

PZ A
(1-17)

Phytopath. Z., 100, 257—269 (1981)
© 1981 Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
ISSN 0031-9481 / InterCode: PHYZA3



S.S.C. de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer;
Laboratoire de Chimie biologique Université Claude Bernard — Lyon I

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

V. Flavones, O- et C-glycosides

Par

A. RAVISÉ et J. CHOPIN

Avec 5 figures

Reçu le 12 novembre 1979

Nous avons précédemment étudié l'action inhibitrice de différents composés phénoliques sur la réalisation *in vitro* du cycle végétatif du *Phytophthora parasitica* et sur l'activité d'enzymes lytiques (KIRKIACHARIAN et RAVISÉ 1976, RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976 a et b). Nous abordons maintenant l'examen des propriétés biologiques des flavonoïdes largement répandus dans le règne végétal et particulièrement étudiés au plan de la chimiotaxonomie et de la pharmacologie.

Dans les interactions hôte-parasite, ce sont surtout des flavanones (GROSSMANN 1962, HUNTER 1974 et 1978, JOHNSON *et al.* 1976, MARTIN 1977, MACE *et al.* 1976) et des flavonols (RAVISÉ et TRIQUE 1972, RAVISÉ et TANGUY 1973, HOWELL *et al.* 1976) qui ont fait l'objet de recherches récentes. La contribution des glucosides flavoniques à la résistance au parasitisme n'a été abordée que pour le couple *Medicago sativa*—*Ascochyta imperfecta* (OLAH et SHERWOOD 1971 et 1973). Bien que les C-glycosyl flavones, caractérisées par une liaison stable C-C entre la partie glucidique et l'hétérocycle oxygéné et non hydrolysable par des enzymes, aient été identifiées dans de nombreuses familles végétales, leurs propriétés inhibitrices ne semblent pas avoir été étudiées avant notre note préliminaire (RAVISÉ et CHOPIN 1978).

U.S. Copyright Clearance Center Code Statement: 0031-9481/81/0003-0257\$02.50/0 **Plus documentaire**

23 JUN 1981

N° : 81/81/00442
Cote : B ex 1

Au stade actuel des investigations, plusieurs groupes de flavonoïdes accumulés dans les tissus après une infection cryptogamique peuvent être considérés comme des phytoalexines, notamment dans le cas de la Betterave et du Cotonnier (JOHNSON *et al.* 1976, MARTIN 1977, HUNTER 1974 et 1978). Au cours de nombreuses interactions entre hôte et parasite, chez des Légumineuses, des Solanacées, des Cucurbitacées, les teneurs en flavonoïdes préexistant à l'infection s'accroissent considérablement (OLAH et SHERWOOD 1971 et 1973, RAVISÉ et TRIQUE 1972, RAVISÉ et TANGUY 1973, CHOPRA *et al.* 1974). Nous présumons que chez plusieurs espèces végétales, des substances constitutives — des flavones ou leurs dérivés glycosylés — peuvent contribuer aux réactions de défense. C'est pourquoi, nous avons comparé *in vitro* les aptitudes inhibitrices de deux flavones, l'apigénine et la lutéoline, du glucoside-7 lutéoline et de C-glycosyl flavones correspondant aux deux aglycones. Nos investigations ont concerné leur action sur la croissance et le cycle végétatif du *Phytophthora parasitica* Dast. par comparaison avec ceux du *Verticillium albo atrum* Rke. et Berth. et du *Colletotrichum musae* (Berck. et Curt.) Arx., septomycètes différenciant entre eux par la production d'une β glucosidase chez le second. Nous avons également comparé leur pouvoir effecteur sur l'activité d'enzymes contribuant aux dégradations de parois cellulaires.

Matériel et techniques

1. Les inhibiteurs

Les structures des flavonoïdes utilisés sont représentées dans la Figure 1. L'apigénine et la lutéoline ont été préparées par synthèse (HAUTEVILLE *et al.* 1975), les autres flavones ont été isolées à partir de sources naturelles. Le lutéoline 7-glucoside provient de *Catananche caerulea* (PROLIAC 1973), la vitexine (C-glucosyl-8 apigénine) de *Vitex lucens* (PERKIN 1898), l'iso-orientine (C-glucosyl-6 lutéoline) d'*Aspalathus acuminatus* (KOEPPEN *et al.* 1962). L'isowertisine (C-glucosyl-8 0-méthyl-7 apigénine) et la molludistine (C-arabinosyl-8 0-méthyl-7 apigénine) sont extraites de *Mollugo distica* (CHOPIN *et al.* 1978), le schaftoside (C-glucosyl-6 C-arabinosyl-8 apigénine) de *Silene schafta* (CHOPIN *et al.* 1974).

