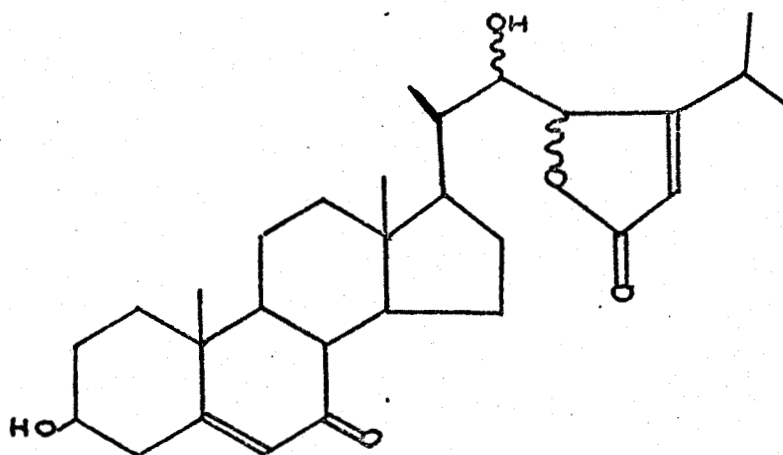
structures sexuées. On peut obtenir les mêmes résultats par l'apport de substances antagonistes : elles peuvent en effet, inhiber la production d'oospores induits par les stérols chez les Pythium, c'est le cas par exemple de l'oestradiol, du cholestanol à forte concentration, des antibiotiques polyènes.

Il y a eu inhibition de la synthèse des stérols : NELSON (36) a mis à profit cette constatation et a utilisé des inhibiteurs de la synthèse du cholestérol pour démontrer le rôle des stérols dans la reproduction sexuée de l'Ascomycète Cochliobolus carbonum : quand il ajoute l'inhibiteur S K F 3301 A au milieu de culture les périthèces ne se forment pas, mais l'addition d'une minime quantité d'ergostérol avant le 7ème jour dans les cultures normalement inhibées provoque l'apparition de périthèces. Si l'inhibiteur S K F est fourni au champignon après la différenciation des périthèces et avant la formation des asques, on empêche leur apparition mais l'addition d'une petite quantité d'ergostérol rétablit leur formation ; la même opération effectuée au 11ème jour après la différenciation des périthèces et des asques inhibe les ascospores et celles-ci peuvent être obtenues par l'apport complémentaire d'ergostérol. Mais on ne sait pas exactement quel peut être le mode d'action de celui-ci.

Par ailleurs l'analyse de stérols et de stéroïdes contenus dans certaines souches fongiques normalement fertiles, indique la présence de composés voisins de substances hormonales, jusqu'ici connues uniquement dans le règne animal.

Il a été récemment prouvé, que le Phycomycète aquatique : Achlya bisexualis (37) était capable de synthétiser une substance hormonale qui a été appelée Anthéridiol. RAPER (38) en 1939 avait établi chez cet organisme l'existence de substances hormonales actives sur le cycle sexuel

et qu'il désignait sous les symboles A, B, C, D. L'hormone A, définie par RAPER, correspond à la substance secrétée par le mycélium femelle d'Achlya bisexualis et qui provoque sur le mycélium mâle l'apparition d'ébauches de spermatocystes ou anthéridies. En 1965, cette substance a pu être isolée (37) à partir du filtrat de culture et analysée. Peu après sa synthèse (39) fut réalisée à partir d'un stérol végétal : le stigmastérol. On a pu vérifier que l'Anthéridiol synthétique possède une haute activité correspondant à l'hormone A : sa structure est la suivante :



Plus tard HENDRIX (40) a montré que des cultures de Pythium periplocum étaient capables de métaboliser le cholestérol, le β sitostérol en deux métabolites, un ester, et un composé plus polaire que le cholestérol. Le composé polaire n'a pas été caractérisé, mais il ressemble à l'anthéridiol par sa polarité et son instabilité.

Dans sa thèse, OCANA (41) a émis des suggestions à propos du rôle des métabolites de l'ergostérol : après 3 semaines de développement, il constate que l'on ne peut plus détecter d'ergostérol dans le mycélium et dans les sporocystes d'un phytophthora ou dans le milieu de culture auquel

pourtant il avait été additionné. Cependant, les extraits insaponifiables du mycélium ou de sporocystes, sont capables d'induire la formation de oospores sur un mycélium cultivé dans un milieu exempt d'ergostérol. Cette démonstration du métabolisme des stérols laisse entrevoir la possibilité d'une transformation des stérols en hormone. Mais le problème du rôle des hormones dans la différenciation sexuelle reste à définir.

C. - HYPOTHESE SUR LE ROLE DES STEROLS DANS LA PERMEABILITE CELLULAIRE.

On ignore encore tout des modalités d'action des stérols : par analogie à l'effet des ions Ca^{++} , qui ont un rôle bénéfique en tant qu'élément capital dans la croissance du champignon, on pense que les stérols, à l'instar de ces ions calcium pourraient jouer un rôle dans la perméabilité cellulaire.

Différents travaux ont montré qu'il devait y avoir une formation complexe entre les stérols et les phospholipides (42). D'autre part GOTTLIEB (43) indique que les antibiotiques polyènes qui sont des inhibiteurs de la croissance et de la reproduction des champignons, agissent en interférant sur les stérols cellulaires : ils auraient pour effet la rupture de la perméabilité cellulaire, cet effet pourrait être contre-carré par la présence de stérols exogènes.

Les membranes des mitochondries ont un rapport phospholipides/stérols très élevé et de ce fait ne sont pas beaucoup affectées par l'action des antibiotiques. Cependant par d'autres moyens on a pu montrer que des stérols étaient impliqués dans les processus respiratoires : le blocage de la synthèse des stérols dans les levures aboutit à une grande diminution

de la capacité respiratoire ; l'apport exogène de stérols rétablit les fonctions normales. SCHLOSSER (44) a montré que le Pythium ultimum cultivé sur cholestérol utilisait et catabolisait plus vite le glucose en gaz carbonique que le même mycélium cultivé sans cholestérol.

En conclusion on peut dire qu'il ne fait aucun doute que les stérols participent activement aux phénomènes de croissance et de reproduction des champignons, ce rôle est sans doute à mettre en parallèle avec celui qu'ils ont en tant que constituant de la membrane : il n'est pas impossible que leur action dans l'augmentation de la perméabilité cellulaire soit un facteur bénéfique à la croissance et à la reproduction.

Il est évident qu'il reste beaucoup de points obscurs à éclaircir mais de nombreux travaux sont actuellement en cours.

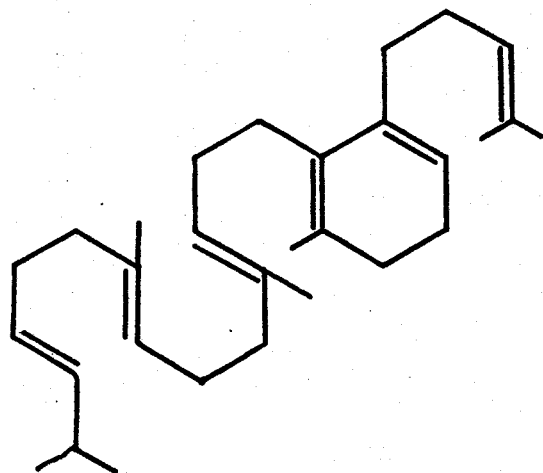
En ce qui nous concerne, nous essayons d'établir chez le *Leptosphaeria typhae* la relation entre fertilisation de la souche et présence de stérols dans le mycélium en ne perdant pas de vue que la lumière constitue un agent inducteur de la fertilisation.

Quelles sont les relations entre

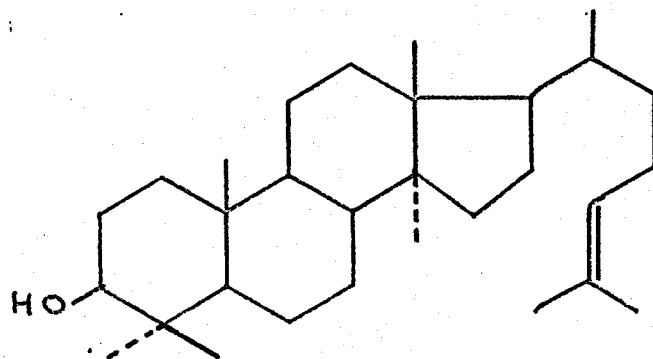
- l'action de la lumière ;
- l'action des stérols contenus dans le mycélium et la fertilisation de la souche. ?

Tout ceci est à l'étude mais il est nécessaire de commencer par définir la composition exacte des stérols contenus dans le mycélium.

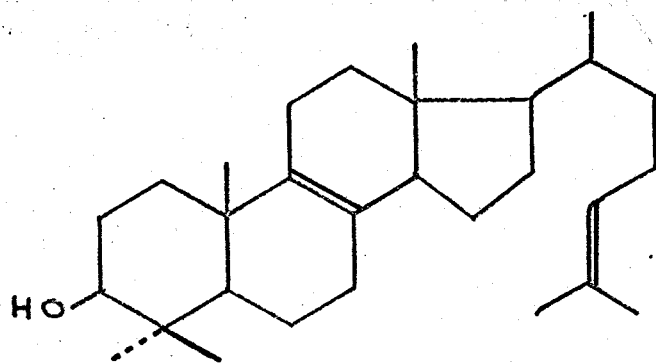
CHAPITRE III



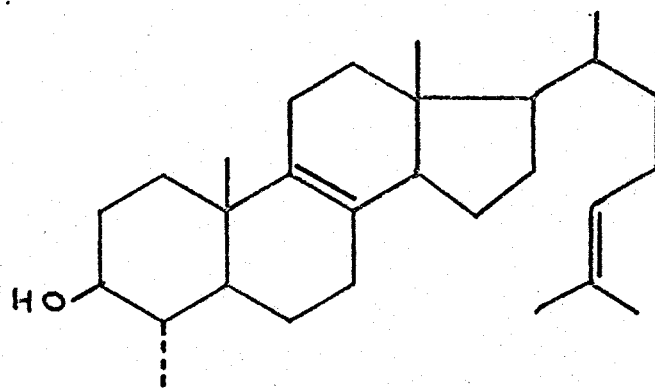
Squalène



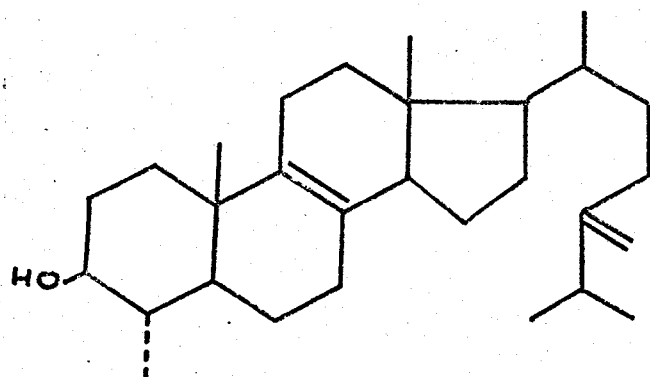
Lanostérol



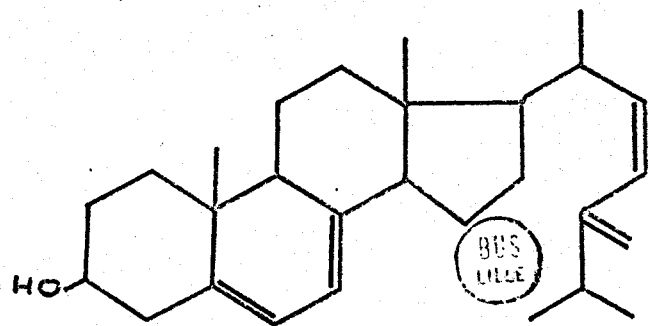
di méthyl-4,4 zymostérol



méthyl-4 α zymostérol



méthyl-4 α méthylène-24 (28)
dihydro-25 zymostérol.



déhydro-24 (28) ergostérol
ou ergostatetraenol.

BIOSYNTHESE DES STEROLS DANS LES CHAMPIGNONS.

°°°°_°°_°°_°°_°°_

HISTORIQUE.

En 1930, BILLS et MASSENGALE (45), constatant que la composition en stérols d'une souche capable d'en synthétiser dépendait essentiellement du milieu de culture, et qu'en l'absence d'une source externe de carbone on notait la conversion en stérols des glucides stockés dans la cellule, eurent l'idée d'étudier l'influence des conditions de culture, et en particulier l'influence de la source de glucides sur le contenu stérolique d'espèces déterminées.

Leurs conclusions sont les suivantes :

Le taux d'ergostérol est plus élevé pour les milieux contenant des di et trihexoses que pour ceux contenant des monohexoses, ils pensent que le clivage de ces sucres complexes libère des hexoses dont la structure est plus facilement convertible en stérols que celle de la forme stable.

Ces résultats ajoutés au fait que les substances azotées et lipidiques ne modifient en aucun cas le contenu stérolique des levures prouvent que l'ergostérol est essentiellement un produit du métabolisme des hydrates de carbone.

Le catabolisme des hydrates de carbone aboutit on le sait à la formation d'acide acétique, la théorie selon laquelle il serait le précurseur

des stérols a été confirmée par les expériences suivantes :

- En 1937, SONDERHOFF et THOMAS (46), trouvèrent que dans une incubation de levure de bière avec de l'acétate marqué au deutérium, il était possible d'isoler une fraction insaponifiable fortement marquée, constituée en grande partie de stérols. Par la suite, des nombreuses expériences aussi bien dans le règne végétal qu'animal, ont permis d'établir un schéma de la chaîne biosynthétique.

- Dans les tissus vivants on a pu montrer la formation d'acide mévalonique à partir d'acétate (47) de même dans les levures (48).

- BLOCH (49), en utilisant l'acide acétique marqué parvint à isoler chez le rat le squalène actif, lequel fut ensuite reconnu comme précurseur du cholestérol. Le squalène a été identifié plusieurs fois dans les levures (50), il s'accumule en quantité très importante quand les levures sont cultivées en anaérobiose. En culture aérobie, le squalène se cyclise en lanostérol par la voie de l'oxydo-2-3 squalène (51). WIELAND avait extrait ce lanostérol en le considérant comme un stérol qu'il avait appelé cryptostérol. Le schéma de la chaîne biosynthétique est donc le suivant :

Acétate —> mévalonate —> squalène —> lanostérol.

ETAPES FINALES DE LA SYNTHÈSE DE STÉROLS.

Elles n'ont été établies avec précision que ces dernières années. Elles divergent selon les classes d'organismes : chez les animaux le lanostérol est converti en cholestérol, chez les plantes supérieures par contre il semble que le lanostérol n'intervienne que rarement (52), et qu'il

se cyclise préférentiellement en cycloarténol (53) lequel est le précurseur des phytostérols.

Dans les levures, PONSINET et OURISSON (54), ont noté l'absence de cycloarténol, mais ont indiqué la présence de lanostérol accompagné de dérivés méthylés : le diméthyl-4,4 zymostérol et le méthyl-4 α zymostérol.

Des études récentes de KATSUKI et BLOCH (55) viennent confirmer que la transformation du lanostérol en ergostérol s'effectue par l'intermédiaire de ces dérivés méthylés.

Mais les stérols végétaux ont la particularité de posséder un carbone supplémentaire sur le carbone 24, ce groupement méthyle provient d'une réaction de transméthylation caractéristique des produits végétaux. BLOCH (56), a pu montrer par biosynthèse de l'ergostérol à l'aide de traceur isotopiques, que le carbone 28 ne provenait pas d'une molécule d'acétate mais que son origine était attribuable à une molécule de formiate. Il a affirmé que le méthyl C_{28} viendrait se fixer sur la molécule alors que la structure stéroïdienne était presque achevée. Depuis ces premiers travaux bien d'autres sont venus confirmer ce fait, actuellement le problème est de savoir si l'alkylation de la chaîne stérolique a lieu sur le lanostérol ou après la déméthylation en 4 et 14 de celui-ci.

BARTON au cours de ses recherches (57) a isolé à partir de la levure un nouveau stérol qu'il identifie avec le méthyl-4 α méthylène-24 (28), dihydro-25 zymostérol ce qui tendrait à prouver que l'incorporation du méthyl en 24 sur la chaîne latérale pourrait s'effectuer avant ou après la déméthylation en 14 α , 4 β du lanostérol.

KATSUKI et BLOCH (55) par contre, par incubation de levure sur méthionine marquée au carbone 14 n'ont pas obtenu de dérivés du lanostérol à squelette ergostane et méthylés en 4 ou 14 ; ils pensent que la transméthylation sur le carbone 24 à partir de la S-adénosylméthionine aurait lieu après complète déméthylation du lanostérol. Un stérol à 27 atomes de carbone serait accepteur de la réaction de transméthylation et ils proposent un intermédiaire du passage stérol à 27 atomes de carbone à l'ergostérol qui serait le 5,7,22,24(28)-ergostatétraène 3 β ol. Il est à noter que ce stérol a été trouvé en 1957 par BREIVIK dans les levures (58).

Dans les cellules de levure, en anaérobie ils constatent la conversion du zymostérol en ce composé, et en milieu oxygéné la transformation de celui-ci en ergostérol, l'accepteur de la réaction de transméthylation pourrait être le zymostérol ou le desmostérol (59).

REGULATION DE LA SYNTHÈSE D'ERGOSTEROL.

KAWAGUCHI (60), a étudié l'incorporation de l'acétate marqué en stérols en fonction de la concentration progressive d'ergostérol dans le milieu. Il a constaté que la conversion d'acétate en stérols diminuait avec l'augmentation de la concentration en ergostérol dans le milieu. Ces résultats suggèrent que l'ergostérol pourrait contrôler sa propre synthèse à partir de l'acétate, malheureusement en milieu acellulaire, il apparaît que l'ergostérol seul n'empêche pas la conversion. KAWAGUCHI pense que les inhibiteurs de la synthèse seraient des métabolites de l'ergostérol.

CHAPITRE IV

BIOLOGIE DU LEPTOSPHAERIA TYPHAE.

