

# RÔLE POSSIBLE D'ENZYMES ET DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA POURRITURE BRUNE

**M. MEIFFREN**

Directeur de Recherches ORSTOM  
Phytopathologiste

**M. HARDY**

Technicien-Biochimiste ORSTOM

**J. TANGUY**

Attaché de Recherches ORSTOM  
Biochimiste

La présente étude envisage essentiellement l'aspect physiologique du problème.

Un champignon qui pénètre les tissus d'une plante se trouve en présence des composants des parois cellulaires : pectine, cellulose, hémicellulose, lignine, protéine. Il y a là des substrats que de nombreux parasites qui produisent des enzymes hydrolysants peuvent dégrader.

On a formulé l'hypothèse que la résistance pouvait être liée à la présence d'inhibiteurs de ces enzymes. Dans les cas de sensibilité, les inhibiteurs feraient défaut ou se présenteraient sous une forme inactive.

On a également pensé à des substances présentant une action antagoniste vis-à-vis de la germination des spores ou de la croissance du champignon. Parmi elles, les composés phénoliques attirent plus particulièrement l'attention.

On désigne ainsi le groupe des phénols simples, des acides phénoliques du groupe benzoïque, des acides cinnamiques auxquels se rattachent les coumarines, les

flavonoïdes-flavonols, flavans et anthocyanes. Autrefois, ces substances étaient groupées sous les vocables de « tanins » ou de « polyphénols ».

Un certain nombre de raisons justifient l'intérêt que les phytopathologistes portent à l'étude de ces constituants. Beaucoup de plantes accumulent de grandes quantités de phénols dans les tissus externes. De très nombreuses données ont permis d'établir que la production, la vitesse de production et la libération de phénols, en réponse à l'infection, constituaient un fait remarquable, dans les cas de résistance. De très nombreux composés phénoliques, et surtout leur quinone, présentent des propriétés antibiotiques. Ils offrent de plus une très grande variété de structure. Cette diversité permet d'entrevoir une explication à la haute spécificité des interactions hôte-parasite.

Puisque c'est sous forme oxydée que ces composés se montrent le plus souvent actifs, le rôle de leurs enzymes d'oxydation, en particulier la polyphénoloxydase, mérite d'être précisé.

# ENZYMES PECTINOLYTIQUES ET CELLULOLYTIQUES DE *PHYTOPHTHORA PALMIVORA*

De nombreux travaux récents ont montré que les enzymes pectinolytiques et cellulolytiques jouaient un grand rôle dans les pourritures humides et les trachéomycoses. Il a été possible de reproduire les symptômes de ces maladies avec des préparations purifiées de ces enzymes. C'est dans cette optique que nous avons étudié certaines activités enzymatiques de *Phytophthora palmivora*. Nous avons volontairement négligé, au stade actuel de nos recherches, l'étude du rôle d'hypothétiques toxines.

## Pectinolyse

Nous nous sommes limités à l'étude de la polygalacturonase (PG) et de la polyméthylgalacturonase (PMG). Ces deux enzymes hydrolysent les liaisons  $\alpha$  1-4 des substances pectiques et scindent les longues chaînes composées d'unités d'acide galacturonique. La première attaque les acides pectiniques peu estérifiés, la seconde, les acides pectiniques à taux d'estérification élevé, c'est-à-dire des substances se rapprochant des pectines naturelles.

L'étude de la pectinéméthylestérase qui hydrolyse les groupes méthyle est conduite par M. TARJOT.

L'activité enzymatique de filtrats de cultures en milieu liquide est mesurée par viscosimétrie. Les substrats sont constitués par des pectines commerciales ayant un degré d'estérification convenant à chaque type d'enzyme. On utilise des viscosimètres d'Ostwald. L'incubation a lieu à 30° pendant 24 h, la viscosité est mesurée à 20°.

Un premier essai a porté sur deux souches de *P. palmivora*, l'une provenant de Côte d'Ivoire, l'autre du Cameroun. Il avait pour but de rechercher après quelle durée les filtrats présentaient leur plus grande activité. Trois semaines après repiquage sur un milieu d'entretien gélose-pomme de terre, onensemence un milieu liquide Czapek-Dox où le glucose est remplacé par de la pectine. On constate que les activités les plus fortes se manifestent après 15-18 jours.

Dans un deuxième essai, on a recherché quel était le pH du substrat qui convenait le mieux à chaque enzyme, pour onze souches de *P. palmivora* qui nous avaient été adressées par M. TARJOT. Suivant les souches, l'activité la plus élevée se manifeste dans une zone de pH allant de 4 à 5 pour la polygalacturonase. Pour la polyméthylgalacturonase, on note des maxima à 4, 5,5 et 7.

Pour des raisons techniques, nous avons abandonné ce dernier pH. En définitive, des substrats tamponnés à pH 4 et 5,5 ont été adoptés pour les deux enzymes.

Nous avons pu dès lors procéder à l'étude comparative de cinquante souches de *P. palmivora* provenant de Côte d'Ivoire. Afin de différencier les enzymes constitutifs des enzymes adaptatifs, les souches ont été cultivées parallèlement sur milieu Czapek-Dox pectine et Czapek-Dox glucose. L'eau de pomme de terre a également été retenue, car c'est le milieu d'élection pour la croissance de ce champignon qui n'est pas liée, rappelons-le, à la production d'enzyme.

Les résultats sont exprimés suivant la formule :

$$\frac{V_t - V}{V_t - V_e} \times 100$$

où :  $V_t$  = durée d'écoulement du témoin,

$V_e$  = durée d'écoulement de l'eau,

$V$  = durée d'écoulement de l'échantillon.

*P. palmivora* produit le plus souvent à la fois des polygalacturonases adaptatives et constitutives. L'activité des premières est supérieure à celle des secondes, sauf pour la souche H4. Elle est toujours plus marquée sur le substrat à pH 4. Les souches B2, B3, B4 et B5 se détachent assez nettement. Seule, la souche O4 manifeste une activité de polyméthylgalacturonase qui mérite d'être signalée (cf. tableau p. 193).

Il sera intéressant de confronter ces résultats à ceux concernant la pectinéméthylestérase et aux données qui ont pu être obtenues par ailleurs sur la virulence de ces souches.