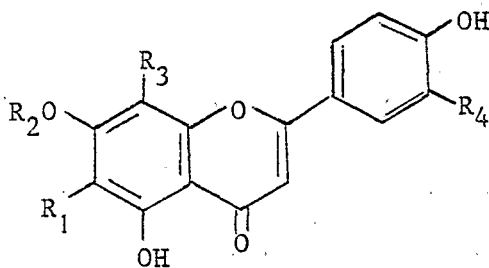


Fig. 1. Apigénine: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$. Lutéoline: $R_1 = R_2 = R_3 = H, R_4 = OH$. Lutéoline 7-glucoside: $R_1 = R_3 = H, R_2 = \beta$ -glucopyranosyl, $R_4 = OH$. Vitexine: $R_1 = R_2 = R_4 = H, R_3 = \beta$ -glucopyranosyl. Isoorientine: $R_1 = R_3 = H, R_4 = OH$. Iso-swertisine: $R_1 = R_4 = H, R_2 = CH_3, R_3 = \beta$ -D-glucopyranosyl. Molludistine: $R_1 = R_4 = H, R_2 = CH_3, R_3 = \alpha$ -L-arabinopyranosyl. Schaftoside: $R_1 = \beta$ -D-glucopyranosyl, $R_2 = R_4 = H, R_3 = \alpha$ -L-arabinopyranosyl

Rectificatif de la légende de la figure 1 :

Isoorientine: $R_1 = \beta$ -glucopyranosyl, $R_2 = R_3 = H, R_4 = OH$.

En fin d'incubation des produits avec des agents pathogènes ou avec des enzymes, nous avons vérifié leur stabilité ou leur dégradation par spectrométrie entre 225 et 375 nm dans l'ultra violet et par chromatographie sur papier ainsi que sur silicagel. Les éluants employés sont l'acide acétique à quinze et à trente pour cent, les mélanges butanol—acide acétique—eau (4 : 1 : 5) ou acétate d'éthyle—méthanol—eau (63 : 12 : 9). La révélation des substances sur les chromatogrammes est réalisée par pulvérisation de l'un des produits ci-après: para-nitraniline, vanilline sulfurique ou benzidine diazotée (CHOPIN 1966, CHOPIN et BOUILLANT 1975, RIBÉREAU-GAYON 1968).

2. Tests de toxicité pour les micromycètes

Le matériel et les méthodes mis en oeuvre pour ces expériences sont décrits dans les études précédentes (KIRKIACHARIAN et RAVISÉ 1976, RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976a et b). Nous avons aussi appliqué les tests à une souche de *Verticillium albo-atrum* isolée de Tomate et à une souche de *Colletotrichum musae* isolée de Bananier. Les déterminations de poids de mycélium sec sont effectuées après des incubations variant de 48 à 144 heures en milieu minéral synthétique liquide, dans des fioles cylindro coniques constamment agitées.

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

Aux techniques décrites précédemment (C. F. supra) nous avons seulement ajouté une mesure de l'activité β glucosidasiqne dans les milieux de culture du *C. musae* après des durées variables d'incubation en présence de flavones, du glucoside-7 lutéoline et de C-glycosyl flavones aux concentrations de $5 \cdot 10^{-6}$ et de $7,5 \cdot 10^{-6}$.

Résultats

1. Toxicité pour le *P. parasitica* et pour les deux septomycètes

Les flavonoïdes incorporés au milieu de culture, même à de faibles concentrations, s'avèrent également toxiques pour un siphomycète, le *Phytophthora parasitica*, et pour deux septomycètes, le *Verticillium albo atrum* et le *Colletotrichum musae* qui possède une β glucosidase constitutive.

Les principales perturbations décelées concernent d'une part la morphologie, le cytoplasme et la croissance des hyphes, d'autre part la formation d'organes de reproduction asexuée et de conservation. La plupart des symptômes semblent correspondre à des propriétés inhibitrices communes aux deux flavones et à leurs dérivés.

Dans les microcultures du *P. parasitica*, dès la concentration de $5 \cdot 10^{-6}$ la croissance des hyphes est ralentie. Le plus souvent leur apex s'enfle en forme de spatule, parfois ils forment des agrégats coralloïdes. La paroi des filaments s'épaissit et l'assise externe devient plus réfringente. Au cours des premières heures d'incubation, le cytoplasme prend un aspect granuleux puis se vacuolise. L'inhibition de la croissance s'établit lentement mais elle persiste tant que dure le contact avec l'inhibiteur. Suivant les produits, la réduction de croissance en microculture varie de $1/3$ à $1/2$ par rapport au témoin. A partir de concentrations en flavonoïdes de $7,5 \cdot 10^{-6}$, la formation de sporocystes et celle de chlamydospores sont inhibées tandis qu'apparaissent sur les hyphes des vésicules intercalaires ou terminales. A ce stade, interviennent un abondant cloisonnement à l'intérieur des filaments, la dégénérescence cytoplasmique et parfois l'éclatement de l'apex.

Des symptômes identiques sont observés dans les microcultures des deux septomycètes. Non seulement la formation des conidies est inhibée, mais aussi la germination de celles transférées avec les microthalles dans les solutions de flavonoïdes.

Les deux flavones diffèrent par leur degré d'hydroxylation; cette caractéristique n'influe pas sur leur toxicité pour les trois agents pathogènes. Leur faible solubilité en phase aqueuse ne nous a pas permis de préciser les concentrations létales des flavones. Par contre, nous avons établi qu'à la concentration de 10^{-5} le glucoside-7 lutéoline et les C-glycosyl flavones sont plus toxiques que les deux aglycones. Les symptômes les plus caractéristiques correspondent au blocage de la croissance, à des malformations des hyphes et à une lyse cytoplasmique accrue. Nous avons aussi établi que l'intensité de l'inhibition dépend de la durée de contact avec les flavonoïdes. Ceux-ci, à la concentration de $7,5 \cdot 10^{-6}$, lors d'incubations avec le *P. parasitica* de respectivement 96 et 120 heures, provoquent des inhibitions de croissance (en poids de mycélium sec par rapport au témoin) passant de 55 % à 75 % pour la lutéoline, de 70—75 % à 83—86 % pour le glucoside-7 lutéoline, l'iso-orientine et le schaftoside.

