

# Phytoalexines des Citrus: séséline

## Propriétés inhibitrices et modulation de synthèse.

Annie VERNENGHI, Florence RAMIANDRASOA,  
Sylvaine CHUILON et A. RAVISE\*

CITRUS PHYTOALEXINS : SESELIN BIOLOGICAL ACTIVITY AND «IN VITRO» SYNTHESIS STIMULATION.

Annie VERNENGHI, Florence RAMIANDRASOA, Sylvaine CHUILON and A. RAVISE.

*Fruits*, Fev. 1987, vol. 42, n° 2, p. 103.111.

SUMMARY - Citrus tissues infected by *Phytophthora* sp. accumulated seselin. This chromeno coumarin was identified by Mass Spectrometry Nuclear Magnetic Resonance and melting point. *In vitro*, the growth of a virulent strain of *P. citrophthora* was less inhibited than that of an avirulent strain of *P. parasitica*. This difference could be the consequence of a partial detoxification of the coumarin. Seselin synthesis in roots was triggered by treatments of Citrus plants with Fosetyl Al, fungal elicitors or a  $\beta$ -cyclodextrin - arachidonic acid inclusion complex.

PHYTOALEXINES DES CITRUS : SESELIN. PROPRIETES INHIBITRICES ET MODULATION DE SYNTHESE.

Annie VERNENGHI, Florence RAMIANDRASOA, Sylvaine CHUILON et A. RAVISE.

*Fruits*, Fev. 1987, vol. 42, n° 2, p. 103-111

RESUME - La séséline, une chroménocoumarine est accumulée dans les tissus de Citrus inoculés par des *Phytophthora* sp. La structure déterminée par spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire est confirmée par le point de fusion. La toxicité *in vitro* est plus importante pour une souche de *P. parasitica* avirulente que pour une souche pathogène de *P. citrophthora*, cette différence pourrait résulter d'une biodégradation partielle par le parasite. La synthèse de séséline dans les tissus racinaires est stimulée par un traitement au phosétyl d'aluminium, l'application d'éléciteurs fongiques ou d'un complexe acide arachidonique/ $\beta$ cyclodextrines.

### INTRODUCTION

Parmi les réactions aux agressions parasitaires, l'accumulation dans les tissus de l'hôte de produits de son métabolisme secondaire, préexistants ou postérieurs à l'infection, contribuent au blocage des agents pathogènes (STOESSL, 1983 ; SMITH, RAVISE et BOMPEIX, 1984 ; EBEL, 1986). Lors des réactions de défense des Citrus contre les *Phytophthora* sp., agents de la gommose, interviennent des synthèses de substances inhibitrices de nature terpénique et phénolique (KHAN et RAVISE, 1985), seule la xanthoxylène étant identifiée (HARTMANN et NIENHAUS, 1974). Dans une première étape, nous avons décrit une coumarine, la xanthylétine, et établi ses propriétés inhibitrices *in vitro* pour le *P. citrophthora* (KHAN *et al.*, 1985). Plus récemment, une diméthoxy coumarine, la scoparone, a été présentée comme phytoalexine des Citrus (AFEK *et al.*, 1986 a et b).

La présente étude concerne l'élucidation de la structure d'une chroméno coumarine, la séséline, ses propriétés biologiques *in vitro* et la modulation de sa synthèse dans les tissus racinaires après l'inoculation de *Phytophthora* sp.

Chez les végétaux cultivés, des coumarines contribuent aux réactions de défense (EBEL, 1986 *inter al.*). Nous avons décrit les propriétés inhibitrices pour le *P. parasitica* et ses enzymes d'agression de plusieurs groupes de coumarines en fonction de leurs substituants (RAVISE et KIRKIA-CHARIAN, 1976 ; RAVISE *et al.*, 1980). La toxicité de la séséline est comparée à celle de quatre substances naturelles possédant une structure proche de cette chroméno coumarine afin d'évaluer, dans la mesure du possible, la contribution du cycle chroméno à l'inhibition des *Phytophthora* sp. *in vitro*.

LAVILLE et CHALANDON (1982) ont démontré que le phosétyl d'aluminium (TEPA), fongicide systémique, possède des propriétés préventives et curatives contre les agents de gommose des agrumes. Par ailleurs, BOMPEIX et SAINDRENAN (1984) ont étudié *in vitro* la toxicité du TEPA pour plusieurs espèces de *Phytophthora* dont

\* - Annie VERNENGHI et A. RAVISE - Laboratoire de Phytopathologie de l'ORSTOM - 72 route d'Aulnay - 93140 BONDY.  
Florence RAMIANDRASOA et Sylvaine CHUILON - Laboratoire des Médiateurs chimiques - INRA-CNRS - Domaine de Brouessy - Magny les Hameaux - 78470 SAINT REMY LES CHEVREUSE.

des parasites des agrumes.

Ultérieurement, nous avons établi une relation entre l'application de TEPA et l'accumulation accrue de facteurs de résistance chez des Citrus (KHAN *et al.*, 1986). Les résultats obtenus lors de l'étude de la synthèse de la séséline tendent à conforter ces observations.

### MATERIEL ET TECHNIQUES

La méthodologie reprend pour l'essentiel les procédures expérimentales décrites précédemment (KHAN *et al.*, 1985 et 1986). Nous les rappelons succinctement.

#### Matériel végétal.

Les semences sont fournies gracieusement par la station INRA de San Giuliano en Corse.

600 plants de Rough lemon, âgés de 12 à 14 mois, sont cultivés en pots dans des serres à 22-26°C, avec un éclairage d'appoint pour la production de phytoalexines.

D'autre part, 650 plants sont cultivés dans les mêmes conditions pour les études de modulation des réactions de défense.

#### Souches de *Phytophthora* sp.

Elles proviennent de la mycothèque de l'IRFA à Montpellier. Une souche de *Phytophthora parasitica* DASTUR (SF) est utilisée avec une souche de *P. citrophthora* (SMITH and SMITH) LEON (BB 13) qui s'est avérée la plus pathogène au cours des essais antérieurs.

#### Techniques d'inoculation.

L'inoculum est préparé en milieu liquide sur une décoction de pois glucosée et supplémentée en thiamine, avec incubation de 2 semaines à 27°C et à l'obscurité.

Après dilacération des thalles à l'aide d'un broyeur turmix, l'inoculum est apporté à des doses correspondant respectivement à 1,5 mg, 3 mg et 6 mg d'équivalent de mycélium sec.

Après décapage du collet et scarification des racines superficielles, le broyat mycélien est versé à la base de chaque plant. L'incubation se déroule dans les conditions décrites précédemment (*loc. cit.*).

Les récoltes d'échantillons sont échelonnées entre un et trois mois, la préparation des extraits méthanoliques de racines effectuée comme lors des études précédentes (*loc. cit.*).

