

*Mission au Liban de l'Office de la Recherche Scientifique  
et Technique Outre Mer;  
Faculté Française de Médecine et de Pharmacie à Beyrouth*

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

### **II. Coumarines**

Par

A. RAVISÉ<sup>1)</sup> et B. S. KIRKIACHARIAN

*Avec 4 figures*

*Reçu le 9 décembre 1975*

Les études concernant les interactions entre hôte et parasite mettent fréquemment en évidence l'accumulation de substances phénoliques dans les tissus infestés. Nous avons examiné dans la première partie de cette étude les propriétés *in vitro* de composés phénoliques appartenant aux groupes des iso-flavonoïdes et des coumestanes. Les structures de ces substances sont proches de celles décelées chez diverses plantes en réaction à des attaques fongiques. Les produits éprouvés ayant manifesté des propriétés inhibitrices, nous avons étendu nos investigations aux coumarines.

Les coumarines sont synthétisées chez de nombreuses espèces végétales (HARBORNE 1964, RIBÉREAU GAYON 1968, BROWN 1965, AKAZAWA et al. 1960), le plus souvent sous forme de glucosides. Fréquemment, après une invasion parasitaire, des coumarines spécifiques s'accumulent chez des plantes cultivées, notamment la scopoline chez le *Solanum tuberosum* (CLARKE 1973) et chez le *Rhododendron simsii* (RAUTENBERG 1973) et cette coumarine associée à la chicoriine chez plusieurs *Nicotiana* (TANGUY 1970, RAVISÉ et TANGUY 1973). De plus, l'hypothèse avait été avancée que dans la biosynthèse de plusieurs phytoalexines, notamment de ptérocarpanes et de coumestanes, des aryl-cou-

<sup>1)</sup> Avec la collaboration technique de NABIH ABOU HADIR.

marines pourraient intervenir (DEWICK, BARZ et GRISEBACH 1970, HIJEWEGEN 1974). En laboratoire, des coumarines sont utilisées comme produits intermédiaires pour la synthèse de ptérocarpanes (KIRKIACHARIAN 1975 et travaux en cours, KIRKIACHARIAN et CHIDIAC 1973 et 1975, KIRKIACHARIAN et RAVISÉ 1976).

Cette étude est réalisée avec des coumarines de synthèse différant des coumarines naturelles par la présence d'un hydroxyle en position 4 et d'un substituant sur le sommet 3 (Fig. 1). Les recherches ont concerné huit produits de structures diverses, en particulier des aryl-3 coumarines et leurs différents éthers méthyliques. Nous avons aussi tenté de déterminer si la position des groupements méthoxy-pouvait influencer sur l'activité biologique des substances éprouvées. Leurs propriétés inhibitrices sont comparées à celles du capsidiol, phytoalexine terpénique (STOESSL, UNWIN et WARD 1972) élaborée par le *Capsicum frutescens* en réaction au parasitisme et dont le Docteur STOESSL a bien voulu nous confier un échantillon purifié pour ces travaux.

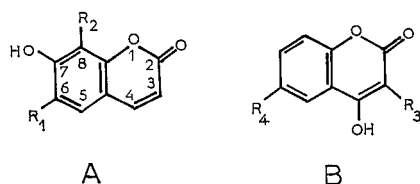


Fig. 1. Comparaison des structures des coumarines naturelles et des coumarines de synthèse utilisées pour les expériences. A: coumarines naturelles.  $R_1 = H, OH, OCH_3$ ;  $R_2 = H, OH, OCH_3$ . B: coumarines des synthèse.  $R_3 = H, \text{chloro}, \text{benzyle}, \text{phényl}$ ;  $R_4 = H, OCH_3$

## Matériel et techniques

### 1. Les inhibiteurs

La coumarine la plus simple des huit substances synthétisées est une hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine (Fig. 1,  $R_3 = R_4 = H$ ). Trois types de substitutions en position —3 sont expérimentées: chloro-3, benzyle-3, et phényl-3 (Fig. 2).

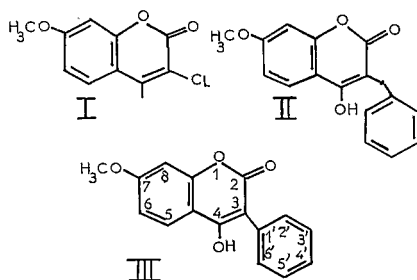


Fig. 2. Structure des trois types de coumarines synthétisées pour les essais de toxicité. I Chloro-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine. II Benzyle-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine. III Phényl-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine

L'ensemble des hydroxy-4 coumarines substituées en position 3 ont été obtenues par la réaction de condensation thermique de MENTZER (MENTZER et URBAIN 1943 et 1944). Cette réaction s'effectue en condensant un phénol et un ester malonique convenablement substitués selon le schéma représenté sur la Figure 3.