Tableau

Inhibition de la croissance (mesurée en poids de mycélium sec) par rapport aux témoins du *P. parasitica* et du *C. musae* après une incubation de 96 heures en milieu liquide, avec agitation permanente, à 30 °C par des flavonoïdes aux concentrations de $7,5 \cdot 10^{-6}$ et de 10^{-5} : A = lutéoline, B = apigénine, C = glucoside-7 lutéoline, D = iso-orientine, E = schaftoside

Parasites	Concentration	A	B	C	D	E
<i>P. parasitica</i>	$7,5 \cdot 10^{-6}$	55	40	75	70	70
	10^{-5}	75	70	84	86	86
<i>C. musae</i>	$7,5 \cdot 10^{-6}$	35	32	35	50	55
	10^{-5}	51	46	49	70	70

Dans les cultures de *Colletotrichum musae* la synthèse et l'activité de la β glucosidase sont peu inhibées par le glucoside-7 lutéoline aux concentrations comprises entre $5 \cdot 10^{-6}$ et 10^{-5} . Nous avons vérifié que pour des durées d'incubation supérieures à soixante heures, le glucoside est entièrement hydrolysé. Le taux d'inhibition causé par ce produit est alors comparable à celui provoqué par la lutéoline. Par contre, les C-glycosyl flavones, retrouvées intactes en fin d'incubation avec le *C. musae*, provoquent une inhibition plus importante que les deux aglycones correspondants. Le Tableau indique une partie des résultats obtenus lors d'incubations en milieu minéral synthétique, avec agitation permanente des cultures de *P. parasitica* et de *C. musae*.

Pour les trois parasites, après des incubations avec les flavonoïdes aux doses fongistatiques — entre 10^{-5} et $1,5 \cdot 10^{-5}$ —, seules les microcultures comportant des chlamydo-spores peuvent engendrer un thalle après leur transfert sur un milieu nutritif gélosé. Dans ce cas, nous avons observé qu'une partie

des chlamydospores demeure optiquement intacte tandis que chez d'autres interviennent des modifications de réfringence de la paroi et la dégénérescence lipidique du cytoplasme. Les doses létales pour le glucoside et les C-glycosyl flavones semblent de l'ordre de $2 \cdot 10^{-5}$, avec des fluctuations dépendant de l'état physiologique des cultures.

2. Influence des flavonoïdes sur les activités enzymatiques

a) sur les hydrolases pectiques

Nous avons observé des inhibitions d'activité de même nature pour des hydrolases pectiques — endo PMG et endo PG — de provenances différentes.

La Figure 2 indique les réductions d'activité obtenues avec la lutéoline, le glucoside-7 lutéoline et la vitexine pour une endo PMG dégradant une pectine méthylée à 75 %. Après vingt quatre heures d'incubation à 30 °C, avec agitation constante, l'inhibition s'avère faible même avec une concentration égale en effecteur et enzyme: dans ces conditions, elle est de l'ordre de 20 à 25 % pour sept des produits éprouvés et de 50 % avec le schaftoside.

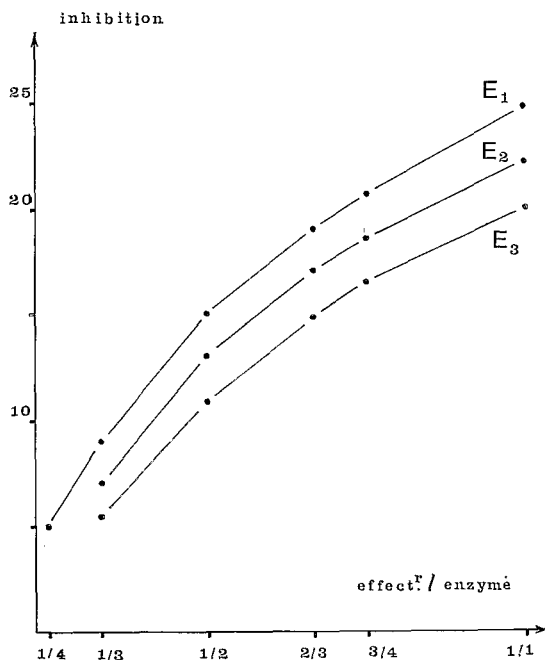


Fig. 2. Valeurs moyennes de l'inhibition d'activité endo PMG, par rapport au témoin, provoquée par 3 flavonoïdes: E₁ = Vitexine, E₂ = Glucoside-7 lutéoline, E₃ = Lutéoline. Incubation à pH 4,5 pendant 24 heures à 30 °C avec pour substrat une pectine méthylée à 75 %

Les résultats sont indépendants du degré de méthylation des pectines ainsi que de la concentration en substrat dans le milieu réactionnel. Il ressort de la comparaison des courbes de Lineweaver-Burk établies pour les activités endo PMG et endo PG que leur inhibition est de type non compétitif pour le substrat; la Figure 3 représente le cas du schaftoside.

