

**PARASITOLOGIE VÉGÉTALE.** — *Propriétés inhibitrices in vitro de dérivés oxygénés d'acides gras polyinsaturés élaborés chez le Lycopersicum esculentum Mill. en réaction à l'infection par le Phytophthora parasitica Dast.* Note de **Annie Vernenghi, Jacques Einhorn, Gerhard Kunesch, Christian Malosse, Florence Ramiandrasoa et André Ravisé**, présentée par **Léon Hirth**.

Des alcools diéniques dérivant du linoléate de méthyle sont élaborés en réaction à l'infection par le *P. parasitica* chez un cultivar de Tomate résistant à ce parasite. Les alcools diéniques naturels ou de synthèse ainsi que les monoépoxydes de divers esters méthyliques d'acides gras polyinsaturés, envisageables comme partenaires, sont toxiques *in vitro* pour le parasite. Un important effet de synergie entre ces produits, des composés phénoliques et/ou la tomatine est observé *in vitro* pour l'inhibition de la croissance et du cycle du *P. parasitica*.

**PLANT PARASITOLOGY.** — *In vitro* antimicrobial activity of hydroxylated polyunsaturated fatty acid derivatives produced in *Lycopersicum esculentum* Mill. in response to infection by *Phytophthora parasitica* Dast.

*Dienic alcohols derived from the methyl ester of linoleic acid have been isolated from tissues of a Tomato cultivar resistant to P. parasitica. Natural and synthetic dienic alcohols as well as monoepoxides produced chemically from the methyl esters of 3 unsaturated fatty acids were efficient inhibitors of fungal growth in vitro. Their inhibition activities were strongly enhanced in the presence of several phenolics and of tomatine whose levels are known to increase in diseased Tomato.*

Les études concernant la réaction du *Lycopersicum esculentum* au parasitisme mettent en évidence la diversité des voies métaboliques stimulées et l'accumulation dans les tissus de substances toxiques pour des champignons pathogènes — tomatine ([17], [19]), sesquiterpènes ([20], [21]), composés phénoliques ([2], [21], [22]), substances polyacétyléniques ([4], [6]).

Dans le cadre de nos recherches sur les facteurs de résistance de l'hôte, nous avons découvert la synthèse de dérivés oxygénés d'acides gras polyinsaturés dans les tissus résistant à l'infection par le *P. parasitica*. Ils correspondent à des alcools diéniques, avec en mélange des monoépoxydes dérivant du linoléate de méthyle. Leur toxicité est comparée à celle des produits de synthèse correspondants.

**MATÉRIELS ET TECHNIQUES.** — Le cultivar de tomate Piéraline possède les gènes de résistance au mildiou et à la verticilliose. La souche de *P. parasitica* isolée de tomates au Liban, est inoculée à des plants d'un mois selon des techniques précédemment décrites ([21], [22]). Les substances toxiques sont extraites des broyats de tissus par diffusion dans le chloroforme puis dans le méthanol. Les fractions possédant une activité biologique sont séparées successivement par entraînement à la vapeur d'eau, par chromatographie sur plaques de silice imprégnées de 10% d'AgNO<sub>3</sub>. Après extraction, les tissus sont traités par de la potasse 2N pour libérer des substances phénoliques et pour établir si des dérivés oxygénés d'acides gras ont été estérifiés au niveau des parois.

