

*S.S.C. de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer;  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université  
de Paris XI*

**Influence de la structure de composés phénoliques  
sur l'inhibition du *Phytophthora parasitica*  
et d'enzymes participant aux processus parasitaires**

**IV. Néoflavonoïdes**

Par

A. RAVISÉ et B. S. KIRKIACHARIAN

*Avec 4 figures*

*Reçu le 20 novembre 1978*

Nos recherches sur les propriétés inhibitrices de composés phénoliques de synthèse possédant des structures analogues à celles des substances naturelles ont concerné des coumarines, des isoflavonoïdes, des homo-isoflavonoïdes (KIRKIACHARIAN et RAVISÉ 1976, RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976 a et b, 1978) et des flavonoïdes (RAVISÉ et CHOPIN 1978). Nous avons étendu nos investigations aux néoflavonoïdes en raison des relations biogénétiques pouvant exister entre ces différents groupes de substances (OLLIS 1968, NAKANISHI et al. 1975). En outre, les néoflavonoïdes constituent un ensemble homogène de produits phénoliques identifiés récemment chez des plantes tropicales, notamment des Lotoideae (DONNELLY et al. 1972, 1975, OLLIS et al. 1978), des Guttiferae (BANDARANAYAKE et al. 1975, CRICHTON et WATERMAN 1978), des Rubiaceae (SANCHEZ-VIESCA 1969).

L'hétérocycle oxygéné des néoflavonoïdes peut être ouvert comme dans le cas des dalbergioquinols et des dalbergioquinones (DONNELLY et al. 1972) ou bien fermé comme dans les structures des néoflavènes (CHATTERJEA et al. 1974) et des aryl-4 coumarines (OLLIS 1968). La présente étude concerne des aryl-4 coumarines et un produit de réduction totale, le phényl-4 chromanol hydroxylé en position-3, précurseur de deux structures largement répandues

l'aryl-4 chromène et le néoflavène (BRAGA de OLIVEIRA et al. 1971). Comme précédemment, nous avons cherché à déterminer d'une part l'influence du nombre et de la position des hydroxyles phénoliques, d'autre part celle de leurs éthers méthyliques sur les propriétés inhibitrices des néoflavonoïdes.

La Figure 1 représente les substances de synthèse et les produits naturels correspondants qui sont énumérés dans le Tableau 1.

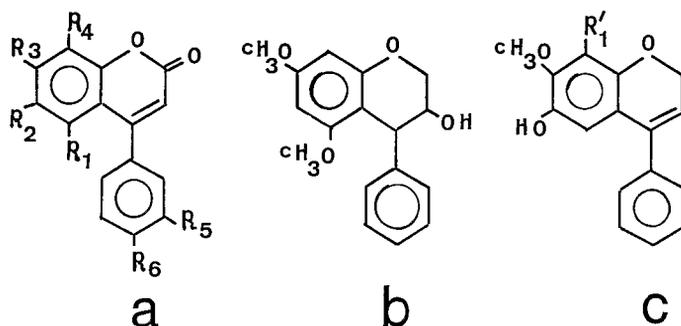


Fig. 1. Comparaison des structures de néoflavonoïdes de synthèse et des substances naturelles; a = produits I à IV et VI à XI; b = produit V; c = produits XII et XIII

Par ailleurs, il existe d'autres néoflavonoïdes ayant une structure quinonique, des phényl-4 diméthyl pyranno coumarines, des phényl-4 furanno coumarines, des phényl-4 chromènes et leurs produits d'ouverture au niveau du noyau chromanne que nous avons mentionnés ci-dessus. C'est pourquoi, nous avons inclus dans cette étude l'hydroxy-4 diméthoxy-5,7 phényl-4 chromanne (V) en tant que précurseur possible des phényl-4 chromènes tels que le dalbergechromène (XII) et le Kuhlmannène (XIII).

## Matériel et techniques

### 1. Les inhibiteurs

La synthèse des phényl-4 coumarines a été effectuée en utilisant la réaction de condensation de Pechman (ZWEIFEL et BROWN 1963). Les éthers méthyliques ont été préparés par l'action du sulfate de méthyle au sein de l'acétone anhydre en présence de carbonate de potassium sec. L'aryl-4 chroménol-3 a été obtenu par hydroboration suivie d'oxydation de la coumarine correspondante par l'eau oxygénée en milieu alcalin.

En fin d'incubation, en présence du parasite ou des enzymes, les contrôles de stabilité ou de dégradation ont été effectués par spectrométrie en ultra violet et par chromatographie sur couches minces de silicagel G<sub>F</sub> 254 (Fluka). Dans ce cas les éluants employés ont été: le chloroforme et le mélange chloroforme—acétone dans les proportions de 3/1 et de 4/1.

### 2. Tests de toxicité en microculture — 3. Etude de l'influence sur les enzymes

Le matériel et les méthodes mis en oeuvre pour ces expériences furent décrits dans les études précédentes (KIRKIACHARIAN et RAVISÉ 1976, RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976a et b, 1978).

## Résultats

Afin de simplifier l'exposé des résultats obtenus au cours des essais d'inhibition, les cinq néoflavonoïdes de synthèse sont désignés par une appellation abrégée suivie de leur numéro permettant de les identifier à l'aide de la Figure 1 et du Tableau 1.

1. Toxicité des néoflavonoïdes pour le *Phytophthora parasitica*

Les cinq substances provoquent en milieu liquide soit sous faible tension d'oxygène (microcultures lutées) soit en aérobiose (cultures en fioles) des troubles physiologiques comparables chez la *P. parasitica*. En particulier, la réduction de croissance semble de même ordre de grandeur dans les deux types d'essais.