## Cellulolyse

Nous avons étudié l'activité de la cellulase *sensu lato* sur des filtrats de culture en milieux liquides par viscosimétrie. Le substrat est constitué par du blanosé (carboxyméthylcellulose) tamponné à pH 6. L'incubation a lieu à 40° pendant 24 h. La viscosité est mesurée à 20°. Les souches ont été cultivées en milieux Czapek-Dox glucose ou blanosé.

Suivant les souches, il n'y a pas de cellulases constitutives ou, quand elles existent, elles sont généralement peu actives à l'exception de A3, K3 et K5. Les cellulases adaptatives sont encore plus rares ou moins actives (cf. tableau p. 194).

Nous avons comparé l'activité des deux souches de *P. palmivora* les plus actives à celle de parasites importants du caféier et cacaoyer. Nous y avons ajouté deux champignons saprophytes, l'un connu comme le meilleur

leur producteur d'enzymes pectinolytiques : *Penicillium chrysogenum*, l'autre d'enzymes cellulolytiques : *Myrothecium verrucaria*, comme témoins.

Ces données sont groupées dans le tableau 1.

La première conclusion à tirer de ce tableau est que, même après sélection des souches, les activités de *P. palmivora* sont généralement faibles si l'on tient compte de la durée d'incubation. On peut également remarquer que la plus large gamme d'activité se trouve chez les deux saprophytes étudiés, plus particulièrement chez *P. chrysogenum*, mais aussi — à moindre degré — chez les deux agents d'anthraxose : *C. coffeanum* et *P. coffeicola*.

## Inhibiteurs

Dans le programme d'étude de la pourriture brune que nous avons fixé, il est prévu de rechercher si les substances phénoliques extraites des cabosses sont inhibitrices de ces activités enzymatiques, ou si elles ont un pouvoir fongistatique ou fongicide vis-à-vis du champignon lui-même. L'isolement de ces substances et leur obtention en quantité suffisante nécessitent de longues et minutieuses recherches. Les résultats obtenus sont exposés plus loin.

Dans l'état actuel des travaux, nous pensons pouvoir entreprendre de tels essais très prochainement.

En attendant, des inhibiteurs d'enzymes pectinolytiques et cellulolytiques ont été recherchés dans des extraits aqueux de plantes de divers groupes de la série végétale : en tout, trois cents extraits appartenant à une centaine de familles.

Des inhibiteurs ont été trouvés dans de nombreuses familles : composées, légumineuses, euphorbiacées, labiées, malvacées, rosacées et solanacées pour la polygalacturonase ; polygonacées, convolvulacées, scrofulariacées, cenothéracées pour la polyméthylgalacturonase ; abiétacées pour la cellulase. Les algues brunes présentent un intérêt particulier, on y trouve des inhibiteurs des trois types d'enzyme.

## Inhibiteurs et antagonisme

Nous avons recherché si les inhibiteurs n'avaient pas une activité plus générale et s'ils agissaient sur la croissance des champignons *in vitro*. Effectivement, certains extraits présentent une activité fongistatique ou fongicide marquée, mais en général on ne peut relier ces actions antagonistes à l'inhibition des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques. Cependant, lorsque le principe actif est constitué par certains pigments : carotènes, xanthophylles, notamment des algues brunes, une corrélation est probable.

## Sensibilité de *P. palmivora* aux fongistatiques d'origine végétale

Parmi ces extraits aqueux, nous en avons choisi d'activité fongistatique moyenne. Ils ont servi à comparer la sensibilité de *P. palmivora* à celle de parasites du caféier et du cacaoyer, des champignons saprophytes les plus résistants : *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium chrysogenum* et de *Candida albicans*, forme levure, agent de mycoses animales.

TABLEAU 1

|  | PG      |         |         |         | PMG     |         |         |         | Cellulose |         |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|---------|
|  | R 4]    |         | R 5,5   |         | B 4     |         | B 5,5   |         | pH 6      |         |
|  | EA<br>% | EC<br>% | EA<br>% | EC<br>% | EA<br>% | EC<br>% | EA<br>% | EC<br>% | EA<br>%   | EC<br>% |
| (1) <i>Phytophthora palmivora</i> B2 ..... | 84      | 83      | 68      | 48      | 0       | 17      | 0       | 0       | 0         | 0       |
| (1) — B3 .....                             | 83      | 59      | 50      | 0       | 0       | 0       | 17      | 0       | 0         | 11      |
| (2) <i>Colletotrichum coffeanum</i> .....  | 65      | 75      | 68      | 69      | 48      | 27      | 85      | 46      | 99        | 96      |
| (2) <i>Pestalozzia coffeicola</i> .....    | 20      | 5       | 29      | 26      | 4       | 6       | 5       | 3       | 75        | 96      |
| (2) <i>Marasmius perniciosus</i> .....     | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 2       | 0       | 0       | 10        | 23      |
| (2) <i>Marasmius scandens</i> .....        | 90      | 11      | 46      | 9       | 5       | 6       | 0       | 6       | 23        | 62      |
| (2) <i>Fusarium xyliarioides</i> .....     | 0       | 0       | 27      | 4       | 0       | 4       | 0       | 0       | 35        | 40      |
| (2) <i>Fomes lignosus</i> B6 .....         | 100     | 5       | 99      | 0       | 87      | 0       | 85      | 0       | 20        | 75      |
| (2) <i>Penicillium chrysogenum</i> .....   | 65      | 81      | 93      | 90      | 71      | 21      | 93      | 16      | 96        | 62      |
| (2) <i>Myrothecium verrucaria</i> .....    | 93      | 36      | 86      | 24      | 38      | 0       | 0       | 0       | 24        | 99      |

EA : enzymes adaptatifs

EC : enzymes constitutifs

R : substrat à base de pectine ruban rouge peu méthylée tamponné à pH 4 et 5,5

B : substrat à base de pectine ruban brun peu méthylée tamponné à pH 4 et 5,5

(1) : durée d'incubation 24 h

(2) : durée d'incubation 4 h

Ces essais ont été conduits en milieux liquides et solides.