La détermination des structures chimiques de certains composés est réalisée par chromatographie en phase gazeuse — spectrométrie de masse, ou par spectrométrie de masse seule, dans les modes impact électronique et ionisation chimique. La localisation de fonctions alcool secondaires et des insaturations (doubles liaisons) est confirmée à l'aide de techniques microchimiques (dérivation, dégradation). La synthèse des alcools diéniques est réalisée par oxydation du linoléate de méthyle (dioxyde de sélénium, benzène); après chromatographie sur gel de silice de l'extrait réactionnel on isole une fraction riche en alcools diéniques dont les caractéristiques spectrales sont identiques à celles des produits naturels. L'époxyde d'oléate de méthyle est synthétisé par époxydation contrôlée (acide *m*-chloroperbenzoïque/dichlorométhane) de l'oléate de méthyle. Il en est de même pour les monoépoxydes de linoléate de méthyle (en position 9-10 ou 12-13) et de linoléate de méthyle (9-10, 12-13, 15-16). Au cours des étapes de purification, sont effectués des contrôles de toxicité sur plaques chromatographiques par pulvérisation de *Cladosporium cladosporioides*. Les études d'inhibition *in vitro* du *P. parasitica* sont effectuées en lames à concavité sur microthalles avec ou sans chlamydo-spores ou réserves nutritives gélosées ([15], [16], [21], [22]).

Des effets de synergie d'inhibition sont recherchés entre ces produits et des composés phénoliques de la Tomate — acides dihydroxy — et trihydroxybenzoïques, *p*-coumarique, caféique, chlorogénique, férulique, la vanilline, le diméthoxybenzaldéhyde-, la tomatine et son aglycone.

ORSTOM Fonds Documentaire

0249-6313/85/03010743 \$2.00 © Académie des Sciences

N° : 23713 ex 1

Cote : B 93 11

Date : 870604

RÉSULTATS. — Dans les tissus des plants inoculés, au niveau des zones nécrotiques où le parasite est bloqué [22] s'accumulent des dérivés oxygénés d'esters méthyliques d'acides gras insaturés. Ils sont purifiés par chromatographie sur plaques de silice imprégnées de 10% de  $\text{AgNO}_3$ , par entrainement à la vapeur d'eau puis par chromatographie liquide à haute performance sur colonnes de silice avec des éluants organiques. Parmi ces produits prédominent des dérivés du linoléate de méthyle — hydroxy-9 octadecadien-10,12 et hydroxy-13 octadecadien-9,11 oate de méthyle et en moindre quantité un monoépoxyde (en position 9,10). La préparation de produits de synthèse — alcools diéniques, monoépoxydes — permet de comparer leurs structures (et celles des produits obtenus après hydrogénation catalytique, traitement au chlorure d'acétyle, deutériation, ozonolyse) et leurs propriétés biologiques avec celles des produits naturels. La figure I indique la similitude des spectres de masse établis en impact électronique (70 eV) du principal alcool diénique élaboré en réaction au parasitisme et du produit de synthèse correspondant.

Les alcools diéniques naturels ou de synthèse manifestent une importante toxicité *in vitro* pour le *P. parasitica*. L'inhibition de croissance varie de 50 à 70% par rapport au témoin entre 50 et 75  $\mu\text{g/ml}$ , le produit de synthèse, plus pur, étant le plus actif; avec celui-ci, la concentration létale est inférieure à 200  $\mu\text{g/ml}$  (fig. 2).

L'oléate de méthyle, aux concentrations étudiées, n'est pas toxique mais le monoépoxyde en dérivant provoque des malformations d'hyphes dès la concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$  (fig. 2). En outre, si le linoléate de méthyle n'est pas toxique, le linoléate de méthyle l'est faiblement; les monoépoxydes correspondants ont une concentration létale de 250  $\mu\text{g/ml}$ . Toutefois, les modalités d'inhibition du *P. parasitica*, observées en microscopie optique, sont identiques pour tous les alcools diéniques et pour les monoépoxydes de synthèse. Même aux plus faibles concentrations, la densité du thalle n'atteint pas le 1/10 de celle du témoin. L'inhibition s'établit en plusieurs étapes. Son intensité et sa rapidité dépendent du pH, l'optimum se situe entre 4 et 6,2. La figure 3 indique les résultats obtenus avec le monoépoxyde de linoléate de méthyle à pH 6,2: la phase de latence de reprise de croissance est d'autant plus longue que la concentration est élevée; dès 50  $\mu\text{g/ml}$  la croissance est bloquée après 24 h d'incubation. A cette même concentration, la germination des sporocystes chute à 10% de celle du témoin.