Tableau 1

Répartition des hydroxyles phénoliques et des éthers méthyliques sur les sommets  $R_1$  à  $R_6$  des néoflavonoïdes de synthèse — A — et des substances naturelles — B — représentés sur la Figure 1

A — Composés de synthèse	
I	$R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = H$ $R_1 = R_3 = OH$ dihydroxy-5,7 phényl-4 coumarine
II	$R_1 = R_2 = R_5 = R_6 = H$ $R_3 = R_4 = OH$ dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine
III	$R_2 = R_4 = R_5 = R_6$ $R_1 = R_3 = OCH_3$ diméthoxy-5,7 phényl-4 coumarine
IV	$R_1 = R_2 = R_5 = R_6 = H$ $R_3 = R_4 = OCH_3$ diméthoxy-7,8 phényl-4 coumarine
V	$R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = H$ $R_1 = R_3 = OCH_3$ hydroxy-3 diméthoxy-5,7 phényl-4 chromanne
B — Substances naturelles	
VI	$R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = H$ $R_3 = OCH_3; R_4 = OH$ dalbergine: hydroxy-6 méthoxy-7 phényl-4 coumarine
VII	$R_1 = R_4 = R_6 = H$ $R_3 = OCH_3; R_2 = R_5 = OH$ stévenine: dihydroxy-6,4' méthoxy-7 phényl-4 coumarine
VIII	$R_1 = R_4 = R_5 = H$ $R_3 = OCH_3; R_2 = R_6 = OH$ mélanettine: dihydroxy-6,4' méthoxy-7 phényl-4 coumarine
IX	$R_1 = R_4 = H; R_3 = R_6 = OCH_3$ $R_2 = R_5 = OH$ mélanéine: dihydroxy-6,3' diméthoxy-7,4' phényl-4 coumarine
X	$R_1 = R_5 = R_6 = H$ $R_3 = R_4 = OCH_3; R_2 = OH$ kuhlmannine: diméthoxy-7,8 hydroxy-6 phényl-4 coumarine
XI	$R_2 = R_4 = R_5 = H$ $R_1 = R_3 = R_6 = OCH_3$ exostémine: phényl-4 triméthoxy-5,7,4' coumarine
XII	$R'_1 = H$ dalbergedchromène
XIII	$R'_1 = OCH_3$ kuhlmannène

En microcultures, avec une concentration en néoflavonoïdes de  $5 \times 10^{-6}$  la croissance radiale, après 96 heures d'incubation, est de  $1/3$  à  $1/2$  de celle du témoin. A cela s'ajoute une diminution sensible de la densité des thalles ainsi que le blocage de la formation des sporocystes et des chlamydo-spores. La réduction du poids de mycélium sec, formé en une semaine dans les cultures en fioles, est indiquée par le Tableau 2 pour des concentrations de  $5 \times 10^{-6}$  et de  $7,5 \times 10^{-6}$ . Dans ces conditions, la réduction de croissance, variant de 80 à 95 p 100 pour la plus forte concentration, apparait sensiblement équivalente à celle observée sur lames à concavité. A partir de la concentration de  $10^{-5}$ , l'arrêt de la croissance mycélienne intervient rapidement et les rares filaments formés à la périphérie des implants, souvent toruleux, en agrégats, abondamment cloisonnés avec un cytoplasme fortement vacuolisé ou lysé, mesurent de 30 à  $100 \mu$  de long. Les symptômes de toxicité sont analogues à ceux décrits précédemment pour l'inhibition du *P. parasitica* par d'autres composés phénoliques, notamment des coumarines et des isoflavonoïdes (RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976 a et b).

La dose létale varie suivant le stade de développement des thalles sur lesquels sont prélevés les implants. Lorsque ceux-ci proviennent de cultures jeunes n'ayant pas différencié de formes de résistance, la dose létale est d'environ  $1,5 \times 10^{-5}$ . Elle atteint  $2 \times 10^{-5}$  pour des microcultures contenant des chlamydo-spores transférées avec l'implant. Pour des concentrations en néoflavonoïdes comprises entre ces deux valeurs, nous observons que la reprise d'activité des microcultures, après leur transfert sur un milieu nutritif gélosé, intervient lorsqu'une partie des chlamydo-spores ne manifestent pas de symptômes de dégénérescence cytoplasmique en cours d'incubation.

Les contrôles chromatographiques réalisés sur les extraits provenant de cultures en fioles révèlent la formation de substances nouvelles lorsque les produits sont incorporés à la concentration de  $5 \times 10^{-6}$ . Le Tableau 3 indique les  $R_f$  des substances correspondant probablement à la transformation des phényl-4 coumarines pendant l'incubation à faible dose en présence du *P. parasitica*. Les produits nouveaux sont décelés à l'état de traces dans le cas des deux substances diméthoxylées (III et IV) et de la dihydroxy-5,7 aryl cou-

Tableau 2

Inhibition de la croissance du *P. parasitica* en milieu liquide par les néoflavonoïdes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction de mycélium sec formé par rapport au témoin après une semaine d'incubation à  $30^\circ\text{C}$ . Les substances sont: I = dihydroxy-5,7 phényl-4 coumarine; II = dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine; III = diméthoxy-5,7 phényl-4 coumarine; IV = diméthoxy-7,8 phényl-4 coumarine; V = diméthoxy-5,7 phényl-4 chromanol-3

Concentrations	Inhibiteurs				
	I	II	III	IV	V
$5 \times 10^{-6}$	30	35	25	25	40
$7,5 \times 10^{-6}$	85	90	80	80	95

marine (I). Seule la dihydroxy-7,8 aryl coumarine (II) paraît subir une transformation plus importante dans les mêmes conditions d'incubation.

