

S. S. C. de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer;
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris

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

III. Homo-isoflavanones

Par

A. RAVISÉ et B. S. KIRKIACHARIAN

Avec 6 figures

Reçu le 17 juin 1977

Le Professeur TAMM et ses collaborateurs ont décelé chez des Liliacées du genre *Eucomis* L. des composés phénoliques possédant une structure particulière. Celle-ci est caractérisée par la présence d'un atome de carbone situé hors des cycles benzéniques, elle est désignée sous le vocable général d'homo-isoflavone (BÖHLER et TAMM 1967, SIDWELL et TAMM 1970, FINCK et TAMM 1972, TAMM 1972).

Ces substances sont présentes principalement dans les cires recouvrant l'épiderme des écailles des bulbes ainsi que dans les tissus de trois espèces d'*Eucomis* — *E. bicolor* Bak., *E. autumnalis* Graeb., *E. punctata* l'Hérit. — La biosynthèse de ces composés phénoliques a été récemment étudiée chez *Eucomis bicolor* (DEWICK 1975). Des produits semblables sont extraits d'une autre Liliacée, *Scilla scilloïdes* Druce (KOUNO et al. 1973) et d'une Guttiférale, *Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz. (WAJID et al. 1976).

Ayant établi, au cours d'études précédentes, que des isoflavonoïdes et une benzyle-3 coumarine sont à divers degrés toxiques pour le *Phytophthora parasitica* et inhibent différenciellement l'activité d'enzymes lytiques (KIRKIACHARIAN et RAVISÉ 1976, RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976a et 1976b), nous avons étudié les propriétés biologiques d'homo-isoflavanones structurellement proches de ces substances. Les homo-isoflavanones, ou benzylidène-3 chromanone-4 (DEWICK 1975) sont constitutives dans les tissus des plantes où elles

ont été reconnues comme l'est la lutéone, une isoflavone possédant des propriétés fongistatiques, chez le lupin (HARBORNE et al. 1976).

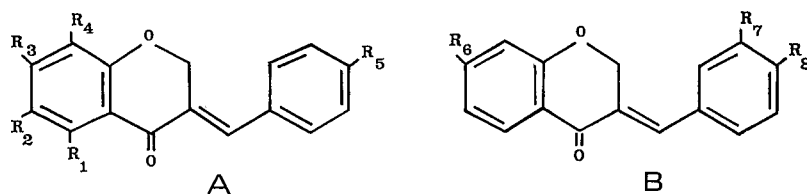


Fig. 1. Comparaison des structures des homo-isoflavones naturelles — A —, et de celles des homo-isoflavones de synthèse — B — utilisées pour les expériences in vitro

Tableau 1

Répartition des hydroxyles et des éthers méthyliques sur les sommets R₁ à R₈ des homo-isoflavones naturelles — A —, et de synthèse — B —, représentées sur la figure 1

A — Substances naturelles	
1	R ₁ = R ₃ = OH R ₂ = R ₄ = H R ₅ = OCH ₃ eucomine
2	R ₁ = R ₄ = H R ₂ = OCH ₃ R ₃ = R ₅ = OH automnaline
3	R ₁ = R ₃ = R ₅ = H R ₂ = OCH ₃ R ₄ = H 3,9-dihydro automnaline
4	R ₁ = R ₃ = OH R ₂ = H R ₄ = R ₅ = OCH ₃ 4'-O-méthyl punctatine
5	R ₁ = R ₄ = H R ₂ = R ₃ = R ₅ = OCH ₃ di-O-méthyl eucomol
6	R ₁ = R ₃ = R ₄ = R ₅ = OCH ₃ R ₂ = H 5,7,4'-tri-O-méthyl punctatine
B — Produits de synthèse	
I	R ₆ = R ₇ = R ₈ = H benzylidène-3 chromanone
II	R ₆ = R ₇ = H R ₈ = OCH ₃ (méthoxy-4' benzylidène)-3 chromanone
III	R ₆ = H R ₇ = R ₈ = OCH ₃ (diméthoxy-3'4' benzylidène)-3 chromanone
IV	R ₆ = OCH ₃ R ₇ = R ₈ = H benzylidène-3 méthoxy-7 chromanone
V	R ₆ = R ₈ = OCH ₃ R ₇ = H (méthoxy-4' benzylidène)-3 méthoxy-7 chromanone
VI	R ₆ = R ₇ = R ₈ = OCH ₃ (diméthoxy-3'4' benzylidène)-méthoxy-7 chromanone

Nous avons déjà mentionné la possibilité de synthèse des homo-isoflavonones (KIRKIACHARIAN et RAVISÉ 1976). Les six produits éprouvés sont des analogues structuraux de l'eucomine, de l'automnaline et des O-méthyl punctatines et en diffèrent — ainsi que des substances précédemment étudiées (FARKAS et al. 1970 et 1971) — par l'absence d'hydroxyles, le nombre et la position des éthers méthyliques fixés sur leurs molécules. La Figure 1 représente ces homo-isoflavanones naturelles et de synthèse; le Tableau 1 indique les arrangements concernant les différents sommets numérotés de R₁ à R₈.

Materiel et Techniques

1. Les inhibiteurs

Les homo-isoflavanones, ou benzylidène-3 chromanone-4, ont été en partie préparées en faisant appel à des techniques décrites dans la littérature (POWELL 1923, PERKIN et al. 1926, PFEIFFER et al. 1949, CHATTERJEA et al. 1974). Il fut également utilisé un nouvel agent de condensation — mélange d'acide acétique et pipéridine — qui fournit d'excellents rendements (KIRKIACHARIAN, travaux en cours).

La benzylidène-3 chromanone (I), la (méthoxy-4' benzylidène)-3 chromanone (II) et la (diméthoxy-3'4' benzylidène)-3 chromanone (III) ont été préparées en condensant respectivement la chromanone-4 avec les aldéhydes benzoïque, méthoxy-4 benzoïque et diméthoxy-3,4 benzoïque.