La lutéoline et l'apigénine ont pratiquement la même incidence sur l'activité des hydrolases pectiques éprouvées. Il en est de même pour le C-glucosyl-6 lutéoline, l'iso (—) orientine. Différentes substitutions de la flavone — méthylation ou O-glucosylation en position-7, C-glucosylation en position-8 —

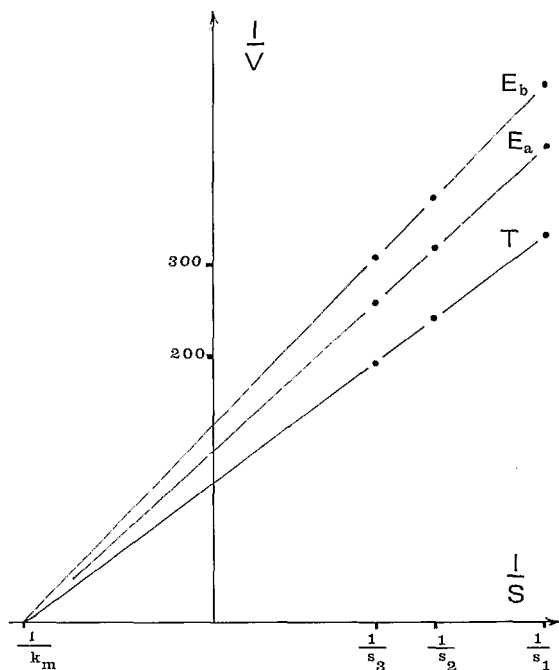


Fig. 3. Courbes de Lineweaver-Burk pour l'activité endo PMG en présence ou en l'absence du Schaftoside: Temoin = T, Rapports effecteur/enzyme: $E_a = 2/3$, $E_b = 1/1$. Le substrat est une pectine méthylée à 75 % aux concentrations de $S_1 = 3 \cdot 10^{-4}$, $S_2 = 4,5 \cdot 10^{-4}$, $S_3 = 6 \cdot 10^{-4}$. Incubation de 24 heures à 30 °C

ne modifient pas le rendement de l'inhibition. Par contre, le schaftoside, diglycosylé en positions-6,8 s'avère plus actif que les autres produits. Nous avons observé qu'outre la faible réduction d'activité, l'inhibition s'établit lentement, le plus souvent après une incubation supérieure à six heures.

b) sur les transéliminases pectiques

Les expériences réalisées avec des transéliminases pectiques d'origine commerciale ou extraites de cultures du *Phytophthora parasitica* fournissent des résultats convergents. Les flavonoïdes étudiés agissent de façon similaire sur l'activité d'endo pectate transéliminases (endo PATE) et d'endo pectine transéliminases (endo PTE). C'est pourquoi, nous considérons seulement les résultats concernant les endo PTE.

Contrairement à l'action sur les endo PMG, l'inhibition s'avère importante pour des rapports entre effecteurs et enzymes variant de 1/4 à 1/1 et pour concentrations en endo PTE comprises entre 10^{-5} et $4 \cdot 10^{-5}$. La concentration en substrat influe sur la viscosité du milieu réactionnel et sur le rendement de la dégradation enzymatique. Toutefois, dans nos essais, le rendement de l'inhibition apparaît optimal pour des rapports entre effecteur et substrat

compris entre $1/15$ et $1/40$; il demeure cependant élevé pour des rapports situés en deçà de $1/60$. L'inhibition est de type non compétitif pour le substrat.

Dans nos conditions expérimentales, il apparaît peu de différences d'activité entre les deux flavones et les substances qui en dérivent. Les huit produits étudiés inhibent fortement l'activité endo PTE dès le rapport entre effecteur et enzyme de $1/4$. La Figure 4 illustre la progression moyenne de l'inhibition

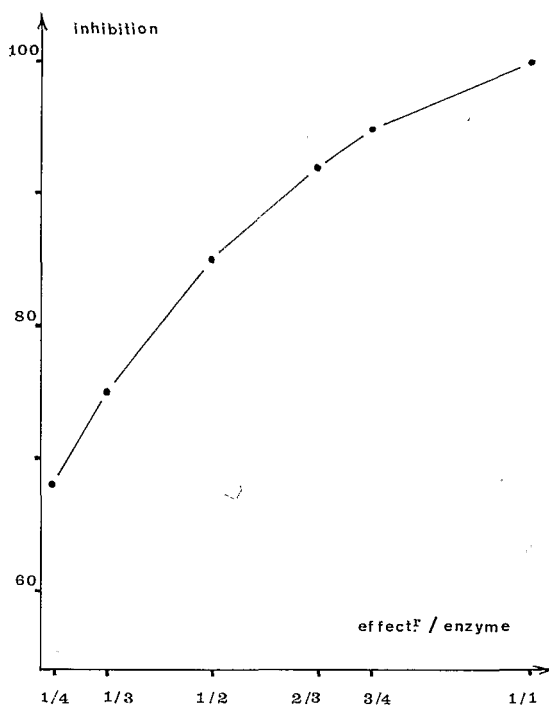


Fig. 4. Représentation graphique des valeurs moyennes de l'inhibition d'activité endo PTE (provenant de cultures du *P. parasitica*) par les flavones et leurs dérivés aux rapports entre effecteurs et enzyme compris entre $1/4$ et $1/1$. Le substrat est une pectine méthylée à 75 %. L'incubation, à pH 7,2, est de 24 heures à 30°C

de l'activité d'une endo PTE extraite de cultures du *P. parasitica*. Apparemment, le degré d'hydroxylation, la nature, la position et le mode de liaison des molécules glucidiques à la flavone ne semblent pas modifier le rendement de l'inhibition dans des proportions significatives. Par contre, nous avons établi que le rapport moléculaire entre effecteur et enzyme influe sur la vitesse d'établissement de l'inhibition. Ainsi, avec la lutéoline ou avec son glucoside, la réduction d'activité endo PTE par rapport au témoin est nulle après trois heures et demi et sept heures d'incubation au rapport effecteur/enzyme de $3/4$; elle est maximale après trois heures et demi d'incubation pour le rapport effecteur/enzyme de 1.