## 2. Influence des néoflavonoïdes sur les activités enzymatiques

### a) sur l' $\alpha$ et la $\beta$ -amylases

Bien que les essais soient réalisés dans les conditions permettant le meilleur contact possible entre l'effecteur et l'enzyme, nous n'avons pas décelé d'inhibition durable. Aux rapports entre effecteur et enzyme compris entre 1 et 3/1, correspondent de faibles ralentissements de la phase initiale de l'activité de la  $\beta$ -amylase. Cependant, après trois heures et demi d'incubation, la dégradation de l'amidon est aussi importante en présence d'effecteur que dans le témoin.

Aucune inhibition de l' $\alpha$ -amylase n'est décelée.

La préincubation à 30°C des effecteurs avec ces enzymes ne modifie pas l'activité de celles-ci.

### b) sur la polyphénol-oxydase

Les néoflavonoïdes étudiés ne modifient pas l'activité d'une polyphénol-oxydase extraite de plants de tomate. Aux rapports effecteur/ enzyme de 2/1, même après un précontact de trois heures à 30°C, l'activité polyphénol-oxydasique demeure comparable à celle du témoin. Aucune stimulation importante n'a été décelée au cours des expériences.

La faible solubilité des deux coumarines dihydroxylées (I et II) ne nous a pas permis de déterminer si elles peuvent servir de substrat à l'enzyme in vitro.

### c) sur la $\beta$ -glucosidase

Les inhibitions d'activité observées pour des rapports effecteur/enzyme variant de 1/2 à 1,5/1 semblent dépendre de la nature et de la position des radicaux portés par les substances.

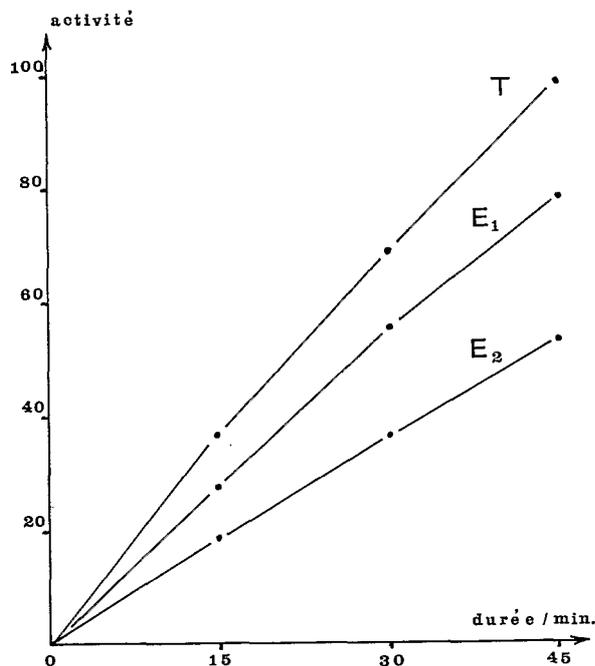
Les éthers méthyliques de la phényl-4 coumarine, en positions 5,7- (III) ou 7,8- (IV) apparaissent les moins efficaces. Ils provoquent une réduction d'activité de l'ordre de 10 % et de 20 % respectivement aux rapports effecteur/enzyme de 1/1 et de 1,5/1. Les coumarines dihydroxylées (I et II) sont plus

Tableau 3

Identification des substances formées au cours de l'incubation du *P. parasitica* avec des néoflavonoïdes incorporés à  $5 \times 10^{-6}$  dans la solution minérale nutritive. Les  $R_f$  sont déterminés en chromatographie sur couche mince de silice  $G_{T254}$  (Fluka) avec pour éluants: A = chloroforme-acétone (4:1); B = chloroforme-acétone (3:1); C = chloroforme. La nomenclature des phényl-4 coumarine est analogue à celle employée dans le Tableau 2

Eluants	Substances			
	I	II	IV	III
A	0,30			
B		0,80	0,20	
C				0,65

actives. Nous constatons une nette prédominance de la dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine (II) pour la quelle les valeurs moyennes de l'inhibition s'établissent à 15, 28 et 45 % pour les rapports effecteur/enzyme de 1/2, 1/1 et 1,5/1. La Figure 2 schématise ces résultats.



Dans tous les essais, l'inhibition d'activité est proportionnelle à la concentration en effecteurs et non compétitive pour le substrat. La durée du pré-contact à 30°C entre l'enzyme et l'effecteur n'influe pratiquement pas sur le rendement de l'inhibition.

Fig. 2. Inhibition de l'activité  $\beta$ -glucosidasique par deux néoflavonoïdes au rapport effecteur/enzyme = 1,5/1. Les effecteurs sont: E<sub>1</sub> = diméthoxy-5,7 phényl-4 coumarine; E<sub>2</sub> = dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine. Témoin d'activité enzymatique = T

#### d) sur les transéliminases pectiques

Nous indiquons successivement les résultats obtenus, à pH basique, avec les enzymes provenant d'une part de la pectinase Fluka, d'autre part de cultures de *Phytophthora parasitica*. Au cours des essais, le rapport entre effecteur et substrat a varié de 1/25 à 1/60. Les résultats obtenus avec les deux catégories d'enzymes apparaissent indépendants de la concentration en substrat ainsi que de la viscosité relative du milieu réactionnel. Ces observations sont valables même dans les cas extrêmes où le rapport effecteur/substrat atteint 1/100.

Les endo pectine transéliminases (endo PTE) de la pectinase Fluka sont les plus sensibles à l'inhibition par les cinq produits étudiés, surtout pour les valeurs les plus faibles du rapport entre effecteur et enzyme. Le Tableau 4 récapitule les valeurs moyennes des inhibitions observées. Celles-ci s'avèrent reproductibles dans le temps avec un faible coefficient de variation,  $\pm 5\%$ . Pour quatre substances (I, III, IV, V), les résultats obtenus sont du même ordre de grandeur à  $\pm 10\%$  près. La dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine (II), dès le rapport effecteur/enzyme de 1/4, provoque une réduction d'activité de 88 % soit de 25 % supérieure à la moyenne de l'inhibition causée par les quatre autres substances étudiées.