La benzylidène-3 méthoxy-7 chromanone (IV), la (méthoxy-4' benzylidène)-3 méthoxy-7 chromanone (V) et la (diméthoxy-3'4' benzylidène)-3 méthoxy-7 chromanone (VI) ont été obtenues en faisant successivement réagir la méthoxy-7 chromanone avec les aldéhydes benzoïque, méthoxy-4 benzoïque et diméthoxy-3,4 benzoïque.

2. Tests de toxicité en microculture

Les essais sont réalisés avec une souche de *Phytophthora parasitica* isolée de *Lycopersicum esculentum* Mill. au Liban. Les conditions expérimentales sont analogues à celles décrites dans les deux études antérieures sauf pour les points suivants.

Les microthalles ont deux origines. Ils sont prélevés soit sur le front de croissance de cultures jeunes, soit sur des thalles âgés d'au moins deux semaines ayant différencié des sporocystes et des chlamydospores. Dans les deux cas, le milieu nutritif d'où proviennent les implants est une décoction gélosée de pois, supplémentée en thiamine.

L'incubation des microcultures à 30 °C dure de six à douze jours, avec des observations microscopiques échelonnées dans le temps.

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

Quelques modifications sont apportées aux protocoles expérimentaux antérieurs. Nous rappelons succinctement les méthodes employées.

Les essais se déroulent à 30 °C sauf dans le cas des enzymes pectinolytiques où la température d'incubation est de 30° et de 40 °C.

a) α - et β -amylases

L' α -amylase (EC 3.2.1.1.) d'origine bactérienne, la β -amylase (EC 3.2.1.2.) extraite de l'orge, sont des produits Fluka.

Le substrat est une solution d'amidon à 2 pour 100. L' α -amylase est éprouvée dans du tampon de Clarks et Lubs — 10⁻¹ M — à pH = 6 en présence de CaCl₂ à 2 p 1000 (PERTEN

1966, RAVISÉ et TRIQUE 1972a). La β -amylase est employée dans un tampon acétate — 10^{-1} M — à pH = 4,9 (MERCIER et COLAS 1967, PECH et al. 1973).

L'activité des substances de synthèse est étudiée à des concentrations variant de 10^{-5} à 2×10^{-5} et pour des rapports entre effecteur et enzyme variant de 2/5 à 4/1.

b) β -glucosidase

La β -glucosidase (EC 3.2.1.21.) Fluka provient d'amandes douces. Son activité sur le p-nitrophényl β ,D glucopyranoside (Fluka) à 8×10^{-4} dans un tampon citrate — 5×10^{-2} M — à pH = 5,5 est mesurée par spectrophotométrie à 410 nm (RAVISÉ et TRIQUE 1972a). Les essais sont réalisés avec ou sans pré-incubation de l'enzyme et des substances phénoliques. Les rapports entre effecteur et enzyme varient de 1/1 à 4/1.

c) Polyphénol-oxydase

La polyphénol-oxydase (EC 1.10.3.1.) est extraite de deux variétés de *Lycopersicum esculentum*. Son activité sur un substrat de pyrocatechol (Fluka) à 5×10^{-3} dans un tampon Mac Ilvaine — 10^{-1} M — de pH = 6 est suivie par spectrophotométrie à 400 nm (FUCHS 1965, RAVISÉ et TRIQUE 1972b). La durée de pré-incubation de l'enzyme avec chaque homoisoflavanone a varié du une heure et demi à huit heures.

d) Transéliminases pectiques

Deux endo pectine transéliminases — endo PTE — et une endo pectate transéliminase — endo PATE — (EC 4.2.99.3.) proviennent d'une préparation commerciale, la pectinase Fluka, contenant une charge inerte dont 20 p 100 de cendres. Les enzymes sont partiellement purifiées par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium puis reprises à l'acétone. Les concentrations sont mesurées par la méthode de Lowry (LOWRY et al. 1951) et exprimées par référence à une sérum albumine. Les activités enzymatiques sont étudiées sur deux pectines, l'une estérifiée 75 p 100 — pectine ruban brun —, l'autre à 30 p 100 — pectine ruban rouge — (gracieusement fournies par Unipectine S.A.) et sur de l'acide polygalacturonique (Sigma).

Une endo PTE dégrade seulement la pectine méthylée à 75 p 100, en milieu acide de pH = 5 à 5,5 dans du tampon citrate — 10^{-1} M —. La seconde endo PTE attaque les deux catégories de pectines en milieu basique, le pH optimum étant de 8,4 — tampon tris/HCl 10^{-1} M —; l'endo PATE dégrade l'acide polygalacturonique à pH = 6 à 6,5.

Le substrat est incorporé à des concentrations comprises entre 3×10^{-4} et 6×10^{-4} dans le milieu réactionnel qui contient du CaCl_2 à 10^{-3} M.

Les rapports entre effecteur et enzyme varient de 1/6 à 2/1 pour des concentrations en enzymes comprises entre 10^{-5} et 9×10^{-5} . La durée d'incubation s'échelonne entre seize et soixante-cinq heures. Deux températures sont utilisées, 30° et 40°C, de façon à pouvoir comparer les Q_{10} des réactions se déroulant en présence ou en absence d'effecteurs.

La dégradation du substrat est suivie en spectrophotométrie entre 226 nm et 235 nm en déterminant l'apparition des doubles liaisons dues à la transélimination, ainsi que par dosage à l'acide thiobarbiturique les lectures étant réalisées entre 530 nm et 560 nm (RAVISÉ et TRIQUE 1972a).

La nature des produits de dégradation est établie en chromatographie sur couches minces de cellulose MN avec pour éluant un mélange de pyridine : acétate d'éthyle : acide acétique : eau (5/5/1/2; V/V) (KNÖSEL et GARBER 1968).

e) Hydrolases pectiques

Une endo polyméthylgalacturonase (endo PMG) et une endo polygalacturonase (endo PG) (EC 3.2.1.15.) sont également préparées à partir de la pectinase Fluka.

L'endo PMG peut dégrader les deux pectines estérifiées à 75 et à 30 p 100. L'activité de l'endo PG est étudiée sur l'acide polygalacturonique.