c) sur la β glucosidase

Dans nos essais, les propriétés inhibitrices des deux flavones se distinguent nettement de celles du glucoside-7 lutéoline et de celles des C-glycosyl flavones. Cependant, le mode d'action sur la β glucosidase est identique pour toutes les

substances éprouvées. L'inhibition est directement proportionnelle au rapport entre effecteur et enzyme, également indépendante de la durée de leur pré-contact avant l'apport de substrat.

La réduction d'activité β glucosidasique obtenue avec la lutéoline et l'apigénine atteint 40 % en 45 minutes pour un rapport effecteur/enzyme de 2/1. Par contre, elle varie de 20 % à 24 %, dans les mêmes conditions d'incubation, avec le glucoside-7 lutéoline et des C-glycosyl flavones. Les rapports entre effecteur et substrat étant de 2/100, l'apport de flavonoïdes peut être considéré comme négligeable sur la concentration en substrat. La Figure 5 schématise les différences d'activité par rapport au témoin en fonction de la nature de l'effecteur.

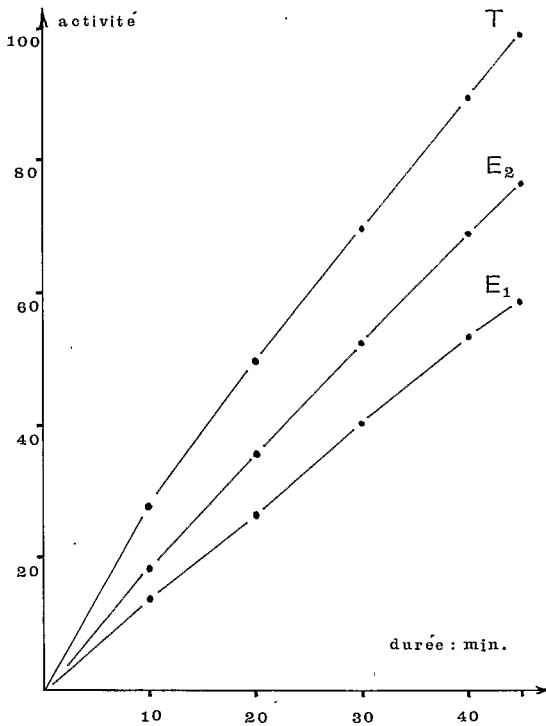


Fig. 5. Inhibition de l'activité (β glucosidasique par deux flavonoïdes au rapport effecteur/enzyme de 2/1. Les inhibiteurs sont: E₁ = Lutéoline, E₂ = iso-orientine. T = témoin d'activité enzymatique. Incubation de 45 minutes à 30 °C, sans précontact entre effecteur et enzyme

Au cours des cultures en milieu minéral synthétique liquide, le glucoside-7 lutéoline, aux concentrations de $5 \cdot 10^{-6}$ et de $7,5 \cdot 10^{-6}$, est entièrement hydrolysé par la β glucosidase du *Colletotrichum musae* après 60 heures d'incubation. Aux mêmes concentrations, les caractères spectrométriques et chromatographiques de C-glycosyl flavones ne sont pas modifiés après six jours d'incubation avec ce parasite.

Discussion

D'après nos résultats, les deux flavones et leurs dérivés peuvent inhiber *in vitro* la croissance d'agents pathogènes et l'activité d'enzymes intervenant dans les dégradations parasitaires.

Précédemment, GROSSMANN (1962) a démontré que la catéchine inhibe l'activité d'enzyme pectinolytiques et, dans une moindre mesure, la croissance du *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum*. La résistance variétale du Cotonnier au *Rhizoctonia solani* est associée selon HUNTER (1974 et 1978) à l'accumulation de flavonoïdes dans les tissus de plants infectés; ces substances sont plus efficaces sous forme oxydée tant sur la croissance du parasite que sur l'activité de ses endo PG. Dans le cas de certaines souches virulentes du *R. solani*, la catéchine oxydée pourrait induire ou stimuler la synthèse d'endo PG avec pour conséquence un accroissement de l'activité enzymatique apparente. Toutefois, HUNTER ne précise par les concentrations initiales en enzymes et en effecteurs dans ses expériences.