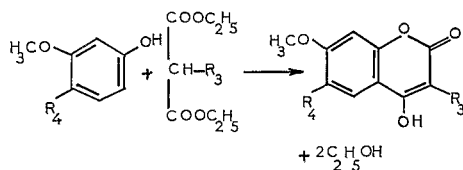


Fig. 3. Préparation des hydroxy-4 coumarines substituées en position 3 par la réaction de condensation thermique de MENTZER

L'hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine a été obtenue par élimination de l'atome de chlore en position 3 par hydrogénolyse à partir de la chloro-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine (KIRKIACHARIAN 1966).

Dans le cas des phényl-3 coumarines, nous avons cherché à établir si le nombre des éthers méthyliques et leur position éventuelle pouvait influencer sur la toxicité et la capacité effective des substances. Le Tableau 1 indique la répartition des éthers méthyliques chez les huit coumarines éprouvées.

Tableau 1

Répartition des éthers méthyliques sur les huit coumarines de synthèse employées pour les tests *in vitro*. Position: le numéro du sommet correspond à la coumarine dans la première colonne et au substituant dans la seconde colonne (voir numérotation, Fig. 2). Total des éthers méthyliques: colonne 3

Substances	Position		Total (3)
	(1)	(2)	
hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	7	—	1
chloro-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	7	—	1
benzyle-3 méthoxy-7 coumarine	7	—	1
hydroxy-4 (méthoxy-4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	7	4'	2
hydroxy-4 (méthoxy-4' phényl)-3 diméthoxy 5,7 coumarine	5,7 (méta)	4'	3
hydroxy-4 (diméthoxy 3',4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	7	3',4' (ortho)	3
hydroxy-4 (diméthoxy 2',4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	7	2',4' (méta)	3
hydroxy-4 (diméthoxy 2',4' phényl)-3 diméthoxy 5,7 coumarine	5,7 (méta)	2',4' (méta)	4

## 2. Tests de toxicité en microculture

Nous rappelons succinctement les techniques employées qui sont identiques à celles décrites dans la première partie de l'étude. Les tests sont effectués avec une souche de *Phytophthora parasitica* Dastur, isolée de *Lycopersicum esculentum* Mill. au Liban. La toxicité des produits est déterminée en incorporant, dans un volume d'éthanol de 1/10 du volume total, des solutions de concentration connue à un milieu nutritif liquide (RIOU et RAVISÉ 1970). Les microthalles, d'environ 100 microns de diamètre, sont placés en incubation pendant 96 heures à 30 °C, sur des lames à concavité lutées à la paraffine; ainsi le contact entre le parasite et la solution reste constant. Puis après examen des microcultures au microscope, celles-ci sont transférées en tubes sur un milieu nutritif. Après une semaine d'incubation en étuve, on sépare les tubes

contenant les implants morts de ceux ayant survécu au traitement puis sont appréciés les caractères macroscopiques et la vitesse de croissance de chaque série de thalles par rapport aux témoins.

### 3. Etude de l'influence des substances sur les réactions enzymatiques

Aucune modification n'est apportée aux méthodes décrites précédemment que nous rappelons succinctement.

Tous les essais se déroulent à 30 °C.

#### a) Polyphénol-oxydase

L'enzyme, extraite de plantules de tomate, agit sur un substrat de pyrocatéchol à 0,50 pour 100 dans un tampon McIlvaine — 0,1 M — à pH 6. La réaction est suivie par spectrophotométrie à 400 nm (FUCHS 1965, RAVISÉ et TRIQUE 1972).

#### b) Bêta-glucosidase

La dégradation du p-nitrophényl bêta, D glucopyranoside par une bêta-glucosidase commerciale, à pH = 5,5, dans du tampon citrate à 50 mM est mesuré à 410 nm par spectrophotométrie (REESE et al. 1968). Le rapport entre effecteur et enzyme est de 1/3.

#### c) Transéliminases pectiques

Elles sont d'origine fongique ou commerciale. Leur aptitude à dégrader des pectines très méthylées et l'acide polygalacturonique est déterminée par spectrophotométrie dans l'ultraviolet entre 226 et 238 nm (RAVISÉ et TRIQUE 1972) et après traitement par l'acide thiobarbiturique entre 530 et 560 nm (TRIQUE 1971). L'inhibition est appréciée pour des rapports de concentrations entre effecteur et enzyme variant de 1/10 à 1/2.