Tableau 4

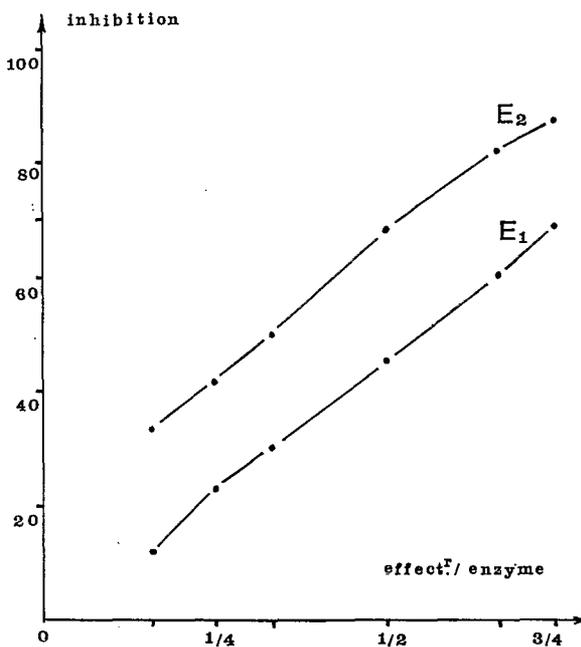
Inhibition de l'activité endo PTE (de la pectinase Fluka), à pH = 7,2, par les néoflavonoïdes pour des rapports entre effecteur et enzyme variant de 1/4 à 3/4. Le substrat est une pectine méthylée à 75 % à la concentration de  $6 \times 10^{-4}$ . Incubation de 24 heures à 30 °C. Résultats exprimés en pourcentage de réduction d'activité par rapport au témoin

Substances	Effecteur/enzyme				
	1/4	1/3	1/2	2/3	3/4
dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine	85	90	100	100	100
dihydroxy-5,7 phényl-4 coumarine	50	60	70	75	85
diméthoxy-5,7 phényl-4 coumarine	55	65	75	80	85
diméthoxy-7,8 phényl-4 coumarine	50	60	70	80	85
diméthoxy-5,7 phényl-4 chromanol-3	55	60	70	80	85

Les études d'inhibition des endo PTE du *P. parasitica* ont été effectuées en plusieurs étapes correspondant à des enzymes extraites de séries de cultures distinctes. Les résultats obtenus sont concordants. Pour des rapports effecteur/enzyme équivalents, l'activité des endo PTE du *P. parasitica* est moins inhibée que celle des endo PTE contenues dans la pectinase Fluka.

Cependant, nous observons le même décalage d'intensité d'inhibition: la dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine (II) a un rendement moyen supérieur d'environ 20 % à celui des quatre autres produits. La Figure 3 illustre cette différence.

Fig. 3. Inhibition de l'activité d'endo PTE du *P. parasitica* par deux néoflavonoïdes pour des rapports effecteur/enzyme variant de 1/5 à 3/4, après une incubation de 24 heures à 30 °C. Les effecteurs sont:  $E_1$  = diméthoxy-5,7 phényl-4 coumarine;  $E_2$  = dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine



Dans les deux séries d'expériences, l'inhibition de l'activité transéliminasi- que est pratiquement proportionnelle au rapport effecteur/enzyme pour des valeurs comprises entre 1/4 et 1/1. Dans ces conditions l'inhibition s'établit rapidement: elle est décelable par spectrométrie en Ultra violet après cinq à

six heures d'incubation. Des résultats analogues sont obtenus lors de l'étude de l'inhibition d'endo pectate transéliminases.

e) sur les hydrolases pectiques

Nous avons observé une inhibition modérée de l'activité des hydrolases pectiques dégradant soit des pectines différemment méthylées (endo PMG) soit de l'acide polygalacturonique (endo PG).

L'origine des endo PMG — des pectinases Fluka et Sigma — et leurs probables différences de structure influent seulement sur le pourcentage de réduction d'activité provoqué par les néoflavonoïdes. Dans tous les cas étudiés, l'inhibition s'établit lentement. En outre, après vingt quatre heures d'incubation et pour les rapports effecteur/enzyme compris entre 1/5 et 1,5/1 on observe des fluctuations de l'inhibition pouvant atteindre  $\pm 10\%$  de la valeur moyenne.

La nature et la position des radicaux OH- et OCH<sub>3</sub>-portés par les néoflavonoïdes, les différences de réduction entre phényl-4 coumarines et phényl-4 chromanol ne provoquent pas de modifications de nature ni d'intensité de l'inhibition. Ses valeurs moyennes correspondent respectivement à 10 %, 20 %, 25 %, 35 %, 40 % pour des rapports effecteur/enzyme de 1/3, 1/2, 3/4, 1/1 et 1,5/1. L'inhibition n'est pas cumulative. Elle est de type non compétitif pour

le substrat comme l'indiquent les courbes de Lineweaver-Burk de la Figure 4, établies avec la diméthoxy-7,8 phényl-4-coumarine (IV) pour des concentrations en pectine de  $3 \times 10^{-4}$  à  $6 \times 10^{-4}$ .