TABLEAU 2

|                                       | Croissance du champignon après |      |      |      |
|---------------------------------------|--------------------------------|------|------|------|
|                                       | 6 j                            | 10 j | 16 j | 30 j |
| <i>Phytophthora palmivora</i> ..      | —                              | —    | —    | —    |
| <i>Colletotrichum coffeanum</i> .     | —                              | —    | +    | ++   |
| <i>Pestalozzia coffeicola</i> . . . . | —                              | —    | +    | ++   |
| <i>Marasmius perniciosus</i> ...      | —                              | —    | —    | —    |
| <i>Marasmius scandens</i> . . . . .   | —                              | —    | —    | —    |
| <i>Myrothecium verrucaria</i> ..      | +                              | ++   | ++   | +++  |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> .      | +                              | ++   | ++   | +++  |
| <i>Candida albicans</i> . . . . .     | +                              | +++  | +++  | ++++ |

*P. palmivora* est un des organismes les plus sensibles. Par ailleurs, surtout en comparant les résultats de ce tableau à ceux du précédent, on constate à nouveau que, parmi les champignons parasites, seul les agents d'antracnose montrent un certain degré de résistance, cependant que les saprophytes sont insensibles à ces fongistatiques modérés.

Il sera maintenant nécessaire de regrouper ces souches de *P. palmivora* et de les comparer aux autres lignées de ce parasite d'origines diverses. Nos recherches peuvent aider à ce travail de classification.

C'est par la suite que nous pourrions remplacer les sondages, inévitables dans un premier stade, par l'étude approfondie des formes de *P. palmivora* les plus intéressantes par leur virulence ou leur extension géographique.

## COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DU PÉRICARPE DE LA CABOSSE

Le rôle possible des composés phénoliques dans le mécanisme de défense de la cabosse vis-à-vis de *Phytophthora palmivora* comporte préalablement une étude systématique et comparative de ces substances au cours de la maturation.

Nous les avons caractérisées dans les extraits totaux de cabosses Amelonado sensibles et de Trinitario présentant un certain degré de résistance. Ces composés se trouvant à l'état de complexes et le plus souvent sous forme d'hétérosides, nous procédons à des hydrolyses acides et basiques afin de les scinder et de libérer l'aglycone phénolique.

Après extraction méthanolique par chromatographie sur papier à deux dimensions, on sépare les différents composés. Nous avons utilisé le butanol acétique en première direction et l'acide acétique 10 % pour la seconde. La détection a été faite en lumière ultra-violette et à l'aide de réactifs spécifiques.

### Résultats

#### EXTRAIT TOTAL

#### Distribution des composés phénoliques dans les deux types de cabosses

La distribution de ces composés est résumée dans le chromatogramme synthétique (fig. 1, p. 188).

Il montre la position des substances phénoliques dans les tissus des deux types de cabosses prises à un même âge.

Les composés les plus importants semblent être les flavans et une substance A donnant par hydrolyse de l'acide caféique.

Notons que les substances A, E1, L1 et L4 ont réagi sous l'action de la polyphénoloxydase.

#### Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation. Etude comparative des deux types de cabosses prises à un même âge

Au cours de la maturation dans les cabosses Amelonado et Trinitario, la teneur en substances telles que les flavans, les flavonosides et A, augmente pour atteindre un maximum dans la cabosse verte adulte puis décroît dans la cabosse mûre.

On note une plus grosse quantité de flavans dans les Trinitario que dans les Amelonado.

Le tableau 3 donne le pourcentage en tanins par rapport au poids sec dans des cabosses vertes adultes de même âge des deux types.

TABLEAU 3

|                                 | % en tanins par rapport au poids sec |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| cabosse verte adulte Amelonado  | 6 %                                  |
| cabosse verte adulte Trinitario | 13 %                                 |

Les flavonosides sont quantitativement plus importants dans les Amelonado. Dans les Trinitario, on détecte la présence d'une substance présentant une fluorescence bleue dans l'U. V.

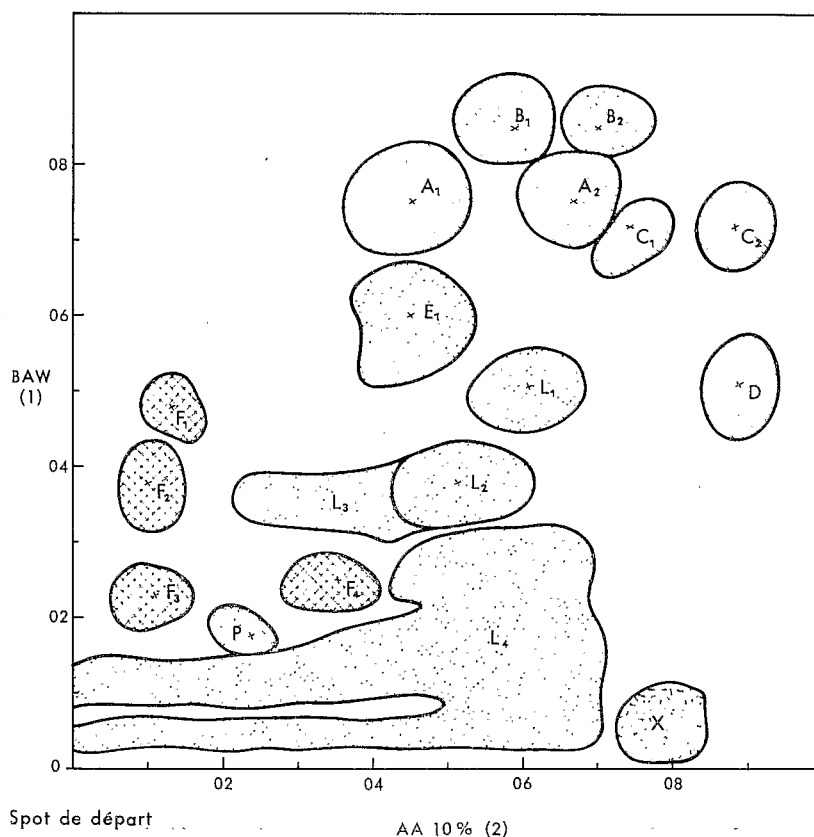
Fig. 1. — En pointillé : le groupe des flavans. E1 : épicatechine, L1-2 : leucocyanidines monomères ou peu polymérisées, L3-4 : leucocyanidines polymérisées.