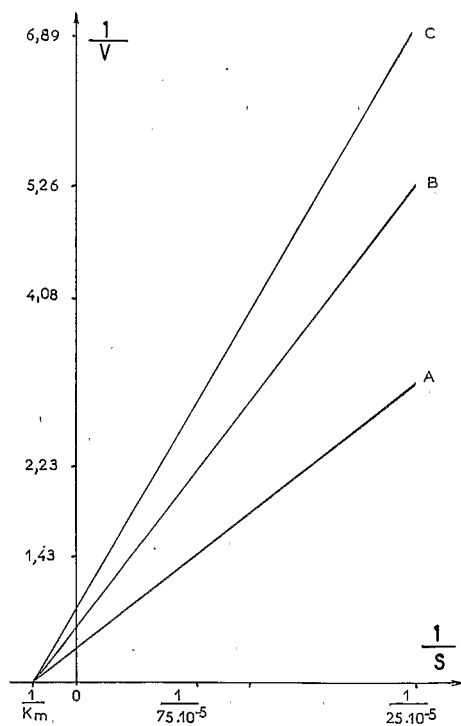


Fig. 4. Courbes de LINEWEAVER-BURK pour l'activité de l'endopectine transéliminase en l'absence ou en présence de l'hydroxy-4 (diméthoxy-3',4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine. Témoin (A), inhibition aux rapports effecteur/enzyme 1/10 (B) et 1/5 (C)

#### d) Hydrolases pectiques

Les hydrolases proviennent d'une préparation commerciale. Les substrats sont analogues à ceux décrits ci-dessus, au pH près. Les rapports effecteur/enzyme varient de 1/20 à 1/10. La réduction d'activité par rapport au témoin est déterminée par spectrophotométrie entre 490 et 530 nm après traitement à l'acide thiobarbiturique.

*Tableau 2*  
Récapitulation, par ordre d'activité décroissante, des altérations provoquées par les inhibiteurs aux microcultures de *P. parasitica*  
(incubation de 96 H à 30 °C, milieu liquide).

Altérations des thalles: A = vacuolisation; B = malformations; C = dégénérescence du cytoplasme  
(+ action positive, — sans effet)

Substances	Action sur le <i>P. parasitica</i>					dose létale
	altérations des thalles à la concentration de $5 \times 10^{-6}$			inhibition de croissance		
	A	B	C	C = $5 \times 10^{-6}$	C = $10^{-5}$	
capsidiol	+	+	+	50 %	totale	$10^{-5}$
benzyle-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	+	+	+	30 %	totale	$10^{-5}$
chloro-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	+	+	+	20 %	totale	entre $10^{-5}$ et $2 \times 10^{-5}$
hydroxy-4 (méthoxy-4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	+	+	—	$\leq 20$ %	totale	$\leq 2 \times 10^{-5}$
hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	+	—	—	$\neq$ nulle	totale	$\neq 2 \times 10^{-5}$
hydroxy-4 (méthoxy-4' phényl)-3 diméthoxy-5,7 coumarine	+	—	—	faible	90 %	$\leq 2 \times 10^{-5}$
hydroxy-4 (diméthoxy 3',4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	+	—	—	faible	90 %	$\leq 2 \times 10^{-5}$
hydroxy-4 (diméthoxy 2',4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	+	—	—	$\neq$ nulle	85 %	$\leq 2 \times 10^{-5}$
hydroxy-4 (diméthoxy 2',4' phényl)-3 diméthoxy 5,7 coumarine	+	—	—	$\neq$ nulle	80 %	$\leq 2 \times 10^{-5}$

## Résultats

### I. Toxicité des coumarines pour le *Phytophthora parasitica*

Plusieurs indications semblent se dégager des essais récapitulés dans le Tableau 2, en particulier:

- les huit produits étudiés déterminent des altérations cytoplasmiques de même nature que celles provoquées par le capsidiol;
- les coumarines substituées paraissent les plus toxiques;
- le nombre de groupements méthoxy influe sur cette propriété.