°°°°_°°_°°_°°_

Leptosphaeria typhae est un Ascomycète Pyrénomycète ascolulaire, vivant en saprophyte sur le Typha latifolia. Isolé (61) il se développe très bien sur divers milieux naturels stérilisés tels que : tiges de Typha, carottes, farine d'avoine gélosée, eau d'avoine. La propriété la plus remarquable de cet organisme est de fructifier sexuellement en quelques jours sur un substrat demeuré liquide, contrairement à la plupart des Ascomycètes qui ont besoin d'un support solide pour former leurs périthèces ou "fruits à asques".

A. - OBSERVATION SUR LA CROISSANCE ET LE DEVELOPPEMENT.

La culture sur eau d'avoine a permis d'établir la courbe de croissance, de préciser le développement de ce champignon. Les résultats sont reportés dans le graphique I.

L'étude physiologique du développement du microorganisme montre le fonctionnement dans le métabolisme intermédiaire de trois voies : le cycle citrique, le cycle glyoxylique et la formation d'acide lactique. L'équilibre entre ces trois systèmes est orienté dans le sens oxydatif pour le mycélium fertile (éclairé) alors que les voies réductrices prennent plus d'importance dans les cultures maintenues à l'obscurité et donc stériles. La stimulation de la voie glyoxylique par l'ion acétate inhibe la reproduction

sexuée. Inversement, une stimulation du métabolisme oxydatif, obtenue en facilitant le contact du mycélium avec l'air augmente le nombre de périthèces et rend leur différenciation plus précoce. Mais jamais aucun périthèce n'est apparu à l'obscurité : la lumière demeure, dans nos conditions expérimentales, le facteur d'induction indispensable à la reproduction sexuée (VIALA et VIDAL, 1972) (62).

Deux observations ont attiré l'attention :

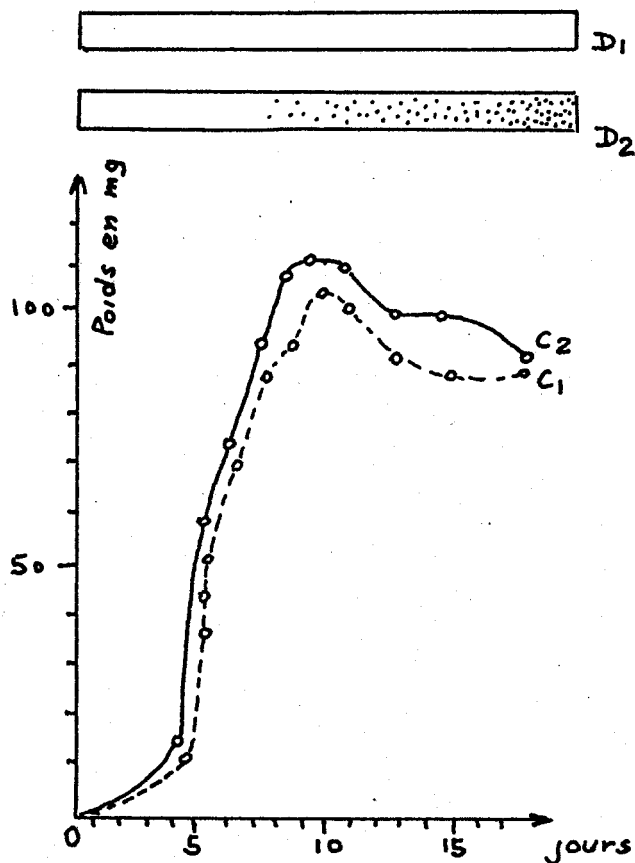
- Les souches cultivées à l'obscurité, accumulent beaucoup de lipides dans leur mycélium et sont toujours stériles ;

- En présence de lumière alternée à l'obscurité selon un rythme de 12 heures, le même organisme passe par une même phase lipidique au début de la croissance, mais au moment physiologique où se forment les premiers périthèces, les lipides intramycéliens disparaissent des filaments.

Donc l'irradiation des cultures sur milieu approprié provoquerait la biosynthèse de composés actifs dans la reproduction sexuée. L'énergie nécessaire au développement des fructifications serait fournie par catabolisme des graisses de réserve.

La sexualisation de la souche sous l'action de l'éclairement intervenant dans la partie ascendante de la courbe de croissance, il nous a semblé judicieux de pratiquer les extractions de stérols au moment où apparaissent les premières fructifications sexuelles soit au 7^{ème} jour de culture.

Graphique I : Influence de l'éclairement sur la croissance et le développement de Leptosphaeria typhae.



Trait plein : Courbe de croissance à l'obscurité

Trait discontinu : Courbe de croissance en lumière alternée d'obscurité selon un rythme de 12 heures.

D₁ : diagramme de la fructification à l'obscurité ;

D₂ : diagramme de la fructification en lumière alternée d'obscurité.

Le nombre de périthèces est proportionnel au nombre de points.

B. - TECHNIQUES DE CULTURE DU LEPTOSPHAERIA TYPHAE.

La culture est effectuée en milieu liquide, dans des fioles de Jouan qui permettent une croissance sur de grandes surfaces avec une faible profondeur, ceci pour remédier à la privation partielle d'oxygène.

1 - Milieu de culture :

20 gr. de farine d'avoine sont mis en suspension dans de l'eau distillée et placés 12 heures à l'étuve à 60°C.

Après décantation et filtration sur laine de verre, la suspension est centrifugée à 3500 tours minutes pendant au moins 15 minutes, le liquide obtenu est réparti en fioles de Jouan à raison de 100 ml par flacon et stérilisé à 110°C pendant 30 minutes.

2 - Conditions expérimentales :

L'ensemencement est réalisé aussi vite que possible après stérilisation du milieu, à partir d'un prélèvement de 2 à 3 périthèces, effectué sur une colonie de 10 jours, fertile et issue du même milieu gélosé.

Une première série de fioles est placée à 18°C et reçoit un éclaircissement de $2.000 \text{ ergs cm}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ selon un rythme de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. La seconde série maintenue à la même température demeure tout au long de l'expérience continuellement à l'obscurité. Après sept jours de culture, le mycélium, contenant ou non des périthèces selon qu'il a été placé à la lumière ou à l'obscurité est recueilli, centrifugé pour éliminer toute trace d'eau d'avoine puis stabilisé par lyophilisation pendant 96 heures.

CHAPITRE V

CHOIX D'UNE METHODE D'EXTRACTION DES STEROLS FONGIQUES
ET ETUDE CRITIQUE DE L'EXTRAIT.

°°°°_°°_°°_°°_°°_

L'ergostérol est un composé très instable, son système de doubles liaisons conjuguées le rend très fragile : nous avons en effet constaté qu'une solution pure d'ergostérol (obtenue à partir de l'ergostérol commercial cristallisé plusieurs fois dans le système éther éthylique - méthanol) abandonnée à la lumière et à l'air devenait très rapidement jaune et odorante et par chromatographie sur couche mince, nous avons mis en évidence l'apparition de plusieurs produits d'oxydation dont le peroxyde d'ergostérol.

Cette sensibilité de l'ergostérol à tout agent oxydant nous a contraint à adapter les méthodes classiques d'extraction à notre problème.

A. - CHOIX D'UNE METHODE D'EXTRACTION.

La validité des méthodes classiques a donc été appréciée selon le comportement de l'ergostérol soumis aux différents traitements.

- Méthode d'extraction avec saponification en milieu basique de
REINARTZ, LAFOS, WETZEL (63) :

La saponification par la potasse en solution aqueuse à 5 % entraîne une dégradation partielle de l'ergostérol, de plus le peroxyde

d'ergostérol, qui est considéré par certains auteurs comme un produit naturel se décompose lors de l'acidification qui suit la saponification (64). Cette méthode qui permet d'extraire la majeure partie des stérols des cellules fongiques ne peut être employée car elle les dégrade.

- Méthode d'extraction de MONNER et PARKS (65) :

Selon ces auteurs, les quantités de stérols obtenues lors de l'extraction par les méthodes avec saponification ne sont pas reproductibles, ils expliquent ce fait par la présence de complexes stéroliques, hydrosolubles (stérols - protéines - polysaccharides) qui résistent très bien à la saponification et ne sont donc pas extractibles par les solvants organiques. La méthode qu'ils ont mise au point peut être schématisée de la façon suivante : après précipitation du complexe protéine-stérol par l'acide trichloracétique, les stérols sont libérés des agents solubilisants et de leurs esters par chauffage à 110° dans le diméthyl sulfoxyde ; l'alcalinisation du milieu, évite l'extraction parasite de lipides méthylés. L'ergostérol, soumis aux traitements de cette méthode, s'est considérablement dégradé .

- Méthode selon BLANK (66) :

Le mycélium stabilisé par lyophilisation est extrait dans un soxhlet par l'éther de pétrole 35-60° pendant 7 jours. Dans ces conditions, l'ergostérol se dégrade.

Pour assurer sa stabilité, nous avons effectué l'extraction en absence de lumière et d'oxygène ; pour ce faire le soxhlet étanche a été relié à une pompe à vide et à un réservoir d'azote pour éliminer l'air du milieu et l'enrichir progressivement en azote, l'ensemble a été placé

dans une pièce noire. Modifiée de cette façon, la méthode de BLANK peut convenir à notre problème.

B. - RESULTATS D'UNE PREMIERE EXTRACTION ET ETUDE CRITIQUE DE L'EXTRAIT.

Les premières extractions ont porté, l'une sur une culture correspondant à 135 fioles de Jouan placées à l'obscurité, l'autre sur 240 fioles soumises à un éclairage de 12 heures par jour.

Dans les deux cas on obtient par fiole environ 100 mg de mycélium stabilisé qui, après extraction et évaporation des solvants d'extraction, donne un résidu huileux correspondant au 1/20 du poids de mycélium sec environ.

- Analyse en chromatographie sur couche mince :

Les deux extraits ont été déposés sur des plaques de silicagel, qui ont été développées dans les systèmes :

A : chloroforme/acide acétique/éther éthylique 97/0,5/2,5 V/V.

B : benzène/acétate d'éthyle 5/1 V/V.

Ces plaques ont été révélées par la réaction de Liebermann-Burchard et par la réaction à la vanilline dans l'acide phosphorique.

Deux taches principales apparaissent sur les plaques :

- leurs Rf relatifs à l'ergostérol qui a été déposé comme témoin sont dans le système A.

- 1 pour la première tache

- 2,75 pour la deuxième tache.

- dans le système B, respectivement 1 et 2,30.

La première tache correspondant à l'ergostérol, est sans doute un mélange de stérols dont la composition est à déterminer.

La deuxième tache qui a un Rf élevé est un composé peu polaire et fait penser à un ester ; en effet un ester de l'ergostérol : l'acétate que nous avons formé par action de l'anhydride acétique sur l'ergostérol dissous dans la pyridine et chromatographié dans le système A, a un Rf relatif à l'ergostérol de 2, 5.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'effectuer une saponification sur l'extrait de champignon ; mais avant il fallait s'assurer que celle-ci ne dénaturait pas les stérols, puisque nous avons constaté que la méthode proposée par REINARTZ (63) dégradait l'ergostérol en produits d'oxydation dont l'un a notamment un Rf élevé.

Par contre, une saponification ménagée, c'est à dire chauffage à reflux pendant deux heures sous azote et à l'obscurité, d'une solution d'ergostérol dans le mélange potasse méthanolique 2 N - benzène (1/1), assurait une stabilité convenable de l'ergostérol.

L'extrait fongique a été saponifié dans ces conditions. Puis après extraction de l'insaponifiable à l'éther éthylique, lavage de cet éther à l'eau et évaporation des extraits éthérés, nous avons déposé pour contrôle un aliquot sur plaque de silicagel. Nous avons constaté que la tache de front avait disparu : il s'agissait donc bien d'un ester.

Par chromatographie préparative, nous avons isolé les esters de l'extrait de champignon. Afin de déterminer quels étaient les acides gras engagés, nous avons coupé les esters par méthanolyse selon le protocole suivant :

Addition au mélange d'ester de

- 3 ml méthanol
- 6 gouttes d'acide sulfurique concentré.

Le tout a été porté au bain marie à 70° pendant deux heures. Les esters méthyliques d'acide gras ont été extraits par agitation par 3 ml d'éther de pétrole et 3 ml d'eau. La phase étherée a été récupérée et chromatographiée en phase gazeuse sur une colonne D E G S à 10 % à une température de 180°.

Par comparaison de l'extrait méthylé des acides gras contenus dans le champignon, avec des esters méthyliques d'acides gras de référence, nous avons identifié : l'ester palmitique et l'ester stéarique.

Les stérols estérifiés sont donc des palmitates et des stéarates.

- Problème relatif au peroxyde d'ergostérol :

Pour terminer cette étude sommaire de la composition de l'extrait fongique, il faut noter que notre attention a été attirée par une tache de Rf égal à 0,56 dans le système A, et 0,50 dans le système B, que l'on trouve quelquefois sur le chromatoplaque mais pas d'une façon constante.

Ce composé coloré en vert par la vanilline, a le même Rf que le peroxyde d'ergostérol que nous avons synthétisé.

Le problème était de savoir s'il était un produit naturel ou s'il résultait de la décomposition de l'ergostérol. A l'heure actuelle le sujet est discuté:

Le peroxyde a été trouvé par BLANK chez Trichophyton schönleini (67), par TANAHASHI chez Daedalea quercina (68) par STARRAT

et MADHOSING chez Fusarium oxysporum (69), par contre ADAM observe chez Piptoporus betulinus et Daedalea quercina l'absence de peroxyde d'ergostérol dans les extraits fraîchement préparés et pense que le peroxyde provient d'une oxydation ultérieure de l'ergostérol (70). De même VACHERON et MICHEL en cultivant Aspergillus flavus découvrent que le peroxyde d'ergostérol et le cérévistérol sont toujours présents à côté de l'ergostérol dans les cultures effectuées en présence de lumière et absents lorsque toutes les opérations, culture, extraction, purification, isolement sont effectuées à l'obscurité. Ces auteurs en déduisent "que les compagnons" de l'ergostérol (peroxyde d'ergostérol et cérévistérol) chez Aspergillus flavus sont "des artefacts et non des métabolites du microorganisme" (71).

Chez le Leptosphaeria typhae, le fait, d'une part que le peroxyde soit trouvé quelquefois dans des extraits de cultures effectuées à l'obscurité, et soit d'autrefois absent des extraits de cultures effectuées à la lumière, tend à prouver qu'il se forme au cours de l'analyse chromatographique, et nous avons faits nôtres les précautions prises par CLAUDE et BAUMONT (72) qui après avoir noté les dégradations du cholestérol au cours de manipulations proposent un protocole de travail :

" Toute phase d'attente des échantillons doit être réalisée sous vide ou gaz inerte, azote, pour éviter l'autoxydation.

Les solvants utilisés pour les opérations analytiques doivent toujours présenter un haut degré de pureté : l'éther éthylique en particulier peut provoquer d'importantes altérations s'il n'est pas rigoureusement exempt de peroxydes.

Les agents adsorbants : kieselgel, alumine, utilisés pour la chromatographie, sont capables dans certaines conditions, de dégrader la molécule de stérol, il semble très probable que cette action soit due à une adsorption de vapeurs ou de substances oxydantes lors d'un stade quelconque de la préparation ou de l'activation de l'adsorbant. Ces altérations

sont toujours évitées en prenant de grandes précautions techniques : préparation extemporanée, dessiccation en étuve). Les conditions d'emploi des adsorbants sont essentielles. Les solvants des cuves à chromatographie doivent être changés très fréquemment et il paraît préférable de les renouveler quotidiennement".

Si ces conditions opératoires sont respectées, il apparaît que les chromatographies ne sont pas capables, à l'obscurité, d'altérer la molécule d'ergostérol.

CHAPITRE VI

METHODES DE DETERMINATION DES STEROLS.

-°°-°°-°°-°°-°°-

Une étude détaillée des stérols a été réalisée. :

Pensant que du point de vue biologique, les stérols libres pouvaient jouer un rôle différent de celui des stérols estérifiés ou conjugués, nous avons réalisé une extraction des stérols en plusieurs temps :

- une première extraction du mycélium, par l'éther de pétrole (30 - 60°) pendant 24 heures, a libéré les stérols libres essentiellement mais avec cependant quelques traces d'esters que nous avons séparés par chromatographie en couche mince et additionnés aux produits de l'extraction suivante ;

- une deuxième extraction a été réalisée par des solvants plus polaires tels que :

- méthanol pendant 24 heures
- éther éthylique pendant 24 heures.

Ces deux derniers extraits réunis ont été saponifiés pendant 2 heures à reflux sous azote à l'obscurité dans le mélange potasse méthanolique 2N/benzène (1/1). Après extraction de l'insaponifiable à l'éther éthylique, nous avons obtenu un mélange de stérols qui étaient primitivement estérifiés.

- enfin, pour extraire les stérols hydrosolubles éventuellement présents, et qui n'auraient pas été extraits précédemment, nous avons

effectué une extraction à l'eau pendant 48 heures selon le protocole suivant (73) :

Le mycélium résiduel est extrait 48 heures par 200 ml d'eau distillée. Après évaporation de l'eau, l'extrait sec est repris par une solution acide (2 N) de méthanol aqueux :

H ₂ O	40 ml
méthanol	60 ml
HCl concentré	20 ml.

La solution est abandonnée pendant 4 jours à température ambiante, à l'obscurité et sous atmosphère d'azote, puis est extraite par l'éther de pétrole ; le résidu d'extraction contient les stérols hydrosolubles en milieu acide.

La solution acide restant après l'extraction est neutralisée par la potasse et évaporée à sec. L'extrait est repris par une solution basique de pyrogallol dans le méthanol aqueux :

30 ml de pyrogallol à 0,5 % dans le méthanol
20 ml de potasse à 60 % dans l'eau
30 ml de méthanol.

La solution est chauffée à reflux pendant 2 heures sous atmosphère d'azote, puis extraite par l'éther de pétrole. Le résidu d'extraction contient les stérols hydrosolubles en milieu basique.

Ces 3 étapes d'extractions ont été réalisées à la fois sur du mycélium provenant de cultures effectuées à l'obscurité continue, pendant 8 jours, et sur du mycélium provenant de cultures effectuées selon un rythme d'éclairement de 12 heures par jour pendant 8 jours.

Chaque série d'extraction a porté sur environ 70 grammes de mycélium sec soit sur 700 fioles mises en culture.

