

SYNTHESE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES DU (\pm)-O-METHYLSATIVAN

B. S. KIRKACHARIAN et A. RAVISÉ

Laboratoire de Pharmacie Chimique, Faculté Française de Médecine et de Pharmacie, Boîte Postale 5076 Beyrouth; Mission de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer, Boîte Postale 9344 Beyrouth, Liban

(Received 16 June 1975)

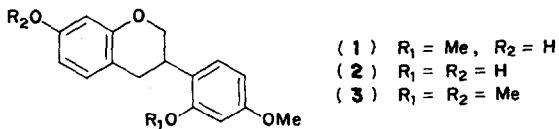
Key Word Index—*Phytophthora parasitica*; fungus; (\pm)-O-méthylsativan; isoflavan; enzyme inhibition.

Abstract—(\pm)-O-méthylsativan, 7,2',4'-trimethoxyisoflavan was prepared by hydroboration followed by chromic acid oxidation of 4-hydroxy-3(2',4'-dimethoxyphenyl)7-methoxycoumarin. At increasing concentrations this compound modifies the metabolism of *Phytophthora parasitica* and then stops its growth. Under the same conditions, it strongly inhibits the activity of pectic transeliminases and, to a less extent, the activities of pectic hydrolases and β -glucosidase.

INTRODUCTION

Il est à présent bien admis que l'infection de plantes cultivées, par des parasites divers, induit la biosynthèse de substances toxiques pour des champignons ou des bactéries, appelées phyto-alexines, contribuant à leur résistance [1]. La structure de ces substances est très variable, elle dépend davantage du génotype de la plante que de la nature de l'agent infectieux. Dernièrement, deux isoflavannes, le sativan-1-(diméthoxy-2'4'-hydroxy-7' isoflavanne) et le vestitol-2-(dihydroxy-7,2' méthoxy-4' isoflavanne) ont été isolés à partir de deux légumineuses, le *Medicago sativa* L. et le *Lotus corniculatus* L. [2,3].

Dans le cadre de recherches actuellement poursuivies en vue d'accéder à des isoflavanones et à des isoflavones, la synthèse de la triméthoxy-7,2',4' isoflavanone isolée d'une légumineuse, *Dalbergia stevenonii* Standl. [4], avait été envisagée. Nous avons présentement obtenu le (\pm)-O-méthylsativan ce qui nous a conduit à en étudier les propriétés biologiques. En effet, de nombreuses recherches ont récemment montré que les phyto-alexines des légumineuses inhibent la croissance de champignons pathogènes et agissent sur l'activité d'enzymes intervenant dans les processus parasitaires [5 à 8].



RESULTATS

Obtention du (\pm)-O-méthylsativan

Nous avons précédemment montré que l'hydroboration suivie d'oxydation chromique [9] des coumarines et des hydroxy-4 coumarines substituées en position 3 permet de préparer les chromanones-4, les isoflavanones ainsi que les homo-isoflavanones [10-12]. Cette réaction a donc été appliquée à l'hydroxy-4 [diméthoxy-2',4'

phénol]-3 méthoxy-7 coumarine [13] en vue d'accéder à l'isoflavanone correspondante.

En réalité, c'est le composé 3, correspondant au produit de réduction totale de l'hétérocycle coumarinique, le triméthoxy-7,2',4' isoflavanne, (\pm)-O-méthylsativan [(\pm) -O-diméthylvestitol] qui a été isolé.

La structure de ce composé a été établie par ses spectres infrarouge, de masse et de R.M.N. En effet le spectre infra-rouge de ce dérivé ne présente plus de bande carbonyle lactonique vers 1720 cm^{-1} ; de même il ne possède pas de bande carbonyle vers 1685 cm^{-1} caractéristique des isoflavanones. Son spectre de masse indique bien l'ion moléculaire M^+ , $m/e = 300$ en accord avec le composé 3. Son spectre de R.M.N. enregistré dans CDCl_3 en présence de tétraméthylsilane comme substance de référence interne se compose d'un doublet entre 2,7-3,1 PPM (2H) attribuable aux deux protons du sommet 4 couplés avec le proton en 3 ($J = 7.5\text{ Hz}$); d'un proton (1H) à 3,7 PPM représentant le proton fixé sur le sommet 3 et de deux protons centrés à 4,2 PPM représentant le groupe méthylène en 2. On retrouve enfin les protons des groupements méthoxy (9H) à 3,8 PPM et les protons aromatiques (6H) entre 6,3-7,2 PPM. Enfin le spectre ultraviolet de ce composé présente des maxima voisins de ceux obtenus avec le sativan naturel [3].