Comme le capsidiol, les coumarines provoquent après quelques heures d'incubation, des modifications cytoplasmiques d'abord décelables vers l'apex des hyphes en croissance. Les premiers symptômes consistent en une vacuolisation accrue, suivie d'une apparition de granulations réfringentes. L'évolution ultérieure dépend de la toxicité du produit incorporé. Le capsidiol, la benzyle-3 et la chloro-3 coumarines déterminent la dégénérescence lipidique du cytoplasme de la plupart des hyphes, avec pour corollaire une croissance très faible des filaments jeunes pendant le début de l'incubation. Ces mêmes substances ainsi que le phényl-3 coumarine la moins méthoxylée provoquent également des malformations des parois. Elles apparaissent au microscope comme des protubérances irrégulières sur les apex ou sur les segments terminaux. Parfois se forment des vésicules, la plupart étant terminales.

La phytoalexine terpénique provoque la réduction de croissance la plus importante. Les trois aryl-coumarines s'avèrent plus toxiques que l'hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine. La benzyle-3 coumarine est presque aussi active que le capsidiol; la dose létale de ces deux substances se situe vers  $10^{-5}$ . La chloro-3 coumarine serait légèrement moins toxique, sa dose létale est comprise entre  $10^{-5}$  et  $2 \times 10^{-5}$  comme celle de la phényl-3 hydroxy-4 diméthoxy-4',7 coumarine dont l'activité s'avère presque équivalente.

La toxicité des phényl-3 coumarines semble dépendre du nombre de groupements méthoxy, et, dans une moindre mesure, de leur position. Ainsi, la phényl-3 coumarine la moins méthylée inhibe nettement la croissance du *Phytophthora parasitica* à la concentration de  $5 \times 10^{-6}$  tandis que les dérivés tri- et tétra-méthoxylés sont sans effet à la même dose. D'autre part, parmi les trois phényl-coumarines triméthoxylées, celle possédant deux radicaux en position méta sur le reste phényl-3 semblerait légèrement moins toxique dans tous les essais.

### 2. Influence des coumarines sur les activités enzymatiques

#### a) sur la bêta-glucosidase

L'inhibition de l'activité bêta-glucosidasique, pour le rapport de concentration entre effecteur et enzyme de 1/3, semble quasi uniforme: de l'ordre de 30 pour 100 pour la coumarine de référence et pour cinq des aryl coumarines. Deux phényl-3 coumarines — la diméthoxy-4',7 et la triméthoxy-3',4',7 — sont légèrement moins inhibitrices, il ne semble pas exister de corrélation entre la position des éthers méthyliques et la réduction d'activité.

## b) sur les hydrolases pectiques

Le mode d'inhibition apparait identique pour des endopectines hydrolases (endo PG) et des endo pectates hydrolases. C'est pourquoi, nous mentionnons dans le Tableau 3 seulement les résultats obtenus pour les premières avec des rapports entre effecteur et enzyme de 1/20 et 1/10.

Trois remarques s'imposent:

- la coumarine la plus simple et plusieurs de ses dérivés arylés inhibent faiblement l'activité endo PG;
- les aryl coumarines fortement méthoxylées se comportent comme de bons effecteurs;
- l'inhibition de l'activité enzymatique, dans la plupart des cas, n'est pas directement proportionnelle à la concentration en coumarine.

Alors qu'elles inhibent fortement la croissance du *Phytophthora parasitica*, les chloro-3 et benzyle-3 coumarines influent peu sur l'activité endo PG. De surcroît, la progression de l'inhibition n'est pas proportionnelle aux variations du rapport entre effecteur et enzyme. Plus efficaces, l'hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine et l'hydroxy-4 (méthoxy-4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine agissent de façon comparable. Il semblerait que l'adjonction du radical phényl porteur d'un éther méthylique modifie peu la fonction effectrice. Par contre, les phényl-3 coumarines les plus méthoxylées se comportent comme de bons inhibiteurs de l'activité endo PG. La plus forte réduction d'activité est obtenue avec une phényl-3 coumarine possédant deux éthers méthyliques en position ortho sur le noyau phényl. Les autres phényl-3 coumarines, tri ou tétra méthoxylées, avec deux d'entre eux en position méta, s'avèrent moins inhibitrices à faible concentration (rapport effecteur/enzyme de 1/20).

Nous avons vérifié pour tous les composés, en faisant varier la concentration en substrat pour chacun des rapports entre effecteur et enzyme, que l'inhibition est non compétitive pour le substrat.