Des résidus huileux obtenus après évaporation des solvants, il faut isoler les stérols, les purifier, les séparer, puis les caractériser.

A. - ISOLEMENT DES STEROLS.

Les stérols ont une tendance très marquée à former des composés moléculaires entre eux, ou bien avec une sapogénine : la digitonine ; la formation avec cette dernière de complexes très peu solubles dans l'éthanol est particulièrement spécifique et générale parmi les molécules possédant un hydroxyle en position 3β . La séparation par la digitonine représente une méthode chimique particulière du domaine des stérols et stéroïdes.

Si l'on traite par la digitonine un mélange de 3α et 3β hydroxystéroïdes en solution alcoolique seuls les seconds sont en grande partie précipités sous forme de complexes très faiblement solubles. On peut les libérer par la suite de leur complexe en les chauffant en présence de pyridine.

- Protocole :

Les opérations doivent être effectuées le plus rapidement possible et à l'obscurité. Les extraits huileux dissous dans l'éthanol à 90° sont chauffés puis mélangés à une solution chaude de digitonine dans l'éthanol. Après refroidissement la solution est abandonnée une nuit au réfrigérateur à 4° pour que la précipitation du complexe soit totale. Le précipité est coupé par la pyridine à chaud, et les stérols libérés sont extraits par l'éther éthylique. L'extrait sec de stérols est séché sous vide dans un dessiccateur contenant de l'acide sulfurique concentré qui capte les trace de pyridine résiduelle.

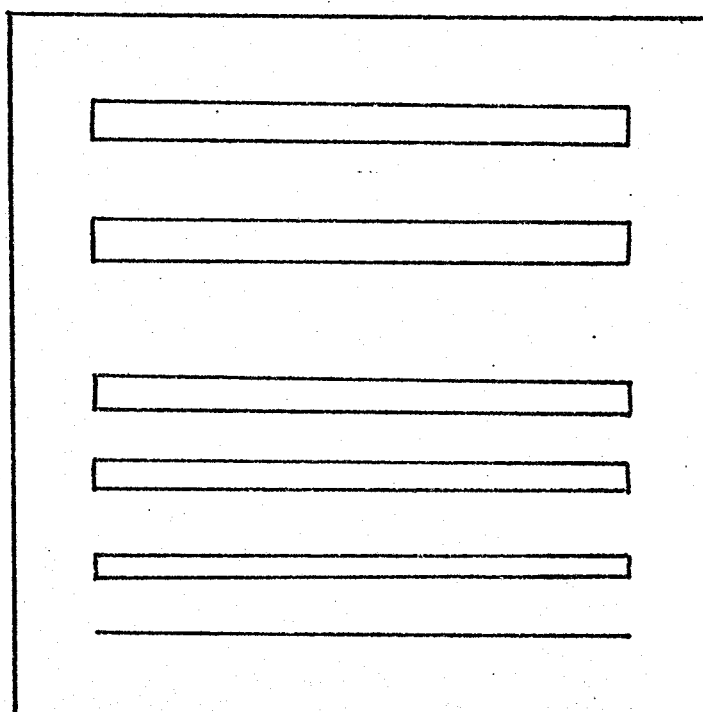
B. - PURIFICATION DES STEROLS.

Les extraits stéroliques sont purifiés par chromatographie préparative sur couche mince de gel de silice. Tous les stérols ont un Rf à peu près identique et voisin de celui de l'ergostérol. Après migration, la bande correspondant aux stérols est découpée, les stérols sont élués et après évaporation des solvants on obtient des substances blanchâtres.

C. - SEPARATION DES STEROLS.

Le mélange de stérols est séparé par chromatographie sur couche mince sur alumine imprégnée de nitrate d'argent. Sur ces plaques, les différentes molécules composant le mélange de stérols peuvent se séparer selon leur degré d'insaturation : une molécule sera d'autant plus retenue qu'elle possède davantage de doubles liaisons. A nombre de liaisons égal, la position de celles-ci semble avoir de l'importante : une molécule possédant dans sa chaîne latérale une double liaison entre C₂₂ - C₂₃ sera moins retenue qu'une autre possédant une double liaison entre C₂₄ - C₂₅ ou C₂₄ - C₂₈.

Les différentes molécules composant la tache stérolique migrent dans l'ordre suivant : diènes conjugués - Δ_5 stérols - Δ_7 stérols - méthylstérols - Alcools triterpéniques.



Alcools
triterpéniques

méthyl - stérols

Δ_7 stérols

Δ_5 stérols

diènes conjugués

Par cette chromatographie, il est possible de séparer des composés qui ont les mêmes Rf sur plaque de gel de silice pur.

- Protocole :

A 60 ml d'eau on ajoute 10 g de nitrate d'argent, après solubilisation de celui-ci on ajoute à la solution le mélange Alumine neutre type T : 30 g, plâtre à modeler : 5 g.

Les plaques sont séchées une nuit à l'obscurité et activées avant l'emploi pendant 10 minutes à 110°. Elles sont développées dans le système chlorure de méthylène, éther de pétrole, acétone (70/30/10, V/V).

Après migration du solvant, les plaques sont vaporisées par une solution de dichlorofluorescéine dans l'éthanol à 0,1 %. Les taches sont repérées à la lumière ultra-violette.

D - CARACTERISATION DES STEROLS.

Les stérols ont été caractérisés par les différents procédés suivants :

- réactions colorées
- chromatographie en phase gazeuse
- spectrométrie ultra-violette
- et surtout spectrométrie de masse.

1 - Réactions colorées :

- Réaction de LIEBERMANN-BURCHARD :

Elle caractérise généralement les stérols possédant un hydroxyle sur le carbone 3 en position β et une double liaison entre les carbones 5 et 6.

On pulvérise sur la plaque une solution fraîchement préparée du mélange : acide sulfurique - anhydride acétique - chloroforme (1/20/50, V/V).

Les taches apparaissent colorées en vert. La réaction peut être effectuée en milieu liquide pour mettre en évidence les stérols en solution : on utilise l'acide sulfurique concentré et l'anhydride acétique dans le chloroforme. Le cholestérol et d'autres Δ_5 -stérols donnent une coloration bleu-vert, qui se développe lentement, le maximum d'intensité étant atteint au bout de 30 minutes, c'est l'une des réactions les plus couramment employées pour le dosage des stérols.

Les stérols insaturés en 7 ou en 5,7 donnent une coloration semblable très rapidement 1 mn 30 sec. Avec les stánols, qui sont saturés, la coloration est faible ou même inexistante.

- Réaction à la vanilline :

On pulvérise sur la plaque une solution de vanilline dans l'acide phosphorique (1 g pour 100 ml). Les taches apparaissent rapidement après passage à l'étuve à 110°C pendant 10 minutes, avec une coloration rose, violette, verte selon les fonctions.

- Réaction à l'acide sulfurique à 50 % :

La solution est pulvérisée sur les plaques qui sont ensuite chauffées à 78°C pendant 10 minutes. Les stérols apparaissent colorés :

	Couleur initiale	Couleur finale (après passage à l'étuve)
Ergostérol	Jaune	Noir
Dermostérol	Rose	Gris
β -sitostérol	Rose gris	Pourpre
Stigmastérol	Rose	Gris
Lanostérol	Jaune	Brun
Cholestérol	Rose gris	Pourpre.

- Réaction de MOORE et BAUMAN (74) :

Cette réaction permet en milieu liquide, de distinguer les stérols Δ_5 des stérols Δ_7 : une solution du réactif suivant est préparée :

- anhydride acétique : 19 ml
- acide sulfurique concentré : 1 ml.

A 4 ml de cette solution fraîche, on ajoute 2 ml de la solution de stérol dans l'acide acétique :

- les dérivés Δ_7 apparaissent immédiatement colorés en vert.
- les dérivés Δ_5 ne se colorent qu'au bout de 30 minutes environ.

2 - Chromatographie en phase gazeuse :

C'est une méthode de séparation de substances volatilisables par écoulement gazeux sur une phase stationnaire. Le temps de rétention est une valeur constante pour chaque constituant ; cette valeur facilement reproductible à 1 % près, sert à l'identification de chaque pic. Des échantillons standards, quand ils existent, s'avèrent très utiles pour cette identification.

La chromatographie en phase gazeuse a surtout permis de contrôler la pureté des stérols séparés préalablement.

Les stérols ont été chromatographiés sous la forme libre sur - des colonnes non polaires de silicones telles que :

- 1 % S.E. 30 de 3 mètres de longueur, sur chromosorb W. 100-200, le four étant porté à une température de 235°, et les débits d'azote et d'hydrogène étant voisins de 20 ml par minute.

- 5 % S.E. 30 à une température de 260°

- des colonnes plus polaires telles que : 0,60 % X.E. 60 + 35 % S E 30 sur chromosorb W 100-200.

3 - Spectrométrie ultra-violette :

En chimie organique, l'absorption ultra-violette et visible n'est observée que si certains groupes, appelés chromophores se trouvent dans la molécule. L'effet du rayonnement ultraviolet est de promouvoir les électrons du niveau énergétique où ils se trouvent (l'état fondamental de la molécule) à un niveau énergétique plus élevé (donc instable). correspondant à un état électroniquement excité de la molécule. La longueur d'onde à laquelle a lieu cette transition est caractéristique de chaque chromophore, elle est d'autant plus élevée que le chromophore est plus conjugué.

4 - Spectrométrie de masse :

a - Principes généraux :

Cette méthode consiste à bombarder la substance dont la structure est recherchée par un faisceau d'électrons et à examiner la nature et l'abondance relative des ions positifs résultant de cette opération.

La séparation de ces ions positifs s'effectue selon leur masse (ou plus exactement selon le rapport de leur masse à leur charge ; mais la plupart de ces ions ne portent qu'une charge égale à la valeur absolue de celle de l'électron).

Le spectre de masse est obtenu en bombardant la substance avec des électrons dont l'énergie est de l'ordre de 70 électrons-volts. Dans ces conditions chaque molécule se brise et de nombreux fragments ioniques sont formés. La représentation graphique des abondances relatives de ces divers fragments ioniques en fonction de leur masse constitue le spectre de masse du composé introduit dans la chambre d'ionisation. Afin de comparer les abondances relatives des divers ions on attribue au pic le plus intense (appelé pic de base) la valeur 100, l'intensité des autres pics du spectre étant définie en pour cent du pic de base.

- Règles générales : Les ruptures de liaisons se font préférentiellement aux atomes de carbone les plus substitués. Il s'agit là de la conséquence de la règle relative aux stabilités des carbocations tertiaires, secondaires et primaires : ainsi les cycles saturés ont tendance à perdre leur chaîne latérale. Les structures cycliques, les doubles liaisons stabilisent l'ion parent et augmentent sa probabilité d'apparition dans le spectre.

Les doubles liaisons favorisent les coupures du type allylique en donnant naissance aux carbocations allyliques stabilisés par résonance.

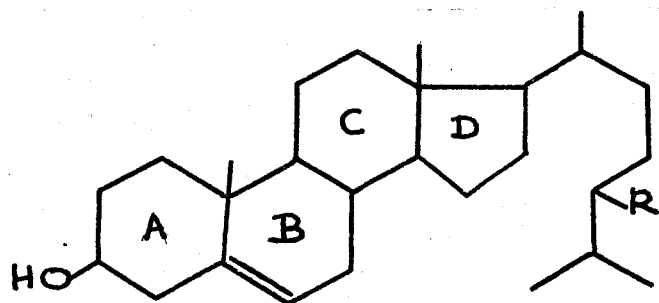
b - Application aux stérols :

Les spectres de masse des stéroïdes et substances apparentes ont été étudiés par de nombreux groupes. En 1956 DE MAYO et REED (75) obtiennent les spectres de masses de quelques composés et

montrent que l'on peut ainsi déterminer à la fois la masse moléculaire et la taille de la chaîne par cette technique.

Tous ces spectres indiquent la prédominance de certaines fragmentations dues notamment à l'élimination de la chaîne latérale, de la chaîne latérale + 42 unités de masse (invoquant la perte de 3 carbones supplémentaires), à l'élimination d'eau ou d'acide acétique des groupes hydroxyles ou acétates.

Les stérols végétaux qui ont un ou deux atomes de carbone supplémentaire sur le carbone 24 forment des familles de série homologue. Les membres de ces familles ont un noyau identique et ne diffèrent que la longueur de la chaîne latérale.



- R = H

- R = CH₃ : méthyl-24 cholestérol
= campesterol.

- R = C₂H₅ : éthyl-24 cholestérol
= β sitostérol.



L'analyse des spectres de ces familles a été mise à profit par ENEROLK, HELLSTROM RYHAGE (76) pour distinguer les ions qui concernent le noyau, c'est à dire les ions communs à tous les membres, et qui impliquent la perte de la chaîne latérale de ceux qui montrent une augmentation successive de 14 unités de masse, correspondant à des coupures analogues sur toute la molécule.

Ainsi par la publication des spectres du 5 β cholestane. 3 β ol et de ses deux homologues en C₂₄, ENEROLK a montré que :

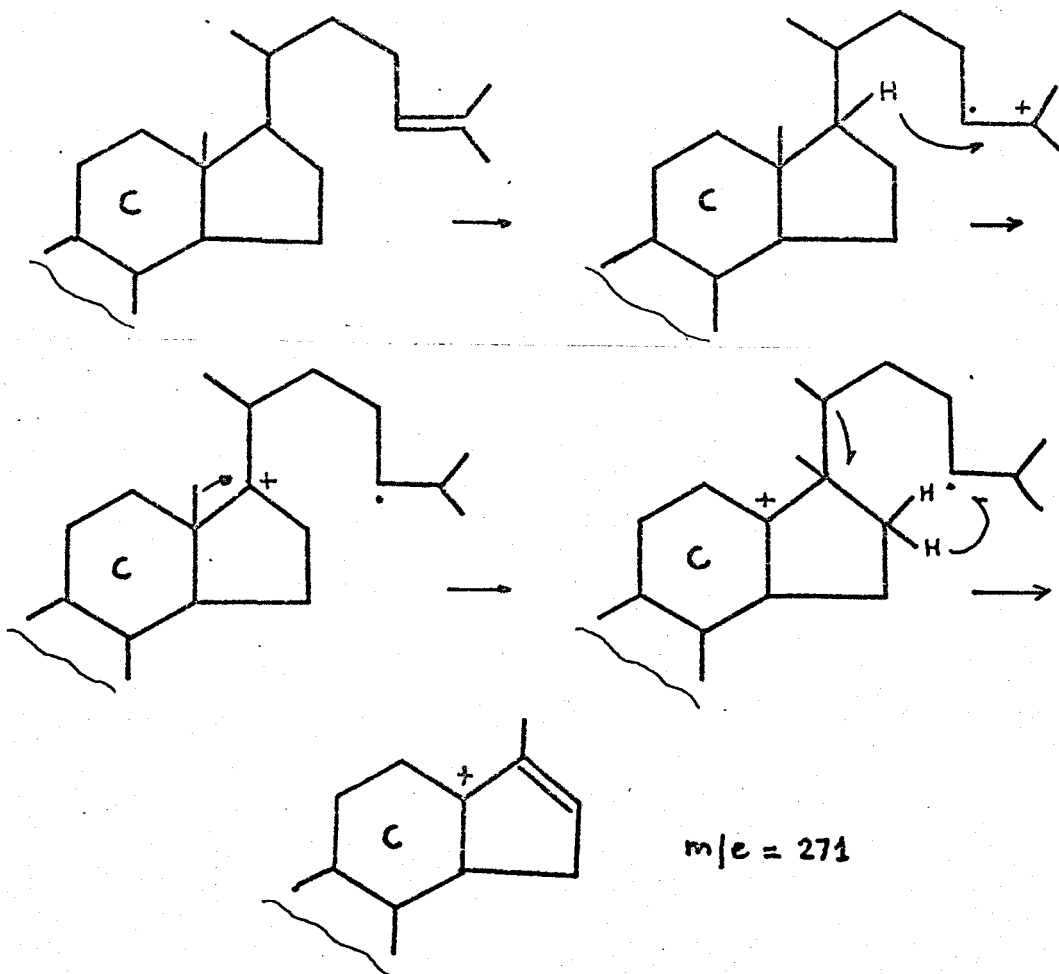
- le pic moléculaire = M
- les ions a : M - 15
- b : M - 18 (H-OH)
- c : M - (15 + 18).

présentent tous une augmentation de 14 unités de masse entre les membres successifs de la série. Tandis que

- les ions d : M - chaîne latérale : m/e = 273
- e : M - (chaîne latérale + 18) : m/e = 255
- f : M - (chaîne latérale + 42 - cycle D) : m/e = 231
- g : M - (chaîne latérale + 42 + 18) : m/e = 213.