L'inhibition de ces enzymes par les substances phénoliques est mesurée pour des rapports entre effecteurs et enzymes variant de 1/8 à 2/1. Les durées et les températures d'incubation sont identiques à celles appliquées aux transéliminases pectiques. Les essais sont effectués en présence de tampon citrate — 10^{-1} M — le pH variant de 4,8 à 5,5 en présence de NaCl à 10^{-2} M. Les concentrations en substrat varient de $2,5 \times 10^{-4}$ à 9×10^{-4} .

L'activité enzymatique est mesurée en spectrophotométrie entre 490 et 530 nm par dosage à l'acide thiobarbiturique des groupes réducteurs libérés. Les produits de dégradation sont identifiés par chromatographie ascendante sur papier Whatman 3 MM, l'éluant étant un mélange de formiate de sodium à 70 % dans l'éthanol à 77 % et d'acide formique à 88 % (85 : 15, V/V), révélé au bleu de bromophénol (PAGE 1961).

Résultats

Afin de simplifier l'exposé des résultats obtenus au cours des essais d'inhibition, les six substances de synthèse sont désignées par une appellation abrégée suivie de leur numéro permettant de les identifier à l'aide de la Figure 1 et du Tableau 1.

1. Toxicité des homo-isoflavanones pour le *Phytophthora parasitica*

Les six homo-isoflavanones étudiées semblent posséder des propriétés inhibitrices fort proches pour la souche de *Phytophthora parasitica*. Celles-ci se manifestent différemment suivant l'origine et l'âge des microcultures :

- filaments prélevés exclusivement sur le front de croissance de jeunes cultures,
- fragments de thalles avec des sporocystes et des chlamydozoospores provenant de cultures âgées de deux semaines.

Les jeunes hyphes semblent légèrement plus sensibles aux faibles concentrations d'inhibiteurs, 5×10^{-6} et 10^{-5} : les perturbations morphologiques et cytologiques apparaissent plus rapidement, la différenciation des sporocystes et des chlamydozoospores est bloquée, la dose létale est abaissée à 10^{-5} sauf pour l'homo-isoflavanone trisubstituée (VI).

Dans tous les essais, les composés phénoliques provoquent la formation soit de vésicules soit d'hyphes anormalement et abondamment ramifiées, avec des agrégats coralloïdes, l'augmentation de la réfringence des parois des hyphes en cours de croissance ainsi que la prolifération de fausses cloisons dans les filaments. Le cytoplasme semble se condenser puis se vacuoliser; l'autolyse cytoplasmique débute le plus souvent dans les filaments les plus anciens. Le contenu cytoplasmique des sporocystes et des chlamydozoospores semble subir une dégénérescence lipidique pour des concentrations en inhibiteurs supérieures à 10^{-5} .

L'homo-isoflavanone triméthoxylée (VI) est la moins toxique: elle provoque une réduction de croissance d'environ 1/2 par rapport au témoin à la concentration de 5×10^{-6} , d'approximativement de 8/10 à celle de 10^{-5} . L'homo-isoflavanone non substituée (I), est légèrement plus active aux mêmes concentrations. Les quatre autres substances diminuent la croissance de 8/10 à 9/10 à la concentration de 5×10^{-6} et la bloquent à celle de 10^{-5} . La dose fongi-

statique indiquée ne semble pas provoquer de modifications irréversibles dans les microcultures. Lorsque celles-ci sont transférées sur un milieu nutritif gélosé, elles peuvent engendrer un nouveau thalle. La dose létale pour les implants possédant des chlamydospores se situe entre $1,5 \times 10^{-5}$ et 2×10^{-5} .

2. Influence des homo-isoflavanones sur les activités enzymatiques

a) sur l' α - et la β -amylases

La dégradation de l'amidon par ces deux enzymes, même incorporées aux plus faibles concentrations dans le milieu réactionnel, c'est à dire dans les conditions optimales pour l'inhibition, n'est pas modifiée par l'adjonction des substances phénoliques. Lors des essais réalisés avec des rapports effecteur/enzyme de 4/1, et après un contact préalable d'une heure, aucune réduction significative d'activité n'est décelée.

b) sur la β -glucosidase

L'inhibition de l'activité β -glucosidasique semble peu dépendre de la durée de pré-contact entre l'enzyme et l'effecteur. Par contre, elle est directement proportionnelle au rapport entre effecteur et enzyme et de type non compétitif pour le substrat.

Le nombre et la position des éthers méthyliques influent sur les propriétés des six substances éprouvées. Les moins actives sont l'homo-isoflavanone (I) et

celle portant deux radicaux méthoxy sur le reste phényl (III). Dans ce cas, l'inhibition est de l'ordre de 20 p 100, au rapport effecteur/enzyme de 4/1. Dans les mêmes conditions, le composé ayant un substituant en position-7 (IV) et celui diméthoxylé en 7,4' (V), comme le plus éthérifié (VI) provoquent une réduction d'activité d'environ 35 p 100. L'homo-isoflavanone la plus active semble

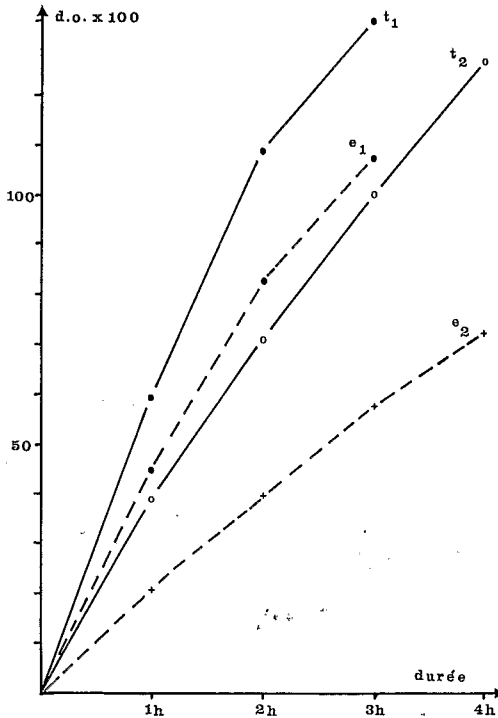


Fig. 2. Inhibition de l'activité β -glucosidasique en fonction de la concentration en (méthoxy-4' benzyldène)-3 chromanone (II). —•—•— = T₁: activité de l'enzyme à la concentration de 10^{-5} ; - - - - - = E₁: inhibition au rapport effecteur/enzyme = 2/1; ○—○—○ = T₂: activité de l'enzyme à 5×10^{-6} ; + - - - + = E₂: inhibition au rapport effecteur/enzyme de 4/1 pour une concentration d'enzyme de 5×10^{-6}