En grisé oblique : les composés dérivés de l'acide cinnamique. A : substance du groupe chlorogénique.

En quadrillage : le groupe des flavonosides. F4 : rutine.

En bâtonnets irréguliers : substance X présentant une fluorescence bleue dans l'U. V. caractéristique de Trinitario.

En petits ronds : P, une anthocyane détectée dans Trinitario.



## COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES EXTRAITS HYDROLYSÉS

### Hydrolysats acide

Les composés identifiés sont : l'acide caféique, l'acide gentisique, la quercétine, la cyanidine.

Le tableau 4 permet de suivre l'évolution de ces aglycones au cours de la maturation et de faire l'étude comparative entre les deux types de cabosses.

On constate une baisse de l'acide caféique, de la quercétine, mais une augmentation de l'acide gentisique au cours de la maturation. L'acide caféique semble atteindre un maximum dans la cabosse verte en développement et la quercétine dans la verte adulte.

Ces deux observations ont été faites sur Amelonado.

L'acide gentisique est en plus grosse quantité dans les Trinitario alors que la quercétine subit une réduction.

### Hydrolysats alcalin

Nous avons mis en évidence les acides férulique, para-coumarique et caféique. Comme précédemment, nous allons tirer des conclusions grâce au tableau 5.

Il y a une augmentation de l'acide férulique au cours de la maturation dans les deux types ; pour l'Amelonado, nous observons une baisse de l'acide para-coumarique. L'acide férulique est quantitativement plus important dans le Trinitario.

Sous quelles formes ces différents aglycones sont-ils dans la cabosse ?

Les acides férulique, caféique et para-coumarique semblent être estérifiés.

La quercétine et l'acide gentisique seraient attachés à d'autres composés par des liaisons du type étheroxyde.

Nous rappelons que les composés principaux sont les flavans et une substance contenant de l'acide caféique. Ils réagissent avec la polyphénoloxydase ; le brunissement est très rapide avec l'épicatechine.

Les flavans, les acides férulique et gentisique sont en plus grosse quantité dans une cabosse Trinitario présentant un certain degré de résistance au parasite.

Il nous a paru utile de donner, en un tableau général (fig. 2), la distribution des différentes substances phénoliques des extraits hydrolysés et non hydrolysés des deux types de cabosses par rapport au schéma général de la classification que nous avons adoptée.

TABLEAU 4

|                       | Cherelles | Cabosses vertes |         | Cabosses mûres |            |
|-----------------------|-----------|-----------------|---------|----------------|------------|
|                       |           | 10 cm           | adultes |                |            |
| Acide caféique .....  | +++       | ++++            | +++     | +++            | Amelonado  |
|                       |           |                 | +++     | +++            | Trinitario |
| Acide gentisique..... | +         | +               | ++      | +++            | Amelonado  |
|                       |           |                 | ++++    | ++++           | Trinitario |
| Quercétine .....      | +         | ++              | ++++    | ++             | Amelonado  |
|                       |           |                 | ++      | +              | Trinitario |

TABLEAU 5

|                            | Cherelles | Cabosses vertes |         | Cabosses mûres |            |
|----------------------------|-----------|-----------------|---------|----------------|------------|
|                            |           | 10 cm           | adultes |                |            |
| Acide caféique .....       | ++        | +++             | ++      | +              | Amelonado  |
|                            |           |                 | ++      | +              | Trinitario |
| Acide férulique .....      | +         | ++              | +++     | ++++           | Amelonado  |
|                            |           |                 | ++++    | ++++           | Trinitario |
| Acide para-coumarique .... | +++       | ++              | +       | 0              | Amelonado  |
|                            |           |                 | ?       | ?              | Trinitario |

## LA POLYPHÉNOLOXYDASE

Comme nous l'avons dit plus haut, le système oxydant de la plante-hôte est très souvent impliqué dans les processus de défense.

Nous avons étudié l'activité de la polyphénoloxydase extraite de tissus sains et pourris de cabosses sensibles à la pourriture brune.

### Activité enzymatique de différents tissus de cabosses sensibles

L'extrait de la polyphénoloxydase a été obtenu au moyen d'un tampon de pH 5,9.

Une première série de cabosses jaunes, provenant de la Côte d'Ivoire, a été infectée expérimentalement avec *Phytophthora palmivora*. L'extraction de l'enzyme a été faite quand les tissus sains et pourris étaient également répartis sur une même cabosse. La polyphénoloxydase a aussi été extraite de cabosses saines. L'activité a été mesurée au spectrophotomètre « UNICAM SP 500 » à 490 m $\mu$ , par l'accroissement de la densité optique des produits d'oxydation du pyrocatechol, mis en présence des trois extraits, à 30°, pendant 30 minutes. Le porte-cuves étant à double paroi, une circulation d'eau intérieure maintenait une température constante. Plusieurs séries de lectures montrent une

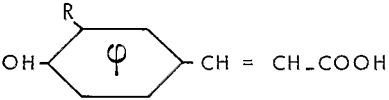
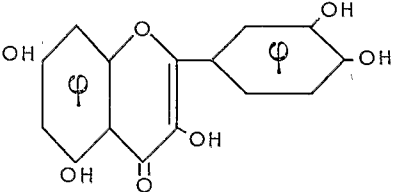
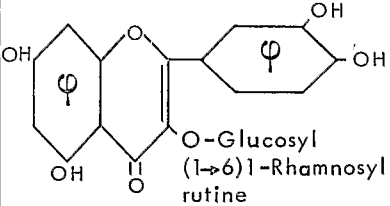
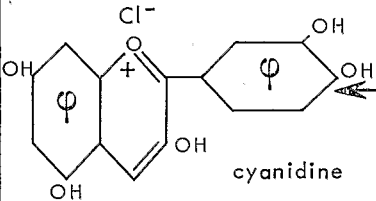
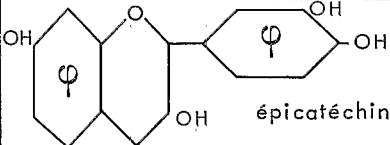
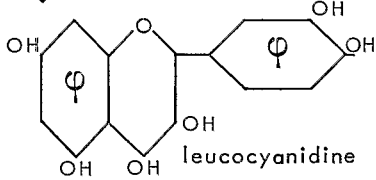
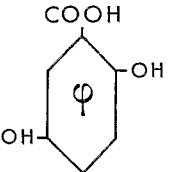
|                                   | Extrait hydrolysé  | Extrait non hydrolysé   |
|-----------------------------------|--|---|
| Acides cinnamiques<br>les dérivés |  $\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{R})-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ <p>R = H-acide p-coumarique<br/>R = OCH<sub>3</sub>-acide férulique<br/>R = OH-acide caféique</p> | composé du groupe chlorogénique donnant par hydrolyse de l'acide caféique   |
| flavonols<br>flavonosides         |  <p>quercétine</p>  | <p>Dans ce groupe identification de la rutine</p>  <p>O-Glucosyl<br/>(1-&gt;6)1-Rhamnosyl<br/>rutine</p>                                      |
| flavans                           |  <p>cyanidine</p>   |  <p>épicatechine</p>  <p>leucocyanidine</p> <p>HCl</p> |
| acide benzoïque                   |  <p>acide gentisique ou<br/>acide 2-5 dihydroxybenzoïque</p>  |   |