#### Traitements chimiques.

- Phoséthyl d'aluminium (TEPA) de Rhône Poulenc.

Lors de l'inoculation, le fongicide est appliqué à raison de 250 mg en solution dans 25 ml d'eau au pied de chaque

plant. Le traitement est renouvelé chaque mois.

- Galactosamine - de Sigma.

Cet oligomère de chitosane, éliciteur fongique, en solution aqueuse, est fourni à la dose hebdomadaire de 100 µg par plant pendant un mois. La rémanence du traitement est évaluée pendant deux mois.

- Complexe 15-hydroxy arachidonique inclus dans des β cyclodextrines.

Ce produit fait l'objet du brevet ANVAR n° 8605001.

Le complexe est incorporé au niveau du collet dans une perforation des tissus de 2,5 mm de diamètre, à raison de 4 à 5 mg (soit 0,45 mg d'acide gras). L'orifice est ensuite bouché avec un mastic horticoles.

#### Produits de référence pour tests de toxicité (figure 1).

- Xanthylétine, cette coumarine a été décrite précédemment (KHAN *et al.*, 1985). A partir d'un extrait méthanolique (cf. infra) 142 mg sont purifiés.

- Substances extraites de *Calophyllum* sp.

M.G. KUNESH, chimiste au CNRS, nous a confié des extraits purifiés par ses soins de :

acide calophyllique  
calophyllolide  
calophyllum «cuba»  
tomentolide B

dont les structures possèdent un cycle chromène.

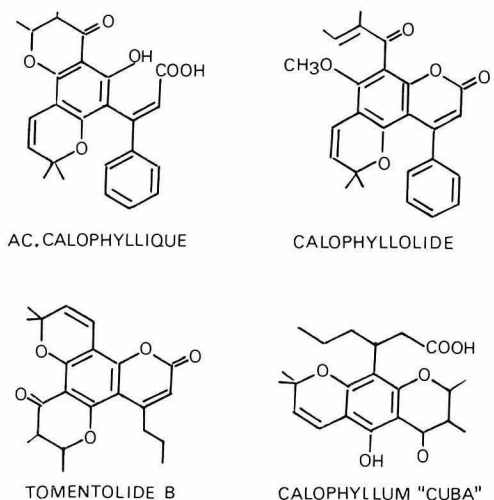


Figure 1 • Structures de l'acide calophyllique, du calophyllolide, du calophyllum "cuba" et du tomentolide B utilisés pour les tests comparatifs de toxicité *in vitro*.

- Scoparone, la 6,7 - diméthoxycoumarine de synthèse est fournie par les laboratoires Sarget.

### Purification de la séséline.

Les extraits méthanoliques de tissus de racines sont partiellement purifiés par chromatographie sur plaques en couches épaisses de silice H (Flucka) avec le mélange hexane - acétate d'éthyle (1,5 : 1) pour éluant.

440 mg de cet extrait sont chromatographiés sur 40 g de silice Merck Kieselgel 60 H à l'aide d'un appareil de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) Jobin et Yvon et élués par un mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle (4 : 1). On obtient ainsi, avec un rendement de 16 p. 100, 68 mg de séséline.

### Etude analytique de la séséline.

- Chromatographie sur couche mince de silice (CCM).

Les études de migration sont réalisées sur plaques Schleicher et Schüll avec les systèmes éluants :

Hexane - acétate d'éthyle (2 : 1) [Hx - Ae (2 : 1)]

Hexane - acétate d'éthyle - méthanol (60 : 40 : 3)  
[Hx - Ae - Me (60 : 40 : 3)]

dichlorométhane (CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>)

chloroforme (Clf)

chloroforme méthanol (95 : 5) [Clf - Me (95 : 5)]

La séséline est décelée sur les chromatographies par sa fluorescence en ultra-violet à 254 et 366 nm.

Puis la coumarine est révélée par pulvérisation de p-nitraniline (*loc. cit.*).

- Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La rétention de la séséline, ainsi que de la xanthylétine et de la scoparone, est déterminée sur deux types de supports : silice et silice greffée en C18.

Les gradients de l'appareil Chromatem - Touzart et Matignon - sont pilotés à l'aide d'un micro-ordinateur Apple II.

La détection des substances est réalisée dans l'ultra-violet à 250 nm et à 280 nm à l'aide d'un détecteur Shimadzu et par réfractométrie avec un détecteur Knauer.

Les colonnes de 3/8" x 30 cm sont protégées chacune par une pré-colonne de 3/8" x 5 cm.

L'éluion des colonnes de silice nucléosil 5 $\mu$  - est réalisée par un gradient d'acétate d'éthyle dans l'hexane.

Celle des colonnes de silice greffée en C18 - nucléosil ODS2 de 5 $\mu$  - par un gradient d'acétonitrile dans une solution acétique à 5 o/oo.

### Détermination de structure de la séséline.

La structure de la coumarine est établie par :

- spectrométrie de masse à l'aide d'un appareil CG - SM (chromatographe en phase gazeuse - spectromètre de masse) Nermag R10 - 10C, piloté par ordinateur, en impact électronique et en ionisation chimique (NH<sub>3</sub>).

- spectrométrie par Résonance Magnétique Nucléaire.

Les spectres sont établis avec un appareil Bruker de 400 MHz dans le CD Cl<sub>3</sub> avec le TMS pour référence.

- détermination du point de fusion sur un appareil Thermovar Reichert par référence aux données bibliographiques.

### Tests de toxicité *in vitro*.

Ils sont réalisés par des techniques décrites précédemment (VERNENGHI, 1985 ; KHAN *et al.*, 1985) soit pour le *Cladosporium cladosporioides* en CCM, soit pour le *P. parasitica* et pour le *P. citrophthora* en lames à concavité sous faible tension d'oxygène.

## RESULTATS

La séséline n'est pas décelée dans les tissus des plants non inoculés. Cette chroménocoumarine est synthétisée, tant dans les racines que dans les tiges après l'inoculation expérimentale de *P. parasitica* et de *P. citrophthora*.

### Caractérisation de la séséline.

#### Caractères chromatographiques.

- en CCM

La migration de la séséline est comparée à celles de la xanthylétine et de la scoparone dans 5 systèmes éluants.

Le tableau 1 indique les positions respectives des trois coumarines.

- en CLHP.

Les rétentions des trois coumarines sont évaluées d'une part sur colonne de silice éluee avec des solvants organiques, d'autre part sur colonne de silice greffée en C18 éluee par l'acétonitrile en solution acétique à 5 p. 1000.

Le tableau 2 présente les résultats obtenus.

#### Détermination de structure.

- en spectrométrie de masse :

Le poids moléculaire de la séséline est caractérisé par le pic moléculaire à M<sup>+</sup> 228 et dans la fragmentation par l'ion à m/z 213 caractéristique de la perte d'un groupe méthyle.