Les composés phénoliques de la Tomate sont toxiques *in vitro* pour le *P. parasitica* ([21], [22]). La figure 4 indique la réduction de croissance par rapport au témoin, à 100  $\mu\text{g/ml}$ , pour 4 substances — les acides chlorogénique, trihydroxybenzoïque, caféique et le diméthoxybenzaldéhyde — parmi les plus actives. De même, la tomatine ou son aglycone sont toxiques dès la concentration de 100  $\mu\text{g/ml}$  à pH acide. Nous avons mis en évidence un effet de synergie entre les dérivés oxygénés d'acides gras insaturés d'une part, les composés phénoliques et/ou la tomatine d'autre part. La synergie entre l'alcool diénique de synthèse et les différents phénols éprouvés décuple leur toxicité comme l'indique la figure 4. Les inhibitions les plus importantes sont observées avec l'acide

#### EXPLICATION DES PLANCHES

##### Planche I

Fig. 1. — (a) Spectre de masse d'un alcool diénique naturel (majoritaire) en impact électronique (70 eV). (b) Spectre de masse, en impact électronique, de l'alcool diénique de synthèse correspondant au produit naturel (hydroxy-9 octadecadien-10,12 oate de méthyle).

Fig. 1. — (a) Mass spectrum of a natural dienic alcohol in electronic impact (70 eV). (b) Mass spectrum, in electronic impact, of the similar synthetic dienic alcohol.