Fig. 2. — Classification des différentes substances phénoliques des extraits des deux types de cabosse.

très nette différence entre l'activité enzymatique de ces différents tissus.

Les extraits des tissus pourris et des cabosses saines présentent à peu près la même activité, bien que la courbe d'accroissement de la densité optique se rapportant aux cabosses saines (— CS-1964) soit légèrement supérieure à celle des tissus pourris (— TP-1964).

Par contre, la polyphénoloxydase extraite des tissus sains des cabosses infectées (— TSI-1964) montre une activité trois fois supérieure dans une série, et huit fois supérieure dans l'autre, à celle des autres tissus (voir graphique, fig. 3).

Sur un autre lot, provenant aussi de la Côte d'Ivoire, l'infection expérimentale a été arrêtée quand la tache brune mesurait environ 2 cm de diamètre.

Les différences de l'activité enzymatique ont été beaucoup moins nettes dans cette expérience que lorsque l'infection avait été de plus longue durée (TSI-1965, CS-1965) (voir fig. 3).

### Activité enzymatique à différents stades de développement de cabosses sensibles

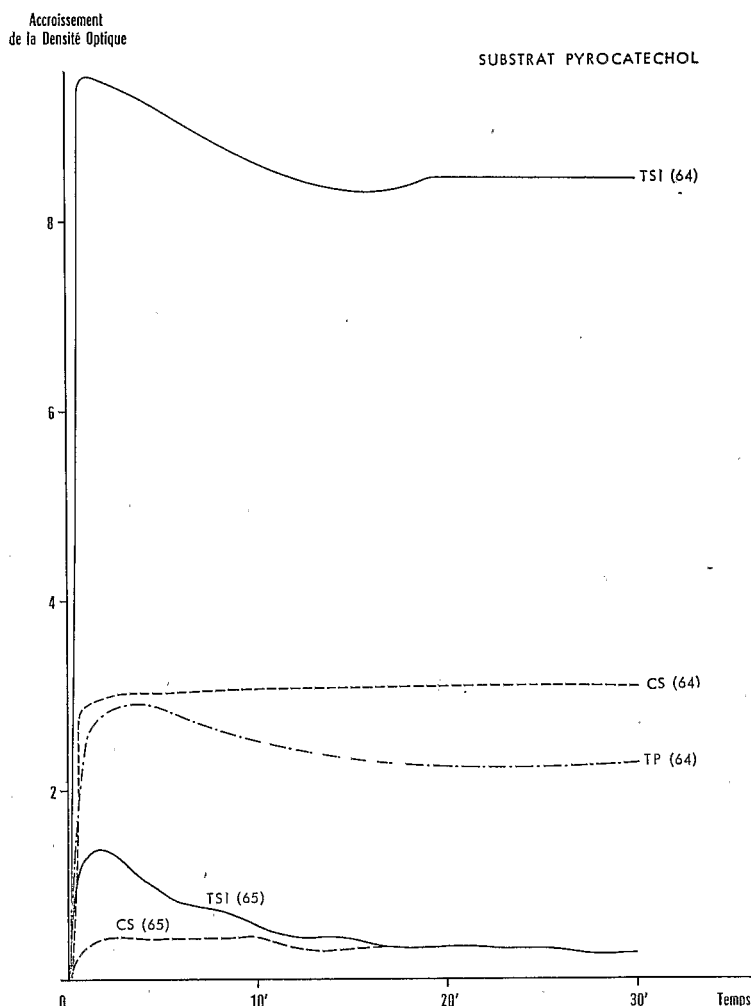
Dans cette dernière série d'extractions, nous avons étudié l'activité de la polyphénoloxydase de cabosses saines et inoculées, à différents stades de maturité : cabosses jaunes 17 cm (1), vertes 17 cm (2), vertes 12 cm (3), chérelles 6 cm (4). Les tissus pourris n'ont pas été étudiés, la quantité de matériel obtenue étant trop peu importante.

Dans le cas des cabosses saines, au fur et à mesure de la maturation, de la chérelle (4) à la cabosse mûre (1), la polyphénoloxydase a une activité décroissante. Une exception doit cependant être faite pour le stade des fruits verts 11 cm (3) dont la courbe d'activité se situe entre les stades (1) et (2).

Dans les tissus sains des cabosses infectées, l'activité augmente au contraire de la chérelle au fruit vert ; la cabosse jaune présente une courbe dont la pente n'est pas parallèle aux autres (voir fig. 4, p. 192).

Tous ces dosages ont été réalisés en prenant le pyrocatechol comme substrat et les résultats rapportés à 100 mg de matière sèche.

Fig. 3.



### Différence d'activité de la polyphénoloxydase avec plusieurs substrats

Une série de mesures a été effectuée avec, comme substrats, des produits commerciaux correspondant aux composés phénoliques mis en évidence par chromatographie sur papier et signalés plus haut : épicatechine, rutine, quercétine, leucocyanidine, catéchine, cyanidine, esculetine, acide gentisique, acide caféique, acide p-coumarique, acide férulique.

On note, en présence de la catéchine, une activité nettement supérieure dans les cabosses saines.



Fig. 4.