Avec les flavonoïdes que nous avons étudiés, l'inhibition des enzymes pectinolytiques, de type non compétitif pour le substrat, apparaît indépendante de l'origine des enzymes. A des rapports effecteur/enzyme de 1, la réduction d'activité après vingt quatre heures d'incubation atteint 25 % pour des hydrolases tandis qu'elle est totale pour les transéliminases pectiques. Le degré d'hydroxylation, la méthylation, la présence d'une ou de deux molécules de glucides ou leur mode de liaison n'influent pas sur les propriétés effectrices. Ces résultats laissent présumer que la configuration stérique des sommets substitués n'interfère pas directement avec les sites actifs des enzymes. L'examen des courbes d'inhibition nous incite à formuler l'hypothèse que, dans le cas des hydrolases pectiques les effecteurs agissent sur des parties de la molécule distinctes du ou des sites actifs (McCLENDON 1979). Pour les transéliminases pectiques, la rapidité du blocage d'activité pourrait résulter soit d'une altération de structure moléculaire soit du masquage du site actif aussi bien par les flavones que par les dérivés glycosylés d'un encombrement stérique bien plus important. Par contre, l'inhibition de la β glucosidase est nettement modifiée par l'adjonction de molécules de glucides aux flavones. Ces résultats sont comparables à ceux concernant l'inhibition d'une aldose réductase par des flavonoïdes et par les glucosides correspondants (VARMA *et al.* 1975).

Les huit substances étudiées inhibent *in vitro* non seulement la croissance mais aussi la reproduction asexuée et la formation de chlamydospores chez le *P. parasitica*, le *V. albo atrum* et le *C. musae*. Les manifestations de la toxicité semblent analogues pour le siphomycète et pour les deux septomycètes malgré des différences de structure et de composition des parois des hyphes, en particulier l'absence de stérols chez le *P. parasitica*. A faibles concentrations, les flavones et leurs dérivés provoquent *in vitro* des malformations des hyphes et des altérations cytoplasmiques comparables à celles causées par des isoflavonoïdes (KIRKIACHARIAN et RAVISÉ 1976, RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976 a, VAN ETEN et PUEPKE 1976, SMITH et BULL 1978).

Actuellement, peu d'études concernent la contribution des flavonoïdes aux mécanismes de résistance au parasitisme fongique. Chez le Cotonnier infecté par le *Verticillium dahliae* (MACE *et al.* 1978), la stimulation de la synthèse de flavonoïdes dans les tissus infectés intervient après celle des aldéhydes terpéniques; elle dure plus longtemps et contribuerait à la "résistance systémique" dans le xylème. La résistance à l'*Alternaria cucumerina* est aussi

associée à l'accumulation de flavones chez le Melon (CHOPRA *et al.* 1974). Des deux phytoalexines de la Betterave, la bétavulgarine — hydroxy-2' methoxy-5 méthylène dioxy-6,7 isoflavone — et la bétagarine — diméthoxy-2',5 méthylène dioxy-6,7 flavanone —, la seconde semble moins active *in vitro* sans que toutefois leur contribution respective à la résistance *in vivo* soit clairement établie (JOHNSON *et al.* 1976, MARTIN 1977). Les essais de toxicité de JOHNSON *et al.* sont réalisés sur milieu gélosé; dans ces conditions l'apigénine n'est pas active à la concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ alors qu'à 10^{-5} en milieu liquide nous observons une inhibition de la croissance de trois parasites. Comme l'indiquent SKIPP et BAILEY (1977), les conditions d'incubation influent sur les processus d'inhibition. C'est pourquoi, nos expériences sont toutes effectuées en milieu liquide, sous faible tension d'oxygène, et dans des conditions de contact optimal entre le micromycète et la substance toxique.

L'infection de la luzerne par l'*Ascochyta imperfecta* provoque l'accumulation de substances phénoliques, en particulier de glucosides flavoniques (OLAH et SHERWOOD 1971 et 1973). Pour ces auteurs, les β glucosidases de l'agent pathogène peuvent hydrolyser les glucosides *in situ*, la libération des aglycones contribuant aux processus de résistance. Nous avons cherché à établir *in vitro* les différences de toxicité entre les flavones, le glucoside-7 lutéoline et les C-glycosyl flavones pour des micromycètes suivant leur aptitude à excréter une β glucosidase. Pour le *P. parasitica* et le *V. albo atrum* dépourvus de cette enzyme, le glucoside et les C-glycosyl flavones s'avèrent plus toxiques que les flavones correspondantes. En présence de β glucosidase chez le *C. musae*, le glucoside est hydrolysé et sa toxicité comparable à celle de l'aglycone après une incubation de 60 heures. Nos observations diffèrent en cela de celles concernant les isoflavonoïdes du Soja (NAIM *et al.* 1974). Vraisemblablement, les glucides facilitent l'absorption des C-glycosyl flavones et du glucoside dont les concentrations accrues au niveau des parois et dans le cytoplasme provoquent l'intensification des symptômes de toxicité décelée en microscopie photonique.

Conclusion

L'inventaire des flavonoïdes dans le règne végétal progresse activement depuis des décennies et s'enrichit sans cesse de substances nouvelles. Il concerne une gamme étendue de familles botaniques, les connaissances étant suffisamment affinées pour permettre des distinctions taxonomiques au niveau du genre, voire même de l'espèce. Et pourtant, nous constatons combien sont rares les études concernant les modifications de synthèse des flavonoïdes en réaction au parasitisme. OLAH et SHERWOOD ont tout particulièrement mis en relief l'accroissement des synthèses de glucosides flavoniques pour une infection cryptogamique chez la Luzerne, parallèlement à l'accumulation des phytoalexines qui sont des ptéocarpanes. Chez le Cotonnier, HUNTER, MACE *et al.* insistent sur la modulation de l'élaboration des flavonoïdes en réaction aux agressions parasitaires, leur contribution à la résistance différente de celle des aldéhydes terpéniques à la fois dans le temps et suivant la nature des tissus.