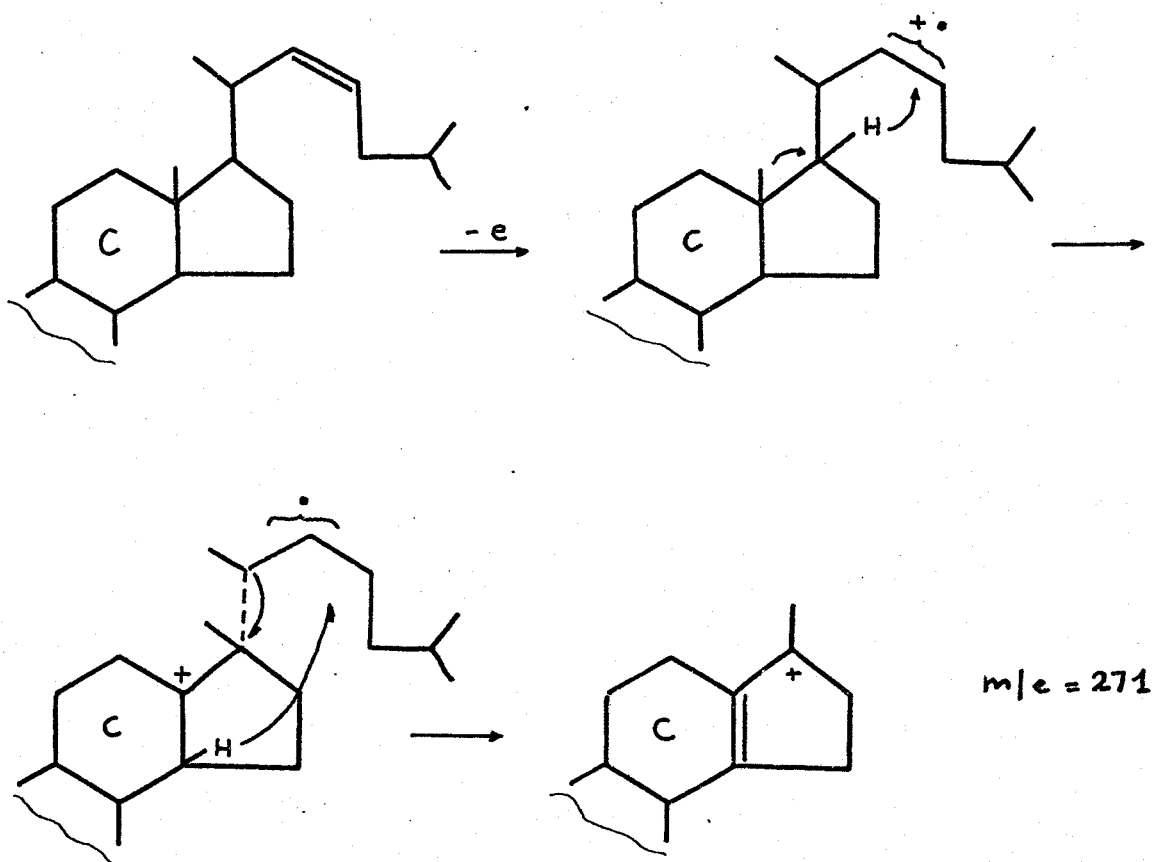
sont communs aux trois spectres avec des intensités relatives équivalentes. Le mécanisme des coupures a été démontré principalement par les travaux de DJERASSI et WILLIE (77). Ils ont synthétisé des oléfines stéroliques, et montré que l'insaturation de la chaîne induisait des coupures particulières. Ainsi la présence d'un pic majoritaire à m/e = 271 dans le spectre d'un stérol inconnu indique que le composé a probablement le noyau stérolique usuel (Δ_5 , $3\beta\text{OH}$) avec une double liaison dans la chaîne latérale.

- Explication donnée par DJERASSI de la présence d'un pic m/e = 271 dans un composé possédant une double liaison dans la chaîne latérale.



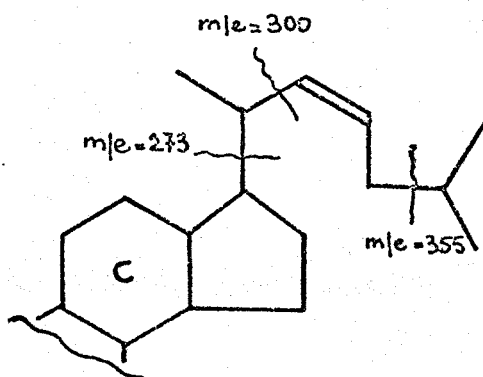
Il y a migration du groupe C_{18} vers le centre déficient en électron C_{17} , dû au départ d'un atome d'hydrogène, l'abstraction d'un second atome d'hydrogène suivi par l'homolyse de la liaison 17 - 20, donne l'ion allylique stabilité $m/e = 271$.

Dans le cas d'une double liaison $C_{22} - C_{23}$, nous avons de manière identique :

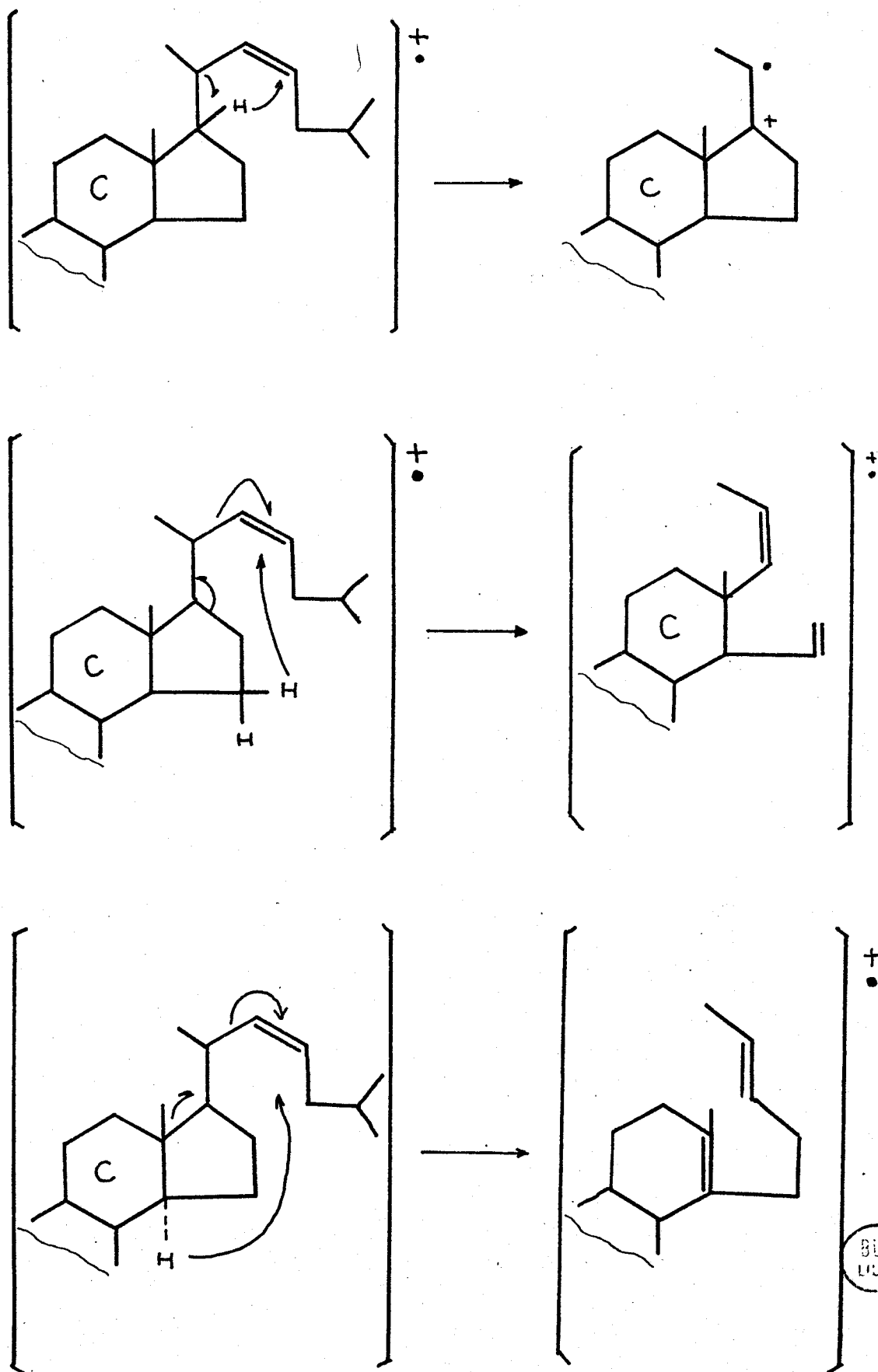


L'inspection plus poussée de ce spectre peut donner d'autres renseignements :

- la présence d'une double liaison $C_{22} - C_{23}$ est indiquée par un pic de coupure allylique à $m/e = 273$ et par un pic à $m/e = 300$.



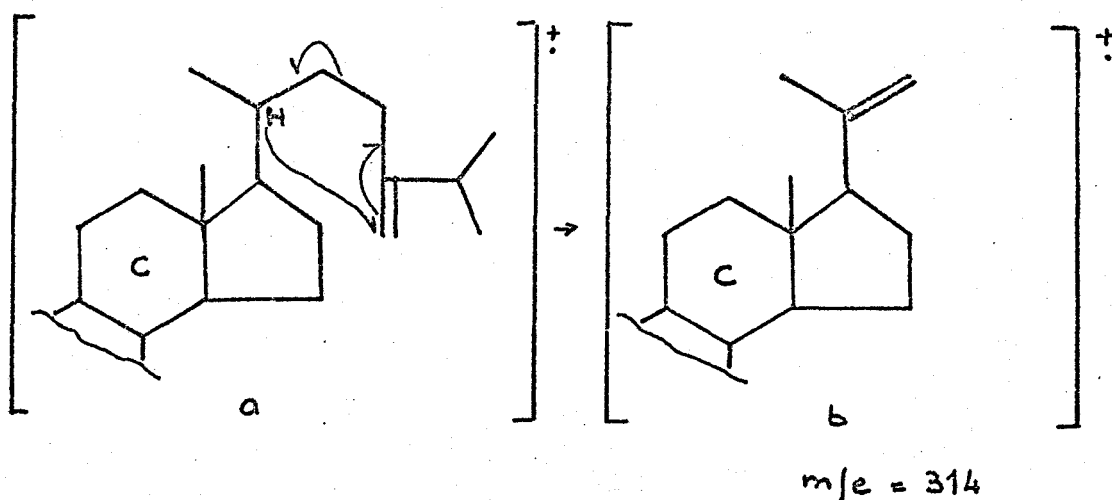
- le pic intense à $m/e = 300$ provient de la coupure vinylique avec transfert d'hydrogène provenant d'un grand nombre de sites comme l'indique le schéma suivant :



De plus pour les stérols Δ_{22} , on note la perte de 43 unités de masse, due à la perte du groupe isopropyle terminal de la chaîne.

Toujours par l'étude d'oléfine de synthèse, DJERASSI a montré que les Δ_{23} (absents dans la nature) auraient un pic à $m/e = 271$, et un pic majoritaire à $m/e = 301$, que les stérols Δ_{24} ont un pic à 271 et sont de plus caractérisés par la présence d'un triplet de basse intensité à $m/e = 299, 300, 301$.

En étudiant des composés possédant une double liaison en $C_{24} - C_{28}$ comme le méthylène-24 cholestérol et le fucostérol, il a montré que le mic $m/e = 271$, était encore présent mais était toujours accompagné d'un pic important à $m/e = 314$. Ce fragment résulte de la coupure de la liaison $C_{22} - C_{23}$ avec un transfert d'hydrogène provenant du C_{20} .



réarrangement de Mc. Lafferty

Pour tous les stérols montrant des pics à $m/e = 271$ et $m/e = 314$, l'intensité relative de ces pics, semble être contrôlée par la position de la double liaison dans le noyau.

En effet, pour les stérols $\Delta_5 - \Delta_{24-28}$ on note que le pic $m/e = 271$ à une intensité inférieure à celle du pic $m/e = 314$.

$$m/e = 271 < m/e = 314.$$

Pour les stérols $\Delta_7 - \Delta_{24-28}$ on note inversement que le pic $m/e = 271$ à une intensité supérieure à celle du pic $m/e = 314$.

$$m/e = 271 > m/e = 314.$$

La position des doubles liaisons nucléaires semble donc avoir une importance sur les fragmentations induites par la double liaison de la chaîne : ainsi une double liaison en $C_8 - C_9$ (type zymostérol) supprime presque complètement la formation de l'ion $m/e = 271$.

A côté de ces travaux sur les mécanismes des principales fragmentations, des études systématiques de KNIGHTS (78) sur les stérols végétaux, renseignent sur les fragmentations caractéristiques des différentes classes de stérol.

La difficulté dans ce domaine est d'obtenir des échantillons purs, de ce fait tous les stérols séparés n'ont pas été étudiés en spectrométrie de basse, cependant les spectres du β sitostérol, de l'ergostérol, du stigmastérol, du campestérol, du méthylène-24 cholestérol et bien d'autres ont été établis avec certitude.

De l'étude de tous les spectres, on peut tirer les conclusions suivantes :

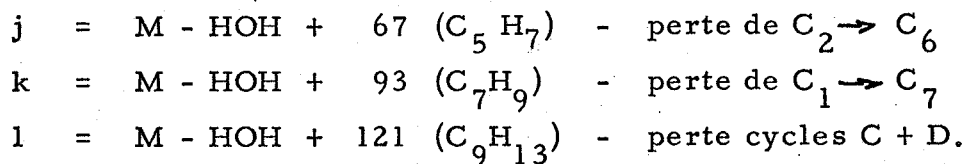
- Δ_5 stérols :
...5.....

Tableau I : D'après KNIGHTS
(les chiffres entre parenthèses indiquent les intensités relatives).

Ion	R =	H	CH ₃	C ₂ H ₅	H	H	H
	R' =	H	H	H	Ac	TFA	TMS
Fragmentation							
M	Molecular ion	386 (98)	400 (100)	414 (100)	428 —	482 (2)	458 (22)
a	M-15	371 (46)	385 (50)	399 (45)	413 —	367 (2)	443 (20)
b	M-R'OH	368 (64)	382 (62)	396 (54)	368 (100)	368 (100)	368 (52)
c	M-15+R'OH	353 (52)	367 (50)	381 (42)	353 (28)	353 (20)	353 (30)
j	M-R'OH+67(C ₅ H ₇)	301 (56)	315 (60)	329 (50)	301 —	301 —	301 (4)
k	M-R'OH+93(C ₇ H ₉)	275 (100)	289 (65)	303 (70)	275 (4)	275 (6)	275 (8)
l	M-R'OH+121(C ₉ H ₁₃)	247 (40)	261 (20)	275 (18)	247 (26)	247 (20)	247 (16)
n	M-129(C ₁ -C ₃ +R'O)*	—	—	—	—	—	329 (100)
o	M-R'OH+108(C ₈ H ₁₂)	260 (12)	274 (14)	288 —	260 (13)	260 (14)	260 —
d	M-side chain	273 (36)	273 (50)	273 (54)	315 —	369 (40)	345 —
e	M-side chain+R'OH	255 (50)	255 (82)	255 (60)	255 (22)	255 (18)	255 (16)
f	M-side chain+42	231 (42)	231 (44)	231 (58)	273 —	327 (8)	303 —
g	M-side chain+42+R'OH	213 (68)	213 (74)	213 (78)	213 (18)	213 (22)	213 (10)
h	M-side chain+27	246 (12)	246 (10)	246 (12)	288 —	342 —	318 —
i	M-side chain+27+R'O	229 (36)	229 (25)	229 (25)	229** (3)	229** (6)	229 (4)

Ils possèdent tous l'ion moléculaire, à l'exception des dérivés 3 acetoxy qui ont comme pic de base l'ion m/e = M-60 correspondant à la perte de l'acide acétique.

Ils sont de plus caractérisés par les ions spécifiques :



- Δ_7 stérols :
 ...7.....

Tableau II : d'après KNIGHTS.

Ion	Sterol: R = R¹=	H	H	H	H	C₂H₅	4 α -methyl H
		H	Ac	TFA	TMS	TFA	Ac
Fragmentation							
M	Molecular ion	386 (98)	428 (74)	482 (72)	458 (64)	510 (67)	442 (100)
a	M-15	371 (32)	413 (18)	467 (34)	443 (16)	495 (23)	427 (16)
b	M-R¹OH	368 (4)	368 (6)	368 (18)	368 (8)	396 (68)	382 (14)
c	M-15+R¹OH	353 (6)	353 (12)	353 (10)	353 (16)	381 (14)	367 (14)
d	M-side chain	273 (25)	315 (10)	369 (62)	345 (6)	369 (56)	329 (7)
e	M-side chain+R¹OH	255 (100)	255 (100)	255 (100)	255 (100)	255 (100)	269 (70)
f	M-side chain+42	231 (38)	273 (14)	327 (58)	303 (6)	327 (50)	287 (9)
g	M-side chain+42+R¹OH	213 (40)	213 (52)	213 (44)	213 (40)	213 (32)	227 (30)
h	M-side chain+27	246 (13)	288 (6)	342 (20)	318 (2)	342 (23)	302 -
i	M-side chain+27+R¹O	229 (33)	229 (32)	229 (28)	229 (28)	229 (23)	243 (16)

Les stérols Δ_7 possèdent tous l'ion moléculaire et notamment les dérivés acetoxy 3β . Ils montrent un pic e = M - (chaîne latérale + HOH) très intense, qui est souvent le pic de base, l'ion b = M - HOH est beaucoup moins intense que l'analogue dans les dérivés Δ_5 .

- Stérols di insaturés :

Les stérols di insaturés présentent tous des pics caractéristiques des stérols avec perte ou non de la chaîne latérale..



