

PHYTOPATHOLOGIE. — *Étude 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.* Note (\*) de André Ravisé et Jean Chopin, présentée par M. Roger Heim.

Des C-glycosyl flavones sont toxiques *in vitro* pour le *Verticillium albo atrum* et le *Phytophthora parasitica*. Elles provoquent, à concentrations équivalentes, des altérations cytologiques semblables chez les deux parasites, inhibent leur croissance, leur reproduction asexuée et ne semblent pas être dégradées au cours de l'incubation. Ces substances inhibent mieux l'activité de transéliminases pectiques que celle d'hydrolases pectiques.

*C-glycosyl flavones are toxic in vitro for Verticillium albo atrum and Phytophthora parasitica. Equivalent concentrations of these compounds cause similar cytological alterations of both parasites, inhibit their growth and asexual reproduction. These phenolics do not seem to be detoxified during incubation. They are better inhibitors of pectic transeliminases than of pectic hydrolases.*

Les études d'interactions hôte — parasite, principalement lors d'infections cryptogamiques, ont mis en évidence la toxicité de substances phénoliques pour de nombreux agents pathogènes. Certaines existent dans les tissus de la plante avant l'infection (6), d'autres sont élaborées après la pénétration d'un micromycète [(10), (14)]. Il s'agit le plus souvent d'acides benzoïques ou cinnamiques, de flavonoïdes ou d'isoflavonoïdes et de leurs dérivés. Parmi les flavonoïdes, le C-glycosyl flavones se distingue par une liaison C—C, très stable, entre l'hétérocycle oxygéné et la partie glucidique (2). Ces produits existent dans de nombreuses familles botaniques : Graminées, Caryophyllacées, composées, Cucurbitacées, Euphobiacées, Rutacées, Sterculiacées... Chez la plupart de ces plantes, les substances contribuant aux réactions de défense n'ont pas — ou partiellement — été identifiées (5). Dans l'hypothèse où des C-glycosyl flavones pourraient y participer, nous avons étudié *in vitro* les aptitudes inhibitrices de cinq produits de ce type.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — Les substances éprouvées diffèrent entre elles par la nature, la position et le nombre des glucides fixés. Elles se distinguent également par le nombre et la position des hydroxyles, deux d'entre elles étant méthoxylées (fig. 1). Ce sont : la vitexine (C-glycosyl-8 apigénine) de *Vitex lucens* (13), l'iso-orientine (C-glycosyl-6 lutéoline) d'*Aspalathus acuminatus* (9), un mélange de molludistine (C-arabinosyl-8 genkwanine) et de l'iso-swertisine (C-glycosyl-8 genkwanine) de *Mollugo distica* (3), le schaftoside (C-glycosyl-6 C-arabinosyl-8 apigénine) de *Silene schafta* (1).

La souche de *Verticillium albo atrum* et celle de *Phytophthora parasitica* isolées de Tomate sont cultivées en milieu liquide — lames à concavité lutées, tubes à hémolyse, fioles cylindro-coniques — selon une technique précédemment décrite [(4), (14)]. L'évolution des thalles est contrôlée au microscope au cours de l'incubation à 30°C qui dure de 4 à 45 jours. Après leur transfert en tubes sur décoction gélosée de pois, les cultures engendrent un thalle lorsque la concentration en inhibiteur n'est pas létale. Dans une partie des essais, les C-glycosyl flavones ont été reprises, dosées par spectrométrie dans l'ultraviolet et chromatographiées sur gel de silice avec le mélange acétate d'éthyle-méthanol-eau (63 : 12 : 9).

Les tests d'inhibition d'activité d'enzymes pectinolytiques sont réalisés à 30°C selon des techniques précédemment décrites [(4), (14) à (17)]. Deux groupes d'hydrolases pectiques — endo PMG — de préparations commerciales (Pectinases Fluka et Sigma) dégradent des pectines méthylées à 30 et à 75 % (Unipectine). Seul le dernier substrat est attaqué par les endopeptinases — endo PTE — provenant du *P. parasitica* ou de la pectinase Fluka. Les rapports entre effecteur et enzyme varient de 1/3 à 1/1.