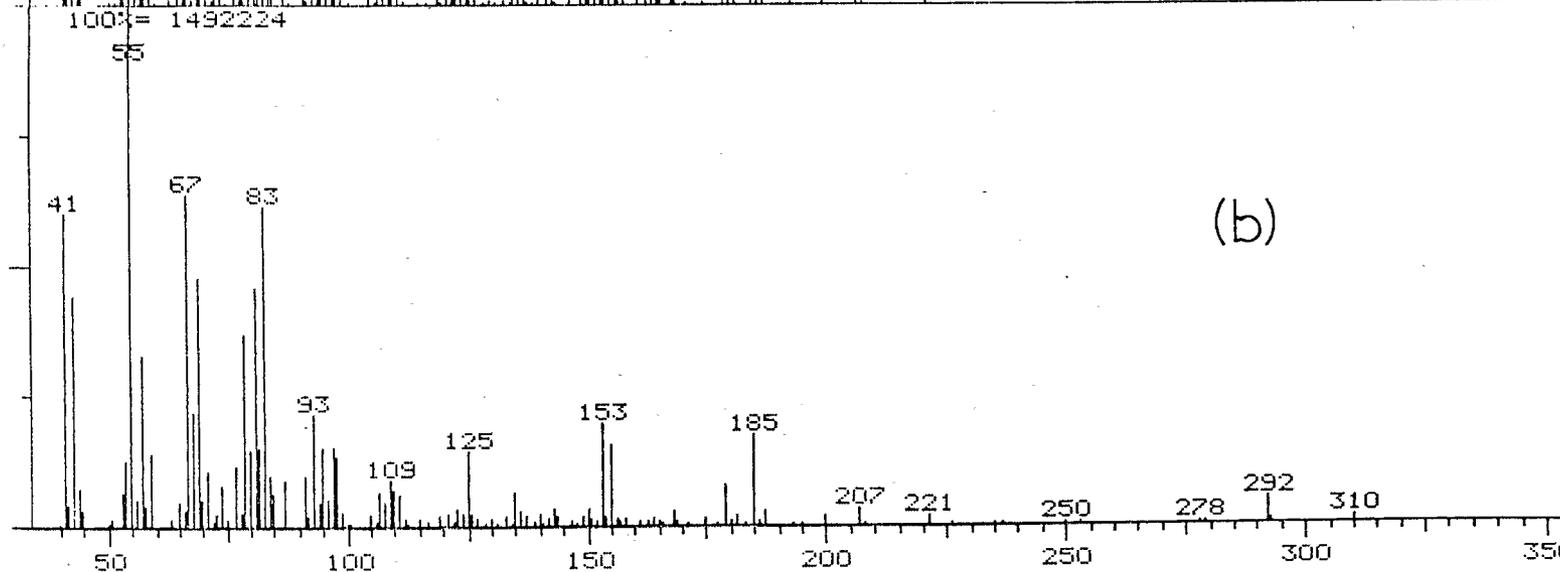
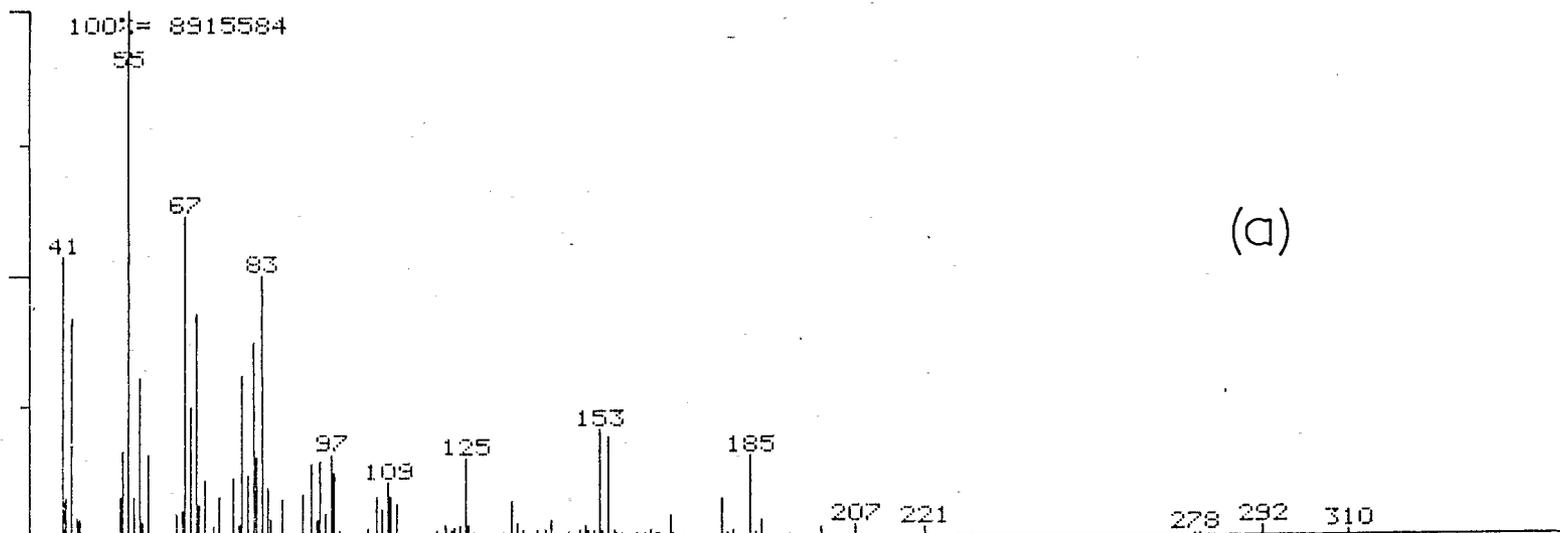
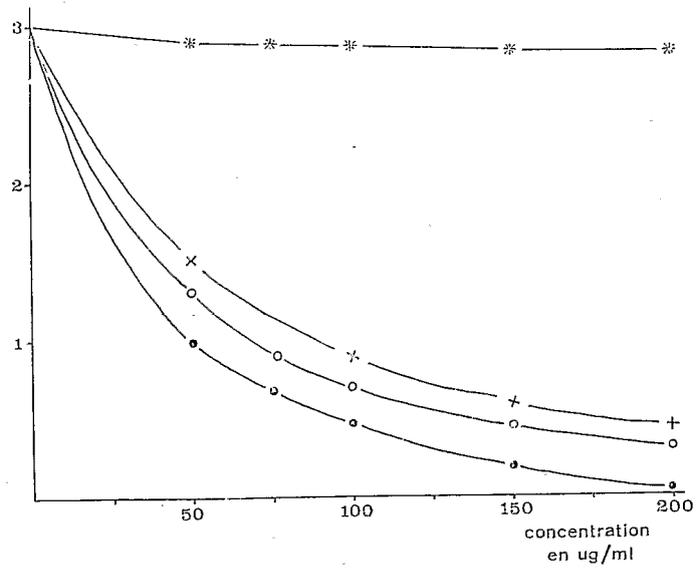