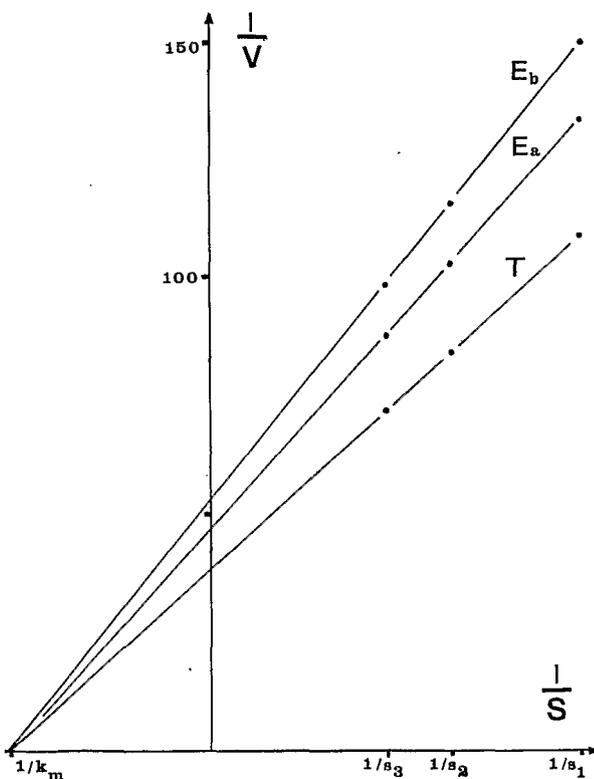


Fig. 4. Courbes de Lineweaver-Burk pour l'activité de l'endo PMG en l'absence ou en présence de la diméthoxy-7,8 phényl-4 coumarine. Témoin = T. Rapports effecteur/enzyme:  $E_a = 3/4$ ;  $E_b = 1/1$ . Le substrat est une pectine méthylée à 75 % aux concentrations de  $S_1 = 3 \times 10^{-4}$ ,  $S_2 = 4,5 \times 10^{-4}$ ,  $S_3 = 6 \times 10^{-4}$ . Incubation de 24 heures à 30 °C

L'inhibition de l'activité des endo PG de la pectinase Sigma présente des points communs avec celle des endo PMG, avec cependant une faible fluctuation des résultats ( $\pm 5\%$ ) entre les répétitions. Les substances substituées en position 5,7 — [le phényl-4 chromanol (V), la coumarine (I) et l'éther méthylrique correspondant (III)] causent des réductions d'activité endo PG analogues à celles des endo PMG. Par contre, les deux composés substitués en position 7,8 —, l'éther méthylrique (IV) et surtout la dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine (II) s'avèrent de meilleurs effecteurs. Dans le cas de la coumarine (II) l'inhibition atteint 70 % pour un rapport entre effecteur et enzyme de 1.

### Discussion

Les néoflavonoïdes que nous avons étudiés s'avèrent capables de perturber plusieurs activités physiologiques chez le *Phytophthora parasitica* et d'inhiber l'activité de la  $\beta$ -glucosidase ainsi que celles d'enzymes pectinolytiques.

Aux plus faibles concentrations —  $5 \times 10^{-6}$  et  $7,5 \times 10^{-6}$  — nous observons dans les microcultures de *P. parasitica* des altérations de parois des hyphes, la lyse cytoplasmique, une réduction de croissance, enfin l'arrêt de la formation de sporocystes et de chlamydo-spores. Ces symptômes tendent à indiquer que plusieurs fonctions sont dérégulées chez l'agent pathogène. Ils semblent de même nature que ceux provoqués sur la même souche de *P. parasitica* par des coumarines, des isoflavonoïdes, des homo-isoflavonoïdes (KIRKACHARIAN et RAVISÉ 1976, RAVISÉ and KIRKACHARIAN 1976 a et b, 1978) ou par des C-glycosyl flavones (RAVISÉ et CHOPIN 1978). Nous relevons également des analogies entre l'inhibition du *P. parasitica* par ces substances et celle de plusieurs espèces de *Phytophthora* provoquées par des sesquiterpènes (STOESSL et al. 1972, 1976, WARD et al. 1974) et par des ptérocarpanes (KEEN 1971, VAN ETTEN et PUEPPKE 1976). En particulier, l'évolution du contenu cytoplasmique, d'abord granuleux puis de plus en plus vacuolisé jusqu'à l'autolyse, les modifications de structure des parois des hyphes pourraient correspondre à des perturbations causées par la plupart des phytoalexines. Les résultats obtenus par VAN ETTEN avec des ptérocarpanes et des isoflavonoïdes pour l'inhibition du *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* et de l'*Aphanomyces euteiches* (VAN ETTEN 1976) corroborent nos observations de même que les travaux d'INGHAM sur les isoflavonoïdes du *Cicer arietinum* pour l'*Helminthosporium carbonum* (INGHAM 1976).

Nous avons établi précédemment que les composés phénoliques di- ou triméthoxylés sont les plus toxiques pour le *P. parasitica*. Au cours de ces essais réalisés avec des substances disubstituées, nous n'avons pas observé d'importantes différences d'efficacité entre les phényl-4 coumarines dihydroxylées (I et II) et leurs éthers méthylriques (III et IV).

Les variations de la dose létale pour chaque produit dépendent du stade de développement des thalles d'où proviennent les implants et principalement de la différenciation de formes de résistance. Bien que les doses létales les plus élevées soient associées à la présence de chlamydo-spores, nous constatons chez

celles-ci des différences de sensibilité aux néoflavonoïdes. Dans les essais réalisés à partir de cultures de quatre semaines ou plus, le contenu cytoplasmique de la plupart des chlamydozoïtes dégénère rapidement. Au contraire, les jeunes chlamydozoïtes prélevées sur des thalles de dix à quatorze jours conservent, en plus grand nombre, un aspect normal. La différence de comportement à l'égard des néoflavonoïdes dépend probablement de la perméabilité des parois et d'une éventuelle dormance (RIOU et RAVISÉ 1970). Comme dans le cas des isoflavonoïdes, le degré de réduction des néoflavonoïdes ne semble pas influencer sur la valeur de la dose létale: l'activité du phényl-4 chromanol (V) est analogue à celles des phényl-4 coumarines (I et II) et de leurs dérivés (III et IV).

Les produits de dégradation décelés en fin d'incubation avec le *P. parasitica*, lorsque celui-ci réalise une croissance limitée, seront étudiés ultérieurement.