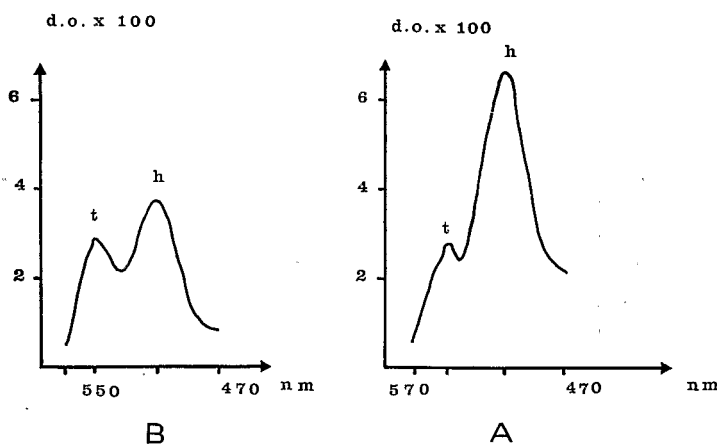


Fig. 3. Comparaison de l'incidence de l'incorporation de la benzylidène-3 chromanone (I) sur les activités d'une endo PMG — h —, et d'une endo PTE — t —, au rapport effecteur/enzyme de 1/2. Motif A: pectine ruban brun à $4,5 \times 10^{-4}$, motif B: pectine ruban brun $4,5 \times 10^{-4}$ et effecteur à 2×10^{-5} . Incubation de 5 heures à 40°C ; réactif: acide thiobarbiturique

l'analogue de l'eucomine (II) avec une inhibition de 45 p 100. La Figure No 2 illustre ces résultats.

c) sur la polyphénol-oxydase

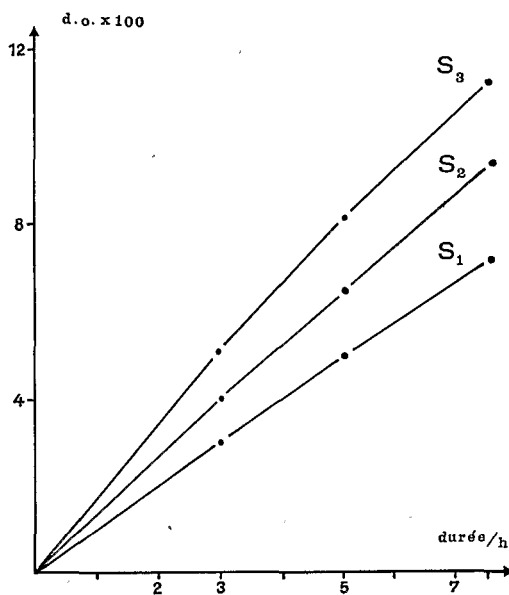
Même après un contact prolongé, les homo-isoflavanones ne réduisent pas l'activité des polyphénol-oxydases extraites de cultivars de tomate. Quatre cas de stimulation temporaire sont observés. Toutefois, la faible solubilité de ces produits ne permet pas d'une part de déterminer leur influence sur le déroulement de la réaction enzymatique à des concentrations élevées, d'autre part de vérifier qu'ils ne peuvent pas être utilisés comme substrat malgré qu'ils ne soient pas hydroxylés.

d) sur les transéliminases pectiques

D'après nos résultats expérimentaux, les homo-isoflavanones n'agissent pas de façon identique sur les transéliminases pectiques éprouvées. D'une part, une endo PTE et une endo PATE actives en milieu basique sont inhibées, d'autre part une endo PTE active en milieu faiblement acide est stimulée pour des rapports entre effecteur et enzyme inférieurs à 3/4. Les homo-isoflavanones méthoxylées en position-7 (IV) et en position-7,4' (V) inhibent l'activité de cette enzyme à partir du rapport effecteur/enzyme de 3/4. La réduction atteint 65 p 100 au rapport 2/1 avec l'homo-isoflavanone diméthoxylée (V).

Dans tous les essais concernant les enzymes actives en milieu basique, la concentration en substrat et par conséquent la viscosité influent sur l'inhibition: celle-ci diminue quand la viscosité augmente. La concentration en substrat influe à la fois sur le rendement de la réaction enzymatique et sur l'action de l'inhibiteur. Aux concentrations de substrat comprises entre $2,5 \times 10^{-4}$ et 4×10^{-4} , la réaction enzymatique se déroule dans des conditions où le substrat est limitant pour son rendement (Fig. 4). D'autre part, les inhibiteurs agissent

Fig. 4. Activité de l'endo PTE à pH 8,4 en fonction de la concentration en substrat (pectine ruban brun): $S_1 = 3 \times 10^{-4}$; $S_2 = 4,5 \times 10^{-4}$; $S_3 = 6 \times 10^{-4}$. Incubation à 40 °C. Mesures par spectrophotométrie en ultra-violet à 232 nm



d'autant mieux que le milieu est plus fluide. L'inhibition est optimale pour des rapports entre effecteur et substrat inférieurs ou égaux à 1/15, puis elle décroît faiblement pour des valeurs comprises entre 1/20 et 1/40. Au delà de ce rapport l'inhibition diminue rapidement. A l'intérieur des limites définies ci-dessus, le pourcentage d'inhibition provoqué par un rapport constant entre effecteur et enzyme varie peu en fonction des concentrations relatives en substrat et en composé phénolique. Ainsi, quoique l'activité de l'enzyme augmente avec la teneur en substrat, pour des rapports effecteur/enzyme de 1/3 et de 2/5 l'inhibition reste pratiquement constante comme l'indique le Tableau 2.