Ion	Sterol	$\Delta^{5, 24} (25)$ (XV)		$\Delta^{5, 22}$ (XIV)				$\Delta^{5, 24} (28)$		$\Delta^{7, 24} (28)$		4 α -methyl- $\Delta^{7, 24} (28)$	
		C-27	C-29	C-29	C-29	C-28	C-29	C-28	C-29	C-28	C-29	C-28	C-29
		R ¹	H	H	Ac	TFA	TMS	TMS	TMS	TMS	Ac	Ac	
Fragmentation													
M	Molecular ion	384 (30)	412 (78) 454	—	508 (23)	470 (30) 484	(6) 470	(24) 484	(6) 454	(20) 468	(3)		
a	M-15	369 (30)	397 (8) 439	—	493 (3)	455 (23) 469	(7) 455	(26) 469	(10) 439	(20) 453	(3)		
b	M-R ¹ OH	366 (14)	394 (6) 394 (100)	394 (80)	380 (78) 394	(8) 380	(12) 394	(3) 394	(7) 408	(2)			
c	M-15+R ¹ OH	351 (14)	379 (7) 379 (8)	379 (8)	365 (52) 379	(10) 365	(14) 379	(6) 379	(10) 393	(2)			
n	M-129 (C ₁ -C ₃ +R ¹ O)	—	—	—	—	341 (100) 355	(16) —	—	—	—			
y	M-129+(C ₂₃ -C ₂₇ +1×H)	—	—	—	—	257 (60) 257	(45) —	—	—	—			
w	M-43 (C ₂₃ -C ₂₇)	—	369 (24) 411	—	465 (24)	—	—	—	—	—			
x	M-43+R ¹ OH	—	351 (31) 351 (21)	351 (48)	—	—	—	—	—	—			
d	M-side chain	273** (14)	273** (26) 315	—	369 (20)	345 (30) 345	—	345 (33) 345	(8) 329	(25) 329	(2)		
e	M-side chain+R ¹ OH	255 (12)	255 (100) 255 (94)	255 (100)	255 (48) 255	(15) 255	(47) 255	(18) 269	(28) 269	(13)			
f	M-side chain+42	231 (10)	231 (18) 273	—	327** (4)	303 — 303	(2) 303	—	303 — 287	(8) 287	(4)		
g	M-side chain+42+R ¹ OH	213 (21)	213 (42) 213 (26)	213 (26)	213 (42) 213	(18) 213	(42) 213	(22) 227	(29) 227	(15)			
h	M-side chain+27	246 —	246 (4) 288	—	342 —	318 (3) 318	(4) 318	(4) 318	(7) 302	(7) 302	(7)		
i	M-side chain+27+R ¹ O	229 (6)	229 (20) 229* (7)	229* (6)	229 (30) 229*	(7) 229*	(22) 229*	(12) 243*	(10) 243*	(5)			
p	M-(C ₂₃ -C ₂₇ +1×H)	314 —	314 (3) 356	—	410 (6)	386 (67) 386	(100) 386	(45) 386	(62) 370	(40) 370	(52)		
q	M-(C ₂₃ -C ₂₇ +1×H)+R ¹ OH	296 —	296 — 296 (4)	296 —	296 (67) 296	(94) 296	(10) 296	(15) 310	(8) 310	(7)			
r	M-side chain+2×H(p-43)	271 (100)	271 (73) 313	—	367 (46)	343 (42) 343	(6) 343	(100) 343	(100) 327	(100) 327	(100)		
s	M-side chain+2×H+R ¹ OH	253 (14)	253 (22) 253 (22)	253 (16)	253 (52) 253	(15) 253	(24) 253	(15) 267	(13) 267	(13)			
t	M-15+(C ₂₃ -C ₂₇ +1×H)	299** (16)	299 (54) 341	—	395*** (38)	371 (14) 371	(14) 371	(6) 371	(6) 355	(†) 355	(†)		
u	M-15+(C ₂₃ -C ₂₇ +1×H)+R ¹ OH	281 (4)	281 (†) 281	—	281 (†)	281 (45) 281	(47) 281	(18) 281	(12) 295	(†) 295	(†)		
v	M-side chain+2×H+42+R ¹ OH†	211 (4)	211 (12) 211 (10)	211 (8)	211 (25) 211	(15) 211	(12) 211	(4) 225	(4) 225	(2.5)			
y	M-(C ₂₃ -C ₂₇ +1×H)+(C ₁ -C ₃ +R ¹ O)	—	—	—	—	257 (60) 257	(45) —	—	—	—			
j	M-R ¹ OH+67	299** (16)	327 (4) 327	—	327** (4)	313 (7) 327	(0.5) —	—	—	—			
k	M-R ¹ OH+93	273** (14)	301 (2) 301	—	301 —	287 (8) 301	(5) —	—	—	—			
l	M-R ¹ OH+121	245 (5)	273** (26) 273	—	273 (2)	259 (24) 273	(4) —	—	—	—			
o	M-R ¹ OH+108	258 (4)	286 — 286 (4)	286 —	272 —	286 —	—	—	—	—			

Tableau III : D'après KNIGHTS.

- Δ_{5-22} stérols :

Ils sont caractérisés par la présence du pic $W = m/e = M - 43$ qui correspond à la perte de groupement isopropyle terminal.

- $\Delta_{5(24-28)}$ stérols :

L'ion le plus caractéristique de ce groupe est : $P = M - (-C_{23} \quad C_{27} - + 1 H)$ qui correspond au réarrangement du type Mc LAFFERTY.

- $\Delta_{7(24-28)}$ stérols :

Ils ont comme pic de base l'ion $r = M - (\text{chaîne latérale} + 2 H)$.

En résumé les pics les plus caractéristiques des stérols sont :

- a = $M - 15$
- b = $M - H_2O$ (très faible pour les Δ_7).
- c = $M - 15 - H_2O$
- d = $M - \text{chaîne latérale}$
- e = $M - (\text{chaîne latérale} + H_2O)$
- f = $M - (\text{chaîne latérale} + 42 - \text{cycle D-})$
- g = $M - (\text{chaîne latérale} + 42 + H_2O)$.

CHAPITRE VII

TENTATIVE D'IDENTIFICATION DES STEROLS
CONTENUS DANS LE LEPTOSPHAERIA TYPHAE.

°°°°_°°_°°_°°_

Les extractions des stérols contenus dans le mycélium, ont été faites par étapes successives pour séparer :

- les stérols libres : extractions à l'éther de pétrole
- les stérols estérifiés : extractions au méthanol puis à l'éther éthylique
- les stérols hydrosolubles : extraction à l'eau.

Après évaporation des solvants d'extraction, et saponification des stérols estérifiés, un test de LIEBERMAN BURCHARD a été réalisé sur les résidus huileux correspondant à chaque fraction pour vérifier la présence de stérols.

Il est à constater que la réaction est positive dans les deux premières fractions : le Leptosphaeria typhae contient donc des stérols libres et des stérols estérifiés, mais qu'elle est négative dans la troisième : le mycélium ne contient donc pas de stérols hydrosolubles non extraits par les extractions précédentes. Des chromatographies complémentaires de l'extrait en couche mince, et en phase vapeur, ont confirmé l'absence de stérols dans cette fraction.

TENEUR DU MYCELIUM EN STEROLS.

Des différentes extractions réalisées sur du mycélium provenant de cultures effectuées tant à la lumière qu'à l'obscurité, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Cultures effectuées à la lumière :

La première série de culture de 500 fioles a donné 50 g de mycélium stabilisé ; la deuxième série de 800 fioles : 88 g.

Dans les deux cas, nous avons obtenu après extraction, des résidus huileux correspondant à 4 % du poids de mycélium.

Après précipitation à la digitonine, et purification par chromatographie en couche mince nous avons obtenu les quantités de stérols suivantes :

- 1er cas :

50 grammes de mycélium ont donné 15,5 mg de stérols (soit 0,031 % du poids de mycélium) répartis de la façon suivante :

- 7,8 mg de stérols libres soit 52 % du total
- 7,7 mg de stérols estérifiés soit 48 % du total.

- 2ème cas :

88 grammes de mycélium ont donné 37,3 mg de stérols (soit 0,042 % du poids de mycélium) répartis de la façon suivante :

- 20 mg de stérols libres soit 53 % du total
- 17,3 mg de stérols estérifiés soit 47 % du total.

- Cultures effectuées à l'obscurité :

La première série de culture a permis d'obtenir 24 grammes de mycélium contenant 8,3 mg de stérols (soit 0,034 % du poids de mycélium) répartis de la façon suivante :

- 3,5 mg de stérols libres soit 42 % du total
- 4,8 mg de stérols estérifiés soit 58 % du total.

La deuxième série de culture a donné 51 g de mycélium contenant 28,8 mg de stérols (soit 0,056 % du poids de mycélium) répartis de la façon suivante :

- 11,5 mg de stérols libres soit 40 % du total
- 17,3 mg de stérols estérifiés soit 60 % du total.

En résumé on peut donner une valeur moyenne de la teneur en stérols du Leptosphaeria typhae : elle varie de 0,030 % à 0,050 % du poids sec de mycélium. Les stérols libres semblent prépondérants dans les cultures effectuées à la lumière, tandis qu'à l'obscurité il semble au contraire que ce soit les stérols estérifiés.

I - STEROLS EXTRAITS DU CHAMPIGNON CULTIVE A LA LUMIERE.

a - Fraction "libre" :

Après précipitation par la digitonine des stérols contenus dans le résidu d'extraction et purification de ceux-ci par chromatographie sur plaque de silice, dans le système pentane/acétate d'éthyle 7/3 V/V, la substance obtenue a été chromatographiée sur plaque d'alumine imprégnée de nitrate d'argent dans le système chlorure de méthylène, éther de pétrole, acétone : 7 - 3 - 1 V/V :

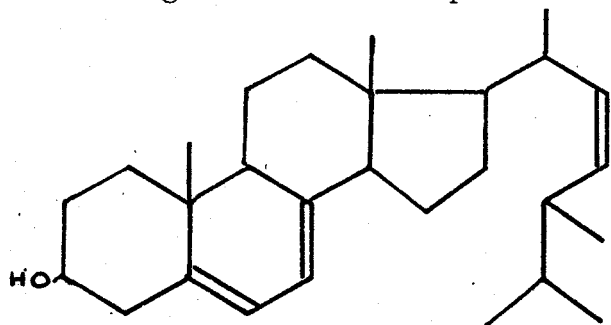
- on n'a noté qu'une seule bande sur la plaque au niveau de l'ergostérol ;

- la pureté du produit a été vérifiée par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne S E - 30 à 1 % ; le chromatogramme a montré un pic unique dont le temps de rétention était identique à celui de l'ergostérol injecté comme témoin.

Il semblait donc que cette fraction ne contenait que de l'ergostérol : pour contrôle le produit a été analysé en spectrométrie de masse ; les principales fragmentations du spectre sont les suivantes :

	m/e	Intensités relatives
396 = M ⁺ = pic de masse		100 %
381 = M - 15 = M - CH ₃		1,85 %
378 = M - 18 = M - HOH		1,56 %
363 = M - (15 + 18) = M - (CH ₃ + HOH)		93 %
271 = M - chaîne latérale		7 %
253 = M - (chaîne latérale + HOH)		13 %
229 = M - (chaîne latérale + 42 -cycle D-)		1,85 %
211 = M - (chaîne latérale + 42 + HOH)		10 %

Ces fragmentations sont exactement les mêmes que celles de l'ergostérol dont le spectre a été fait comme témoin.



Un spectre ultra-violet a été effectué pour un dernier contrôle :

Il montre des bandes d'absorption à 262, 271, 282, 294 mμ qui sont bien caractéristiques de l'ergostérol. La

fraction stérolique "libre" du champignon cultivé à la lumière n'est donc composée que d'ergostérol.

b - Fraction conjuguée :

Après extraction du mycélium par le méthanol et l'éther et saponification du résidu, l'insaponifiable a été soumis au même protocole que précédemment. C'est à dire que les stérols ont été précipités par la digitonine et que le résidu blanchâtre obtenu après coupure des digitonides a été purifié par chromatographie sur silice dans le système pentane/acétate d'éthyle (7/3, V/V).

La bande correspondant à la zone stérolique a été découpée et éluee à l'éther éthylique. Le nouveau résidu a été chromatographié sur plaque d'alumine imprégnée de nitrate d'argent, dans le système chlorure de méthylène/éther de pétrole/acétone (7/3/1, V/V).

Il est à noter qu'après révélation, plusieurs bandes apparaissent sur la plaque :

- | | |
|---|-------------------------------|
| a) une bande inférieure intitulée "a" située au niveau de l'ergostérol déposée comme témoin | Rf relatif ergostérol = 1 |
| b) une bande intermédiaire intitulée "b" | Rf relatif ergostérol = 2,41 |
| c) une bande supérieure intitulée "c" | Rf relatif ergostérol = 3,91. |

Chaque bande a été découpée, l'alumine a été éluee par l'éther éthylique. Les produits séparés ont été étudiés séparément.

- Produit "a" :

- par chromatographie en phase gazeuse il donne un seul pic dont le temps de rétention est analogue à celui de l'ergostérol ;
- son spectre U.V. est analogue à celui de l'ergostérol ;
- son spectre de masse montre toutes les fragmentations du spectre de l'ergostérol : il s'agit donc bien encore de l'ergostérol.

- Produit "b" :

En chromatographie en phase gazeuse, il donne un pic dont le temps de rétention est légèrement inférieur à celui de l'ergostérol.

Temps de rétention relatif à l'ergostérol = 0,93.

Son spectre de masse montre les fragmentations suivantes :

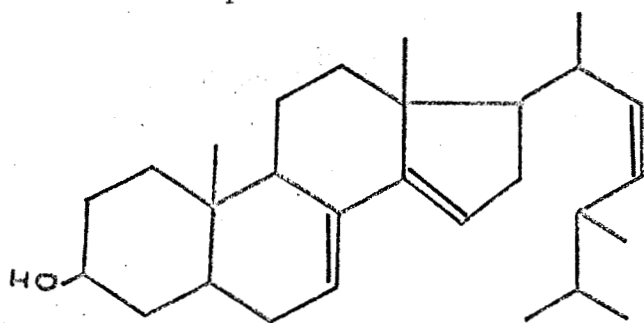
m/e	Intensités relatives
396 = M ⁺ = pic de masse	100 %
381 = M - 15	4,7 %
378 = M - 18	9,4 %
363 = M - (15 + 18)	92 %
271 = M - chaîne latérale	47 %
253 = M - (chaîne latérale + 18)	37 %
229 = M - (chaîne latérale + 42)	7,5 %
211 = M - (chaîne latérale + 42 + 18)	24 %

On voit que le pic de masse et les fragmentations sont identiques à celles au spectre de l'ergostérol, avec cependant des intensités relatives différentes.

Le spectre ultra-violet effectué sur cette substance, n'a montré qu'une seule bande d'absorption à 211 mμ .

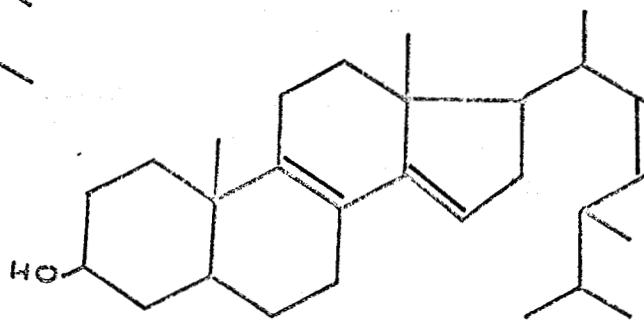
Le spectre de masse indique cependant que la substance possède 3 doubles liaisons : une dans la chaîne latérale, et deux dans la partie cyclique : ce produit b est certainement un isomère de l'ergostérol.

Comme l'indiquent les travaux de REINDEL et WALTER (79), il existe des isomères de l'ergostérol obtenus par synthèse tel que :



ergostérol B₁

$\lambda = 250 \text{ m}\mu$



ergostérol B₃

$\lambda = 242 \text{ m}\mu$

mais d'après la longueur d'onde d'absorption en U.V., le produit b n'est vraisemblablement pas d'un diène conjugué. La position des doubles liaisons de la partie cyclique n'a pas pu être précisée.

Position de la double liaison dans la chaîne : le produit b est moins retenu sur couche mince d'alumine imprégnée de nitrate d'argent que l'ergostérol, il ne possède certainement pas une double liaison C₂₄₋₂₅, de plus il ne possède pas l'ion caractéristique de la coupure décrite par Mc LAFFERTY induite par une double liaison en C₂₄₋₂₈.

Par élimination on peut donc dire que la double liaison du produit b est vraisemblablement en C₂₂₋₂₃.

- Produit "c" :

Le produit c a été chromatographié en phase gazeuse, le chromatogramme montre un pic dont les temps de rétention relatifs à l'ergostérol sont :

1,24 sur colonne S E 30 à 1 % à 235°
 1,17 sur colonne S E 30 à 5 % à 260°
 1,17 sur colonne { S E 30 à 0,35 % à 230°
 { X E 60 à 0,60 %

Le produit analysé en spectrométrie de masse donne principalement les fragmentations suivantes :

m/e	Intensités relatives
398 = M ⁺ = pic de masse	20 %
383 = M - 15	22 %
314 = M - 98	32 %
271 = M (chaine latérale + 2 H)	100 %
255 = M - (Ch + 18)	24 %
246 = M - (Ch + 27)	10 %
231 = M - (Ch + 42)	20 %
213 = M - (Ch + 42 + 18).	26 %

L'examen du spectre amène à faire les constatations suivantes :

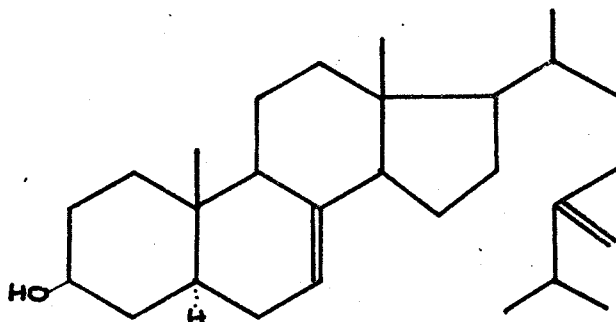
- d'après son pic de masse, le produit possède 28 atomes de carbones et il est di-insaturé ;

- il possède tous les ions caractéristiques des coupures de la partie cyclique des stérols m/e = 271, 255, 246, 231, 213 ;

- la présence du pic à m/e 271 indique que le stérol possède une double liaison dans la chaîne ;
- la présence du pic à m/e 314 indique que le réarrangement de Mc LAFFERTY a eu lieu, donc que la molécule possède un méthylène en C_{24} : la double liaison de la chaîne est entre C_{24} et C_{28} ;
- dans la partie cyclique, plusieurs constatations donnent à penser que la double liaison est située à Δ_7 ;
- le pic $m/e = 271 > m/e = 314$, ce qui est d'après DJERASSI une caractéristique des stérols Δ_{7-24} (28) ;
- d'autre part, on ne note pas de pic à $M - 18$ caractéristique des stérols Δ_5 .

De plus le test de MOORE et BAUMAN (qui permet de distinguer les Δ_5 des Δ_7) effectué sur le stérol confirme qu'il s'agit bien d'un Δ_7 . Le spectre ultra-violet montre une bande d'absorption à $\lambda = 211 \text{ m}\mu$: ce n'est pas un diène conjugué.

En résumé, d'après les principales fragmentations du spectre de produit c, on peut proposer la formule suivante :



Epistérol

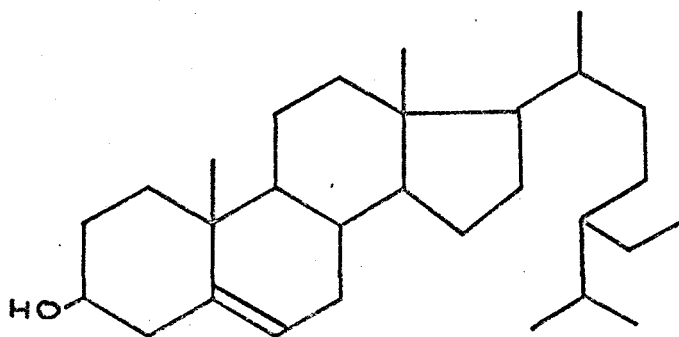
Un examen plus approfondi du spectre montre qu'il existe des fragmentations mineures qui correspondent à un pic de masse d'intensité relative très faible à $m/e = 414$ (intensité relative 6 % du pic $m/e = 298$).