Toutes les substances que nous avons éprouvées — coumarines, isoflavonoïdes, homo-isoflavonoïdes, néoflavonoïdes et leurs éthers méthyliques, C-glycosyl flavones sont toxiques pour le *P. parasitica* sans être préalablement oxydées en quinones. Les résultats de ces travaux échelonnés sur cinq ans diffèrent de ceux obtenus avec d'autres composés phénoliques, en particulier la phloridzine de la pomme (RAA 1968, OVEREEN 1976).

Il ressort des études enzymatiques que l'activité des  $\alpha$ - et  $\beta$ -amylases ne sont pas modifiées par l'incorporation de néoflavonoïdes. Ces résultats confirment les essais antérieurs avec d'autres substances phénoliques mais diffèrent de ceux obtenus avec les phytoalexines de la tomate (RAVISÉ et TRIQUE 1972).

La polyphénol-oxydase de la tomate, même après une longue incubation à 30 °C n'est pas inhibée par les trois substances méthoxylées (III, IV et V). Nous avons précédemment établi que la diméthoxy-7,4' isoflavone et deux aryl-3 méthoxy-7 coumarines, comme les phytoalexines de la tomate, stimulent l'activité polyphénol-oxydasique. La faible solubilité des phényl-4 coumarines (I et II) ne nous a pas permis de déterminer si elles peuvent servir de substrat à la polyphénol-oxydase.

L'activité  $\beta$ -glucosidasique est réduite proportionnellement à la concentration des substances étudiées. Nous avons observé des différences d'inhibition liées à la nature des substituants, le produit le plus actif étant la dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine (II). Apparemment, les variations de structures des composés phénoliques ont une incidence sur leurs propriétés effectrices de la  $\beta$ -glucosidase.

Les principaux résultats concernent les enzymes pectinolytiques pour lesquels nous avons établi une différence importante de sensibilité entre les transéliminases et les hydrolases.

Bien que le type d'inhibition pour les deux catégories d'enzymes semble proche — inhibition non cumulative et non compétitive pour le substrat —, les cinq échantillons de néoflavonoïdes agissent faiblement sur les endo PMG. Il se pourrait que la conformation des néoflavonoïdes gêne leur accessibilité au site actif des diverses hydrolases que nous avons éprouvées. Dans leur cas, la réduction d'activité est indépendante de la nature et de la position des sub-

stituants. Par contre, pour les endo PG le diphénol en position 7,8- (II) paraît améliorer le rendement de l'inhibition. Les phényl-4 coumarines se distinguent nettement des hydroxy-4 phényl-3 coumarines parmi lesquelles nous avons décelé de bons inhibiteurs d'hydrolases pectiques, en particulier les substances di- et tri-méthoxylées soit sur la coumarine soit sur le reste phényl. Des variations analogues existent dans le cas des isoflavonoïdes et des coumestanes. Tout particulièrement le dihydroxy-11,12 méthoxy-7 coumestane est un médiocre inhibiteur des endo PMG alors que le diméthoxy-11,12 hydroxy-7 coumestane est très plus actif. Ainsi, malgré que de nombreuses hydrolases soient élaborées par les plantes pour les remaniements de structures des parois pectocellulosiques, les substances phénoliques que nous avons étudiées sont de bons inhibiteurs des endo PMG et endo PG à l'exception des C-glycosyl flavones et des néoflavonoïdes. De même, chez le cotonnier HUNTER a démontré que les polyphénols, en particulier la cathéchine, peuvent inhiber in vitro et in vivo l'activité d'enzymes pectinolytiques (HUNTER 1974, 1978).

Les néoflavonoïdes de cette série s'avèrent d'excellents effecteurs de l'activité de transéliminases pectiques quelle que soit leur provenance. La position des radicaux influe sur l'inhibition. Le meilleur rendement est obtenu avec la dihydroxy-7,8 phényl-4 coumarine (II). Cependant, avec tous les produits l'inhibition s'accroît proportionnellement à leur concentration dans le milieu réactionnel. Une efficacité comparable dans ce domaine a été observée dans le cas des C-glycosyl flavones, d'isoflavonoïdes et d'aryl-3 coumarines. Pour celles-ci, nous avons également établi que la nature, le nombre et la position des substituants influent sur le pouvoir effecteur. En particulier, les chloro-3 et benzyle-3 coumarines, bien qu'excellents inhibiteurs de la croissance du *P. parasitica* s'avèrent de médiocres inhibiteurs de toutes les transéliminases pectiques. Au contraire, les phényl-3 coumarines, principalement celles di- ou tri-méthoxylées sont aussi actives que les phényl-4 coumarines.

Le degré de réduction des substances, dans le groupe des isoflavonoïdes, dans celui des coumarines ou des produits de transition ne semble pratiquement pas modifier les propriétés effectrices qui correspondent à la configuration stérique. Par exemple, le phényl-4 chromanol (V) et les phényl-4 coumarines (I et II) se comportent de façon comparable. Nous avons établi précédemment qu'une isoflavane — le  $\pm$  (0)méthyl sativan —, des diméthoxy-7,4' isoflavanones et isoflavones manifestent des propriétés analogues à l'égard des deux groupes d'enzymes pectinolytiques.

### Conclusion

Les résultats obtenus tendent à indiquer que les néoflavonoïdes possèdent in vitro des propriétés inhibitrices comparables à celles que nous avons reconnues précédemment chez d'autres substances phénoliques. Leur action s'exerce autant sur la réalisation du cycle biologique d'un agent pathogène que sur l'activité d'enzymes dégradant les structures de l'hôte.

Il apparaît que certaines fonctions communes à l'hôte et au parasite ne sont pas altérées par les divers composés phénoliques étudiés. Ainsi, les

activités  $\alpha$ - et  $\beta$ -amylasiques demeurent quasi constantes. L'activité de la polyphénol-oxydase est stimulée par plusieurs éthers méthyliques d'isoflavones et de phényl-3 coumarines; les autres produits dont les néoflavonoïdes n'influent pas sur le déroulement de la réaction enzymatique.