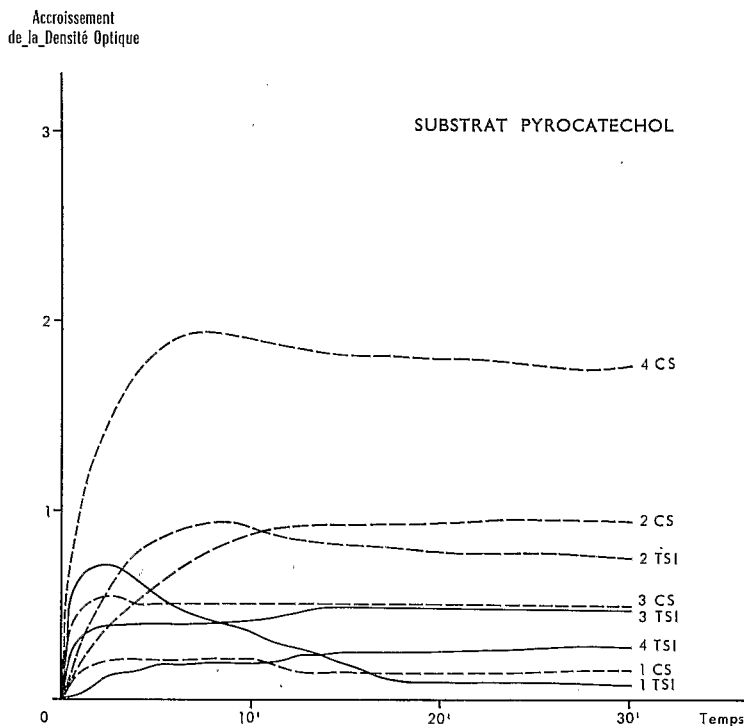
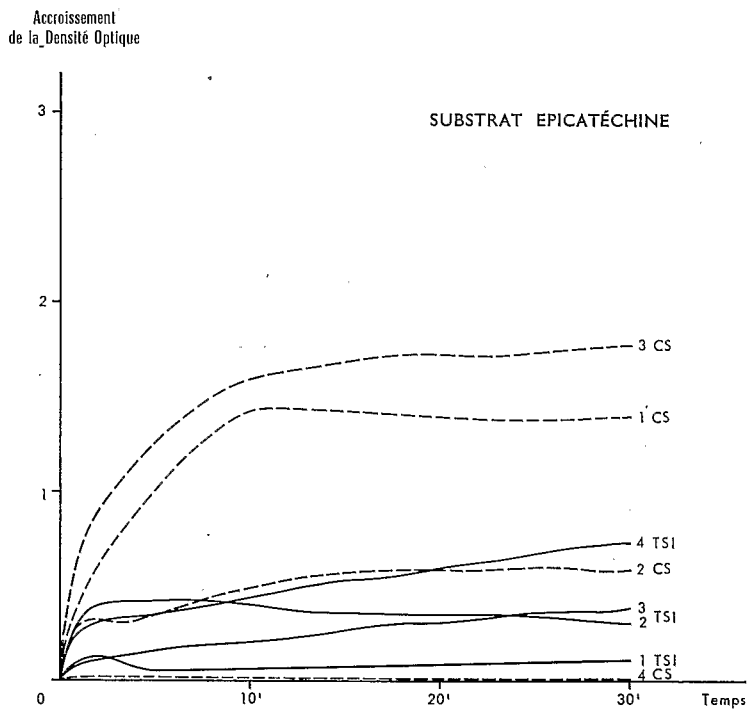


Fig. 5.



Avec l'épicatéchine comme substrat, l'extrait de polyphénoloxydase des tissus sains de cabosses inoculées paraît agir plus tardivement (voir graphique, fig. 5). L'épicatéchine avait, comme la leucocyanidine, donné une réaction positive lors de la vaporisation de chromatogrammes d'un extrait méthanolique total de cabosses, avec des solutions de polyphénoloxydase des mêmes fruits. L'épicatéchine était devenue jaune immédiatement après l'application de l'extrait enzymatique, la leucocyanidine quelques instants plus tard.

Ces constatations conduisent à penser que l'étude de l'évolution de l'activité enzymatique au cours de la progression de la pourriture de la cabosse mérite d'être suivie. D'autre part, on se rapprocherait davantage des conditions naturelles en prenant comme substrats les composés phénoliques extraits des cabosses, et non des produits commerciaux, ceci au cours de la maturation des cabosses sensibles. De même, il faudrait suivre parallèlement une série de cabosses présentant un certain degré de résistance.

Nous nous proposons de rechercher si ces composés phénoliques préexistent dans les tissus de la cabosse, ou sont élaborés en réponse à l'infection. Pour cela, il est nécessaire de les étudier avant l'infection et au cours de l'évolution de la pourriture dans les deux types de cabosse. Nous étudierons parallèlement l'activité de ces composés en utilisant soit des produits du commerce, soit des substances obtenues à partir d'extraits, après élution et purification, avant ou après action de la polyphénoloxydase.

Nous avons présenté ici, extrêmement résumés, les premiers résultats obtenus dans l'étude de la pourriture brune des cabosses. Ils peuvent paraître disparates. Dans notre idée, ce ne sont que quelques uns des éléments qui, une fois assemblés, permettront, nous l'espérons, d'avoir une vue générale sur l'aspect biochimique de la maladie.

Ces travaux ont été conduits au laboratoire « Biochimie de la résistance » des services scientifiques centraux de l'O. R. S. T. O. M. dont la création a été guidée par le souci de réunir deux disciplines : Phytopathologie et Biochimie. Une collaboration étroite avec d'autres disciplines serait des plus souhaitables.