L'épistérol serait donc accompagné dans le produit c d'une petite quantité d'une autre substance. Les fragmentations se rapportant à cette substance sont les suivantes :

m/e	Intensités relatives.
414 = pic de masse: M^+	100 %
399 = M - 15	48 %
396 = M - 18	54 %
381 = M - (15 + 18)	38 %
329 = M - (18 + 67 : $C_5H_7^-$)	50 %
303 = M - (18 + 93 : $C_7H_9^-$)	70 %

D'après son pic de masse on peut dire qu'il s'agit d'un stérol à 29 atomes de carbone et qu'il est mono insaturé. Le fait que le pic de masse soit le pic de base et qu'il possède un pic à $m/e = M - 18$ plaide en faveur d'un stérol Δ_5 , de même que la présence des pics j et k (voir tableau I).

Il s'agit vraisemblablement du β sitostérol dont la formule est la suivante :



les fragmentations et les intensités relatives du spectre correspondent en effet à celles données dans la littérature par KNIGHTS (78).

Le produit doit être formé par un mélange de :

- épistérol : 94 %
- β sitostérol : 6 %

la répartition des stérols primitivement estérifiés trouvés dans le champignon cultivé à la lumière est la suivante :

- produit a : 58 %
- produit b : 20 %
- produit c : 22 % (produit principal 94 % soit 21 % du total)
(produit mineur 6 % soit 1 % du total)

En résumé nous pensons que la composition en stérols du champignon cultivé à la lumière est la suivante :

Stérols libres	Stérols estérifiés.
Ergostérol : 100 %	Ergostérol : 58 % Isomère ergostérol : 20 % Epistérol : 21 % β Sitostérol : 1 %

L'ergostérol, à la fois sous sa forme libre et sous sa forme estérifiée, représente 80 % des stérols totaux.

II. - STEROLS EXTRAITS DU CHAMPIGNON CULTIVE A L'OBSCURITE.

a - Fraction libre :

Le résidu d'extraction à l'éther de pétrole a été soumis aux traitements préalablement décrits. Les stérols purifiés ont été de la même façon chromatographiés sur alumine imprégnée de nitrate d'argent.

Après révélation on voit apparaître 3 bandes sur la plaque :

- d : Rf relatif à l'ergostérol = 1
- e : Rf relatif à l'ergostérol = 2,07
- f : Rf relatif à l'ergostérol = 4,84.

- Produit "d" :

Donne en chromatographie en phase gazeuse un pic dont le temps de rétention est analogue à celui de l'ergostérol. Son spectre de masse est identique à celui de l'ergostérol et son spectre ultra-violet

présente 4 bandes d'absorptions : $\lambda = 262, 271, 282, 294 \text{ m}\mu$ caractéristiques des $\Delta_5 - \Delta_7$ dienes, il s'agit donc de l'ergostérol.

- Produit "e" :

Ses chromatogrammes en phase gazeuse réalisés sur des colonnes 1 % S E 30 235° - 5 % S E 30 260°, montrent un pic dont les temps de rétention, relatifs à l'ergostérol, sont respectivement 1,24 et 1,14.

Son spectre de masse présente les fragmentations suivantes :

m/e	Intensités relatives
398 = M ⁺ = pic de masse	20 %
383 = M - 15	24 %
314 = M - 98	32 %
271 = M - (Ch + 2 H)	100 %
255 = M - (Ch + 18)	30 %
246 = M - (Ch + 27)	12 %
231 = M - (Ch + 42)	22 %
213 = M - (Ch + 42 + 18)	22 %

Pour les mêmes raisons que celles citées précédemment pour le produit c, nous pensons qu'il s'agit de l'épistérol. La présence de la double liaison en Δ_7 , a été confirmée par le test de MOORE et BAUMAN qui est positif. Le spectre U.V. ne montre qu'une zone d'absorption à $\lambda = 210 \text{ m}\mu$.

Comme dans le produit c, le spectre montre quelques fragmentations mineures qui correspondent à un pic de masse M = 414, ces fragmentations sont les mêmes que celles du β sitostérol.

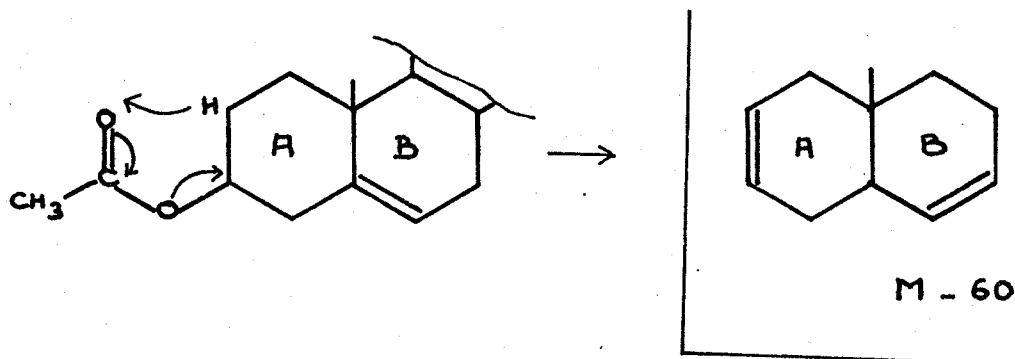
Le β sitostérol existe donc à côté de l'épistérol, mais il est présent à l'état de traces puisqu'il ne représente que 2 % du mélange, ceci explique pourquoi le Rf de ce produit sur plaque imprégnée de nitrate d'argent est inférieur à celui trouvé pour le produit c.

Un dérivé acétylé a été formé sur ce produit "e", l'acétate a été étudié en spectrométrie de masse. Les fragmentations sont les suivantes :

m/e	Intensités relatives
440 = M ⁺ = pic de masse (398 + 42)	22 %
425 = M - 15	23 %
380 = M - 60 = perte de l'acide acétique	10 %
365 = M - (60 + 15)	16 %
356 = (314 + 42)	30 %
313 = (271 + 42)	100 %
255 = M - (chaîne + 60)	40 %
213 = M - (chaîne + 42 + 60)	46 %

Ce spectre confirme la présence d'épistérol, puisque les dérivés Δ_7 montrent le pic moléculaire de l'acétate.

Par contre on ne trouve pas le pic à m/e = 456 (414 + 42) qui serait le pic moléculaire de l'acétate de β sitostérol, mais un pic à m/e = 396 : (456 - 60) qui correspond à la perte de l'acide acétique. Ceci confirme la présence d'un composé Δ_5 dont les acétates subissent une dégradation qui résulte du réarrangement de Mc LAFFERTY :



Le produit e est donc un mélange de

- 98 % epistérol
- 2 % sitostérol.

- Produit "f" :

- Il a en chromatographie en phase gazeuse un temps de rétention très voisin de celui de l'ergostérol sur 5 % S E 30 : temps de rétention relatif à l'ergostérol = 1,02.

- Son spectre de masse montre les fragmentations suivantes :

398 = M ⁺ = pic de masse	44 %
383 = M - 15	19 %
355 = M - 43	11 %
300	22 %
285	22 %
273 = M - chaîne	58 %
271 = M - (Ch + 2 H)	100 %
255 = M - (Ch + 18)	70 %
246 = M - (Ch + 27)	41 %
231 = M - (Ch + 42)	25 %
213 = M - (Ch + 42 + 18)	27 %

Le pic de masse à M = 398 indique qu'il s'agit d'un stérol à 28 atomes de carbone qui possède deux centres d'insaturation. Il possède les fragmentations typiques du noyau stérolique m/e = M-15, 271, 255, 246, 231, 213.

Le pic $m/e = 271$ indique que la chaîne latérale est insaturée, et qu'elle possède 9 atomes de carbone. 3 fragmentations typiques indiquent que la double liaison de la chaîne doit être située en $C_{22} - C_{23}$.

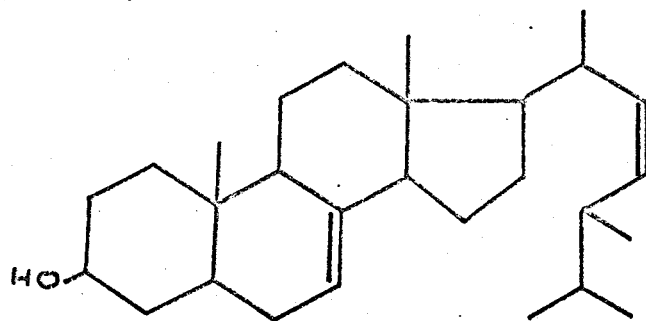
- Le pic à $M - 43$ qui correspond à la perte du groupement isopropyl terminal ;
- Le pic $m/e = 300$ correspond à une coupure vinylique avec transfert d'hydrogène ;
- Enfin le pic $m/e = 273$ qui provient de la coupure allylique de la chaîne.

Le pic f peut être soit :

- le dihydro-5-6 ergostérol si Δ_7
- le brassicastérol si Δ_5

Le fait que l'on ne trouve pas de pic à $M - 18$ (caractéristique des Δ_5), que le pic de base soit $m/e = 271$ et non pas $m/e = 255$ comme dans le brassicastérol, et de plus que le test de MOORE et BAUMAN soit positif, plaide en faveur d'un stérol Δ_7 .

Le produit f est vraisemblablement



le dihydro-5-6 ergostérol.

Le dihydro-5-6 ergostérol nous ayant été fourni par la Société ROUSSEL-UCLAF, nous avons pu vérifier que le produit f avait :

- le même Rf en chromatographie sur couche mince ;
- le même temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse ;

- le même spectre de masse,

que le dihydro-5-6 ergostérol de synthèse. Sa structure est donc confirmée.

La répartition des stérols libres provenant du champignon cultivé à l'obscurité, est la suivante :

- produit d :	86 %	} - produit principal 98 % soit 9,8% du total - produit mineur 2 % soit 0,2% du total
- produit e :	10 %	
- produit f :	4 %	

La composition en stérol pourrait être la suivante :

- ergostérol : 86 %
- épistérol : 9,8 %
- β sitostérol : 0,2 %
- dihydro-5-6 ergostérol : 4 %

b - Fraction conjuguée :

Toujours selon les mêmes procédés, le résidu d'extraction à l'alcool-éther a été saponifié, les stérols précipités à la digitonine, puis purifiés par chromatographie. Un dépôt du mélange sur plaque d'alumine imprégnée de nitrate d'argent a permis d'isoler trois produits : g, h, i.

- Produit "g" :

Après étude en chromatographie en phase gazeuse, en spectrométrie de masse, et spectrométrie ultra-violette, il est ressorti clairement qu'il s'agissait de l'ergostérol.

- Produit "h" :

Ses temps de rétention relatifs à l'ergostérol, en chromatographie en phase gazeuse sont :

- sur 1 % S E 30 235° : 1,24
- sur } (0,35) X E 60 230° : 1,17
- } (0,60) S E 30

Son spectre de masse montre un pic de masse à $M = 398$ et possède toutes les fragmentations déjà décrites pour l'épistérol. Son spectre ultra-violet montre qu'il ne s'agit pas d'un diène.

- Produit "i" :

Bien qu'il ne montre qu'un pic en phase gazeuse, de temps de rétention relatif à l'ergostérol = 1,18 sur 1 % S E 30 à 235°, ce produit s'est révélé, par la spectrométrie de masse, être un mélange de 4 substances, dont les pics moléculaires sont :

	intensités relatives.
- $M_1 = 428$	56 %
- $M_2 = 426$	41 %
- $M_3 = 414$	67 %
- $M_4 = 412$	63 %

avec les principales fragmentations suivantes :

m/e	intensités relatives.
396	52 %
394	66 %
271	100 %
269	81 %
255	92 %
213	74 %

Les substances dont les pics de masse sont M_3 et M_4 sont vraisemblablement le β sitostérol et le stigmastérol puisque l'on trouve dans le spectre $m/e = 396 = M_3 - 18$; $m/e = 394 = M_4 - 18$, perte d'eau caractéristique des dérivés Δ_5 .

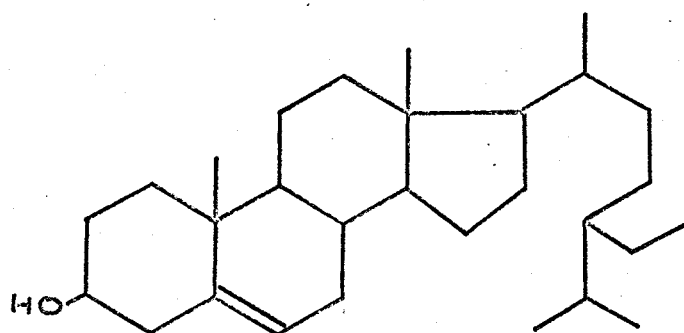
Les substances dont les pics de masses sont $M_1 = 428$; $M_2 = 426$ doivent être des dérivés méthylés en 4 :

$$- 414 + 14 = 428$$

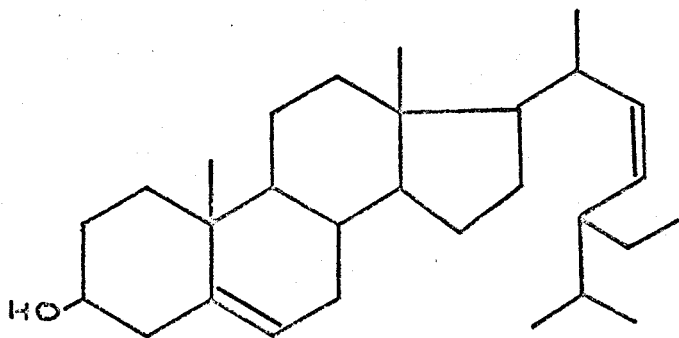
$$- 412 + 14 = 426,$$

mais elles doivent posséder dans la partie cyclique une double liaison en Δ_7 ; le pic à $m/e = 269$ est caractéristique d'après KNIGHTS des stérols Δ_7 , 4 α méthyl et correspond à $M - (\text{chaîne latérale} + \text{HOH})$.

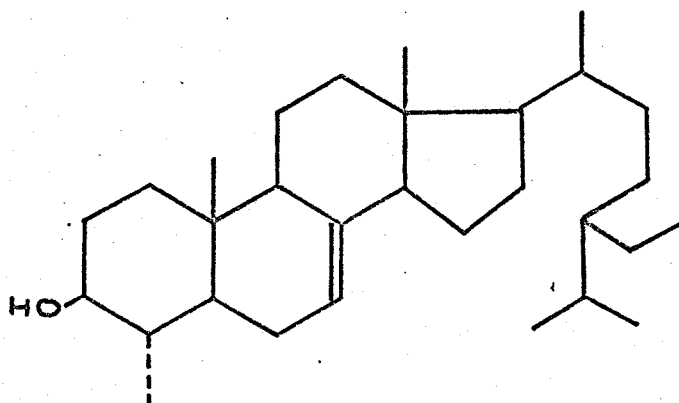
Le produit i doit être composé de :



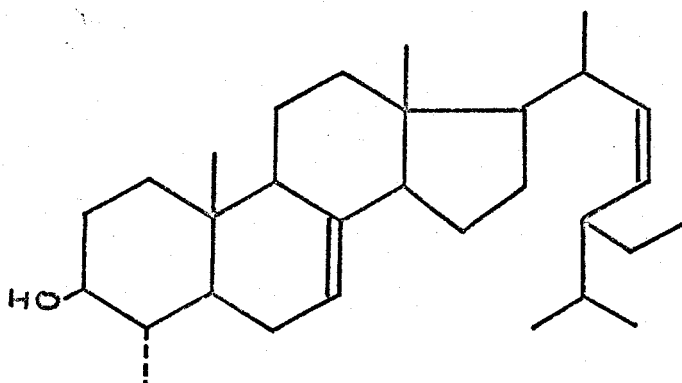
β sitostérol



Stigmastérol



méthyl-4 α stigma-7ène ol 3 β
ou méthyl-4 α Δ_7 chondrillastérol



méthyl-4 α stigma-5adiene-7,22 ol 3 β
ou méthyl 4 α chondrillastérol

La répartition des stérols primitivement estérifiés trouvés dans le champignon cultivé à l'obscurité, est la suivante :

- produit g : 54 %
- produit h : 21 %
- produit i : 25 %

La composition stérolique pourrait être la suivante :

- ergostérol : 54 %
 - epistérol : 21 %
 - β sitostérol + stigmastérol
 - + 4 α méthyl Δ_7 chondrillastérol
 - + 4 α méthyl chondrillastérol
- } 25 %

En résumé nous pensons que la composition en stérols du champignon cultivé à l'obscurité peut être la suivante :

Stérols libres	Stérols estérifiés
Ergostérol 86 %	Ergostérol 54 %
Epistérol 9,8 %	Epistérol 21 %
β sitostérol 0,2 %	β sitostérol-stigmastérol
Dihydro-5-6 ergostérol 4 %	méthyl-4 α Δ_7 chondrillastérol
	méthyl-4 α chondrillastérol
	} 25 %

L'ergostérol à la fois sous la forme libre et sous la forme estérifiée représente 68 % des stérols totaux.

Avant de conclure que ces stérols sont bien synthétisés par le champignon, il fallait s'assurer qu'ils ne provenaient pas du milieu de culture, en effet KNIGHTS (80) a montré que les graines d'avoine contenaient notamment du :

- β sitostérol
- Δ^5 avenastérol
- campestérol
- brassicastérol.