Les activités  $\beta$ -glucosidasiques et pectinolytiques sont inhibées selon des processus paraissant semblables avec toutes les substances phénoliques éprouvées. Différentes situations sont observées quant à l'intensité et à la rapidité de l'inhibition des enzymes pectinolytiques. Les produits se répartissent en trois catégories, certains inhibent fortement les hydrolases et les transéliminases pectiques, d'autres davantage des enzymes appartenant à l'un des deux groupes. Ces différences apparaissent en relation avec, par ordre d'influence décroissante, la structure des substances, la nature, le nombre et la position des substituants. Ainsi, parmi les coumarines étudiées, la plupart des phényl-3 coumarines inhibent fortement les endo PMG et les endo PTE tandis que les phényl-4 coumarines sont seulement de bons effecteurs de l'activité transéliminasique.

Il apparaît également que la structure des produits étudiés est en relation avec leur toxicité pour le *P. parasitica*. Le plus souvent, la nature et le nombre des radicaux fixés module l'importance de l'inhibition. Dans le cas des néoflavonoïdes, les hydroxyles phénoliques et leurs éthers méthyliques perturbent de façon comparable la croissance du parasite. Ces observations, comme celles publiées précédemment, indiquent qu'une oxydation préalable en quinone n'est pas une condition indispensable pour l'inhibition de plusieurs fonctions physiologiques chez le *P. parasitica*. Les vérifications chromatographiques et spectrométriques effectuées en fin d'incubation corroborent cette hypothèse.

La sensibilité des hyphes jeunes placés au contact des néoflavonoïdes à des concentrations comprises entre  $5 \times 10^{-6}$  et  $10^{-5}$  laisse présumer que ces produits existant dans les tissus sains pourraient constituer une éventuelle barrière en début d'infection par un *Phytophthora* sp. Cette éventualité pourrait être vérifiée par l'étude de la pénétration du parasite *in vitro* dans des cultures de tissus ou *in vivo* dans de jeunes plantules des Espèces végétales concernées, en repérant les localisations respectives des néoflavonoïdes et des hyphes puis en déterminant leur évolution dans le temps. Des études analogues seraient susceptible de confirmer au cours de l'infection le rôle *in situ* des isoflavonoïdes, des homo-isoflavonoïdes, des C-glycosyl flavones et des coumarines dans les tissus des plantes qui les élaborent.

Nous remercions Madame ELIANE CONSTANT de sa collaboration aux études d'inhibition *in vitro* du *P. parasitica* et de celles des diverses activités enzymatiques.

### Résumé

Cette étude concerne l'influence de cinq néoflavonoïdes de synthèse sur la croissance du *Phytophthora parasitica* et sur diverses activités enzymatiques en fonction de la position de groupements phénoliques ou de leurs éthers méthyliques. L'incidence de la réduction d'une phényl-4 coumarine en phényl-4

chromanol-3 a été également envisagée. Ces substances inhibent fortement la croissance du *P. parasitica*, les doses létales variant de  $1,5 \times 10^{-5}$  à  $2 \times 10^{-5}$ . Les activités des  $\alpha$ - et  $\beta$ -amylases et celle d'une polyphénoloxydase ne sont pas modifiées par les néoflavonoïdes. Par contre, ils inhibent différemment selon leur structure une  $\beta$ -glucosidase, des hydrolases et surtout des transéliminases pectiques.

#### Summary

#### Influence of the structure of phenolic compounds on the inhibition of the growth of *Phytophthora parasitica* and the activity of parasitogenic enzymes

#### IV. Neoflavonoids

This study concerns the influence of five neoflavonoids on the growth of *P. parasitica* and the activity of some enzymes in relationship with the position of phenolic groups or their methyl ethers. The role of the reduction of a 4-phenyl coumarin to 3-hydroxy-5,7-dimethoxy-4-phenyl-chroman is also examined. These compounds inhibit strongly the growth of *P. parasitica*, lethal doses ranging from  $1.5 \times 10^{-5}$  to  $2 \times 10^{-5}$ . The activities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases and of a polyphenol oxidase are not modified. However, these neoflavonoids inhibit differently a  $\beta$ -glucosidase, pectic hydrolases and mainly pectic transeliminases according to their structure.

#### Zusammenfassung

#### Einfluß der Struktur phenolischer Verbindungen auf die Hemmung des Wachstums von *Phytophthora parasitica* und der Aktivität parasitogener Enzyme

#### IV. Neoflavonoide

Neoflavonoide verschiedener Struktur (Tab. 1) hemmen *in vitro* das Wachstum und die Sporenbildung von *Phytophthora parasitica*. Diese Verbindungen beeinflussen die Aktivität der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen und einer Polyphenoloxydasen nicht. Sie hemmen Pektinhydrolasen, eine  $\beta$ -Glucosidase und vor allem Pektintranseliminasen entsprechend ihrer Struktur in unterschiedlichem Ausmaß.

#### Bibliographie

- BANDARANAYAKE, W. M., S. S. SELIAH, M. U. S. SULTANBAWA, and D. E. GOMES, 1975: Xanthones and 4-phenyl-coumarins of *Mesua thwaitesii*. *Phytochemistry* 14, 265—269.
- BRAGA DE OLIVEIRA, A., O. R. GOTTLIEB, W. D. OLLIS, and C. T. RIZZINI, 1971: A phylogenetic correlation on the genera *Dalbergia* and *Machaerium*. *Phytochemistry* 10, 1863—1876.
- CHATTERJEA, J. N., V. PRASAD, R. PRASAD, and N. D. SINHA, 1974: New synthesis of 3-alkyl (or -aryl) chrom-3-enes. *J. Indian Chem.* 27, 1256—1258.