Tableau 3

Pourcentages d'inhibition, par rapport au témoin, de l'activité endo pectine hydrolase selon les coumarines aux rapports entre effecteur et enzyme de 1/20 et de 1/10. Incubation: 24 heures à 30 °C

Substances	Effecteur/enzyme	
	1/20	1/10
hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	33	44
chloro-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	15	25
benzyle-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	32	25
hydroxy 4 (méthoxy-4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	39	50
hydroxy-4 (méthoxy-4' phényl)-3 diméthoxy-5,7 coumarine	32	64
hydroxy-4 (diméthoxy-3',4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	53	67
hydroxy-4 (diméthoxy-2',4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	23	58
hydroxy-4 (diméthoxy-2',4' phényl)-3 diméthoxy-5,7 coumarine	38	64

Dans les mêmes conditions expérimentales, le capsidiol, sesquiterpène élaboré par le *Capsicum frutescens*, inhibe de 24 p 100 l'activité endo PG pour un rapport effecteur/enzyme de 1/10.

c) sur les transéliminases pectiques

Les coumarines agissent de la même façon sur les endo pectates transéliminases et les endo pectines transéliminases (endo PTE), aussi mentionnerons nous seulement les résultats concernant ces dernières.

Comme l'indique le Tableau 4, la structure des coumarines étudiées influe sur leur aptitude à inhiber ces enzymes. L'hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine, dans ce cas, s'avère un médiocre effecteur. Des différences existent entre les aryl-3 coumarines qui en dérivent. Quoique plus actives, la chloro-3 et la benzyle-3 coumarines agissent faiblement au rapport effecteur/enzyme de 1/10. Dans les mêmes conditions, les phényl-3 coumarines sont plus efficaces. Les différences observées entre les phényl-3 coumarines tendent à indiquer que le nombre de groupements méthoxy et leur position influent sur la propriété effectrice. Dans le cas de ces expériences, son optimum est obtenu avec une phényl-3 coumarine triméthoxylée en 4',5,7, ayant deux fonctions éther en méta sur la coumarine. Il semblerait que les autres combinaisons déterminent une inhibition moins importante. Enfin, il paraît probable qu'une forte méthoxylation — cas de la phényl-3 coumarine tétraméthoxylée — réduise l'efficacité.

Tableau 4

Pourcentage d'inhibition, par rapport au témoin, de l'activité endo pectine transéliminase par les coumarines éprouvées aux rapports entre effecteur et enzyme de 1/10 et 1/4. Incubation: 24 heures à 30 °C

Substances	Effecteur/enzyme	
	1/10	1/4
hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	≠ 15	58
chloro-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	33	70
benzyle-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	34	65
hydroxy-4 (méthoxy-4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	55	75
hydroxy-4 (méthoxy-4' phényl)-3 diméthoxy-5,7 coumarine	72	100
hydroxy-4 (diméthoxy-3',4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	50	73
hydroxy-4 (diméthoxy-2',4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine	54	77
hydroxy-4 (diméthoxy-2',4' phényl)-3 diméthoxy-5,7 coumarine	40	65

La vitesse à la quelle se réalise l'inhibition de l'activité des lyases pectiques semble aussi dépendre de la structure des coumarines incorporées au milieu réactionnel. Le Tableau 5 fournit un exemple de cette interaction. L'hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine comme la chloro-3 et la benzyle-3 coumarines inhibent lentement la réaction enzymatique. Par contre, les phényl-3 coumarines, à l'exception de la plus méthoxylée d'entre elles, réduisent rapidement l'activité des lyases pectiques.



Dans les mêmes conditions expérimentales, le capsidiol possède une activité voisine de celle de l'hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine.

Tableau 5

Variations du pourcentage d'inhibition, par rapport au témoin, de l'activité endopeptine trans-éliminase en fonction du temps suivant la structure des coumarines pour le rapport entre effecteur et enzyme de 1/4. Le substrat est de la pectine ruban brun à  $25 \times 10^{-5}$

Substances	Durée d'incubation en heures		
	3½	7	25
chloro-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	0	58	66
benzyle-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine	0	50	62
hydroxy-4 (méthoxy-4' phényl)-3 diméthoxy-5,7 coumarine	100	100	91
hydroxy-4 (diméthoxy-2',4' phényl)-3 diméthoxy-5,7 coumarine	58	72	63

Nous avons établi, pour des concentrations en substrat comprises entre  $25 \times 10^{-5}$  et  $75 \times 10^{-5}$  et pour des rapports entre effecteur et enzyme variant de 1/10 à 1/2, que l'inhibition de l'activité des transéliminases pectiques par les coumarines n'est pas compétitive pour le substrat. La Figure 4 concrétise ce résultat pour la phényl-3 hydroxy-4 triméthoxy-3',4',7 coumarine.