Inhibition de la croissance du *Phytophthora parasitica*

Les tests d'inhibition, en microculture dans un milieu synthétique liquide, sont effectués avec une souche de *Phytophthora parasitica* parasite de la tomate au Liban. Le (\pm)-O-méthylsativan à la concentration de $5 \times 10^{-6}\text{ M}$, provoque non seulement une réduction de croissance d'environ un demi par rapport au témoin mais aussi des troubles physiologiques. Ceux-ci correspondent à des malformations de la paroi des hyphes et à une vacuolisatation importante du cytoplasme. En 96 heures, certains filaments se lysent tandis que d'autres parties du thalle s'isolent par de fausses cloisons. A la concentration de 10^{-5} M , il provoque une inhibition totale de la croissance et une importante dégénérescence cytoplasmique dans tous les éléments du thalle. Cependant, les microcultures

Tableau 1. Pourcentage d'inhibition de l'activité d'une endo-pectine hydrolase suivant la concentration en effecteur et son rapport avec celle de l'enzyme. Incubation pendant 24 hr à 30°

Concentration en effecteur ($\times 10^{-5}$)	Rapport effecteur enzyme	Concentration en substrat ($\times 10^{-4}$)	Pourcentage d'inhibition
1	1/10	5	55
2	1/10	5	57
2	1/10	7.5	33
4	1/5	7.5	40

transférées sur décoction d'avoine gélosée et glucosée de farine d'avoine, supplémentée en thiamine, peuvent engendrer une colonie probablement à partir de chlamydospores indemnes. La dose létale se situe entre 1.5×10^{-5} et 2×10^{-5} suivant l'âge des cultures dont proviennent les implants.

Nous avons étudié dans des conditions analogues le pouvoir fongistatique d'une autre phyto-alexine: le capsidiol, sesquiterpène de formule $C_{15}H_{24}O_2$. Avec celui-ci, la réduction de croissance est plus importante pour la concentration de 5×10^{-6} , la dose létale semble proche de 10^{-5} .

Inhibition des enzymes intervenant dans les dégradations parasitaires

Nous considérerons successivement l'incidence du (\pm)-O-méthylsativan sur une β -glucosidase, des hydrolases et des transéliminases pectiques. L'activité β -glucosidasique est réduite de 25 pour 100 avec une concentration en effecteur de 10^{-5} et un rapport effecteur enzyme de 1/3. Pour les hydrolases pectiques, les tests ont concerné l'inhibition des activités endo-pectine et endo-pectate hydrolytiques. Le processus semblant le même dans les deux cas, nous indiquerons seulement les résultats concernant la première. Le pourcentage d'inhibition dépend d'une part du rapport des concentrations de l'enzyme et de l'effecteur, d'autre part de la viscosité du substrat comme l'indique le Tableau 1. Il ressort de ces résultats que l'inhibition est de type non compétitif.

Les endo-pectine et les endo-pectate transéliminases sont inhibées de façon similaire. La réduction d'activité dépend, comme ci-dessus, du rapport entre effecteur et enzyme: elle passe de 60 à 100 pour 100 lorsque le rapport croît de 1/13 à 1/5. A partir d'une concentration en substrat de 7.5×10^{-4} , la viscosité du milieu réactionnel diminue l'efficacité de l'effecteur.

Dans toutes les combinaisons étudiées, avec une concentration en substrat de 2.5 à 5.7×10^{-4} , la valeur maximale d'inhibition des transéliminases est atteinte en moins d'une heure et demi et reste constante pendant 24 hr. Avec un substrat à 7.5×10^{-4} , l'inhibition diminue lentement après 12 hr d'incubation; ce résultat laisse présumer qu'elle n'est pas cumulative. L'inhibition n'est pas non plus compétitive comme l'indiquent les courbes de Lineweaver-Burk établies avec des concentrations en effecteur de 3×10^{-6} et 6×10^{-6} par rapport au témoin.

A titre de comparaison, nous avons éprouvé l'activité du capsidiol, phytoalexine de structure chimique différente, dans les conditions de l'expérience il s'avère moins actif contre les enzymes pectinolytiques.

Le (\pm)-O-méthylsativan n'influe pas sur l'activité de plusieurs polyphénol-oxydases extraites de différentes

variétés de tomate. Même après un contact pendant 6 hr à 30° entre l'effecteur et l'enzyme, l'activité de celle-ci n'est pas perturbée.

DISCUSSION

L'inhibition de la croissance et les troubles métaboliques observés chez le *Phytophthora parasitica*, pour des concentrations comprises entre 5×10^{-6} et 10^{-5} , indiquent la forte toxicité *in vitro* du (\pm)-O-méthylsativan. Ces résultats sont du même ordre que ceux mentionnés par Bonde, Millar *et al.* [3] pour l'*Helminthosporium turcicum*: une inhibition de 50 pour 100 de la croissance étant obtenue sur milieu gélosé avec respectivement des concentrations de 15×10^{-6} et de 35×10^{-6} de (-) sativan et de (-) vestitol.