TABLEAU 1 - Migration en CCM des trois coumarines selon la nature des éluants.

I - hexane - acétate d'éthyle [Hx - Ae (2 : 1)]  
 II - hexane - acétate d'éthyle - méthanol [Hx - Ae - Me (60 : 40 : 3)]  
 III - dichlorométhane [CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>]  
 IV - chloroforme [Clf]  
 V - chloroforme - méthanol [Clf - me (95 : 5)]

	I	II	III	IV	V
Séséline	0,68	0,83	0,33	0,53	0,76
Xanthylétine	0,57	0,77	0,40	0,46	0,87
Scoparone	0,22	0,59	0,40	0,46	0,86

TABLEAU 2 - Elution des trois coumarines.

- sur colonne de silice 5 $\mu$  3/8" par un gradient de 0 à 45 p. 100 d'acétate d'éthyle dans l'hexane avec un plateau à 27 p. 100

- sur colonne de silice 5 $\mu$  3/8" greffée en C18 par un gradient d'acétonitrile dans une solution acétique à 5 p. 1000

TR : temps de rétention - Ae : acétate d'éthyle Actn : acétonitrile

	TR (mm)	p. 100 Ae	TR en mm	p. 100 Actn
Séséline	60	27	59	72
Xanthylétine	64	27	56	65
Scoparone	62	27	42	45

- en spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (figure 2).

Les données en RMN du proton fournissent une information sur les déplacements chimiques notamment des protons aromatiques.

RMN <sup>1</sup>H à 200 MHz (CD Cl<sub>3</sub>/TMS)  $\delta$  ppm : 7,6 (d, 1H) ; 7,25 (d, 1H) ; 6,85 (d, 1H) ; 6,7 (d, 1H) ; 6,2 (d, 1H) ; 5,7 (d, 1H) ; 1,5 (1,2 CH<sub>3</sub>).

Les constantes de couplage des protons aromatiques et la multiplicité des signaux ont permis de positionner les substituants et d'attribuer la structure de la séséline

(figure 3). En particulier la valeur 9Hz est en faveur d'une constante de couplage en position ortho pour la séséline tandis que la xanthylétine est caractérisée par deux singulets résonnant à 7,03 et à 6,72 ppm correspondant à des protons en position para.

Ces caractéristiques spectrales correspondent à celles établies pour la séséline par SHANBHAG *et al.* (1964) et GRAY *et al.* (1978).

- par le point de fusion :

Le point de fusion est de 110-113°C. Cette valeur est conforme aux données bibliographiques (KATO, 1970).

FR 155-1 CDCL3 NK  
 BRUKER  
 DATE 15-11-85  
 SF 200.132  
 ST 80.130  
 O1 3341.000  
 S1 16384  
 TD 16384  
 SV 2403.846  
 HZ/PT .293  
 PV 3.0  
 RD 3.000  
 AQ 3.408  
 RG 20  
 NS 8  
 TE 295  
 FV 3100  
 O2 3707.112  
 DP 25L PO  
 LB .300  
 GB 0.000  
 CX 37.50  
 CY 0.00  
 F1 2200.20  
 F2 49.88  
 HZ/CM 60.002  
 PPM/CM .300  
 SR 2339.50

Figure 2 • Spectre de la séséline établi par Résonance Magnétique Nucléaire dans le CD Cl<sub>3</sub> sur un appareil Bruker de 400 MHz.

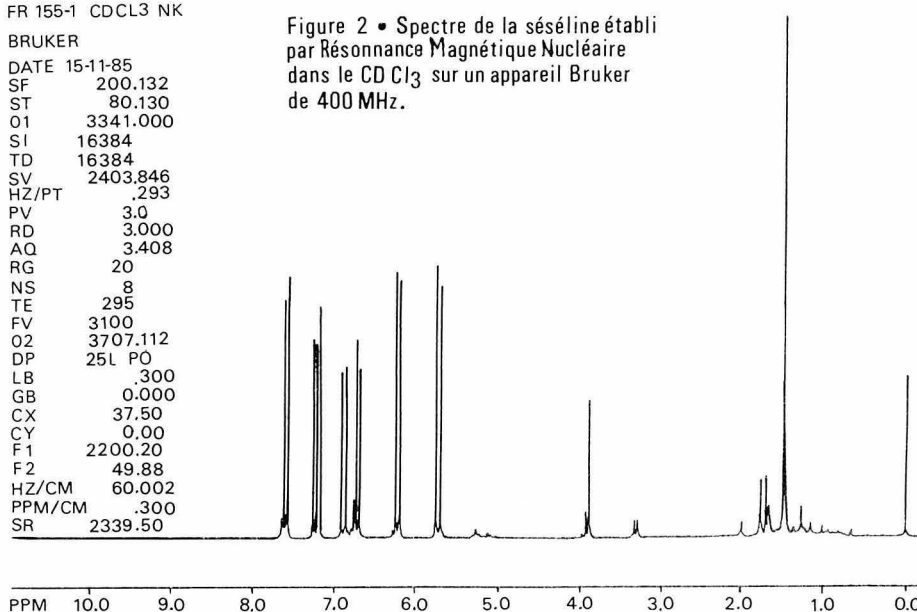




Figure 3 • Structures de la séséline (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>).

**Etude comparative de la toxicité *in vitro*.**

La toxicité de la séséline *in vitro* pour le *Phytophthora parasitica* et le *P. citrophthora*, en microculture en lames à concavité sous faible tension d'oxygène, est comparée à celle des deux autres coumarines.

En outre, ces résultats sont mis en parallèle avec ceux obtenus en incorporant au milieu de culture quatre produits naturels possédant un cycle chromène.

Dans ces conditions expérimentales la séséline à la concentration de 10 µg/ml provoque une inhibition de croissance d'environ 50 p. 100 dès la 12e heure d'incubation. Puis celle-ci décroît entre 16 h et 36 h jusqu'à une valeur de 30 à 40 p. 100 qui se maintient jusqu'au 3e jour. Ensuite doit intervenir une dégradation par le parasite qui se traduit par une inhibition de 15 p. 100 stable à partir du 4e jour.

Par contre, à la concentration de 20 µg/ml l'inhibition initiale vers 12 h est de l'ordre de 75 p. 100 ; elle tend à augmenter faiblement entre 16 h et 24 h puis se stabilise de nouveau à la valeur initiale (figure 4).