## ANNEXE I

Activité pectinolytique de *Phytophthora palmivora*

| Souches  | Milieu Czapek-Dox<br>glucose |           |         |           | Milieu Czapek-Dox<br>pectine |           |         |           | Milieu eau-<br>pomme de terre |           |         |           |
|----------|------------------------------|-----------|---------|-----------|------------------------------|-----------|---------|-----------|-------------------------------|-----------|---------|-----------|
|          | PG                           |           | PMG     |           | PG                           |           | PMG     |           | PG                            |           | PMG     |           |
|          | R4<br>%                      | R5,5<br>% | B4<br>% | B5,5<br>% | R4<br>%                      | R5,5<br>% | B4<br>% | B5,5<br>% | R4<br>%                       | R5,5<br>% | B4<br>% | B5,5<br>% |
| A1.....  | 37                           | 0         | 0       | 0         | 63                           | 44        | 0       | 15        | 62                            | 0         | 0       | 0         |
| A2.....  | 9                            | 0         | 0       | 0         | 70                           | 33        | 0       | 0         | 46                            | 0         | 0       | 0         |
| A3.....  | 63                           | 0         | 0       | 0         | 61                           | 0         | 0       | 14        | 62                            | 0         | 0       | 0         |
| A4.....  | 0                            | 0         | 0       | 0         | 70                           | 23        | 0       | 14        | 47                            | 0         | 0       | 0         |
| A5.....  | 34                           | 0         | 0       | 0         | 54                           | 29        | 0       | 0         | 68                            | 0         | 0       | 0         |
| B1.....  | 71                           | 0         | 0       | 0         | 50                           | 0         | 0       | 0         | 84                            | 58        | 0       | 0         |
| B2.....  | 73                           | 0         | 0       | 0         | 84                           | 68        | 0       | 0         | 83                            | 48        | 17      | 0         |
| B3.....  | 62                           | 12        | 0       | 0         | 83                           | 50        | 0       | 17        | 59                            | 0         | 0       | 0         |
| B4.....  | 69                           | 0         | 0       | 0         | 74                           | 44        | 0       | 0         | 83                            | 6         | 18      | 0         |
| B5.....  | 69                           | 0         | 0       | 0         | 78                           | 51        | 0       | 0         | 74                            | 47        | 0       | 0         |
| G1.....  | 30                           | 0         | 0       | 0         | 43                           | 0         | 0       | 0         | 59                            | 0         | 0       | 0         |
| G2.....  | 0                            | 0         | 0       | 0         | 38                           | 0         | 0       | 15        | 52                            | 0         | 0       | 0         |
| G3.....  | 17                           | 0         | 0       | 0         | 9                            | 0         | 0       | 0         | 63                            | 0         | 0       | 0         |
| G4.....  | 34                           | 0         | 0       | 0         | 45                           | 0         | 0       | 0         | 47                            | 0         | 0       | 0         |
| G5.....  | 10                           | 0         | 0       | 0         | 52                           | 14        | 0       | 0         | 50                            | 0         | 0       | 0         |
| K1.....  | 54                           | 0         | 0       | 0         | 35                           | 27        | 0       | 0         | 55                            | 0         | 0       | 0         |
| K2.....  | 39                           | 0         | 0       | 0         | 50                           | 25        | 0       | 0         | 44                            | 0         | 0       | 0         |
| K3.....  | 0                            | 0         | 0       | 0         | 32                           | 22        | 0       | 0         | 52                            | 0         | 0       | 0         |
| K4.....  | 31                           | 0         | 0       | 0         | 57                           | 0         | 0       | 0         | 51                            | 0         | 0       | 0         |
| K5.....  | 39                           | 0         | 0       | 0         | 55                           | 36        | 0       | 0         | 66                            | 22        | 0       | 0         |
| M1.....  | 41                           | 0         | 0       | 0         | 37                           | 25        | 0       | 0         | 58                            | 0         | 0       | 0         |
| M2.....  | 50                           | 0         | 0       | 0         | 33                           | 36        | 0       | 0         | 55                            | 0         | 0       | 0         |
| M3.....  | 37                           | 0         | 0       | 0         | 36                           | 17        | 0       | 0         | 44                            | 0         | 10      | 0         |
| M4.....  | 43                           | 0         | 0       | 0         | 50                           | 23        | 0       | 0         | 38                            | 0         | 10      | 0         |
| M5.....  | 42                           | 0         | 0       | 0         | 40                           | 0         | 0       | 0         | 44                            | 0         | 0       | 0         |
| MB1..... | 21                           | 0         | 0       | 0         | 53                           | 13        | 0       | 0         | 58                            | 0         | 0       | 0         |
| MB2..... | 0                            | 0         | 0       | 0         | 58                           | 0         | 0       | 0         | 38                            | 0         | 10      | 0         |
| MB3..... | 22                           | 0         | 0       | 0         | 50                           | 23        | 0       | 0         | 56                            | 0         | 0       | 0         |
| MB4..... | 0                            | 0         | 0       | 0         | 53                           | 0         | 0       | 0         | 34                            | 0         | 0       | 0         |
| MB5..... | 10                           | 0         | 0       | 0         | 51                           | 28        | 0       | 0         | 42                            | 0         | 0       | 0         |
| T1.....  | 0                            | 0         | 0       | 0         | 58                           | 0         | 0       | 0         | 58                            | 0         | 0       | 0         |
| T2.....  | 17                           | 0         | 0       | 0         | 64                           | 0         | 0       | 0         | 56                            | 0         | 0       | 0         |
| T3.....  | 0                            | 0         | 0       | 0         | 46                           | 0         | 0       | 0         | 51                            | 0         | 0       | 0         |
| T5.....  | 18                           | 0         | 0       | 0         | 42                           | 36        | 0       | 0         | 22                            | 0         | 0       | 0         |
| S1.....  | 28                           | 0         | 0       | 0         | 68                           | 20        | 0       | 0         | 53                            | 0         | 0       | 0         |
| S2.....  | 13                           | 0         | 0       | 0         | 59                           | 0         | 0       | 0         | 36                            | 0         | 0       | 16        |
| S3.....  | 21                           | 0         | 0       | 0         | 52                           | 15        | 0       | 0         | 18                            | 0         | 0       | 0         |
| S4.....  | 0                            | 0         | 0       | 0         | 52                           | 7         | 0       | 0         | 18                            | 0         | 20      | 14        |
| S5.....  | 43                           | 0         | 0       | 0         | 59                           | 0         | 0       | 0         | 45                            | 0         | 0       | 0         |
| O1.....  | 49                           | 0         | 0       | 0         | 68                           | 0         | 0       | 0         | 30                            | 0         | 0       | 10        |
| O2.....  | 37                           | 0         | 0       | 0         | 46                           | 0         | 0       | 0         | 35                            | 0         | 0       | 0         |
| O3.....  | 36                           | 0         | 0       | 0         | 58                           | 0         | 0       | 0         | 14                            | 0         | 0       | 16        |
| O4.....  | 0                            | 0         | 42      | 54        | 22                           | 0         | 0       | 0         | 20                            | 0         | 0       | 0         |
| O5.....  | 9                            | 0         | 0       | 0         | 39                           | 0         | 0       | 0         | 34                            | 0         | 0       | 16        |
| H4.....  | 77                           | 48        | 0       | 0         | 47                           | 48        | 0       | 0         | 63                            | 9         | 0       | 0         |
| HCS..... | 0                            | 0         | 0       | 0         | 31                           | 13        | 0       | 0         | 0                             | 0         | 0       | 0         |
| AN.....  | 39                           | 0         | 0       | 0         | 36                           | 25        | 0       | 0         | 0                             | 0         | 0       | 15        |
| AG.....  | 60                           | 0         | 0       | 0         | 62                           | 21        | 0       | 0         | 29                            | 0         | 0       | 0         |
| JG.....  | 6                            | 0         | 0       | 0         | 55                           | 10        | 0       | 0         | 30                            | 0         | 0       | 17        |
| JB.....  | 0                            | 0         | 0       | 0         | 37                           | 0         | 0       | 0         | 26                            | 0         | 13      | 16        |