L'étude comparative réalisée avec une autre phyto-alexine, le capsidiol, démontre que le produit de synthèse est presqu'aussi actif *in vitro* contre le *Phytophthora parasitica*. Ces résultats tendent à confirmer les hypothèses formulées antérieurement: certaines des substances phénoliques élaborées par les plantes après leur invasion par un agent infectieux peuvent posséder des propriétés fongistatiques importantes [1]. Nous le vérifions à partir de l'éther méthylique du sativan. Ce produit inhibe aussi l'activité de la β -glucosidase, enzyme élaborée par des micromycètes aussi éloignés taxonomiquement que le *Pyrenopeziza lycopersici* [14], l'*Helminthosporium maydis* [15] ou le *Colletotrichum lindemuthianum* [16].

L'inhibition des hydrolases pectiques est moindre que celle des transéliminases pectiques. Dans les deux cas elle paraît meilleure que celle provoquée par le capsidiol. Nous avons précédemment observé des taux analogues d'inhibition par des composés phénoliques, en particulier des coumarines élaborées par différents *Nicotiana* en réaction à une infection cryptogamique [17].

Enfin, le (\pm)-O-méthylsativan ne semble pas modifier l'activité polyphénol-oxydase. Celle-ci semble liée aux processus de réaction de nombreuses plantes contre la parasitisme. Elle s'accroît notamment chez le concombre [18], certains *Lycopersicum* [19], le *Populus tremuloides* [20]. Il est donc important que le (\pm)-O-méthylsativan, inhibant par ailleurs plusieurs fonctions enzymatiques lysantes, n'entrave pas l'un des processus de défense de l'hôte contre les agents pathogènes.

PARTIE EXPERIMENTALE

Synthèse du (\pm)-O-méthylsativan. Une quantité de 1.64 g (0.005 M) d'hydroxy-4 (diméthoxy-2',4' phényl)-3 méthoxy-7 coumarine [13] dissoute dans du tétrahydrofurane anhydre a été traitée vers 0°, sous azote, par 0.22 mol de diborane en solution dans le tétrahydrofurane anhydre. Après retour

à la température ambiante, le mélange réactionnel a été agité durant 24 hr. Le tétrahydrofurane a été alors évaporé sous vide et le résidu oxydé durant trois hr à la température ambiante par une solution de 1,1 g de $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 0,8 ml de H_2SO_4 et 4,5 ml d'eau après addition de 300 ml d'éther. La phase éthérrée est séparée et le résidu aqueux extrait de nouveau à l'éther. Les solutions éthérrées réunies sont lavées à l'aide d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium suivie d'eau distillée. La solution éthérrée est séchée et évaporée. Après chromatographie sur colonne de silice, une fraction pure correspondant au (\pm)-*O*-methylsativan est obtenue; ses caractéristiques sont: P.F.: 101° (MeOH); analyse: + calculée % = C 72, H 6,66; + trouvée % = C 71,85, H 6,78. spectre UV EtOH λ_{max} : 211, 227, 280, 284, 289 nm (épaulements), spectre IR: bandes à 1615 et 1580 cm^{-1} ; spectre RMN: voir texte (résultats).

Tests d'inhibition de croissance en microculture. La souche de *Phytophthora parasitica* Dastur, employée pour les tests d'inhibition, a été isolée au Liban sur *Lycopersicum esculentum*. Les implants de 0,5 mm proviennent de thalles produits sur décotion d'avoine gelosée et glucosée supplémentée en thiamine. L'étude de l'inhibition est réalisée dans un milieu synthétique liquide préalablement décrit [21] auquel est incorporée une soln éthanolique de l'effecteur. L'incubation, à 30°, se déroule pendant 96 hr dans des lames à concavité (Thomas) recouvertes d'une lamelle lutée à la Vaseline. Puis les microcultures sont examinées au microscope et transférées sur le milieu à base d'avoine indiqué ci-dessus. L'éventuelle reprise de croissance est appréciée après une semaine d'incubation à 30°.