La concentration en substrat dans le milieu réactionnel agit également sur le rendement de l'inhibition. En milieu visqueux — pectine ruban brun à  $75 \times 10^{-5}$  — l'inhibition de l'activité transéliminasiqne, pour chaque effecteur, atteint plus lentement une valeur maximale, le plus souvent après six à huit heures d'incubation. Fréquemment, dans ces conditions, les valeurs observées en fin d'expérience — aus delà de dixhuit heures d'incubation — sont inférieures à ce maximum. Ces résultats laissent présumer que l'inhibition n'est pas cumulative.

#### d) sur la polyphénol-oxydase

Six des coumarines éprouvées n'influent pas sur la dégradation du pyrocatéchol par une polyphénol-oxydase extraite de tomate. L'activité de l'enzyme n'est pas modifiée par un contact avec ces substances pendant six heures à 30 °C. Par contre, l'hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine stimule cette activité de 32 p 100 et la chloro-3 hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine de 14 p 100. Nous avons vérifié que les deux coumarines ne peuvent pas servir de substrat pour cette enzyme.

### Discussion

L'importance de l'inhibition de la croissance du *Phytophthora parasitica* et celle des activités enzymatiques étudiées, hormis le cas de la bêta-glucosidase, paraît en relation avec la structure et le nombre de groupement méthoxy des huit coumarines. La plupart d'entre elles, à la concentration de  $5 \times 10^{-6}$  sont moins toxiques que le capsidiol pour le *Phytophthora parasitica*, par contre elles s'avèrent de meilleurs effecteurs des enzymes pectinolytiques.

Les modifications cytoplasmiques, puis l'autolyse plus ou moins étendues dans les hyphes du *P. parasitica* semblent les conséquences communes de l'incorporation de capsidiol ou de coumarines. Parmi celles ci, les meilleurs inhibiteurs sont trois aryl coumarines: benzyle-3, chloro-3 et phényl-3 coumarines, la première étant presque aussi active que le capsidiol. Par contre, l'hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine, structure initiale, est moins toxique à la concentration de  $5 \times 10^{-6}$ . Il apparaît nettement que plus les coumarines sont méthoxylées, moins elles entravent la croissance du *P. parasitica* aux concentrations de  $5 \times 10^{-6}$  et de  $10^{-5}$ . Cette caractéristique avait été décelée précédemment chez des isoflavonoïdes (RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976, KIRKIACHARIAN et RAVISÉ 1976).

Parmi les activités enzymatiques étudiées en présence de coumarines, celle de la polyphénol-oxydase diffère des trois autres. Six coumarines n'influent pas sur l'activité polyphénol-oxydasique. La structure la plus simple et son dérivé chlorogéné la stimulent respectivement de 32 et 14 %, sans toutefois être utilisées comme substrat. Nous avons indiqué précédemment (RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976) que la diméthoxy-4',7 isoflavone, quoique n'ayant pas d'hydroxyle phénolique, possède la même propriété décelée également chez des phytoalexines de la tomate (RAVISÉ et TRIQUE 1972).

Il ressort de nos essais que les coumarines possèdent des propriétés communes pour l'inhibition des enzymes pectinolytiques (endo PG et endo PTE). Les phényl-3 coumarines semblent les meilleurs effecteurs: pour les deux groupes d'enzymes, des phényl-3 coumarines triméthoxylées provoquent l'inhibition la plus importante. Les chloro-3 et benzyle-3 coumarine, l'hydroxy-4 méthoxy-7 coumarine sont moins efficaces; au rapport effecteur/enzyme de 1/10 ces substances provoquent, par rapport au témoin, une réduction d'activité inférieure à 50 pour 100.

D'autre part, le degré de méthoxylation semble influencer moins sur l'activité endo PG que sur celle de l'endo PTE. Pour celle-ci les coumarines di et triméthoxylées provoquent entre 50 et 72 pour 100 de réduction d'activité, celle tétra méthoxylée environ 40 pour 100. Une telle différence n'apparaît pas dans le cas des hydrolases pectiques. Nous constatons des analogies entre ces résultats et ceux acquis précédemment (RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976). Des coumestanes, la diméthoxy-isoflavanone et le ( $\pm$ ) 0-méthyl sativan (triméthoxy-isoflavane) s'avèrent des effecteurs efficaces des deux groupes d'enzymes pectinolytiques. Au contraire, dans le cas de trois isoflavones, le nombre de groupements méthoxy influe faiblement sur l'inhibition de l'activité endo PTE, négativement sur celle de l'endo PG.