Par contre, la nature du substrat n'influe pas sur le rendement de l'inhibition. L'activité de l'endo PTE est peu différente sur pectine estérifiée à 75 p 100 et sur celle à 30 p 100; dans les deux cas le mode d'action des homoisoflavanones est identique.

Tableau 2

Inhibition par la benzylidène-3 méthoxy-7 chromanone (IV) et la (méthoxy-4' benzylidène)-3 méthoxy-7 chromanone (V) de l'activité endo PTE à pH 8,4 — aux rapports effecteur et enzyme de 1/3 et 2/5 — pour des concentrations en substrat de 3×10^{-4} , $4,5 \times 10^{-4}$ et 6×10^{-4} (rapports effecteur/substrat de 1/15 à 1/40). Incubation de 24 heures à 30 °C. Résultats exprimés en pourcentage de réduction d'activité par rapport au témoin

Rapports effecteur/substrat	Substance IV effecteur/enzyme		Substance V effecteur/enzyme	
	1/3	2/5	1/3	2/5
1/15	—	50	—	65
1/20	22	—	35	—
1/22,5	—	50	—	43
1/30	33	—	24	—
1/30	—	46	—	48
1/40	29	—	26	—

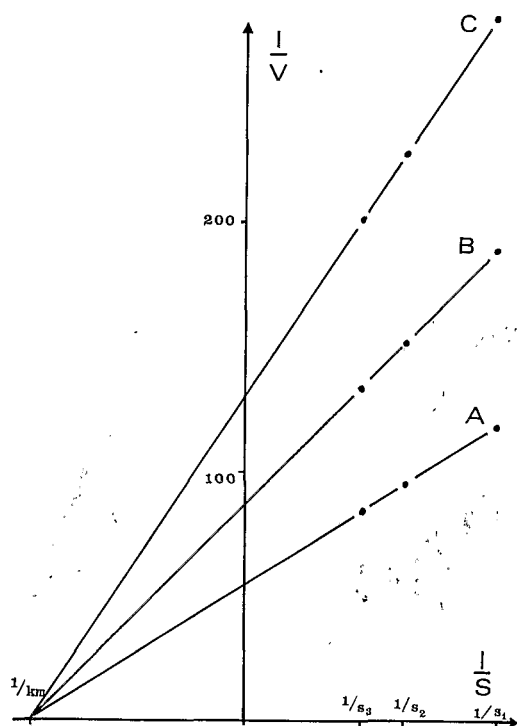


Fig. 5. Courbes de LINEWEAVER-BURK pour l'activité de l'endo pectine trans-éliminase en l'absence ou en présence de la (méthoxy-4' benzylidène)-3 méthoxy-7 chromanone (V). Témoin (A), inhibition aux rapports effecteur/enzyme de 1/3 (B) et de 1/2 (C). Le substrat est de la pectine méthylée à 75 p 100 (ruban brun) aux concentrations de $S_1 = 3 \times 10^{-4}$, $S_2 = 4,5 \times 10^{-4}$, $S_3 = 6 \times 10^{-4}$

L'inhibition des activités endo PTE et endo PATE est non compétitive pour le substrat comme l'indiquent les courbes de Lineweaver-Burk (Fig. 5) établies pour l'homo-isoflavane diméthoxylée en position-7,4' (V). Nous avons vérifié cette situation en faisant varier la température d'incubation de 30 °C à 40 °C : le Q_{10} de la réaction

enzymatique évolue de façon analogue dans les séries avec effecteurs et dans les essais de référence.

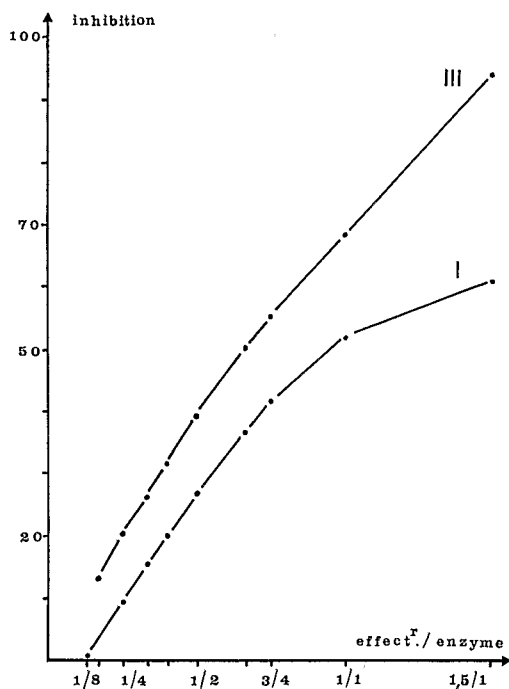
Le rendement de l'inhibition diffère suivant la configuration des substances éprouvées sans pour autant provoquer des modifications du mode d'action sur les transéliminases pectiques au cours de nos essais. L'homo-isoflavane (I), ses dérivés monométhoxylé en position-4' (II) et triméthoxylé (VI) influent faiblement sur l'activité enzymatique. Avec ces produits, l'inhibition moyenne, pour le rapport effecteur/enzyme de 1/1, est respectivement de 55 p 100, 60 p 100 et 50 p 100. Il se pourrait que la faible solubilité de l'homo-isoflavane trisubstituée contribue à sa faible performance. La substance diméthoxylée sur le reste phényl (III) provoque dans les mêmes conditions une inhibition de 75 p 100. Les homo-isoflavanes monométhoxylée en position-7 et diméthoxylées en position-7,4' (IV et V) sont les plus actives; elles déterminent une inhibition totale la première au rapport effecteur/enzyme de 1/1, la seconde de 3/4.