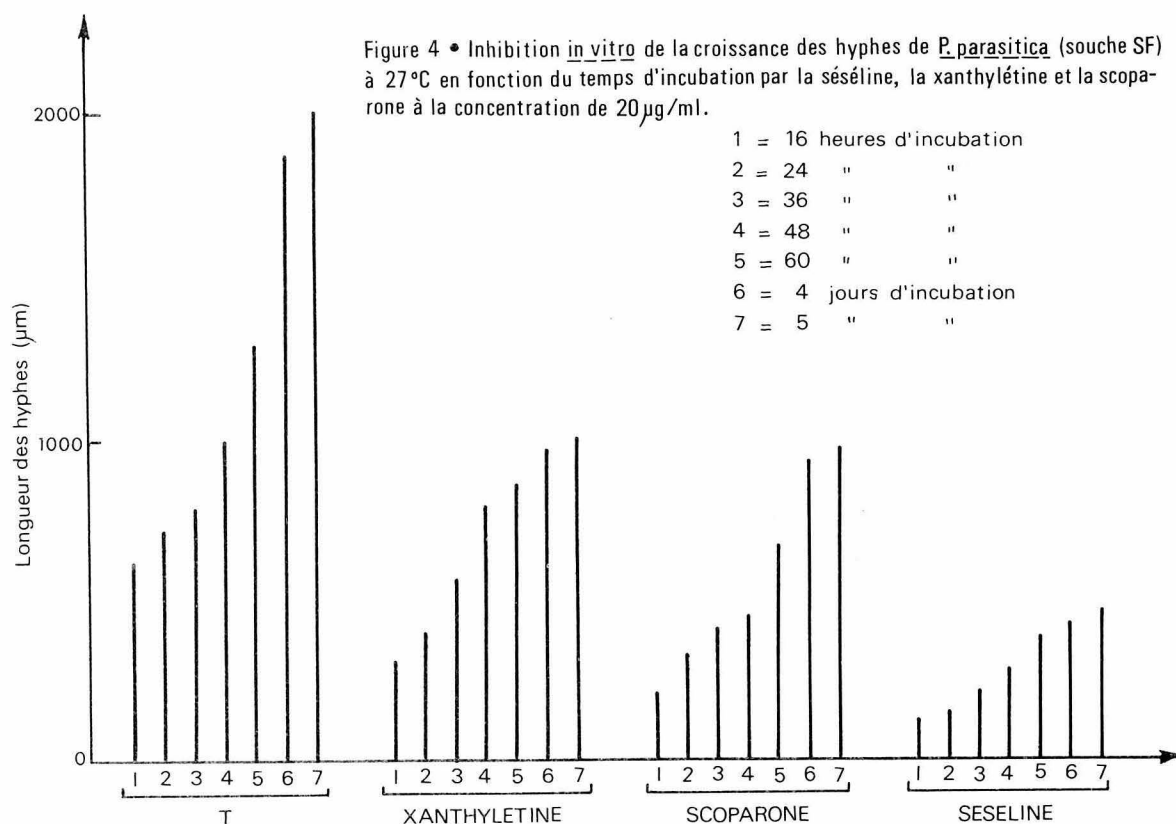
Ces résultats indiquent qu'à cette concentration la séséline bloque chez le *P. parasitica* l'induction d'enzymes capables de modifier la toxicité de la coumarine.

A la concentration de 20 µg/ml, la xanthylétine est davantage dégradée que la séséline à partir de 36 h, sa toxicité se stabilise autour de 50 p. 100 pour le *P. parasitica* dès le 4e jour. Un processus similaire mais plus atténué est observé pour la scoparone qui provoque aussi une inhibition de l'ordre de 50 p. 100 après 96 h d'incubation (figure 4).

La comparaison de la toxicité des coumarines après 48 h d'incubation *in vitro* montre clairement que l'inhibition dépend non seulement de la concentration mais aussi du parasite éprouvé (figures 5 et 6).

Le *P. parasitica*, dès la concentration de 15 µg/ml ne parvient pas à dégrader la séséline. Au contraire, celle-ci ne bloque pas complètement la croissance du *P. citrophthora* à 75 µg/ml (inhibition de 91 p. 100).

Sur la figure 6, les modifications de pente des courbes d'inhibition du *P. citrophthora* par la scoparone et la xanthylétine font présumer que le phénomène est plus important pour ces deux coumarines. Toutefois, à la concentration de 150 µg/ml, le parasite ne parvient plus à détoxifier les trois coumarines.



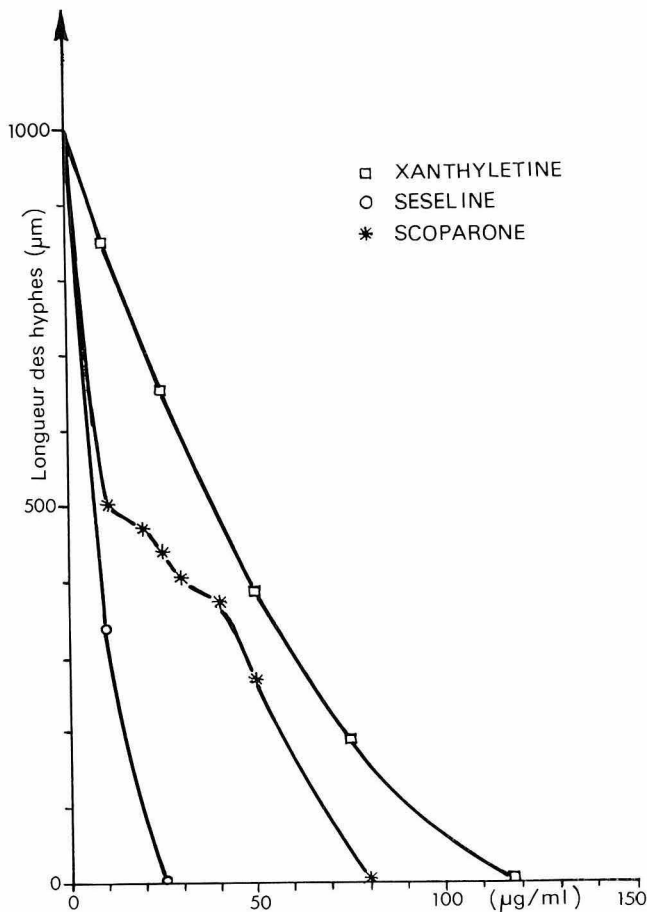


Figure 5 • Incidence de la concentration en coumarines sur la croissance *in vitro* des hyphes de *P. parasitica* (souche SF). Temps d'incubation : 48 h - Température : 27°C.

Les quatre substances isolées de *Calophyllum* se révèlent moins toxiques pour le *P. parasitica* que les 3 coumarines précédemment citées (figure 7). Leur DL 50 sont à peu près homogènes et oscillent entre 50 et 75 µg/ml sauf pour le *Calophyllum* «cuba». Dès 24 h d'incubation, de nettes variations de toxicité, signe d'un début de biodégradation des substances, apparaissent notamment pour l'acide calophyllique dont la courbe d'inhibition présente un palier étendu entre 50 et 150 µg/ml. Dans tous les cas, une inhibition totale de croissance du parasite est obtenue pour des concentrations de 200 à 250 µg/ml.