- CRICHTON, E. G., and P. G. WATERMAN, 1978: Dihydromammea c/ob: a new coumarin from the seed of *Mammea africana*. *Phytochemistry* 17, 1783—1786.
- DONNELLY, D. M. X., J. O'REILLY, and J. THOMPSON, 1972: Neoflavonoids of *Dalbergia cultrata*. *Phytochemistry* 11, 823—826.
- , —, and W. BASIL WHALLEY, 1975: Neoflavonoids of *Dalbergia melanoxylon*. *Phytochemistry* 14, 2287—2290.
- ETTEN, H. D. VAN, 1976: Antifungal activity of pterocarpan and other selected isoflavonoids. *Phytochemistry* 15, 655—659.
- , and S. G. PUEPKE, 1976: Isoflavonoids phytoalexins. *Ann. Proc. Phytochem. Soc.* 13, 239—289.
- HUNTER, R. E., 1974: Inactivation of pectic enzymes by polyphenols in cotton seedlings of different ages infected with *Rhizoctonia solani*. *Physiol. Plant Path.* 4, 151—159.
- , 1978: Effects of catechin in culture and in cotton seedlings on the growth and polygalacturonase activity of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 68, 1032—1036.
- INGHAM, J. L., 1976: Induced and constitutive isoflavonoids from stems of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) inoculated with spores of *Helminthosporium carbonum* Ullstrup. *Phytopath. Z.* 87, 353—367.
- KEEN, N. T., J. J. SIMS, D. C. ERWIN, E. RICE, and J. E. PARKRIDGE, 1971: 6a-hydroxyphaseollin: an antifungal chemical induced in soybean hypocotyls by *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology* 61, 1084—1089.
- KIRKIACHARIAN, B. S., et D. RAULAIS, 1969: Hydroboration des coumarines. *C. R. Acad. Sci., sér. C*, 269, 464—467.
- , et —, 1970: Hydroboration d'hétérocycles oxygénés. *Bull. Soc. Chim.* 60, 1139—1143.
- , et A. RAVISÉ, 1976: Synthèse et propriétés biologiques du ( $\pm$ )-0 méthyl sativan. *Phytochemistry* 15, 907—909.
- NAKANISHI, K., et al., 1975: *Nat. Prod. Chem.* 2, 253—255.
- OLLIS, W. D., 1968: New structural variants among the isoflavonoid and the neoflavonoid classes. *Rec. Adv. Phytochem.*, 361—378. North Holland Publ. Co., Amsterdam.
- , B. T. REDMAN, R. J. ROBERTS, I. O. SUTHERLAND, O. R. GOTTLIEB, and M. T. MARGALHAES, 1978: Neoflavonoids and the cinnamylphenol Kuhlmannistyrene from *Machaerium kuhlmannii* and *M. nicticans*. *Phytochemistry* 17, 1383—1388.
- OVEREEM, J. C., 1976: Pre-existing antimicrobial substances in plants and their role in disease resistance. *Ann. Proc. Phytochem. Soc.* 13, 195—206.
- RAA, J., 1968: Polyphenols and natural resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *Netherl. J. Plant Path.* 74, 37—45.
- RAVISÉ, A., et J. CHOPIN, 1978: Etude in vitro des propriétés inhibitrices de C-glycosyl flavones pour le *Verticillium albo atrum* Rke. et Berth., le *Phytophthora parasitica* Dast. et des enzymes pectinolytiques. *C. R. Acad. Sci., Sér. D*, 286, 1885—1888.
- , et B. S. KIRKIACHARIAN, 1976a: Influence de la structure de composés phénoliques sur l'inhibition du *Phytophthora parasitica* et d'enzymes participant aux processus parasitaires. I. Isoflavonoïdes et coumestanes. *Phytopath. Z.* 85, 74—85.
- , et —, 1976b: II. Coumarines. *Phytopath. Z.* 86, 314—326.
- , et —, 1978: III. Homo-isoflavanones. *Phytopath. Z.* 92, 36—50.
- , et B. TRIQUE, 1972: Réactions phénoliques et production de phytoalexines chez les plantules de *Lycopersicon* Mill. infectées par des souches de *Phytophthora* de Bary. *C. R. Acad. Sci., Sér. D*, 274, 1505—1508.
- RIOU, S., et A. RAVISÉ, 1970: Etude des chlamydospores chez quelques espèces de *Phytophthora* de Bary. *Cah. Maboké* 8, 93—106.
- SANCHEZ-VIESCA, F., 1969: The structure of exostemin, a new 4-phenyl-coumarin isolated from *Exostemma caribaeum*. *Phytochemistry* 8, 1821—1823.
- STOESSL, A., C. H. UNWIN, and E. W. B. WARD, 1972: Postinfectional inhibitors from plants. I. Capsidiol, an antifungal compound from *Capsicum frutescens*. *Phytopath. Z.* 74, 141—152.
- , —, and —, 1976: Sesquiterpenoid stress compounds of the Solanaceae. *Phytochemistry* 15, 855—872.

- WARD, E. W. B., C. H. UNWIN, and A. STOESSL, 1974: Postinfectional inhibitors from plants. XIII. Fungitoxicity of the phytoalexin capsidiol and related sesquiterpenes. *Canad. J. Bot.* **52**, 2481—2488.
- ZWEIFEL, G., and H. C. BROWN, 1963: The Pechman condensation. *Organic Reactions* **13**, 1—58.

Adresses des auteurs: A. RAVISÉ, directeur de recherches à l'O.R.S.T.O.M., Services Scientifiques Centraux (S.S.C.), 72 route d'Aulnay, 93140 Bondy (France). B. S. KIRKICHARIAN, Professeur agrégé de pharmacie chimique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 2 rue J. B. Clément, 92290 Chatenay Malabry (France).