Appréciation de l'inhibition des activités enzymatiques. Toutes les études sont réalisées à 30°. β -glucosidase: Les essais sont réalisés suivant la méthode de Reese *et al.* [22] avec le *p*-nitrophénol- β -D-glycopyranoside à 4 p. 100 dans un tampon citrate à 5×10^{-2} M de pH 5,5. L'activité de l'enzyme est suivie en spectrophotométrie à 410 nm. Hydrolases pectiques: Les études sont effectuées avec la "pectinase" (Fluka) dans un milieu à pH 5, tamponné par du citrate à 5×10^{-2} M et en présence de NaCl à 5×10^{-1} M. Le substrat est soit une pectine très méthylée (ruban brun, Unipectine S.A.) soit du polypectate de sodium ou de l'acide polygalacturonique (Sigma). La quantité de produits de dégradation obtenus est mesurée, après réaction avec l'acide thiobarbiturique, par spectrophotométrie entre 490 et 520 nm [23]. Transéliminases pectiques: les mêmes substrats que ci-dessus sont dégradés soit par une enzyme commerciale (Fluka) soit par des extraits de cultures de *P. parasitica*. L'incubation se déroule dans le premier cas à pH 6, dans le second à pH 7,5 en présence de CaCl_2 à 10^{-3} M. Ces résultats sont contrôlés par l'appréciation de la quantité de groupes réducteurs à l'acide thiobarbiturique par spectrophotométrie entre 540 et 550 nm, et en UV par la mesure de l'accroissement de densité optique consécutif à la formation de doubles liaisons, entre 230 et 236 nm [23]. Polyphénol-oxydases: celles-ci sont extraites de 5 variétés de tomate possédant différents génotypes de résistance. Leur activité est mesurée selon la méthode de Fuchs [18]

en suivant leur action, par spectrophotométrie à 400 nm, sur du pyrocatechol à 0,50 p. 100 dans un tampon Mac Ilvaine, 10^{-1} M, à pH 6.

Remerciements—Nous remercions le Docteur A. Stoessl (Institut de Recherches Agronomiques du Canada, London-Ontario) qui a eu l'obligeance de nous fournir un échantillon de capsidiol puis de nous autoriser à publier les résultats obtenus, ainsi que Messieurs D. Davoust et J. Rivière (Laboratoire de Chimie du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, France) pour les spectres de R.M.N. et de masse.

REFERENCES

1. Cruickshank, I. A. M. and Perrin, D. R. (1964) in *Biochemistry of Phenolic Compounds*. (Harborne, J. B., ed.), p. 511 et 517. Academic Press, New York.
2. Ingham, J. L. and Millar, R. L. (1973) *Nature* **242**, 125.
3. Bonde, M. R., Millar, R. L. and Ingham J. L. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2957.
4. Donnelly, D. M. X., Thompson, J. C., Whalley, W. B. and Ahmad, U. (1973) *J. Chem. Soc. (Perkin I)* 1737.
5. Smith, D. A., Van Etten, H. D. and Bateman, D. F. (1973) *Physiol. Plant Path.* **3**, 179.
6. Olah, A. F. and Sherwood, R. T. (1973) *Phytopathology* **63**, 739.
7. Olah, A. F. and Sherwood, R. T. (1971) *Phytopathology* **61**, 65.
8. Geigert, J. (1973) *Tetrahedron* **29**, 2703.
9. Brown, H. C. and Garz, C. P. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 2931.
10. Kirkiacharian, B. S., Elia, G. H. et Mahuzier, G. (1974) *C.R. Acad. Sci. SC*, **279**, 151.
11. Kirkiacharian, B. S. (1975) *Chem Commun* **5**, 162.
12. Kirkiacharian, B. S. et Chidiac, H. (1975) *C.R. Acad. Sci. série C*, **280**, 775.
13. Deschamps-Vallet, C. (1963) Thèse Doctorat Sciences, Lyon, No d'ordre **319**, 115.
14. Besri, M. (1970) Thèse doctorat sciences, Nancy, No d'ordre A O 4747.
15. Reddy, M. N., Paterson, P. A. and Tipton, C. L. (1973) *Phytopath Z.* **78**, 264.
16. Keegstra, K., English, P. D. and Albersheim, P. (1972) *Phytochemistry* **11**, 1873.
17. Ravisé, A. et Tanguy, J. (1973) *Phytopath. Z.* **76**, 253.
18. Fuchs, A. (1965) *Neth. J. Plant Path.* **71**, 157.
19. Ravisé, A. et Trique, B. (1972) *Agron. Trop.* **27**, 751.
20. Takai, S. and Hubbes, M. (1973) *Phytopath. Z.* **78**, 97.
21. Ravisé, A. et Tanguy, J. (1971) *C.R. Acad. Sci. Sér. D*, **272**, 1252.
22. Reese, E. T., Maguire, A. M. and Parrish, F. W. (1968) *Can. J. Biochem.* **46**, 25.
23. Ravisé, A. et Trique, B. (1972) *Coton Fibres Trop.* **27**, 295.