#### Accumulation de la séséline dans les tissus de racines de plants inoculés.

Les analyses chromatographiques réalisées en CLHP sur colonne de silice greffée en C18 révèlent que la synthèse de séséline est accrue après l'inoculation de souches de *Phytophthora* sp. Afin de circonscrire et de quantifier la réaction, on procède à des co-injections de séséline purifiée, à plusieurs concentrations, avec une partie des extraits de tissus étudiés.

Ce procédé est aussi utilisé pour comparer l'évolution des teneurs en xanthylétine et en scoparone après les infections expérimentales.

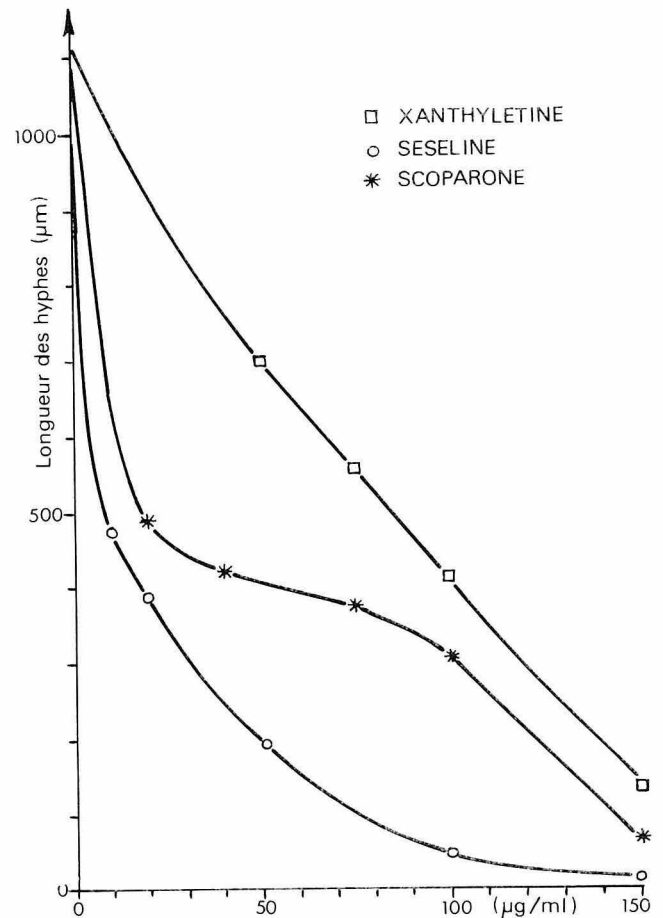


Figure 6 • Inhibition *in vitro* de la croissance des hyphes de *P. citrophthora* (ED) en fonction de la concentration en coumarines. Incubation : 48 h - Température : 27°C.

Pendant le premier mois suivant l'inoculation de souches de *P. parasitica* et de *P. citrophthora*, les teneurs en séséline augmentent. Son accumulation est maximale dans les tissus de plants inoculés avec la plus forte pression d'inoculum (6 mg de mycélium sec/plant) de la souche avirulente de *P. parasitica*. Dès le second mois, la souche pathogène de *P. citrophthora* (avec un inoculum correspondant à 3 mg de mycélium sec par plant) provoque d'importantes nécroses racinaires ; l'analyse des extraits de tissus en CLHP révèle une réduction des concentrations en séséline. Trois mois après des infections expérimentales réalisées avec la même dose d'inoculum (3 mg de mycélium sec par plant) les teneurs en séséline restent élevées dans les tissus de racines inoculées par le *P. parasitica* (nécroses limitées et cicatrises), elles régressent dans ceux des plants inoculés par le *P. citrophthora* (racines secondaires détruites à plus de 50 p. 100). La figure 8 illustre cette évolution. La comparaison d'intensité des pics correspondant à la séséline fait présumer une différence d'accumulation d'environ 20 p. 100 plus forte dans le cas de la résistance au *P. parasitica*. De même dans les extraits de tissus inoculés par le *P. citrophthora*, la surface des pics correspondant à la xanthylétine est réduite d'environ 50 p. 100 par rapport au motif correspondant au *P. parasitica*. Par contre, dans les deux types d'infections, les pics correspondant à la contribution de la scoparone s'avèrent réduits.

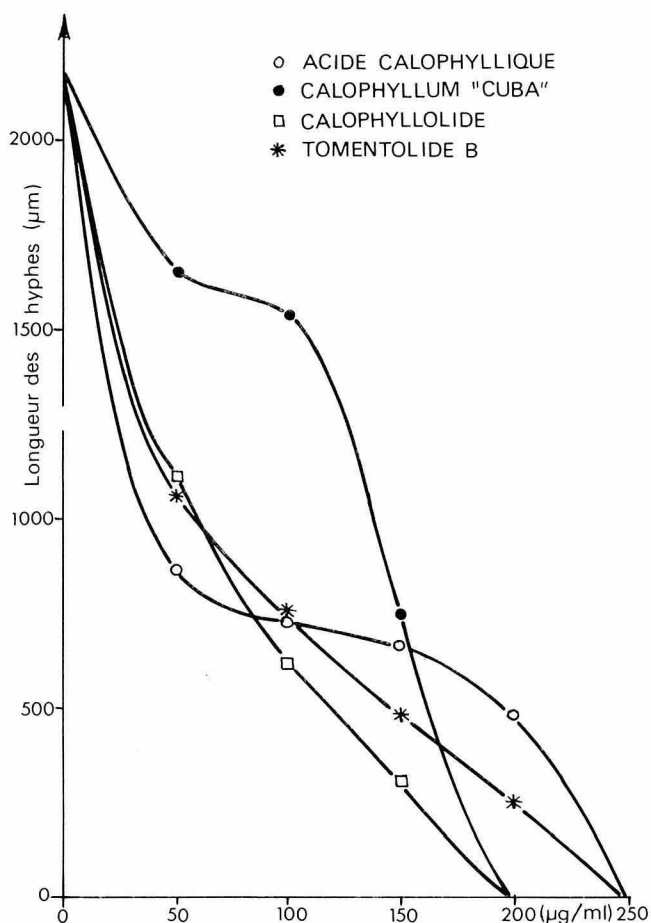


Figure 7 • Influence de la concentration en dérivés de chroménocoumarines sur la croissance *in vitro* des hyphes de *P. parasitica* (SF). Incubation : 24 h - Température : 27°C.

#### Modulation de la synthèse de séséline par des médiateurs chimiques.

Nous avons indiqué (KHAN et RAVISE, 1985 ; KHAN *et al.*, 1986) que la modulation des réactions de défense par le TEPA et par des éliciteurs fongiques provoque des modifications semblables de synthèse de facteurs de résistance chez l'oranger Valencia late, le *Poncirus trifoliata* et le Rough lemon.