23 OCT. 1978

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

Collection de Référence

no M 9332 P. 2. 57.

RÉSULTATS. — Les C-glycosyl flavones à la concentration de  $5 \cdot 10^{-6}$  provoquent chez le *P. parasitica* la formation d'hyphes toruleuses ou vésiculeuses, souvent groupées. Leur paroi très réfringente présente des épaissements irréguliers vers l'apex. Dans les filaments, de fausses cloisons compartimentent le cytoplasme qui se vacuolise progressivement. La formation de sporocystes est bloquée, ceux transférés avec l'implant dégènèrent. Les symptômes s'accroissent à la concentration de  $10^{-5}$ . Notamment la dégénérescence cytoplasmique se généralise et concerne même le contenu de la plupart des chlamydo-spores. Des manifestations analogues de toxicité sont observées chez le *V. albo atrum*. En particulier la germination des conidies transférées avec l'implant et la sporogénèse sont inhibées.

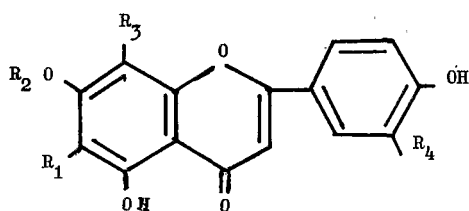


Fig. 1

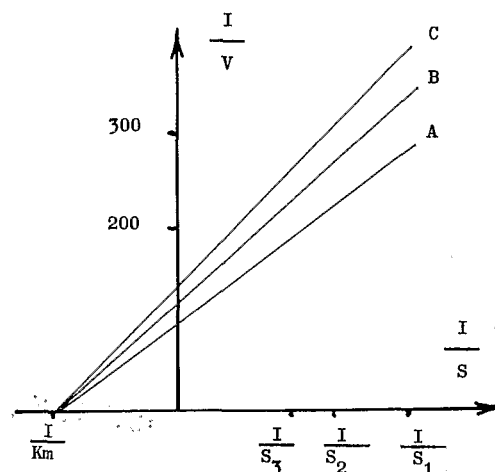


Fig. 2

Fig. 1. — Vitexine :  $R_1 = R_2 = R_4 = H$ ,  $R_3 = \beta$ -D-glucopyranosyl; Iso-orientine :  $R_1 = \beta$ -D-glucopyranosyl,  $R_2 = R_3 = H$ ,  $R_4 = OH$ ; Molludistine :  $R_1 = R_4 = H$ ,  $R_2 = CH_3$ ,  $R_3 = \alpha$ -L-arabinopyranosyl; Iso-swertisine :  $R_1 = R_4 = H$ ,  $R_2 = CH_3$ ,  $R_3 = \beta$ -D-glucopyranosyl; Schaftoside :  $R_2 = R_4 = H$ ,  $R_1 = \beta$ -D-glucopyranosyl,  $R_3 = \alpha$ -L-arabinopyranosyl.

Fig. 2. — Courbes de Lineweaver-Burk pour l'activité de l'endo PMG en l'absence ou en présence du schaftoside : témoin (A), inhibition aux rapports effecteur/enzyme de 2/3 (B) et de 1/1 (C).

La réduction de croissance des deux micromycètes est de l'ordre de  $1/3$  à  $1/2$  avec une concentration de  $5 \cdot 10^{-6}$ , le schaftoside est le moins toxique. L'inhibition s'établit lentement mais persiste pendant toute la durée du contact avec les C-glycosyl flavones au cours d'un essai suivi pendant 40 jours. Avec une concentration de  $10^{-5}$ , le blocage de la croissance intervient en quelques heures. La taille de l'implant et la présence de réserves nutritives ne modifient pas la sensibilité aux produits éprouvés. Pour des hyphes en cours de croissance, la dose létale est de l'ordre de  $2 \cdot 10^{-5}$ . Lorsque le thalle a différencié des chlamydo-spores, elle est plus élevée, probablement en fonction des variations de perméabilité des parois des chlamydo-spores.