Fig. 1

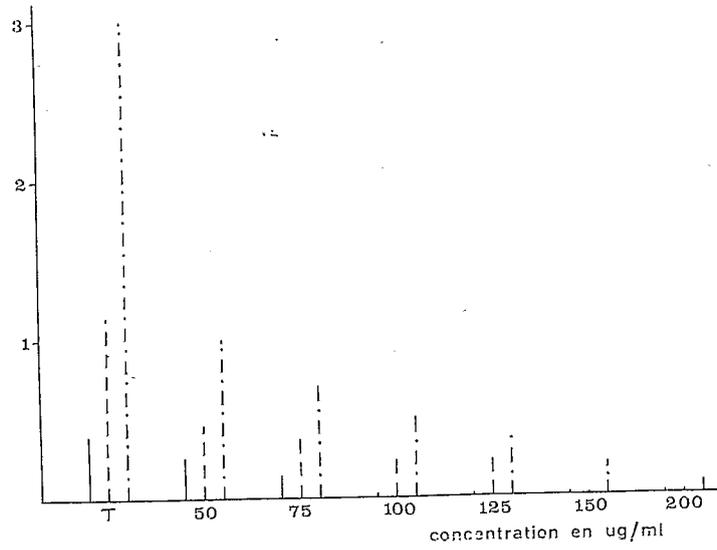
longueur des hyphes  
en  $\mu\text{m} \times 10^3$

Fig. 2



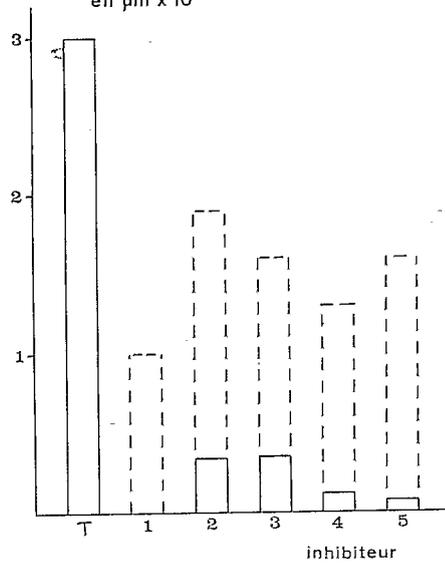
longueur des hyphes  
en  $\mu\text{m} \times 10^3$

Fig. 3



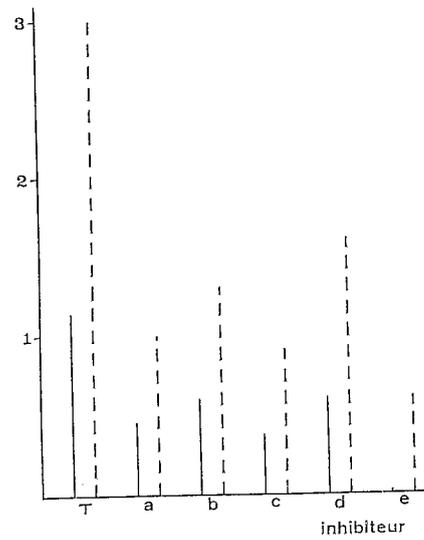
longueur des hyphes  
en  $\mu\text{m} \times 10^3$

Fig. 4



longueur des hyphes  
en  $\mu\text{m} \times 10^3$

Fig. 5



## Planche II

Fig. 2. — Inhibition du *P. parasitica* par des dérivés oxygénés d'acides gras naturels ou de synthèse selon la concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) après une incubation de 24 h : —\*—, oléate de méthyle (# témoin); —○—, monoépoxyde d'oléate de méthyle; —+—, alcools diéniques naturels; —●—, alcools diéniques de synthèse.