La décoction d'eau d'avoine a été soumise à plusieurs contrôles :

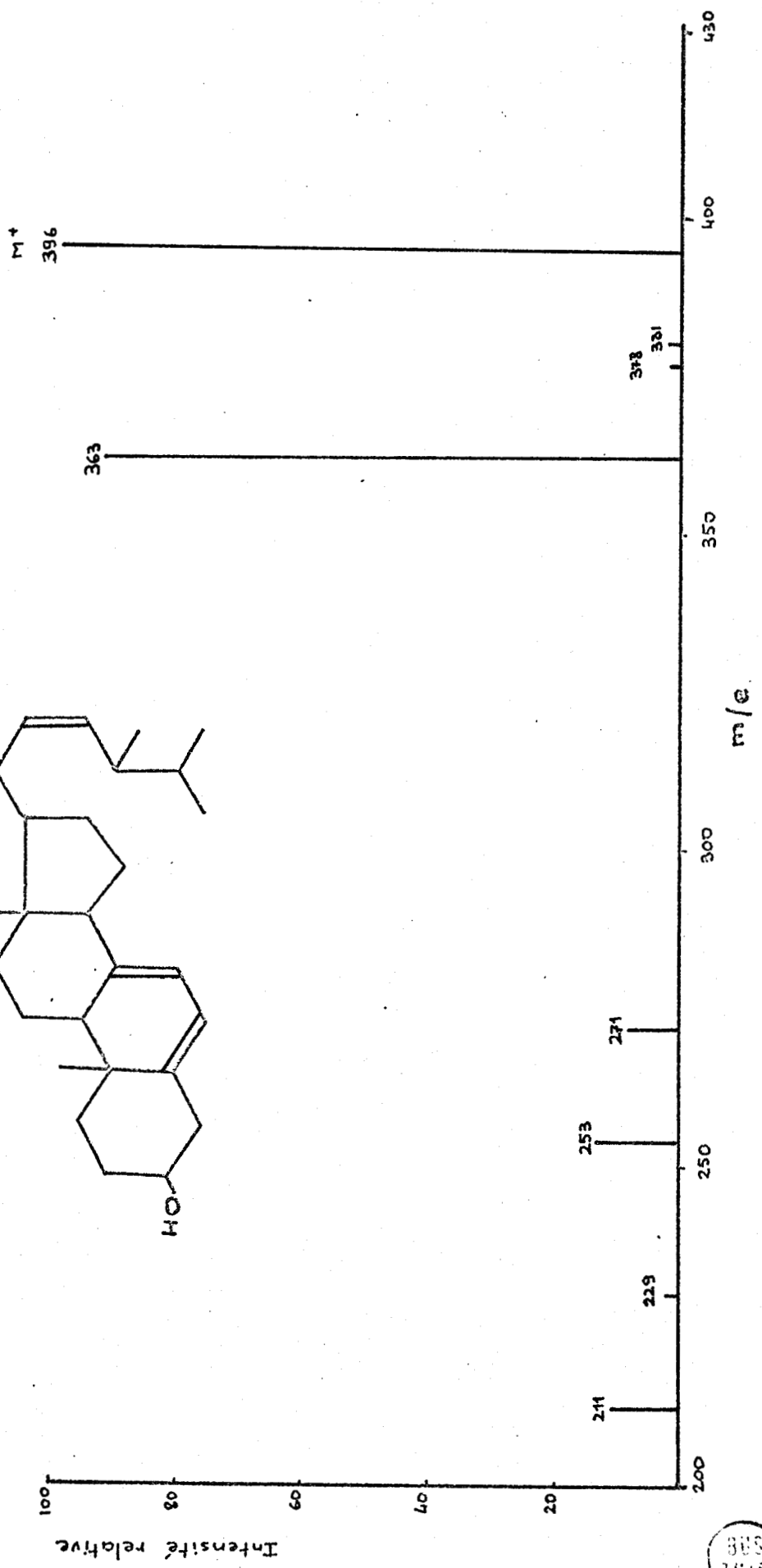
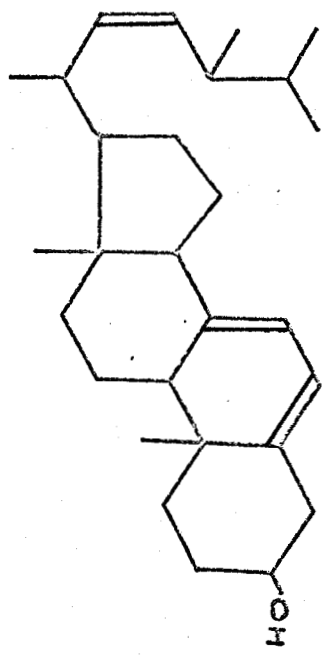
Après avoir été lyophilisée, ses résidus ont été extraits par du chloroforme ; l'extrait sec a été purifié par la digitonine :

- une réaction de LIEBERMAN-BURCHARD effectuée sur cet extrait s'est révélée être négative ;
- une chromatographie sur plaque n'a révélée aucune tache ;
- une chromatographie en phase gazeuse n'a montré aucun pic.

Les stérols trouvés dans le Leptosphaeria ne peuvent donc pas provenir du milieu de culture.

SPECTRES DE MASSE DES PRODUITS ISOLÉS.

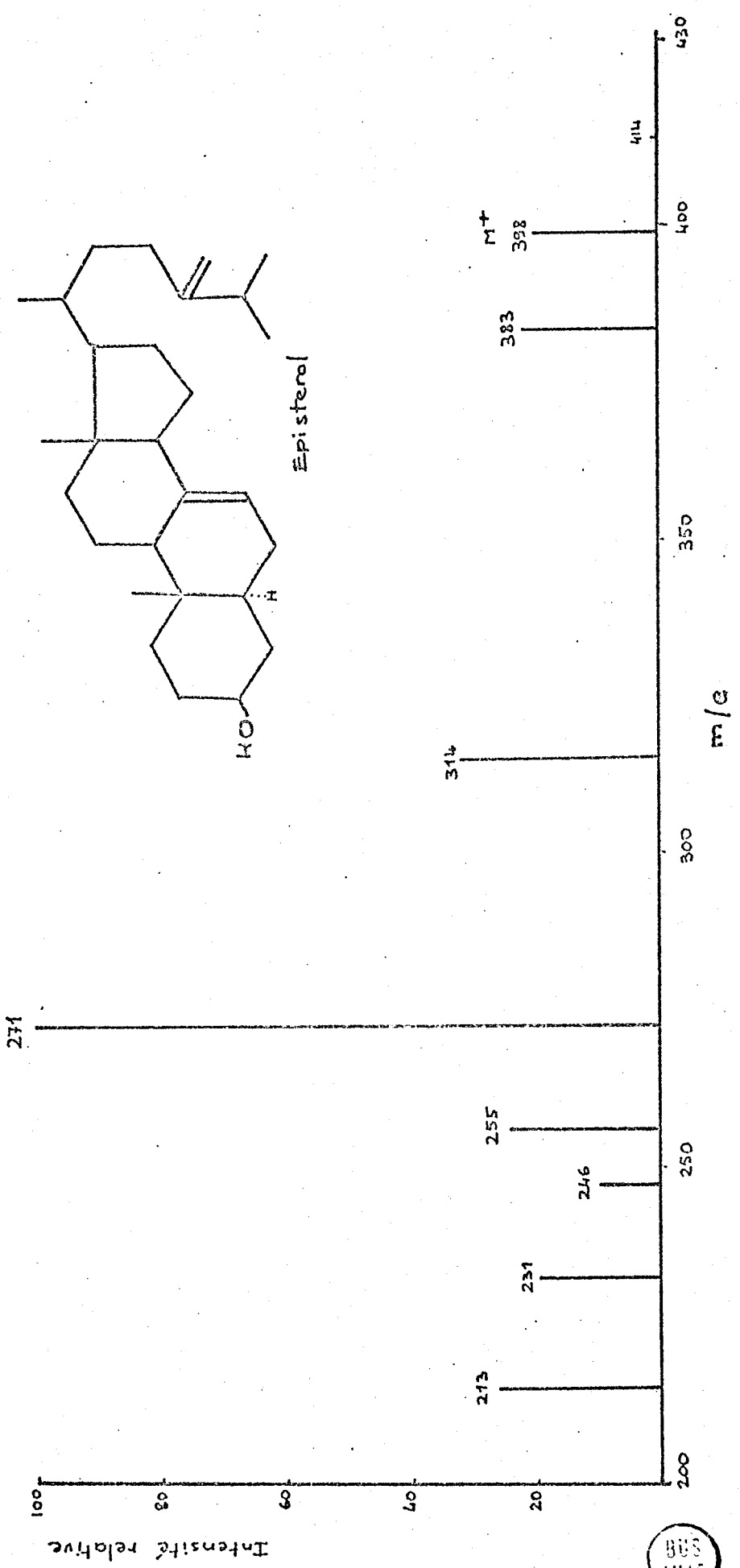
—°°°°°°°°—



3711
396

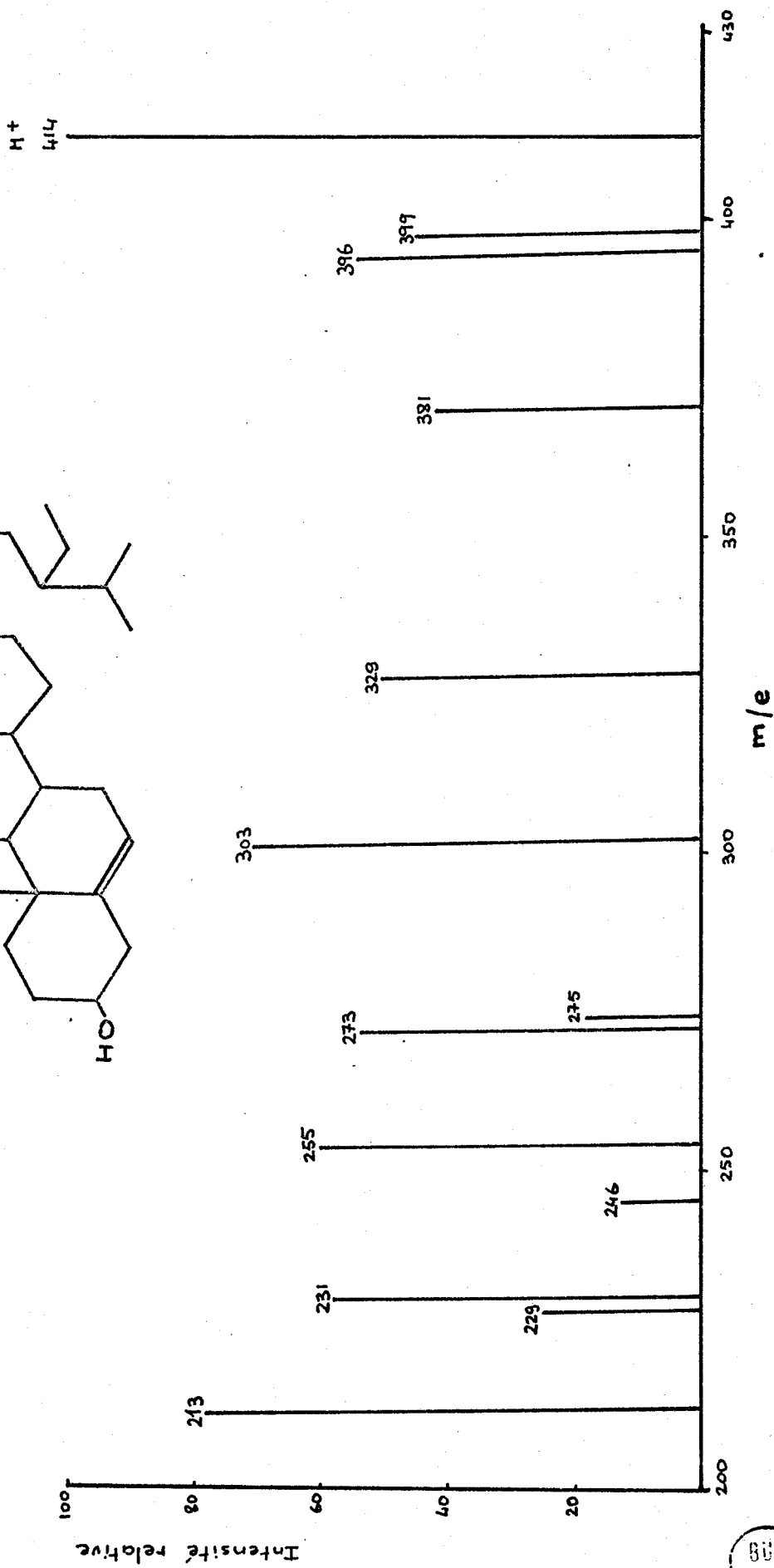
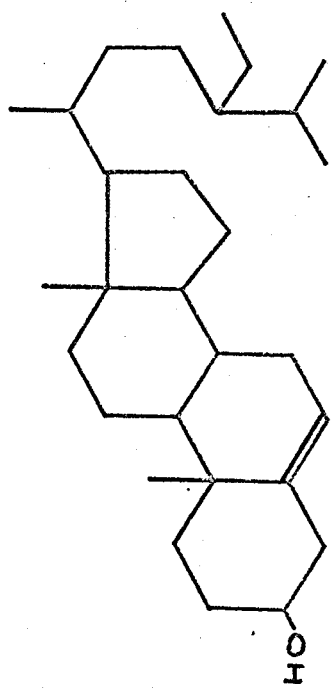
Spectre n° 1

Ergostérol



3115
LILLE

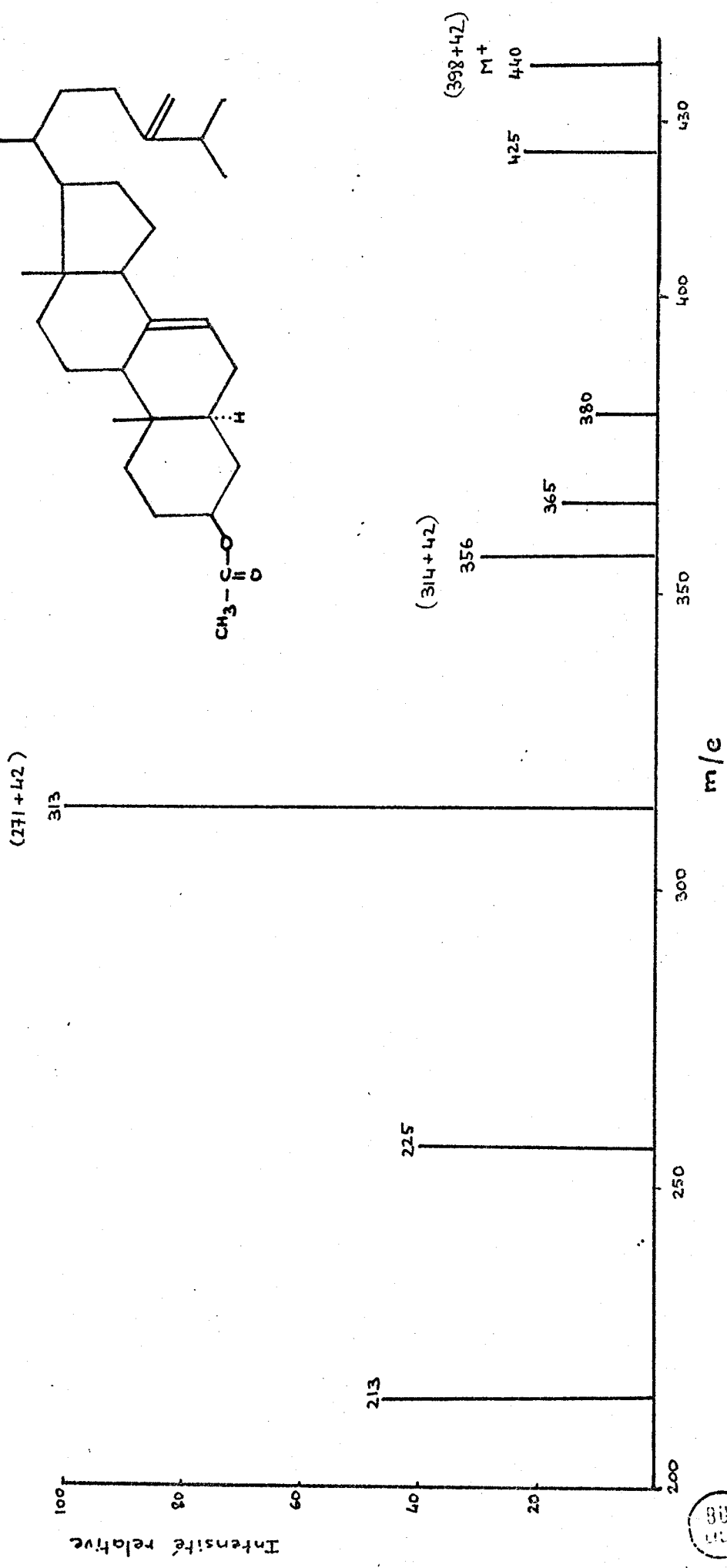
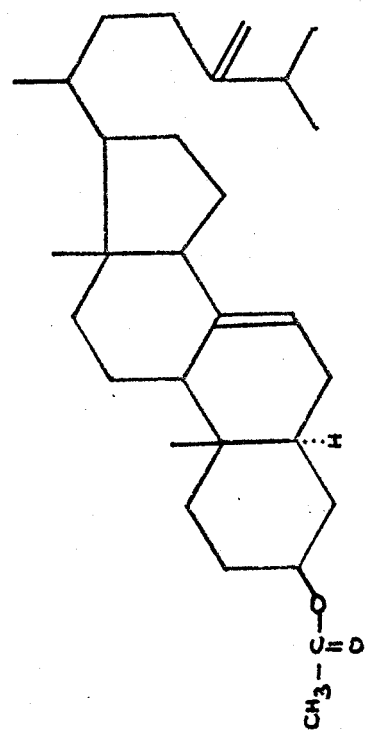
Spectre n° 2