Les vérifications effectuées à la fin de plusieurs séries d'incubations, notamment après un développement modéré du thalle et dans les conditions les plus favorables aux échanges gazeux, n'ont pas permis de déceler des indices de dégradation des C-glycosyl flavones par les deux parasites.

Les cinq produits agissent différemment sur l'activité d'hydrolases et sur celle de trans-éliminases pectiques. Dans chaque groupe, les modalités d'inhibition varient peu suivant l'origine des enzymes. La réduction d'activité des endo PMG est modeste quel que soit

le substrat attaqué : 18, 20 et 25 % environ aux rapports effecteur/enzyme de 1/3, 1/2 et 1/1, pour les quatre premiers. Avec le schaftoside, l'inhibition moyenne est de 20, 35 et 50 % aux mêmes rapports. L'inhibition est de type non compétitif pour le substrat comme l'indiquent les courbes de Liweaver-Burk établies pour trois concentrations en pectines (fig. 2).

Avec les endo PTE le rendement de l'inhibition apparaît meilleur et quasi indépendant des différences de structure entre les C-glycosyl flavones. Pour l'endo PTE de la Pectinase Fluka, aux rapports effecteur/enzyme de 1/2 et de 1/1 l'activité moyenne s'avère inférieure de 85 et de 95 % à celle du témoin. L'inhibition est non compétitive pour le substrat et semble non cumulative. La réduction d'activité enzymatique est décelable après 3 à 6 h d'incubation.

DISCUSSION. CONCLUSION. — D'après nos résultats, les C-glycosyl flavones sont également toxiques pour deux parasites différant par la composition de la paroi des hyphes, notamment l'absence de stérols dans celles du *P. parasitica*. A faible concentration en milieu liquide, les cinq substances provoquent des perturbations durables affectant le cytoplasme, la croissance et la reproduction asexuée. Celles-ci pourraient être la conséquence, chez les deux champignons, de la perméabilité de la paroi des hyphes pour la partie glucidique des inhibiteurs. En effet, seuls les glycosides flavoniques sont hydrolysables par les  $\beta$  glucosidases fongiques et moins toxiques que leurs aglycones (<sup>12</sup>). Les contrôles chromatographiques et spectrophotométriques indiquent que les altérations observées ne résultent pas d'une oxydation des hydroxyles en quinones observée pour certains composés phénoliques (\*). Ces résultats concordent avec ceux d'études antérieures concernant la toxicité d'isoflavonoïdes et de coumestanes [(<sup>11</sup>), (<sup>16</sup>)], de coumarines (<sup>17</sup>) ou de leurs éthers méthyliques pour le *P. parasitica*. En outre, les doses fongistatiques des C-glycosyl flavones, exprimées en concentration d'apigénine, de lutéoline et de genkwanine, s'avèrent comparables à celles que nous avons déterminées pour des substances phénoliques extraites de *Gossypium* (<sup>14</sup>) et de *Nicotiana* (<sup>15</sup>).

D'autre part, les C-glycosyl flavones ne semblent pas dégradées au cours de l'incubation avec le *V. albo atrum* ou le *P. parasitica* même lorsque les conditions expérimentales permettent une croissance mycélienne limitée. Cette stabilité, dans la mesure où elle serait vérifiée avec d'autres agents pathogènes, distinguerait les C-glycosyl flavones de la plupart des isoflavonoïdes et de ptéocarpanes dont les structures sont altérées par divers micro-mycètes [(<sup>7</sup>), (<sup>8</sup>)].

Les cinq produits étudiés inhibent différemment l'activité d'endo PTE et celle d'endo PMG. Pour chaque groupe, ces propriétés paraissent indépendantes de l'origine des enzymes et de leurs probables différences (nature et arrangement des acides aminés). Nos résultats comme ceux obtenus avec des isoflavonoïdes et des coumarines [(<sup>11</sup>), (<sup>16</sup>), (<sup>17</sup>)] tendent à confirmer que la structure des composés phénoliques influe sur leurs propriétés effectrices pour les deux catégories d'enzymes pectinolytiques.