Fig. 2. — *In vitro* growth inhibition of *P. parasitica* by: —\*—, methyl oleate (# reference); —○—, monoepoxide of methyl oleate; —+—, natural dienic alcohols; —●—, synthetic dienic alcohols. — Concentration:  $\mu\text{g/ml}$ ; incubation: 24 hrs.

Fig. 3. — Inhibition de la croissance des hyphes de *P. parasitica* par le monoépoxyde de linoléate de méthyle en fonction de la concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) et selon la durée d'incubation : —, 3 h 1/2; ---, 7 h; —.—, 24 h.

Fig. 3. — *In vitro* growth inhibition of *P. parasitica* in relation with the concentration of methyl linolenate monoepoxide ( $\mu\text{g/ml}$ ) and the incubation: —, 3 hrs. 1/2; ---, 7 hrs.; —.—, 24 hrs.

Fig. 4. — Inhibition du *P. parasitica* par un seul inhibiteur, — — — et effet de synergie, — (50  $\mu\text{g}$  d'alcools diéniques + 100  $\mu\text{g}$  de composé phénolique par millilitre): T, témoin; n° 1, alcool diénique à 50  $\mu\text{g/ml}$ ; n° 2 à 5, 100  $\mu\text{g/ml}$  d'acide chlorogénique (2), d'acide trihydroxybenzoïque (3), d'acide caféïque (4), de diméthoxybenzaldéhyde (5).

Fig. 4. — *In vitro* growth inhibition of *P. parasitica* by 1 inhibitor, — — — and synergistic effect, — (dienic alcohol 50  $\mu\text{g/ml}$  + phenolics 100  $\mu\text{g/ml}$ ). T, reference; Nos. 1, dienic alcohols (50  $\mu\text{g/ml}$ ); Nos. 2 to 5, 100  $\mu\text{g/ml}$  of chlorogenic acid (2), trihydroxybenzoic acid (3), caffeic acid (4), dimethoxy-benzaldehyde (5).

Fig. 5. — Effet de la synergie des inhibiteurs sur la croissance du *P. parasitica* (—, 7 h; —.—, 24 h). T, témoin; a, alcools diéniques de synthèse à 50  $\mu\text{g/ml}$ ; b, tomatine à 100  $\mu\text{g/ml}$ ; c, a+b; d, diméthoxybenzaldéhyde à 100  $\mu\text{g/ml}$ ; e, a+b+d associés à la concentration unitaire de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Fig. 5. — Synergistic effect of inhibitors (—, 7 hrs.; —.—, 24 hrs.). T, reference; a, synthetic dienic alcohols (50  $\mu\text{g/ml}$ ); b, tomatin (100  $\mu\text{g/ml}$ ); c, a+b; d, dimethoxy-benzaldehyde (100  $\mu\text{g/ml}$ ); e, a+b+d (50  $\mu\text{g/ml}$  of each compound).

caféïque et le diméthoxybenzaldéhyde. Selon les associations, la phase de latence atteint ou dépasse 7 h. La croissance est bloquée en moins de 24 h et représente 10 à 15% de celle du témoin. Les malformations des jeunes hyphes et les altérations cytoplasmiques sont nettement décelables après 3 h d'incubation. L'association avec la tomatine ou la tomatidine se révèle moins efficace que la précédente bien que provoquant des symptômes analogues. L'incorporation au milieu de culture de 3 effecteurs — alcools diéniques de synthèse, tomatine, diméthoxybenzaldéhyde — à 50  $\mu\text{g/ml}$  accroît l'inhibition (fig. 5). Dans les mêmes conditions, en ajoutant l'acide caféïque, le blocage de la croissance du parasite est observé pour des concentrations unitaires de 30  $\mu\text{g/ml}$  des 4 inhibiteurs.