Dans nos expériences, les flavones et leurs dérivés se comportent comme des inhibiteurs pouvant agir sur des agents pathogènes à différents niveaux des interactions hôte-parasite. Il apparaît que les C-glycosyl flavones, largement répandues dans le règne végétal, semblent posséder des propriétés inhibitrices plus importantes que les aglycones correspondants, au moins pour les trois parasites étudiés. De plus, la partie glucidique ne semble pas réduire, par rapport aux flavones, la capacité d'inhiber l'activité d'enzymes pectinolytiques. Les voies de synthèse des flavonoïdes sont maintenant bien définies (HAHLBROCK et GRISEBACH 1979) comme celles de la glycosylation (DOONER 1979). Pour certaines C-glycosyl flavones non seulement les gènes mais aussi les enzymes régulant leur synthèse sont identifiés (HEINSBROEK *et al.* 1979). Les multiples connaissances concernant la biosynthèse des flavonoïdes et sa régulation chez différentes entités botaniques devraient faciliter l'analyse de leur contribution aux mécanismes de défense contre les agents pathogènes. Ainsi, des investigations concernant chez les plants infectés soit la stimulation des réactions naturelles soit l'incorporation d'analogues structuraux de flavonoïdes, pourraient peut être contribuer à faire progresser les méthodes de lutte contre le parasitisme fongique.

Nous remercions Madame ELIANE CONSTANT (S.S.C. de l'O.R.S.T.O.M.) de sa collaboration aux études d'inhibition *in vitro* de la croissance des parasites et de celles des activités enzymatiques.

Résumé

Deux flavones, un O-glucoside et cinq C-glycosides en dérivant, inhibent *in vitro* la croissance et la reproduction asexuée du *Phytophthora parasitica* comme celles du *Verticillium albo atrum* et du *Colletotrichum musae* qui diffère des autres espèces par l'aptitude à synthétiser une β glucosidase. Les C-glycosyl flavones sont plus toxiques que les aglycones correspondants. Avec le O-glucoside, l'inhibition des deux micromycètes dépourvus de β glucosidase est équivalente à celle provoquée par les C-glycosyl flavones. Ces flavonoïdes inhibent différemment l'activité d'hydrolases et de transéliminases pectiques et celle d'une β glucosidase.

Zusammenfassung

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

V. Flavone, O- und C-Glycoside

Zwei Flavone, ein Flavon-O-Glucosid und fünf Flavon-C-Glycoside hemmen *in vitro* das Wachstum und die asexuelle Fortpflanzung bei *Phytophthora parasitica* ebenso wie bei *Verticillium albo atrum* und *Colletotrichum musae*, das sich von den beiden anderen Pilzen durch die Fähigkeit zur Synthese einer β -Glucosidase unterscheidet. C-Glycosylflavone sind giftiger als die

entsprechenden Aglycone. Die Hemmwirkung des O-Glucosids auf die beiden keine β -Glucosidase bildenden Pilze ist gleich wie diejenige der C-Glycosyl-Flavone. Diese Verbindungen hemmen pektinspaltende Enzyme und eine β -Glucosidase unterschiedlich.

Summary

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

V. Flavones, O- and C-glycosides

Two flavones, one O-glucoside and five flavone C-glycosides inhibit *in vitro* growth and asexual reproduction of *Phytophthora parasitica* as well as those of *Verticillium albo atrum* and *Colletotrichum musae*; the latter species differs by the capacity for synthesizing a β glucosidase. C-glycosyl-flavones are more toxic than the corresponding aglycones. The O-glucoside and C-glycosides similarly inhibit both micromycetes lacking β glucosidase but differently inhibit pectinolytic enzymes and a β glucosidase.

Bibliographie

- CHOPIN, J., 1966: Les C-glycoflavonoïdes. In: MENTZER (éd.), Actualités de Phytochimie fondamentale, 44—72. Masson, Paris.
- , M. L. BOUILLANT, H. WAGNER und K. CTALLE, 1974: Endgültige Struktur von Schaftosid aus *Silene schafta*. Phytochemistry 13, 2583—2586.
- , and —, 1975: C-glycosylflavonoids. In: HARBORNE, MABRY and MABRY (Eds.), The Flavonoids, 632—691. Chapman and Hall, London.
- , —, A. G. RAMACHAUDRAN, N. P. RAMESH, and T. J. MABRY, 1978: New C-glycosyl-flavones from *Mollugo distica*. Phytochemistry 17, 299—300.
- CHOPRA, B. L., J. S. JHOOTY, and K. L. BAJAJ, 1974: Biochemical differences between two varieties of watermelon resistant and susceptible to *Alternaria cucumerina*. Phytopath. Z. 79, 47—52.
- DOONER, H. K., 1979: Flavonol glucosyltransferase activity in bronze embryos of *Zea mays*. Phytochemistry 18, 749—751.
- ETTEN, H. D. VAN, and S. G. PUEPPKE, 1976: Isoflavonoid phytoalexins. In: FRIEND and THRELFALL (Eds.), Biochemical Aspects of Plant-Parasite Relationships, 239—289. Academic Press, London.
- GROSSMANN, F. V., 1962: Untersuchungen über die Hemmung pektolytischer Enzyme von *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. III. Wirkung einiger Hemmstoffe *in vivo*. Phytopath. Z. 45, 139—159.
- HAUTEVILLE, M., M. CHADENSON, et J. CHOPIN, 1975: Synthèse de nouvelles dihydroxy-2,5 flavanones apparentées aux flavones naturelles. Bull. Soc. France, 1803—1808.
- HEINSBROEK, R., J. VAN BREDERODE, G. VAN NIGTEVECHT, and J. KAMSTEG, 1979: Biosynthesis and genetic control of isovitexin 2''-O-arabinoside in petals of *Silene dioica*. Phytochemistry 18, 935—937.
- HOWELL, C. R., A. A. BELL, and R. D. STIPANOVIC, 1976: Effect of aging on flavonoid content and resistance of cotton leaves to *Verticillium wilt*. Physiol. Plant Path. 8, 181—188.
- HUNTER, R. E., 1974: Inactivation of pectic enzymes by polyphenols in cotton seedlings of different ages infected with *Rhizoctonia solani*. Physiol. Plant Path. 4, 151—159.