Nous examinons ici la modulation de l'accumulation de séséline provoquée par ces traitements. Deux mois après l'inoculation de *P. citrophthora*, la teneur en séséline est quatre fois plus importante que chez le témoin inoculé (figure 9) dans les extraits de plants traités par le complexe 15-hydroxy arachidonique/ $\beta$  cyclodextrines.

Dans les mêmes conditions expérimentales, le traitement par la galactosamine provoque le doublement de la concentration en séséline, l'application de TEPA seulement une augmentation de 50 p. 100 de cette concentration (figure 10).

Les stimulations de synthèse de la xanthylétine et de scoparone sont moins importantes. Dans le cas du traitement le plus efficace, avec le complexe arachidonique, la

surface du pic de la xanthylétine semble augmenter de 40 p. 100, celle du pic correspondant à la scoparone de l'ordre de 30 p. 100.

Trois mois après l'infection par le *P. citrophthora*, alors que les racines des plants inoculés sont fortement attaquées (cf supra), les nécroses paraissent stabilisées chez les plants traités par le TEPA et par le complexe arachidonique.

A ce stade, le fongicide et le complexe éliciteurs provoquent des réactions semblables à celles décrites à 2 mois. Toutefois, on observe une diminution de surface des pics correspondant à la séséline, celle-ci est évaluée à un tiers dans l'un et l'autre motif. Les diminutions des teneurs en xanthylétine et en scoparone évoluent dans les mêmes proportions.

#### DISCUSSION - CONCLUSION

Comme chez d'autres plantes cultivées (STOESSL, 1983 ; TAQUET *et al.*, 1985 ; VERNENGHI *et al.*, 1986 *inter al.*), les mécanismes de défense des Citrus contre des *Phytophthora* sp. impliquent plusieurs voies métaboliques. Parmi celles-ci les biosynthèses de composés phénoliques, en particulier de coumarines (KHAN *et al.*, 1985 ; AFEK *et al.*, 1986 a), semblent prédominantes.

La séséline est décrite comme coumarine constitutive des tissus des fruits de *Seles indicum* et de *Ruta pinnata*. Elle se trouve également dans l'écorce de *Flindersia pimentalia*, les tiges et les feuilles de *Carum roxburghianum* et de *Myrtopsis* sp. (SATTAR *et al.*, 1978).

Chez les agrumes que nous avons étudiés, la synthèse de séséline intervient *de novo* après l'infection expérimentale.

Dans les tissus de racines de Rough lemon il s'accumule environ deux fois moins de séséline que de xanthylétine. Par contre, *in vitro* l'activité biologique de la séséline s'avère meilleure que celle de son isomère. La scoparone, accumulée à faible concentration dans les tissus d'après nos expériences, possède des propriétés inhibitrices intermédiaires, les résultats étant acquis avec un produit de synthèse.

Ces coumarines, en particulier la xanthylétine (KHAN *et al.*, 1985) peuvent être dégradées partiellement par les *Phytophthora* sp, d'où l'aspect des courbes d'inhibition de croissance *in vitro*. Au-delà d'un seuil variable selon la souche de *Phytophthora* éprouvée, il semble que soit la capacité à détoxifier la coumarine est bloquée soit une seconde cible métabolique du parasite est atteinte. La souche de *P. parasitica* avirulente pour le Rough lemon est particulièrement sensible à la séséline. La toxicité de cette substance *in vitro* semble - bien que les souches éprouvées soient différentes - plus importante que celle des autres groupes de coumarines (RAVISE et KIRKIACHARIAN, 1976, 1978). Par contre, les études de toxicité réalisées avec des acides calophylliques et le tomentolide B, ne fournissent pas d'indications positives sur la contribution du cycle chromène à la toxicité pour des *Phytophthora* sp. Ces quatre substances s'avèrent moins inhibitrices que la séséline et

Colonne de silice nucléosil 5 $\mu$  greffée en C18 - 3/8" x 30cm - munie d'une précolonne - 3/8" x 5 cm - éluée par un gradient d'acétonitrile de 10 à 99% dans une solution acétique à 5%. Débit 1,5 ml/mn; défilement 5 mm/mn.  
Détection UV :  $\lambda = 280$  nm, S = 1 mV.

↑ = Repérage des coumarines  
Scp = SCOPARONE  
Xan = XANTHYLETINE  
Ssl = SESELINE

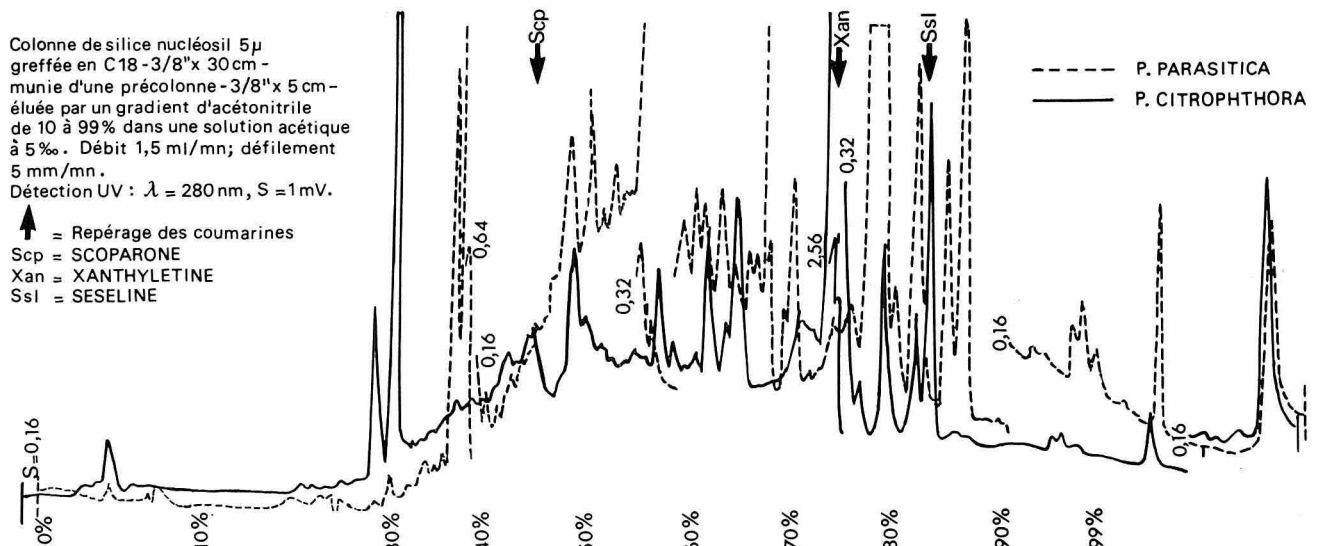


Figure 8 • Analyse comparative en CLHP de la composition d'extraits méthanoliques de racines (correspondant à 10 mg de tissus frais) de plants de Rough lemon inoculés par le *P. parasitica* ou par le *P. citrophthora*. Durée de l'infection expérimentale : 3 mois.