Les C-glycosyl flavonoïdes sont synthétisés à des concentrations relativement importantes chez des graminées — principalement l'Avoine, le Blé et l'Orge — pendant la première phase de leur croissance. Ces substances sont également connues chez des plantes tropicales : *Hevea*, *Citrus*, Cacaoyer. L'une des étapes ultérieures des investigations envisageables pourrait consister à déterminer le rôle des C-glycosyl flavonoïdes dans l'inhibition *in vivo* de Champignons parasites, en particulier de *Phytophthora* sp. attaquant ces cultures tropicales.

(\*) Séance du 24 avril 1978.

- (<sup>1</sup>) J. CHOPIN, M. L. BOUILLANT, H. WAGNER et K. GALLE, *Phytochemistry*, 13, 1974, p. 2583.
- (<sup>2</sup>) J. CHOPIN et M. L. BOUILLANT, *C-glycosyl Flavonoids, in the Flavonoids*; HARBORNE, MABRY et MABRY, éd., Chapman et Hall, Londres, 1975, p. 632-691.
- (<sup>3</sup>) J. CHOPIN, M. L. BOUILLANT, A. G. RAMACHANDRAN NAIR, P. RAMESH et T. J. MABRY, *Phytochemistry*, 17, 1978, p. 299-304.
- (<sup>4</sup>) P. DAVET et A. RAVISÉ, *Comptes rendus*, 282, série D, 1976, p. 1351.
- (<sup>5</sup>) B. J. DEVERALL, *Ann. Proc. Phytochem. Soc.*, 13, 1976, p. 207-223.
- (<sup>6</sup>) J. B. HARBORNE, J. L. INGHAM, L. KING et M. PAYNE, *Phytochemistry*, 15, 1976, p. 1485-1487.
- (<sup>7</sup>) J. VAN DEN HEUVEL et H. D. VAN ETEN, *Physiol. Plant Path.*, 3, 1973, p. 327-339.
- (<sup>8</sup>) J. L. INGHAM, *Phytochemistry*, 15, 1976, p. 1489-1495.
- (<sup>9</sup>) B. H. KOEPPEN, C. J. B. SMIT et D. G. ROUX, *Biochem. J.*, 83, 1962, p. 507.
- (<sup>10</sup>) J. KUC, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 10, 1972, p. 207-232.
- (<sup>11</sup>) B. S. KIRKIACHARIAN et A. RAVISÉ, *Phytochemistry*, 15, 1976, p. 907-909.
- (<sup>12</sup>) M. NAIM, B. GESTETNER, S. ZILKAH, Y. BIRK et A. BONDI, *J. Agr. Food Chem.*, 22, 1974, p. 806-809.
- (<sup>13</sup>) J. PERKIN, *J. Chem. Soc.*, 73, 1898, p. 1019.
- (<sup>14</sup>) A. RAVISÉ et B. TRIQUE, *Coton et Fib. Trop.*, 27, 1972, p. 295-310.
- (<sup>15</sup>) A. RAVISÉ et J. TANGUY, *Phytopath. Z.*, 76, 1973, p. 253-264.
- (<sup>16</sup>) A. RAVISÉ et B. S. KIRKIACHARIAN, *Phytopath. Z.*, 85, 1976, p. 74-85.
- (<sup>17</sup>) A. RAVISÉ et B. S. KIRKIACHARIAN, *Phytopath. Z.*, 86, 1976, p. 314-326.

Laboratoire de phytopathologie, S.S.C. de l'O.R.S.T.O.M., 74, route d'Aulnay, 93140 Bondy;

Laboratoire de Chimie biologique, Université Claude-Bernard, Lyon-I,  
43, boulevard du 11-Novembre-1918, 69621 Villeurbanne.