Nous avons observé par spectroscopie en ultra-violet, d'après la vitesse d'apparition des doubles liaisons absorbant entre 230 nm et 235 nm que l'inhibition s'établit plus vite avec les substances les plus actives.

e) sur les hydrolases pectiques

La série d'homo-isoflavanes modifie de façon similaire l'activité des endo PMG et endo PG éprouvées.

Fig. 6. Inhibition de l'activité endo polyméthylgalacturonase, en fonction du rapport entre effecteur et enzyme, par la benzylidène-3 chromanone (I) et la (diméthoxy-3',4' benzylidène)-3 chromanone (III). Les résultats correspondent aux valeurs moyennes de réduction d'activité par rapport au témoin après 24 heures d'incubation à 30°C



D'une façon générale, l'inhibition des hydrolases pectiques est moindre que celle des transéliminases; en outre, elle paraît moins stable dans le temps. Cependant, les modalités de l'inhibition sont analogues. En particulier, celle-ci est indépendante de la nature du substrat dégradé par l'endo PMG. De même, l'inhibition pour un rapport effecteur/enzyme déterminé varie peu lorsque les proportions d'effecteur et de substrat sont maintenues dans les proportions mentionnées ci-dessus.

La nature de l'inhibition est indépendante du degré de substitution des six homo-isoflavanones. Dans tous les cas étudiés, il semble ne pas exister de compétition entre l'effecteur et l'enzyme pour le substrat. L'évolution de l'inhibition dans le temps laisse présumer qu'elle n'est pas cumulative.

La position et le nombre des radicaux méthoxy-influent sur les propriétés des produits étudiés qui, dans nos essais, semblent se répartir en deux groupes. La Figure 6 illustre cette différence de comportement.

Les substances les moins actives sont l'homo-isoflavanone (I), son éther en position-4' (II) et le dérivé triméthoxylé (VI); elles provoquent une inhibition des activités endo PG et endo PMG de l'ordre de 50 p 100 pour un rapport effecteur/enzyme de 1/1. Dans l'autre groupe, se trouvent par ordre d'activité croissante l'éther méthylique en position-7 (IV) et les deux produits diméthoxylés (III) et (V) qui bloquent les activités des hydrolase pectiques à des rapports effecteur/enzyme compris entre 1,5 et 2.

Discussion

Cette première étude d'analogues structuraux de composés phénoliques constitutifs de liliacées nous fournit plusieurs indications sur leurs propriétés biologiques: ils sont toxiques pour un siphomycète parasite, inhibent trois groupes d'enzymes lytiques tandis que d'autres activités ne sont pas affectées.

Comme les produits étudiés précédemment, ces substances semblent altérer à plusieurs niveaux le métabolisme du *Phytophthora parasitica*. Les perturbations sont décelables tant dans la morphologie des hyphes qui présentent dans ces conditions des analogies avec ceux du *Phytophthora cinnamomi*, que dans la structure du cytoplasme et les phénomènes de croissance. La toxicité semble plus importante pour les hyphes jeunes, peut-être à cause de la plus grande perméabilité de leur paroi. Dans le cas des microcultures comportant des chlamydospores, malgré la dégénérescence lipidique observée dans leur cytoplasme il se pourrait qu'une partie d'entre elles soient capables de régénérer un thalle lors de la levée de l'inhibition par des concentrations inférieures à la dose létale.

Entre les six homo-isoflavanones, nous n'avons pas décelé d'importants écarts de toxicité. La substance la plus méthoxylée (VI) inhibe le moins l'agent pathogène: cette situation est analogue à celle décrite pour les isoflavonoïdes et les coumarines les plus substitués (RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976 a, 1976 b). Enfin, les propriétés inhibitrices des homo-isoflavanones pour le *Phytophthora parasitica* s'avèrent presque équivalentes à celles du capsidiol, phytoalexine sesquiterpénique du poivron, et du (\pm) O-méthyl sativan (KIRKIACHARIAN et RAVISÉ 1976), produits les plus actifs in vitro au cours de nos essais précédents.

D'après les résultats obtenus, les homo-isoflavanones présentes dans les tissus des bulbes des liliacées pourraient se comporter comme les inhibitrices reconnues dans plusieurs familles botaniques, en particulier la lutéone, isoflavone du *Lupinus albus* (HARBORNE et al. 1976).

Les résultats concernant l'activité polyphénol-oxydasique concordent avec ceux obtenus précédemment. Comme les phytoalexines de la tomate ou du cotonnier et comme les autres composés phénoliques de synthèse, les homo-isoflavanones n'inhibent pas les polyphénol-oxydases extraites de *Lycopersicon esculentum*.

De même les six substances éprouvées n'influent pas sur l'activité d' α et de β -amylases. Cette propriété les distingue d'une phytoalexine de la tomate (RAVISÉ et TRIQUE 1972 a).

Une autre hydrolase, la β -glucosidase s'avère différemment sensible, à concentrations égales, à l'homo-isoflavanone et surtout à ses éthers méthyliques. Dans nos essais, le composé le plus actif semble celui dont la structure (II) est voisine de celle de l'eucomine. Les différences entre les pourcentages d'inhibition en relation avec les substituants sont plus importantes que celles observées précédemment dans le cas de coumarines et d'isoflavonoïdes (RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976 a, 1976 b).

Les résultats les plus importants concernent les enzymes pectinolytiques que nous considérons comme prédominantes au cours des processus de dégradation des structures pariétales (RAVISÉ et TRIQUE 1972 b, 1972 c).

Nous avons observé un cas de stimulation d'activité transéliminasique pour une enzyme active en milieu faiblement acide. Cette stimulation intervient pour des rapports entre effecteur et enzyme inférieur ou égaux à 3/4, suivant les substances, puis l'accroissement des concentrations en effecteur

jusqu'au rapport 2/1 provoque une inhibition modérée. Parmi les hypothèses probables, nous tendons à envisager celle d'une relation stérique (HANSON 1976) entre l'enzyme et ce groupe d'effecteurs. Elle pourrait correspondre soit à la liaison benzylidène-soit à l'effet de position benzylidène-3 chromanone-4. En effet, aucune des isoflavones et isoflavanone, ni la benzyle-3 coumarine éprouvées précédemment ne possèdent cette propriété. L'incidence de la configuration des composés phénoliques sur leur activité biologique, principalement l'inhibition de la croissance de champignons parasites, a fait l'objet d'études aboutissant à plusieurs hypothèses (VAN ETTEN 1976).