Conditions expérimentales analogues à celles de la figure 8.

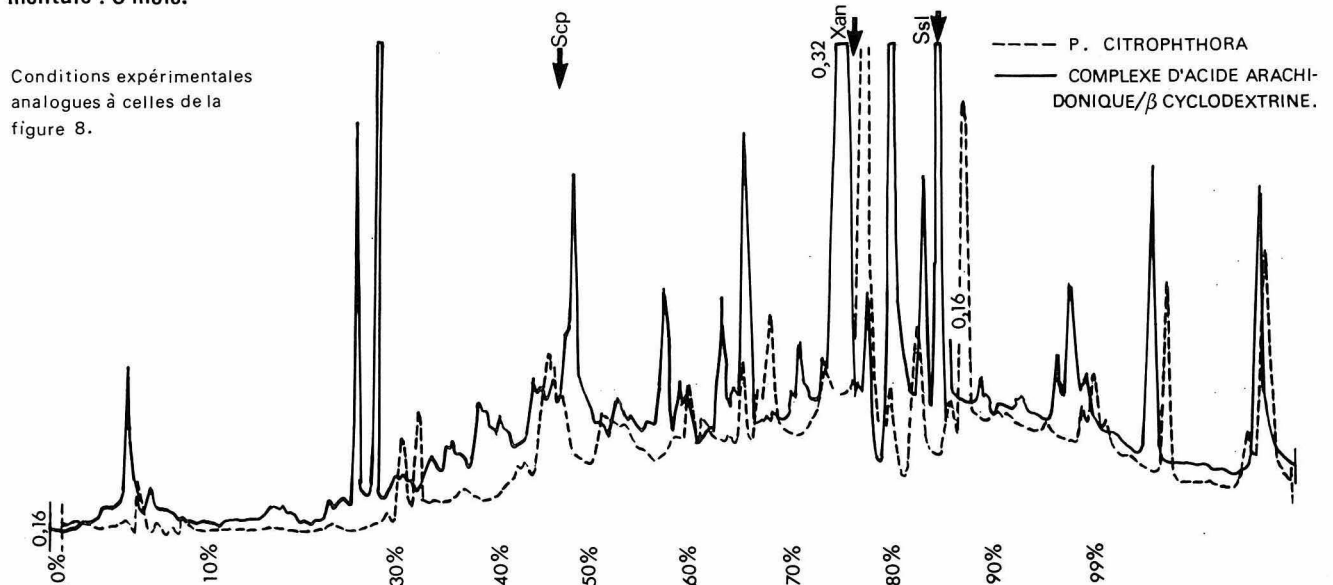


Figure 9 • Analyse comparative en CLHP de la composition d'extraits méthanoliques de racines (correspondant à 10 mg de tissus frais) de plants de Rough lemon inoculés par le *P. citrophthora* ou inoculés et traités par le complexe d'acide arachidonique/ $\beta$  cyclodextrine. Durée de l'infection : 2 mois.

Conditions expérimentales analogues à celles de la figure 8.

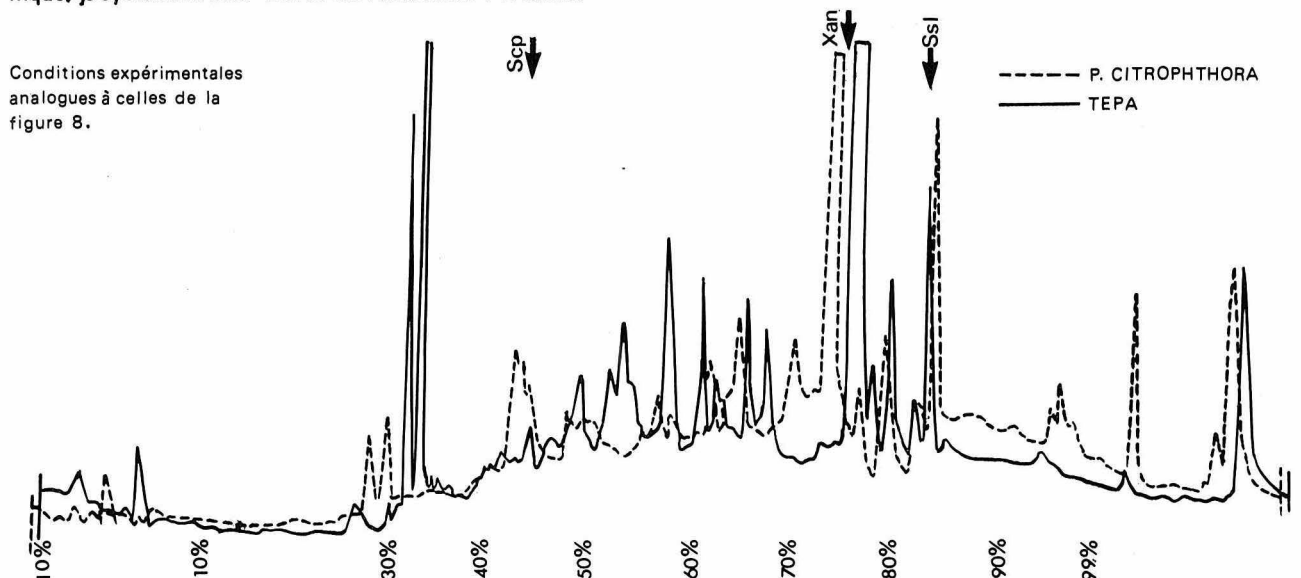


Figure 10 • Analyse comparative en CLHP de la composition d'extraits méthanoliques de racines (correspondant à 10 mg de tissus frais) de plants de Rough lemon inoculés par le *P. citrophthora* ou inoculés et traités par le TEPA. Durée de l'infection expérimentale : 2 mois.



présentent le même phénomène de plateau de toxicité que la xanthylétine, en particulier l'acide calophyllique.

Les analyses chromatographiques en CLHP mettent en évidence une relation entre l'accumulation de séséline et de xanthylétine dans les tissus des racines et le blocage des nécroses provoquées par le *P. parasitica*.

De même, les concentrations en coumarines dans ces tissus demeurent importantes tant que, sous la pression d'inoculum, le *P. citrophthora* n'a pas surmonté la réaction de défense du Rough lemon. Dans les mêmes conditions expérimentales, l'accumulation des coumarines est accrue par l'application de TEPA, d'éliciteurs fongiques ou d'un complexe en dérivant, avec pour conséquence l'arrêt de l'infection. Il semble donc s'agir d'un mécanisme de résistance modulable par l'application de médiateurs chimiques.