### Conclusion

D'après les résultats des études préliminaires, plusieurs catégories de composés phénoliques de synthèse, ou leurs éthers méthyliques, possèdent *in vitro* l'aptitude à inhiber la croissance d'un champignon pathogène, le *Phytophthora parasitica*, et l'activité d'enzymes intervenant dans les dégradations parasi-

taires. Ces substances préparées au laboratoire semblent donc susceptibles comme dans le cas de produits phénoliques naturels accumulés chez certaines espèces végétales dans le tissu infectés, de contribuer à l'inhibition de processus parasitaires reproduits expérimentalement.

Nous avons éprouvé des substances appartenant à trois groupes: iso-flavonoïdes, coumestanes, coumarines. Ceux-ci sont largement représentés parmi les produits élaborés en réaction à la pénétration d'un champignon pathogène, notamment chez les légumineuses et les solanacées. Des substances possédant des structures différentes telles qu'une isoflavane, une isoflavanone, un diméthoxy-coumestane, des aryl coumarines s'avèrent posséder *in vitro* des propriétés biologiques analogues tant à l'égard d'un micromycète parasite que comme effecteurs d'activités enzymatiques. Ces observations concordent avec celles que nous avons effectuées précédemment avec des extraits phénoliques de plantules de *Gossypium*, de *Lycopersicum*, de *Nicotiana* possédant des caractères de résistance à divers parasites, cultivées et inoculées aseptiquement. De telles analogies tendraient à indiquer que les propriétés inhibitrices des substances phénoliques pourraient n'être que faiblement spécifiques. En apparence, plusieurs processus contribueraient aux mécanismes de défense de l'hôte chez lequel peuvent intervenir simultanément plusieurs biosynthèses de substances phénoliques ou terpéniques.

Parmi les investigations complémentaires, il serait concevable de stimuler l'un des processus de réaction chez une plante parasitée. L'étude des conséquences de l'incorporation d'un composé phénolique de synthèse, possédant une structure proche de celle d'un produit accumulé naturellement après l'infection, indiquerait les modifications physiologiques en résultant et leur éventuelle répercussion sur la résistance de l'hôte au parasite.

Nous remercions le Docteur A. STOESSL (Institut de Recherches Agronomiques du Canada, London—Ontario) qui a eu l'obligeance de nous fournir un échantillon de capsidiol cristallisé puis de nous autoriser à publier les résultats obtenus au cours des études comparatives d'activités biologiques.

### Summary

Coumarins, synthesized with different structures, inhibit *in vitro* the activity of enzymes implicated in parasitic degradations and the growth of *Phytophthora parasitica*. The activity of a polyphenol-oxidase extracted of tomato is enhanced by two coumarins, the others being not effective. The nature of the substituted molecules and their degree of methoxylation affect their toxicity for the pathogen and mainly the inhibition of pectinolytic enzymes (endo PG and endo PTE).

### Résumé

Des coumarines, préparées au laboratoire et possédant différentes structures, inhibent *in vitro* l'activité d'enzymes participant aux dégradations

parasitaires et la croissance du *Phytophthora parasitica*. L'activité d'une polyphénol-oxydase est stimulée par deux coumarines, les autres substances étant sans effet. La nature des substituants et le degré de méthoxylation des coumarines influent sur leur toxicité pour l'agent pathogène et principalement sur le taux d'inhibition d'enzymes pectinolytiques (endo PG et endo PTE).

### Zusammenfassung

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

#### II. Coumarine

Coumarine verschiedener Struktur hemmen *in vitro* die Aktivität lytischer Enzyme und das Wachstum von *Phytophthora parasitica*. Die Aktivität einer aus Tomaten isolierten Polyphenoloxydase wurde durch zwei Verbindungen erhöht; die übrigen Verbindungen waren inaktiv. Substituenten und Methoxylierungsgrad beeinflussten die Wachstumshemmung des Parasiten und vor allem die Hemmung pektinspaltender Enzyme (endo-PG und endo-PTE).