Quel que soit le motif étudié, on observe toujours les mêmes séquences d'altérations : les apex se renflent en spatule ou se spiralisent, les parois s'épaississent et leur réfringence s'accroît. Les hyphes en élongation deviennent toruleux, grêles et fréquemment ramifiés en arbuscules coralloïdes. Dans le cytoplasme, à une vacuolisation au niveau des apex succèdent la formation de globules lipidiques puis l'autolyse en 24 h. Nous avons vérifié que les parois des chlamydozoïdes sont moins perméables aux inhibiteurs que celles des hyphes; leur présence permet parfois la survie des microthalles après 3 à 6 jours d'incubation quand ils sont transférés sur milieu nutritif en tubes.

DISCUSSION. CONCLUSION. — Nous avons décelé chez la Tomate de nouveaux facteurs de résistance : des alcools diéniques présents sous forme diffusible dans les tissus infectés. Dans l'autre modèle connu, chez le Riz, des monoépoxydes d'acides polyéniques sont estérifiés aux parois [8]. Comparés aux dérivés oxygénés, le linoléate de méthyle n'est pas toxique *in vitro*, le linoléate de méthyle l'est faiblement ([18], [21]).

Par analogie avec les études de Kollatukudy [10], nous présumons que ces produits puissent être liés au métabolisme du suber. Plusieurs auteurs ont mis en évidence des substances phénoliques dans le suber (*inter al.* [7], [9]). Nous avons démontré que des produits phénoliques et des lipides s'accumulent chez la Tomate au site d'infection par des *Phytophthora* sp. ([2], [5], [21], [22]). Des sécrétions lipophénoliques toxiques sont

également décrites chez la Tomate dans les réactions de défense contre le *Cladosporium fulvum* [13]. C'est pourquoi, nous avons étudié l'incidence sur l'inhibition du *P. parasitica* de l'association des dérivés oxygénés avec des composés phénoliques et la tomatine ou son aglycone. Nous avons également recherché comme le Baut et coll. [12] si la nature du dérivé oxygéné ou le degré d'insaturation des acides polyéniques influent sur la toxicité. Actuellement, nous ne décelons pas de différences de mode d'action, en microscopie optique, entre les alcools diéniques et les monoépoxydes dérivant des acides gras polyéniques. Une nette synergie se manifeste aux pH acides entre ces substances, les composés phénoliques et/ou l'alcaloïde de la Tomate. L'association *in vitro* des inhibiteurs à faible concentration est rapidement létale en l'absence de chlamydospores dont les parois semblent moins perméables que celles des hyphes.

Ces résultats correspondent probablement à la complémentarité des cibles. Les acides benzoïques et cinnamiques ou leurs dérivés perturbent le cycle de la glycolyse (II), provoquent un découplage partiel entre l'oxydation et la phosphorylation oxydative [1], inhibent la synthèse et l'activité d'enzymes lytiques ([15], [16]). La tomatine ou son aglycone agit sur les mitochondries, les chloroplastes et les lysosomes entraînant entre autres des perturbations de l'activité phosphatase acide [17]. Enfin, les dérivés oxygénés d'acides gras agissant au niveau des phospholipides de la membrane, modifient leur degré d'insaturation et leur fluidité, donc leur perméabilité ([3], [14]). C'est pourquoi, nous envisageons d'approfondir l'étude de la biosynthèse et du mode d'action de ces facteurs de résistance.

M<sup>me</sup> Sylvaine Chuilon — Laboratoire des Médiateurs chimiques — et M. Robert Pelletier — O.R.S.T.O.M. — ont contribué à la réalisation technique de ces travaux.