Entre l'inhibition des autres transéliminases pectiques et celle des hydrolases pectiques existent seulement des différences d'intensité; plusieurs caractères communs se dégagent de ces interactions. La réduction d'activité pour un rapport déterminé entre effecteur et enzyme reste pratiquement constante quand s'accroît la concentration en substrat malgré que celle-ci influe positivement sur le rendement de la réaction. D'autre part, tant pour une endo PTE que pour une endo PMG, l'inhibition n'est pas modifiée par la nature du substrat (pectines de degré croissant de méthylation).

Le nombre et la position des éthers méthyliques fixés sur les homo-isoflavanones semblent agir différemment sur leur aptitude à inhiber les enzymes pectinolytiques. Ainsi, une importante différence existe entre les deux dérivés monométhoxylés en position-4' (II) et en position-7 (IV): le premier influe faiblement sur les activités des deux catégories d'enzymes, le second s'avère un bon inhibiteur des endo PTE et dans une moindre mesure des endo PMG et endo PG. Nous avons par ailleurs établi que la substance (II) se comporte comme le meilleur inhibiteur de l'activité β -glucosidasique dans cette série. Les deux composés diméthoxylés, en position-3',4' (III) et en position-7,4' (V), agissent différemment. Le premier (III) est l'un des plus actifs sur l'endo PG et l'endo PMG alors que dans les mêmes conditions il est un médiocre inhibiteur des transéliminases pectiques. Le second (V) semble, dans cette série, le meilleur inhibiteur des deux groupes d'enzymes pectinolytiques. Enfin, l'homo-isoflavanone triméthoxylée (VI) s'avère peu active de même qu'elle est la moins toxique pour l'agent pathogène. Nous avons observé des situations semblables pour des isoflavonoïdes, des coumestanes et des coumarines, en particulier les substances les plus méthoxylées étant les moins actives (RAVISÉ et KIRKIACHARIAN 1976 a, 1976 b).

Conclusion

Les homo-isoflavanones de synthèse manifestent *in vitro* des propriétés biologiques analogues à celles d'autres produits phénoliques étudiés dans les mêmes conditions.

Leur toxicité pour le *Phytophthora parasitica* semble davantage dépendre de la structure initiale, la benzylidène-3 chromanone, que du degré de substitution de ses dérivés. D'après les observations en microscopie optique, les troubles provoqués chez l'agent pathogène ressemblent à ceux causés par le

capsidiol, un sesquiterpène, par des coumarines et des isoflavonoïdes. Les analogies observées tant pour les concentrations toxiques que pour les symptômes qui en résultent, tendent à conforter l'hypothèse que chez les plantes parasitées peuvent intervenir des modifications dans le métabolisme des substances terpéniques et phénoliques dont les produits contribueraient, par des processus en apparence assez proches, à l'inhibition de la croissance ou à l'élimination de micromycètes parasites.

Les homo-isoflavanones se comportent comme des inhibiteurs modérés des enzymes pectinolytiques, moins actifs que la benzyle-3 coumarine et la diméthoxy-7,4' isoflavanone dont les structures sont les plus proches. Cependant les homo-isoflavanones agissent différenciellement, en fonction de leurs substituants, sur les activités de ces deux groupes d'enzymes considérés comme primordiaux dans les dégradations parasitaires.

L'expérimentation in vivo, notamment avec des représentants du genre *Scilla* spontanés dans la flore du Moyen-Orient, permettrait d'établir une corrélation entre les propriétés biologiques des substances de synthèse et celles des homo-isoflavanones naturelles. Celles-ci pourraient agir dans les tissus des *Eucomis* sp. et des *Scilla* sp. comme des inhibitrices de la même façon que la lutéone, une isoflavone, chez le *Lupinus albus*.

Résumé

Des homo-isoflavanones synthétisées au laboratoire et possédant différentes structures inhibent in vitro la croissance et la sporogénèse de *Phytophthora parasitica*. Ces substances sont sans effet sur des polyphénol-oxydases et sur des α - ou β -amylases. Elles inhibent différemment une β -glucosidase et des enzymes pectinolytiques (endo PTE/PATE, endo PMG/PG). La nature des substituants et le degré de méthylation des homo-isoflavanones influent sur leur toxicité pour l'agent pathogène et principalement sur le taux d'inhibition d'enzymes pectinolytiques.

Zusammenfassung

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

III. Homo-Isoflavanone

Homo-Isoflavanone verschiedener Struktur hemmen in vitro das Wachstum und die Sporenbildung von *Phytophthora parasitica*. Diese Verbindungen hemmen die Aktivität einer Polyphenoloxydase und der α - und β -Amylasen nicht; sie hemmen in unterschiedlichem Ausmaß eine β -Glucosidase und die pektinspaltenden Enzyme (endo-PTE/PATE, endo-PMG/PG). Substituenten und Methylierungsgrad beeinflussen die Wachstumshemmung des Parasiten und vor allem die Hemmung pektinspaltender Enzyme.

Summary

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

III. Homo-isoflavanones

Homo-isoflavanones, synthesized with different structures, inhibit in vitro growth and sporogenesis of *Phytophthora parasitica*. These phenolics do not affect the activity of a polyphenol-oxidase and of α - and β -amylases. They inhibit differently a β -glycosidase and pectinolytic enzymes (endo PTE/PATE, endo PMG/PG). The nature of the substituted molecules and their degree of methoxylation affect their toxicity for the pathogen and mainly the inhibition of pectinolytic enzymes.