— R4 et R5,5 : substrats à base de pectine ruban rouge à pH 4 et 5,5.

— B4 et B5,5 : substrats à base de pectine ruban brun à pH 4 et 5,5.

## ANNEXE II

Activité cellulolytique de *Phytophthora palmivora*

Substrat : blanose pH 6

Activité %

| Milieu blanose |   |    |   |    |    | Milieu glucose |    |    |    |    |    |    |    |     |    |
|----------------|---|----|---|----|----|----------------|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|
| A1             | 0 | B1 | 0 | G1 | 0  | A1             | 0  | B1 | 8  | G1 | 0  | K1 | 12 | M1  | 0  |
| A2             | 8 | B2 | 0 | G2 | 0  | A2             | 10 | B2 | 0  | G2 | 9  | K2 | 0  | M2  | 0  |
| A3             | 0 | B3 | 0 | G3 | 0  | A3             | 38 | B3 | 11 | G3 | 0  | K3 | 23 | M3  | 4  |
| A4             | 0 | B4 | 0 | G4 | 0  | A4             | 8  | B4 | 0  | G4 | 10 | K4 | 0  | M4  | 0  |
| A5             | 0 | B5 | 0 | G5 | 0  | A5             | 0  | B5 | 0  | G5 | 0  | K5 | 19 | M5  | 0  |
| MB1            | 0 | S1 | 0 | O1 | 4  | MB1            | 15 | S1 | 10 | O1 | 7  | T1 | 0  | H4  | 0  |
| MB2            | 0 | S2 | 0 | O2 | 0  | MB2            | 0  | S2 | 16 | O2 | 0  | T2 | 15 | HCS | 5  |
| MB3            | 8 | S3 | 0 | O3 | 4  | MB3            | 8  | S3 | 0  | O3 | 10 | T3 | 0  | AN  | 0  |
| MB4            | 0 | S4 | 8 | O4 | 10 | MB4            | 0  | S4 | 0  | O4 | 0  | T5 | 13 | AG  | 13 |
| MB5            | 0 | S5 | 0 | O5 | 0  | MB5            | 0  | S5 | 16 | O5 | 12 | JG |    | JG  | 12 |
|                |   |    |   |    |    |                |    |    |    |    |    | JB | 10 | JB  | 0  |

MEIFFREN (M.), TANGUY (J.), HARDY (M.). — **Rôle possible d'enzymes et de composés phénoliques dans le développement de la pourriture brune.** Conférence internationale sur les recherches agronomiques cacaoyères, Abidjan, 15-20 novembre 1965. Paris (1967), p. 184-194, fig. tabl.

La présente étude envisage essentiellement l'aspect physiologique du problème. En effet, les travaux les plus récents conduisent à penser que les enzymes extra-cellulaires des champignons parasites jouent un très grand rôle dans les processus d'invasion de la plante-hôte. On se propose ici d'étudier l'activité pectinolytique et cellulolytique de *Phytophthora palmivora* Butler.

Des indications sont données sur la sensibilité de ce parasite aux fongostatiques ainsi que sur les inhibiteurs naturels de ses enzymes.

D'autre part, les tissus des organes attaqués peuvent contenir des composés susceptibles d'intervenir dans les mécanismes de défense. Parmi les constituants du péricarpe de la cabosse, les substances phénoliques attirent plus particulièrement l'attention. Une étude méthodique en a été faite sur des cabosses d'Amelonado et des cabosses d'un Trinitario présentant un certain caractère de résistance. Il a semblé intéressant de suivre leur composition en phénols au cours de la maturation.

Enfin, certaines substances phénoliques sont des substrats pour les enzymes d'oxydation. L'étude a porté en premier lieu sur la polyphénoloxydase, en relation avec certains des composés mis en évidence, au cours de la maturation, dans les tissus sains et pourris.

MEIFFREN (M.), TANGUY (J.), HARDY (M.). — **Possible role of enzymes and phenolic compounds in the development of black pod-rot.** Conférence internationale sur les recherches agronomiques cacaoyères, Abidjan, 15-20 novembre 1965. Paris (1967), p. 184-194, fig., tabl.

The present study considers chiefly the physiological aspect of the problem. The most recent work leads us to think that the extra-cellular enzymes of parasitic fungi play a very great part in the invasion of the host plant. The authors intend here to study the pectinolytic and cellulolytic activity of *Phytophthora palmivora* Butler.

Particulars are given of the sensitivity of this parasite to fungistatics and the natural inhibitors of its enzymes.

Besides, the tissues of the affected organs may contain compounds capable of intervening in the mechanism of protection. Among the components of the pod pericarp, the phenolic substances deserve special attention. A methodical study of them was carried out with Amelonado pods and pods of a Trinitario tree which had some resistance tendency. It appeared interesting to follow up their phenol content during the ripening period.

Finally, some phenolic substances are substrata for the oxidizing enzymes. The study dealt first with the polyphenoloxidase connected with some of the compounds found, in course of the ripening in the sound and rotted tissues.