- , 1978: Effects of catechin in culture and in cotton seedlings on the growth and polygalacturonase activity of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 68, 1032—1036.
- JOHNSON, G., D. D. MAAG, D. K. JOHNSON, and R. D. THOMAS, 1976: The possible role of phytoalexins in the resistance of sugarbeet (*Beta vulgaris*) to *Cercospora beticola*. *Physiol. Plant Path.* 8, 225—230.
- KIRKIACHARIAN, B. S., et A. RAVISÉ, 1976: Synthèse et propriétés biologiques du (\pm)-O-méthylsativan. *Phytochemistry* 15, 907—909.
- KOEPFEN, B. H., B. SMITH, and D. G. ROUX, 1962: The flavone C-glycosides and flavonols O-glycosides of *Aspalathus acuminatus* (Rooibos Tea). *Biochem. J.* 83, 507—511.
- McCLENDON, J. H., 1979: The active site of yeast endo polygalacturonase contains seven subsites. *Phytochemistry* 18, 765—769.
- MACE, M. E., A. A. BELL, and R. D. STIPANOVIC, 1978: Histochemistry and identification of flavanols in *Verticillium* wilt resistant and -susceptible cottons. *Physiol. Plant Path.* 13, 143—149.
- MARTIN, S. S., 1977: Accumulation of the flavonoids betagarin and betavulgarin in *Beta vulgaris* infected by the fungus *Cercospora beticola*. *Physiol. Plant Path.* 11, 297—303.
- NAIM, M., B. GESTETNER, S. ZILKAH, Y. BIRK, and A. BONDI 1974: Soybean isoflavones. Characterization, determination and antifungal activity. *J. Agric. Food Chem.* 22, 806—809.
- OLAH, A. F., and R. T. SHERWOOD, 1971: Flavones, isoflavones and coumestans in alfalfa infected by *Ascochyta imperfecta*. *Phytopathology* 61, 65—69.
- , 1973: Glycosidase activity and flavonoid accumulation in alfalfa infected by *Ascochyta imperfecta*. *Phytopathology* 63, 739—742.
- PERKIN, A. G., 1898: Colouring matters of the New Zealand Dyewood Puriri, *Vitex littoralis*. *J. Chem. Soc.* 73, 1019—1031.
- PROLIAC, A., 1973: Contribution à l'étude chimique de *Catananche caerulea* L. (composées). Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Univ. Lyon I.
- RAVISÉ, A., et J. CHOPIN, 1978: Etude *in vitro* des propriétés inhibitrices de C-glycosyl flavones pour le *Verticillium albo-atrum* Rke. et Berth., le *Phytophthora parasitica* Dast. et des enzymes pectinolytiques. *C. R. Acad. Sci.*, Sér. D, 286, 1885—1888.
- , et B. S. KIRKIACHARIAN, 1976a: Influence de la structure de composés phénoliques sur l'inhibition du *Phytophthora parasitica* et d'enzymes participant aux processus parasitaires. I. Isoflavonoïdes et coumestanes. *Phytopath. Z.* 85, 74—85.
- , et —, 1976b: II. Coumarines. *Phytopath. Z.* 86, 314—326.
- , et —, 1978a: III. Homo-isoflavanones. *Phytopath. Z.* 92, 36—50.
- , et —, 1978b: IV. Néoflavonoïdes. *Phytopath. Z.* (sous presse).
- , 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* tropicaux. Propriétés de composés phénoliques élaborés par des plantules de *Gossypium* L. et de *Lycopersicum* Mill. *Coton et Fibres trop.* 27, 296—310.
- RIBÉREAU GAYON, P., 1968: Les composés phénoliques des végétaux, 254 p. Dunod éd., Paris.
- SKIPP, R. A., and J. A. BAILEY, 1977: The fungitoxicity of isoflavanoid phytoalexins measured using different types of bioassay. *Physiol. Plant Path.* 11, 101—112.
- SMITH, D. A., and C. A. BULL, 1978: Kievitone — a membranolytic phytoalexin? 3rd Intern. Congr. Plant Pathology, München, Abstr. Pap. P. 245.
- VARMA, S. D., I. MIKUNI, and J. H. KINOSHITA, 1975: Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase. *Science* 188, 1215—1216.

Adresses des auteurs: A. RAVISÉ, directeur de recherches à l'O.R.S.T.O.M., Services Scientifiques Centraux (S.S.C.), 72, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France). Professeur J. CHOPIN, Laboratoire de Chimie biologique, Université Claude Bernard — Lyon I, 43, Boulevard du 11 novembre 1918, 69621 Villeurbanne (France).