Bibliographie

- BÖHLER, P., and C. TAMM, 1967: The homo-isoflavones, a new class of natural products. Isolation and structure of eucomin and eucomol. *Tetrahedron Letters* 36, 3479—3483.
- CHATTERJEA, J. N., S. C. SHAW, et J. N. SINGH, 1974: *J. Ind. Chem. Soc.* 51, 281—287.
- DEWICK, P. M., 1975: Biosynthesis of the 3-benzylchroman-4-one Eucomin in *Eucomis bicolor*. *Phytochemistry* 14, 983—988.
- FARKAS, L., A. GOTTSCHEN, and M. NÓGRÁDI, 1970: The synthesis of eucomin and (\pm)-eucomol. *Tetrahedron* 26, 2787—2790.
- — —, — — —, and J. STRELISKY, 1971: Synthesis of homo-isoflavanones. II. Constituents of *Eucomis autumnalis* and *E. punctata*. *Tetrahedron* 27, 5049—5054.
- FINCK, R. E., and C. TAMM, 1970: The homo-isoflavones. III. Isolation and structure of punctatin, 3,9-dihydro-punctatin, 4'-O-methyl-3,9-dihydro-punctatin, 4'-demethyl-eucomin and 4'-demethyl-5-O-methyl 3,9-dihydro-eucomin. *Experientia* 26, 472—481.
- FUCHS, A., 1965: Polyphenol-oxidases and phenolics in relation to resistance against cucumber scab in *Cucumis sativus*. I. Fungal and host polyphenoloxydases. *Netherl. J. Plant Path.* 71, 157—166.
- HANSON, K. R., 1976: Concepts and perspectives in enzymes stereochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 45, 307—330.
- HARBORNE, J. B., J. L. INGHAM, L. KING, and M. PAYNE, 1976: The isopentenyl isoflavone luteone as a pre-infectious antifungal agent in the genus *Lupinus*. *Phytochemistry* 15, 1485—1487.
- KIRKIACHARIAN, B. S., et A. RAVISÉ, 1976: Synthèse et propriétés biologiques du (\pm)-O-méthyl sativan. *Phytochemistry* 15, 907—909.
- KNÖSEL, D., and E. D. GARBER, 1968: Separation of pectolytic and cellulolytic enzymes in culture filtrates of phytopathogenic bacterial species by starch gel zone electrophoresis. *Phytopath. Z.* 61, 292—298.
- KOUNO, I., T. KOMORI und T. KAWASAKI, 1973: Zur Struktur der neuen Typen homo-isoflavanone aus Bulben von *Scilla scilloides* Druce. *Tetrahedron Letters* 46, 4569—4572.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, 1951: *J. Biol. Chem.* 193, 265—269.
- MERCIER, C., et A. COLAS, 1967: Les amylases en panification. *Ann. Nutr. Aliment.* 21, 299—340.
- PAGE, O. T., 1961: *Phytochemistry* 51, 337—338.
- PECH, J. C., G. BONNEAU, et J. FALLOT, 1973: Purification partielle et propriétés des amylases de la poire. *Phytochemistry* 12, 299—306.
- PERKIN, W. H., J. N. RAY, and R. ROBINSON, 1926: *J. Chem. Soc.* 129, 945.
- PERTEN, M., 1966: A coloric method for the determination of the alpha-amylase activity. *Cereal Chem.* 43, 336—342.

- PFEIFFER, P., K. GRIMM, and H. SCHMIDT, 1949: *Phytochemistry* 18, 208.
- POWELL, S. G., 1923: *J. Amer. Chem. Soc.* 45, 2.
- RAVISÉ, A., et B. S. KIRKIACHARIAN, 1976a: Influence de la structure des composés phénoliques sur l'inhibition du *Phytophthora parasitica* et d'enzymes participant aux processus parasitaires. I. Isoflavonoïdes et coumarines. *Phytopath. Z.* 85, 74—85.
- , et —, 1976b: II. Coumarines. *Phytopath. Z.* 86, 314—326.
- , et B. TRIQUE, 1972a: Réactions phénoliques et production de phytoalexines chez des plantules de *Lycopersicum* Mill. infectées par des souches de *Phytophthora* de Bary. *C. R. Acad. Sci., Sér. D*, 274, 1505—1508.
- , et —, 1972b: Réactions de plantules de *Gossypium* L. au parasitisme de *Phytophthora* de By. tropicaux. Propriétés de composés phénoliques élaborés par des plantules de *Gossypium* L. et de *Lycopersicum* Mill. *Coton et Fibres trop.* 27, 295—310.
- , et —, 1972c: Détermination des enzymes pectinolytiques de deux souches de *Phytophthora* de Bary. Variations d'activité dans les tissus des plantules de tomate en relation avec les génomes de résistance. *Agron. Trop.* 27, 751—762.
- SIDWELL, W. T. L., and C. TAMM, 1970: The homo-isoflavones. II. Isolation and structure of 4'-O-methyl-punctatin, automnalin and 3,9-dihydro-automnalin. *Tetrahedron Letters* 7, 475—478.
- TAMM, C., 1972: Die Homo-isoflavone, eine neue Klasse von Naturstoffen. *Arzneimittel-Forsch.* 22, 1776—1784.
- VAN ETEN, H. D., 1976: Antifungal activity of pterocarpan and other selected isoflavonoids. *Phytochemistry* 15, 655—659.
- WAJID, H. A., et al., 1976: Biflavonoids and a Flavanone-chromone from the leaves of *Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 13, 1458—1463.

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). B. S. KIRKIACHARIAN, Professeur agrégé de pharmacie chimique; laboratoire de pharmacie chimique, Faculté des Sciences, Pharmaceutiques et Biologiques, 2, rue J. B. Clément, 92290 Chatenay-Malabry (France).

Sonderdruck aus „Phytopathologische Zeitschrift“

[Phytopath. Z. 92, 36—50, 1978]

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

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

S. S. C. de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer;
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris

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

III. Homo-isoflavanones

Par

A. RAVISÉ et B. S. KIRKIACHARIAN

88
M
18 OCT. 1978
O. R. S. T. O. M.
Collection de Référence
n° 9331 P.2. A.