### Bibliographie

- AKAZAWA, T., I. URITANI, and H. KUBATA, 1960: Isolation of ipomeamarone and two coumarin derivatives from sweet potato roots injured by the weevil *Cyrtus elegantulus*. Arch. Biochem. Biophys. 88, 150—156.
- BROWN, S. A., 1965: Biosynthesis of the coumarins. Further studies on herniarin formation in lavender. Canad. J. Biochem. 43, 199—207.
- CLARKE, D. D., 1973: The accumulation of scopolin in potato tissue in response to infection. Physiol. Plant Path. 3, 347—358.
- DEWICK, P. M., W. BARZ, and H. GRISEBACH, 1970: Phytochemistry 9, 775.
- FUCHS, A., 1965: Polyphenol oxidases and phenolics in relation to resistance against cucumber scab in *Cucumis sativus*. I. Fungal and host polyphenol-oxidases. Netherl. J. Plant Path. 71, 157—166.
- HARBORNE, J. B., 1964: Biochemistry of phenolic compounds, 618 p. Academic Press, Londres.
- HJEWEGEN, T., 1973: Autonomous and induced pterocarpanoid formation in the leguminosae. Phytochemistry 12, 375—380.
- KIRKIACHARIAN, B. S., 1966: Thèse de doctorat es Sciences, Paris, No. AO 1047.
- , 1975: J. Chem Soc., Chem. Comm., p. 162.
- , et H. CHIDIAC, 1973: C. R. Acad. Sci. 276, Sér. C, 795.
- , et —, 1975: C. R. Acad. Sci. 280, 775.
- , et A. RAVISÉ, 1976: Synthèse et propriétés biologiques du (±) 0-méthyl sativan. Phytochemistry (sous presse).
- MENTZER, C., et G. URBAJN, 1943: Bul. Soc. Chim. Fr., p. 404.
- , et —, 1944: Bul. Soc. Chim. Fr., p. 171.
- RAUTENBERG, E., 1973: Untersuchungen an *Exobasidium*-Gallen von *Rhododendron simsii* Planch. III. Fluoreszierende Phenolderivate in Gallen und Blättern. Phytopath. Z. 78, 214—226.
- RAVISÉ, A., et B. S. KIRKIACHARIAN, 1976: Influence de la structure de composés phénoliques sur l'inhibition du *Phytophthora parasitica* Dastur et d'enzymes participant aux processus parasitaires. I. Isoflavonoïdes et coumestanes. Phytopath. Z. 85, 74—85.

- , et J. TANGUY, 1973: Etude des réactions phénoliques de plantules de *Nicotiana* inoculées par des souches de *Phytophthora* de Bary. *Phytopath. Z.* 76, 253—264.
- , et B. TRIQUE, 1972: Réactions de plantules de *Gossypium* L. au parasitisme de *Phytophthora* de By. tropicaux. Propriétés de composés phénoliques élaborés par des plantules de *Gossypium* L. et de *Lycopersicum* Mill. *Coton et Fib. Trop.* 27, 296—310.
- REESE, E. T., A. M. MAGUIRE, and F. W. PARRISH, 1968: Glucosidases and exogluconases *Canad. J. Biochem.* 46, 25—34.
- RIBÉREAU-GAYON, P., 1968: Les composés phénoliques des végétaux, 254 p. Dunod — Paris.
- RIOU, S., et A. RAVISÉ, 1970: Etude des chlamydo-spores chez quelques espèces de *Phytophthora* de Bary. *Cah. Maboké* 8, 93—106.
- 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.
- TANGUY, J., 1970: Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotiana* hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac, souche commune. Thèse de doctorat es Sciences, Paris.
- TRIQUE, B., 1971: Pectinase et acide fusarique du *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis*; leurs rôles dans la fusariose du palmier à huile. *Oléagineux* 26, 163—168.

Adresse en France: A. RAVISÉ, S.S.C. de l'O.R.S.T.O.M., 70—72 route d'Aulnay, 93140 Bondy.

Adresses des auteurs: A. RAVISÉ, directeur de recherches à l'O.R.S.T.O.M., mission de l'O.R.S.T.O.M. près de l'I.R.A.L., Fanar par Jdeideh el Metn (Liban). B. S. KIRKIACHARIAN, professeur agrégé, laboratoire de pharmacie chimique de la Faculté Française de Médecine et de Pharmacie, Boîte postale 5076, Beyrouth (Liban).

Sonderdruck aus „Phytopathologische Zeitschrift“

[Phytopath. Z. 86, 314—326, 1976]

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdruckes, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

---

*Mission au Liban de l'Office de la Recherche Scientifique  
et Technique Outre Mer;  
Faculté Française de Médecine et de Pharmacie à Beyrouth*

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

**II. Coumarines**

Par

A. RAVISÉ<sup>1)</sup> et B. S. KIRKIACHARIAN

10 DEC. 1976

O. R. S. T. O. M.

Collection de Références

n° 8438 Phyto