Remise le 3<sup>e</sup> juin 1985, acceptée le 30 septembre 1985.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. BENZ et S. MCLAUGHLIN, *Biophys. J.*, 41, 1983, p. 381-398.
- [2] G. BOMPEIX, A. RAVISE, G. RAYNAL, F. FETTOUCHE et M. C. DURAND, *Ann. Phytopathol.*, 12, 1980, p. 337-351.
- [3] J. DE GIER, C. J. A. VAN ECHTELD, A. T. M. VAN DER STEEN, P. C. NOORDAM, A. J. VERKLEIJ et B. DE KRUIFF, in *Biochemistry and metabolism of plant lipids*, Elsevier, 1982, p. 315-325.
- [4] P. J. G. M. DE WIT et E. KODDE, *Physiol. Plant Pathol.*, 18, 1981, p. 58-66.
- [5] M. C. DURAND et G. SALLE, *Agronomie*, 1, 1981, p. 723-732.
- [6] D. M. ELGERSMA, A. C. M. WEIJMAN, H. J. ROEYMANS et G. W. VAN EIJK, *Phytopath. Z.*, 109, 1984, p. 237-240.
- [7] R. T. V. FOX, J. G. MANNERS et A. MYERS, *Potato Res.*, 14, 1971, p. 61-73.
- [8] T. KATO, Y. YAMAGUCHI, T. UYEHARA, T. YOKOYAMA, T. NAMAI et S. YAMANAKA, *Tetrahedron Letters*, 24, 1983, p. 4714-4718.
- [9] P. E. KOLLATUKUDY, in *Recent advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant lipids*, T. GALLIARD et E. I. MERCER éd., Academic Press, London, 1975, p. 203-246.
- [10] P. E. KOLLATUKUDY et R. CROTEAU, *Arch. Biochem. Biophys.*, 170, 1975, p. 61-72.
- [11] H. A. KREBS, D. WIGGINS, M. STUBBS, A. SOLS et F. BEDOYA, *Biochem. J.*, 214, 1983, p. 657-663.
- [12] G. LE BAUT, L. SPARFEL, C. CLAIRC, R. FLOCH, P. DUCREY, F. BENAZET, L. LACROIX et J.-L. LEROY, *Eur. J. Med. Chem.*, 18, 1983, p. 447-455.
- [13] G. LAZAROVITS et V. G. HIGGINS, *Can. J. Bot.*, 54, 1976, p. 235-249.
- [14] F. OESCH, *Xenobiotica*, 3, 1973, p. 305-340.
- [15] A. RAVISE et J. CHOPIN, *Phytopath. Z.*, 100, 1981, p. 257-269.
- [16] A. RAVISE et B. S. KIRKIACHARIAN, *Phytopath. Z.*, 86, 1976, p. 314-326.
- [17] J. G. RODDICK, *J. of Exp. Bot.*, 29, 1978, p. 1371-1381.
- [18] M. SHIMURA, M. IWATA, N. TASHIRO, Y. SEKIZAWA, Y. SUZUKI, S. MASE et T. WATANABE, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1981, p. 1431-1439.
- [19] C. A. SMITH et W. E. MCHARDY, *Phytopathology*, 72, 1982, p. 415-419.
- [20] E. C. TJAMOS et I. M. SMITH, *Physiol. Plant Pathol.*, 6, 1975, p. 215-225.
- [21] A. VERNENGI, *Thèse de 3<sup>e</sup> cycle*, Université Paris-VI, 28 février 1985, 171 p.
- [22] VO-THI-HAI, G. BOMPEIX et A. RAVISE, *Comptes rendus*, 288, série D, 1979, p. 71-74.

A. V. et A. R. : Laboratoire de Phytopathologie de l'O.R.S.T.O.M., 72, route d'Aulnay, 93140 Bondy;  
 J. E., C. M., G. K. et F. R. : I.N.R.A.-C.N.R.S., Laboratoire des Médiateurs chimiques, Brouessy,  
 Magny-les-hameaux, 78470 Saint-Rémy-lès-Chevreuse.