β Sitosterol d'après Knights

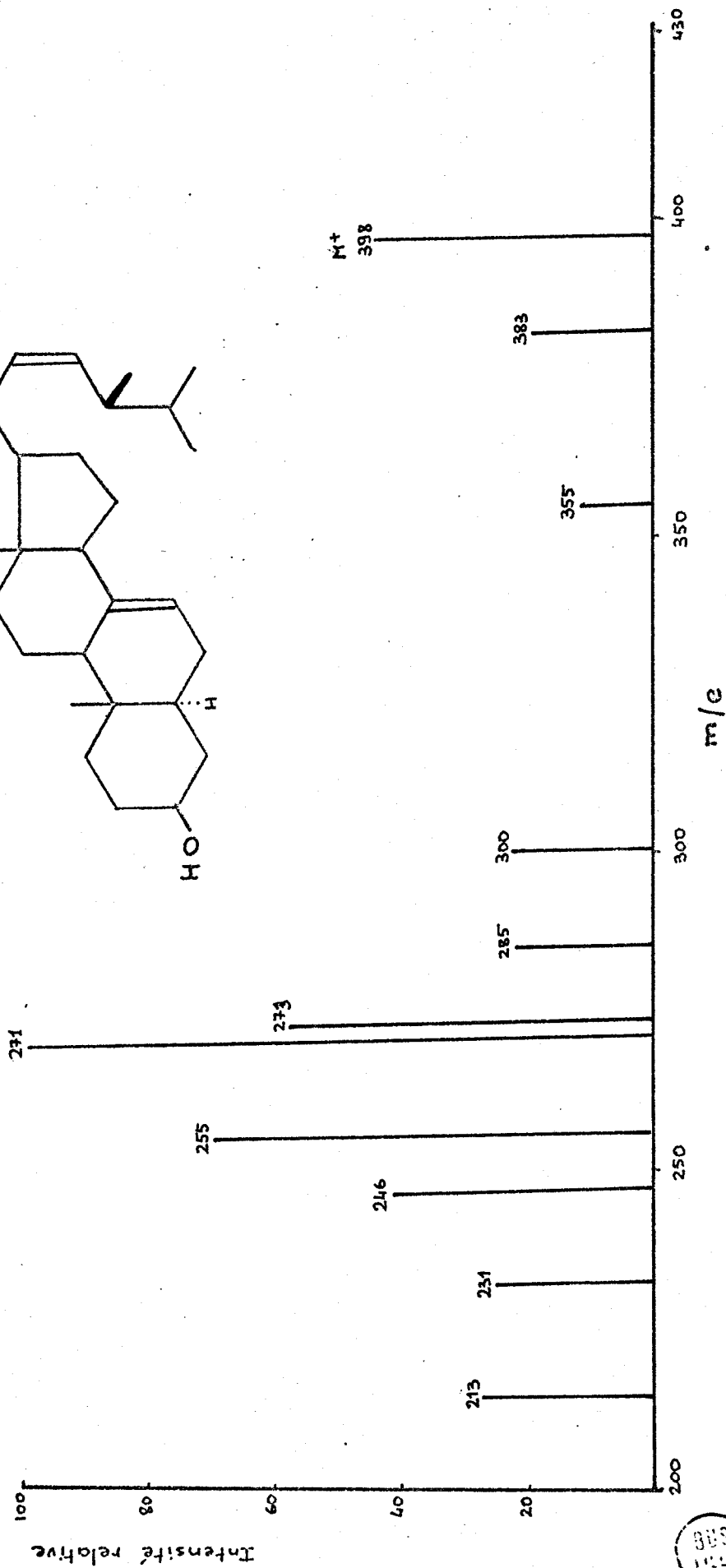
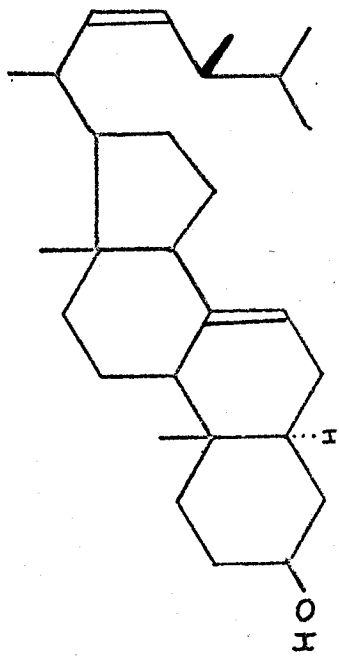
spectre n° 3

Acetate d'épisterol



3717
588
L111E

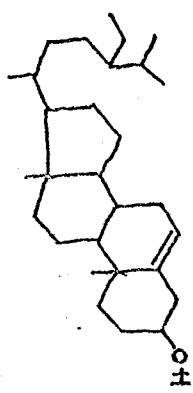
Spectre n°4



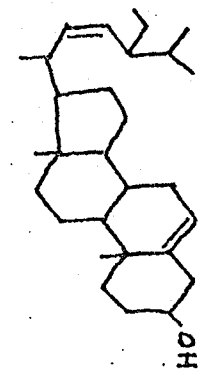
308
1214

Spectre n° 5

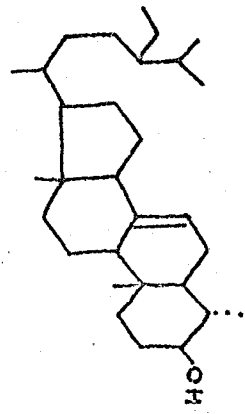
Dihydro-5,6 ergostérol



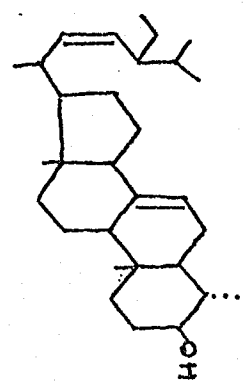
3: β sitosterol



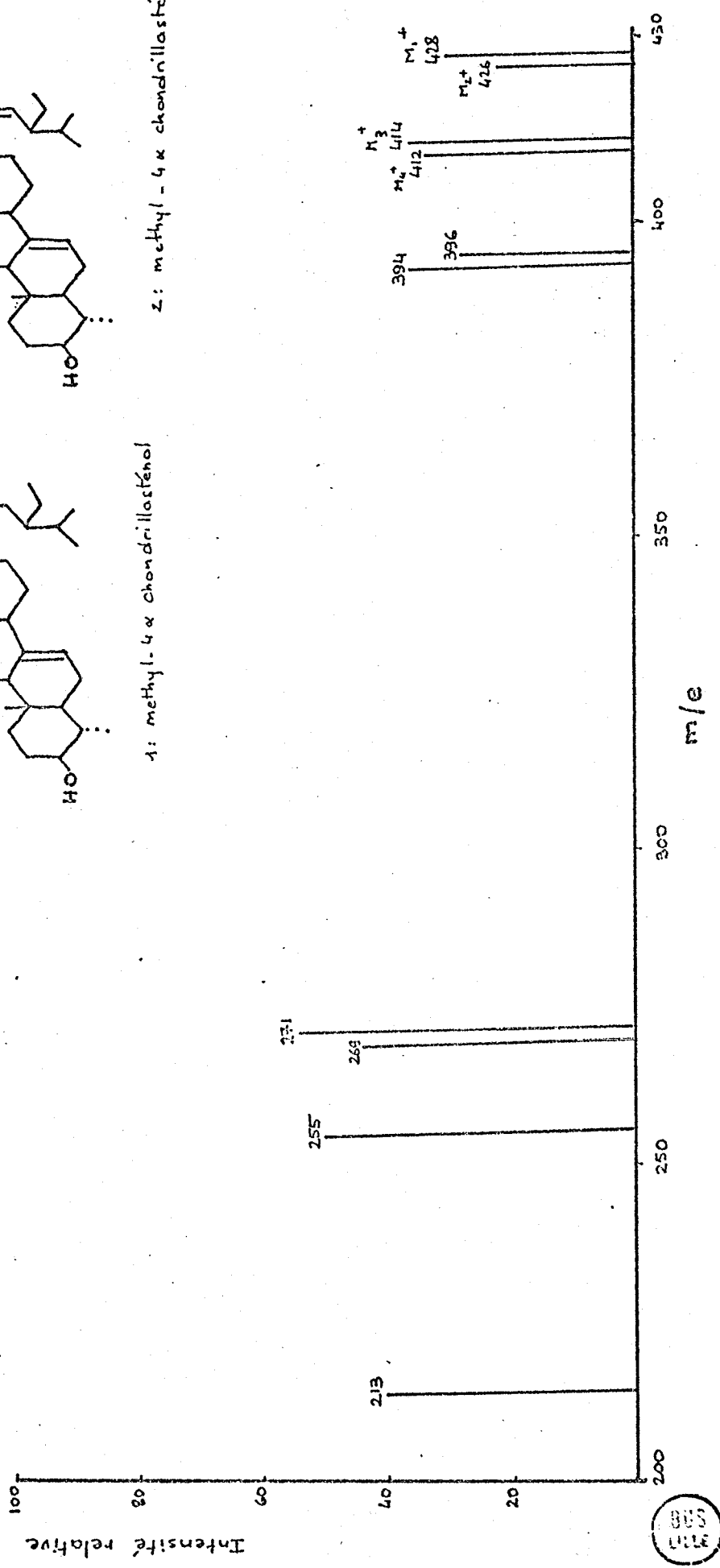
4: stigmasterol



1: methyl-4 α chondrillasterol



2: methyl-4 α chondrillasterol



CONCLUSION.

-°°-°°-°°-°°-

Des moyens techniques ont été mis en œuvre pour caractériser les stérols du Leptosphaeria typhae au 7ème jour de sa croissance végétative, c'est à dire au moment où s'amorce le processus de différenciation sexuée pour les cultures effectuées à la lumière, les cultures effectuées à l'obscurité restant toujours stériles.

Une étude distincte de la composition stérolique provenant de champignon cultivé à la lumière et à l'obscurité a été entreprise.

Par étapes successives d'extraction, les stérols libres ont été séparés des stérols estérifiés. Les composants de chaque catégorie ont été identifiés par des méthodes chimiques : chromatographies, et surtout physiques : spectrométrie de masse.

La composition en stérol est probablement la suivante :

- Dans le Leptosphaeria cultivé à la lumière :

. Stérols libres :	{ ergostérol	100 %
	{ ergostérol	58 %
	{ isomère de l'ergostérol	20 %
. Stérols estérifiés :	{ épistérol	21 %
	{ β sitostérol	1 %

- Dans le *Leptosphaeria* cultivé à l'obscurité :

. Stérols libres	}	ergostérol	86	%
		épistérol	9,8	%
		βsitostérol	0,2	%
		dihydro-5,6 ergostérol	4	%
. Stérols estérifiés	}	ergostérol	54	%
		épistérol	21	%
		βsitostérol	}	25%
		stigmastérol		
		méthyl-4α Δ ₇ chondrillastérol		
		méthyl-4α chondrillastérol		

Pour conclure, il n'est pas interdit de formuler quelques hypothèses qui peuvent venir à l'esprit à la vue de ce tableau :

Ne pourrait-on admettre, que par analogie avec le règne animal, où les hormones libres sont les seules actives du point de vue biologique, (les hormones conjuguées ayant un rôle de réserve), les stérols libres joueraient un rôle dans la reproduction sexuée du champignon ?.

Deux constatations sont en effet à mettre en parallèle :

- d'une part, la composition stérolique est différente selon le mode de culture : à la lumière on ne trouve que de l'ergostérol, à l'obscurité on trouve en plus de celui-ci des stérols mineurs.

- d'autre part, la reproduction n'a lieu qu'en présence de lumière.

N'y aurait-il pas eu alors consommation de ces stérols mineurs d'où induction de la reproduction ?.

Une deuxième différence de composition se situe dans la fraction conjuguée : on note dans le mycélium cultivé à l'obscurité la présence de méthyl-stérols : sont-ils des précurseurs ? pourront-ils ultérieurement, (action de la lumière) se transformer en stérols non méthylés en $4 \times$?.

Tout ceci pose des problèmes qu'il est impossible de résoudre maintenant, une étude systématique de la composition en stérols et de ses variations au cours du développement du champignon devra être entreprise.

BIBLIOGRAPHIE.

-°°-°°-°°-

- (1) TANRET - C.R. Acad. Sc., 1889, 108, 98.
- (2) BLANK - Journal of investigation dermatology, 1962, 39, 91-94.
- (3) TSUDA ; AGAKI - Science, 1957, 126, 927.
- (4) ALCAIDE ; DEVIS ; BARBIER - Phytochem., 1967, 6, 667.
- (5) DENYS ; BARBIER - C.R. Acad. Sc., 1965, 261, 4901.
- (6) LINDE ; ERGENC ; MEYER - Hed. Chim. Acta, 1966, 49, 1246.
- (7) CHEN ; HASKINS - Canad. J. Chem., 1963, 41, 1647.
- (8) MORIMOTO - Ann., 1967, 218-230.
- (9) POLLARD ; PIPPER - Biochem. J., 1931, 25, 135.
- (10) BRANDT ; PRYCE ; ANDING ; OURISSON - Eur. J. Biochem.
1970, 17, 344-349.
- (11) GILLAM - Biochem.J.5, 1936, 30, 1253.
- (12) MAUGENET - Ann. Technol. Agric., 1965, 14, 23.

- (13) BLANK - Dept. Chem., Mc Gill Univ. Montréal Canada, 1964, 202, 4938.
- (14) BAUSLAUGH ; JUST ; BLANK - Nature, 1964, 202, 1218.
- (15) WINDAUS ; BRUNKEN - Ann., 1928, 460, 225.
- (16) JAKAHASHI - Bull. Chem. Soc. Japon, 1966, 39, 348.
- (17) VACHERON ; MICHEL - Phytochemistry, 1968, 7, 1645-1651.
- (18) STARRAT ; MADHOSING - Canad. of Microbiol., 1967, 13.
- (19) CLARKE ; Mc KENZIE - Nature, 1967, 213, 504.
- (20) SMETLEY ; Mc LEAN - Biochem. J., 1928, 22, 22.
- (21) WIELAND - Ann., 1943, 544.
- (22) SCHAW ; JEFFERIES - The Analyst, 1953, 78, 509.
- (23) WIELAND ; GOUGH - Ann., 1930, 482, 36.
- (24) HONEYWELL ; BILLS - J. Biol. Chem., 1933, 103, 515.
- (25) BREIVIK - J. Agr. Food Chem., 1957, 5, 360.
- (26) TILLMAN ; BEAN - Mycologia, 1970, 62, 3, 428.
- (27) GOULSTON - Biochem. J., 1967, 102, 15 c.
- (28) BARTON - Chem. Comm., 1968, 17.
- (29) BERGMANN - Annual Rev. Plant Physiol. Cyt., 1961, 11, 171.
- (30) ANDREASSEN ; STIER - J. Cell. Physiol., 1953, 41, 24-36.

- (31) PROUDLOCH - Biochem. Biophys. Acta, 1968, 434-437.
- (32) ELLIOT - Nature, 1964, 25.
- (33) HASKINS ; TULLOCH - Can. J. Microbiol., 1964, 10, 187-195.
- (34) HENDRIX - Science, 1964, 144, 1028-1029.
- (35) LEAL - Nature, 1964, 203, 545-546.
- (36) NELSON - Phytopath., 57, 1081-1085.
- (37) BARKSDALE - Science, 1969, 166, 3907.
- (38) RAPER - Ann. J. Botany, 1939, 26, 639.
- (39) EDWARDS ; MILLS - J. Amer. Chem. Soc., 1968, 90, 5635.
- (40) HENDRIX ; BENNET - Microbiol., 1970, 5, 11-15.
- (41) OCANA - 1967, Thesis Univ. Calif. Riverside.
- (42) FINEAN - "Circulation", 1962, 26, 1151.
- (43) GOTTLIEB - Ann. Rev. Phytopath., 8, 371-402.
- (44) SCHLOSSER - Arch. Mikrobiol., 61, 246-256.
- (45) BILLS ; MASSENGALE - J. Biol. Chem., 1930, 87, 259.
- (46) SONDERHOFF ; THOMAS - Ann., 1937, 530, 195.
- (47) LYNEN - Biochem. J., 1958, 330, 269.
- (48) BLOCK - J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 2646.
- (49) BLOCK - J. Biol. Chem., 1944, 155-255.

- (50) The chemistry and biology of Yeast (Edited by A.H. COOK).
- (51) COREY - J. Amer. Chem. Soc., 1966, 88, 4751.
- (52) PONSINET ; OURISSON - Phytochem., 1968, 7, 89.
- (53) BEVENISTE ; HIRTH ; OURISSON - Phytochem., 1966, 5-45.
- (54) PONSINET ; OURISSON - Bull. Soc. Chim., 1965, 3682.
- (55) KATSUKI ; BLOCH - J. Biol. Chem., 1967, 242, 2, 222-227.
- (56) BLOCK - J. Biol. Chem., 1944, 155, 255.
- (57) BARTON - Chem. Comm., 1968, 17.
- (58) BREIVIK - J. Agr. Food., 1957, 5, 360.
- (59) LEDERER - Biochem., 4, 347 (1965).
- (60) KAWAGUCHI - Biochem. Biophys. Res. Commun., 33, 463-468.
- (61) LACOSTE - C.R. Acad. Sc., 1965, 260, 3133-3136.
- (62) VIALA ; VIDAL - Physiol. Vég., 1972, 10 (3), 481-494.
- (63) REINARTZ ; LAFOS ; WETZEL - Microchem., 1951, 38, 581.
- (64) AMBID - DEA Toulouse, 1966.
- (65) MONNER ; PARKS - Analytical Biochemistry, 1968, 25-61.
- (66) BLANK - Investigation dermatology, 1962, 39, 91.

- (67) BAUSLAUGH ; JUST ; BLANK - Nature, 1964, 202, 1218.
- (68) TANAHASHI ; TAKAHASHI - Bull. Chem. Soc. Japon, 1966, 39, 848
- (69) STARRAT ; MADHOSING - Can. J. of Microbiology, 1967, 13.
- (70) ADAM ; CAMPBELL, Mc CORKINDALE - Nature, 1957, 216, 397.
- (71) VACHERON ; MICHEL - Phytochemistry, 1968, 7, 1645.
- (72) CLAUDE ; BAUMONT - J. Chrom., 1966, 21, 189-201.
- (73) BRANDT ; PRYCE ; ANDING ; OURISSON - Eur. J. Biochem.,
1970, 17, 344-349.
- (74) MOORE - J. Biol. Chem., 1952, 195, 615.
- (75) DE MAYO ; REED - Chem. and Ind. London, 1956, 1481.
- (76) ENEROTH ; HELLSTROM ; RYHAGE - J. Lipid. Res., 1964,
5, 245.
- (77) WILLIE ; DJERASSI - J. Org. Chem., 1968, 3, n°1, 305.
- (78) KNIGHTS - J. Biol. Chem., 1952, 195, 615.
- (79) REINDEL ; WATER ; RAUCH - Ann., 1927, 42, 452.
- (80) KNIGHTS - Phytochemistry, 1965, 4, 957.