Au stade actuel des recherches il n'est pas possible

d'évaluer exactement la contribution de la séséline et des autres composés phénoliques aux propriétés curatives du TEPA en vergers (LAVILLE et CHALANDON, 1982) d'autant que ce fongicide possède des propriétés inhibitrices *in vivo*. Les investigations se poursuivent selon deux directions, d'une part l'élucidation des autres réactions de défense des Citrus contre des *Phytophthora* sp., d'autre part la recherche de méthodes de stimulation de la résistance transposable dans la pratique.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur reconnaissance à M. G. KUNESH (CNRS) qui a gracieusement fourni les substances extraites de *Calophyllum* pour les tests biologiques et pour ses conseils dans le domaine chimique ainsi que M. R. PELLETIER (ORSTOM) pour la culture des Citrus en serre et les applications de médiateurs chimiques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- AFEK (U.), SZTEJNBERG (A.) et CARMELY (S.). 1986 a.  
6,7-Dimethoxycoumarin, a Citrus phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora gummosis*.  
*Phytochemistry*, 25(8), 1855-1856.
- AFEK (U.) et SZTEJNBERG (A.). 1986 b.  
A Citrus phytoalexin, 6,7-Dimethoxycoumarin, as a defense mechanism against *Phytophthora citrophthora*, and the influence of Fosetyl Al and phosphorous acid on its production.  
*Phytoparasitica*, 14 (3), 246.
- BOMPEIX (G.) et SAINDRENAN (P.). 1984.  
*In vitro* antifungal activity of Fosetyl Al, and phosphorous acid on *Phytophthora* species.  
*Fruits*, 39 (12) 777-786.
- EBEL (J.). 1986.  
Phytoalexin synthesis : the biochemical analysis of the induction process.  
*Ann. Rev. Phytopathol.*, 24, 235-264.
- GRAY (A.I.), WAITH (R.D.), PGTGW. WATERMAN *et al.*, 1978.  
Interactions of Coumarins with lanthanite shift reagent : determination of substitution pattern.  
*J. Chem.Soc. Perkin Trans.*, 2, 391-395.
- HARTMANN (G.) and NIENHAUS (F.). 1974.  
The isolation of xanthoxylin from the bark of *Phytophthora* and *Hendersonula* infected Citrus Lemon and its fungitoxic effect.  
*Phytopath. Z.*, 81, 97-113.
- KATO (K.) 1970.  
Seselin, a chromeno coumarin.  
*Acta Crystallogr.*, sect. B, 26, 2022-2024.
- KHAN A.J., KUNESCH (G.), Sylvaine CHUILON et A. RAVISE. 1985.  
Structure and biological activity of xanthyletin, a new phytoalexin of Citrus.  
*Fruits*, 40 (12), 807-811.
- KHAN (A.J.) and RAVISE (A.). 1985.  
Stimulation of defense reaction in Citrus by fosetyl Al, and fungal elicitors against *Phytophthora* spp.  
*Commun. Coll. Int. Fungicides for Crop protection, 100 years of progress, Bordeaux, 6 september 1985.*  
Résumé in proceedings, BC PC monograph n° 31, 281-284.
- KHAN (A.J.), VERNENGI (Annie) and RAVISE (A.). 1986.  
Incidence of fosetyl Al and elicitors on the defence reactions of Citrus attacked by *Phytophthora* spp.  
*Fruits*, 41 (10), 587-595.
- LAVILLE (E.) et CHALANDON (A.). 1982.  
Synthèse des résultats obtenus avec le phosétyl Al dans la lutte contre les maladies à *Phytophthora* des agrumes.  
*Fruits*, 37 (1), 11-17.
- RAVISE (A.) et KIRKIACHARIAN (B.S.). 1976.  
Influence de la structure de composés phénoliques sur l'inhibition du *Phytophthora parasitica* et d'enzymes participant aux processus parasitaires.  
II.- Coumarines.  
*Phytopath. Z.*, 86, 314-326.
- RAVISE (A.) et KIRKIACHARIAN (B.S.). 1978.  
Influence de la structure de composés phénoliques sur l'inhibition du *Phytophthora parasitica* et d'enzymes participant aux processus parasitaires.  
III.- Homo-isoflavonones.  
*Phytopath. Z.*, 92, 36-50.
- RAVISE (A.), KIRKIACHARIAN (B.S.), CHOPIN (J.) et KUNESCH (G.). 1980.  
Composés phénoliques et analogues structuraux de phytoalexines : influence des structures et des substituants sur l'inhibition *in vitro* de micromycètes et d'enzymes lytiques.  
*Comm. au 18e Coll. de la Société française de Phytopathologie, Toulouse 17 mai 1980.*  
Résumé dans *Ann. Phytopathol.*, 12 (4), 335
- SHANBHAG (S.N.), MHESTA (C.K.), MAHESHWARJ (S.R.), TAKMIKAR (S.R.) and BHATTACHARYAYA (S.C.). 1964.  
JATASNASCIN a new terpenic coumarin from NARDOSTACHYS JATTAMANSY.  
*Tetrahedron Letters*, 2605-2615.
- SATTAR (A.), ASHRAF (M.), BHATTY (M.K.) and CHISTI (N.H.). 1978.  
 $\beta$  cyclolavandulic acid and seselin in the essential oil of *Carum roxburghianum*.  
*Phytochemistry*, 17, 559-560.
- SMITH (I.), RAVISE (A.) and BOMPEIX (G.). 1984.  
Resistance induced in higher plants by fungi.  
*Comm. Synthèse au 4e Congrès de la Fédération européenne des Sociétés de Physiologie végétale, Strasbourg 3 août 1984.*
- STOESSL (A.). 1983.  
Secondary plant metabolites in preinfectious and postinfectious resistance in the dynamics of host defence.  
*Eds. Bailey J.A. and Deverall B.J., Academic Press London.*
- TAQUET (B.), RAVISE (A.), RENARD (J.L.) et KUNESCH (G.). 1985.  
Modulation des réactions de défense du Palmier à huile contre le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis* (SCHLECHT) TOOVERY.  
Applications : prémunition et stimulation chimique.  
*Phytopath. Z.*, 112, 298-314.
- VERNENGI (Annie). 1985.  
Réactions de défense du *Lycopersicon esculentum* MILL. à des infections cryptogamiques : mises en évidence de phytoalexines et de leurs propriétés inhibitrices.  
*Thèse de 3e cycle, Université de Paris VI, 28 février 1985.*
- VERNENGI (Annie), EINHORN (J.), KUNESCH (G.), MALOSSE (C.), RAMIANDRASOA (Florence) et RAVISE (A.). 1986.  
Phytoalexines et réactions de défense de la tomate aux infections par le *Phytophthora parasitica* DAST. et par le *Verticillium albo-atrum*.  
*Can. J. Bot.*, 64, 973-982.