



**Modalités de l'obtention des nécroses bloquantes
sur feuilles détachées de Tomate
par l'action du tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium
(phoséthyl d'aluminium), hypothèses
sur son mode d'action *in vivo***

G. BOMPEIX, A. RAVISÉ *, G. RAYNAL **, F. FETTOUCHE et M. C. DURAND

Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), Laboratoire de Pathologie végétale,
tour 53, place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05

* S.S.C. de l'O.R.S.T.O.M., Laboratoire de Phytopathologie, 74, route d'Aulnay, 93140 Bondy

** I. N. A. Paris-Grignon, Laboratoire de Pathologie végétale, 78850 Thiverval-Grignon

Résumé

Le tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium (TEPA) aux concentrations de 10 à 250 µg/ml provoque chez des feuilles de Tomate infectées par des *Phytophthora* spp. l'arrêt de la progression des hyphes par une nécrose bloquante. Le TEPA, à ces mêmes doses, n'inhibe pas la croissance des *Phytophthora* spp. *in vitro*. L'acide phosphoreux, produit de dégradation du TEPA, possède des propriétés analogues. La réaction de défense induite chez la Tomate par le TEPA peut être annulée en présence d'ions phosphate. Les essais comparatifs réalisés avec diverses espèces de *Phytophthora* montrent que le TEPA agit plus sur le métabolisme des hôtes que sur celui des parasites. En effet, contrairement à ce que l'on observe avec la Tomate, le Poivron, le Haricot, le TEPA ne provoque pas de réaction de défense chez la Pomme de terre. Les études physiologiques, cytologiques et cytochimiques font présumer que les réactions de défense provoquées par le TEPA sont de même nature que les mécanismes de résistance naturelle aux infections cryptogamiques.

Introduction

Bertrand *et al.* (1977) ont mis en évidence l'action anti-mildiou du tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium ou phoséthyl d'aluminium. Cette substance est active à l'encontre des maladies des plantes maraîchères (Clergeau et Beyries, 1977), de la Vigne (Lafon *et al.*, 1977; Chazalet *et al.*, 1977; Chalandon *et al.*, 1979), des plantes fruitières (Frossard *et al.*, 1977) et des plantes ornementales (Vegh *et al.*, 1977). Cependant *in vitro*, des tests utilisant la croissance mycélienne ou des spores déjà germées auraient laissé passer le tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium (TEPA) dans les mailles de la sélection de cette substance en tant que fongicide. En effet, le TEPA inhibe peu la croissance du mycélium des agents pathogènes, notamment des *Phytophthora* spp. Par contre, ce produit est actif sur la formation des organes de reproduction asexuée comme les sporocystes et sur leur germination.

L'efficacité sur le développement des maladies pouvait donc s'expliquer par une rupture des cycles biologiques provoquant un éventuel arrêt d'une épidémie. Pour confirmer ces observations d'ordre agronomique variées semblaient manquer la poursuite

Phytophthora

N° :	2177
Cote :	B
Date :	29 DEC. 1982

d'une infection pouvait être bloquée. Autrement dit, à basse concentration, un arrêt de la croissance mycélienne pouvait être envisagé *in vivo*.

Vo-Thi-Hai, Bompeix et Ravisé (1979) ont déjà montré que sur Tomate le *Phytophthora capsici* a effectivement sa croissance mycélienne bloquée *in vivo* par des concentrations de TEPA inactive *in vitro*. Le TEPA appliqué seul sur folioles de Tomate ne provoque aucune modification de la teneur en substances inhibitrices. En revanche, sur les folioles infectées par le *P. capsici* il y a formation d'une zone nécrotique qui bloque l'évolution parasitaire. Une accumulation de composés phénoliques et de substances présumées être des phytoalexines a été constatée. Ces produits inhibent *in vitro* les *Phytophthora* spp. et semblent responsables de l'arrêt de croissance *in vivo* de l'agent pathogène en atteignant des concentrations beaucoup plus élevées que dans le témoin inoculé.

De même, dans le cas de la Vigne, le TEPA appliqué seul ne provoque pas de modification importante en composés phénoliques. En revanche, l'application du TEPA simultanément au dépôt de zoospores du *Plasmopara viticola* ou 24 h après une contamination effective, aboutit à une augmentation très nette en stilbènes (resvératrol, viniférines, stilbène non identifié) et en flavonoïdes (flavonols et C-glycosyl flavones) actifs *in vitro* sur divers micromycètes. Dans les tissus des feuilles témoins inoculées dans les mêmes conditions, ces substances sont décelées à des concentrations non fongostatiques (Raynal, Ravisé et Bompeix, 1980).

Si l'hypothèse d'une action du TEPA *via* les phytoalexines et les composés phénoliques peut être retenue, des vérifications sont encore nécessaires. De nombreuses questions sont à résoudre concernant l'établissement de la nécrose bloquante : spécificité du phénomène, action des facteurs de l'environnement expérimental ; enfin, un examen plus approfondi de la genèse des nécroses bloquantes nous a paru indispensable en utilisant simultanément les techniques biochimiques et celles de la microscopie électronique. Pour sa facilité d'emploi, le modèle Tomate — *Phytophthora* spp. — a principalement été utilisé.

Matériel et méthodes

1. — Le matériel végétal

Nos expériences sont réalisées avec des cultivars de Tomate différant entre eux par l'absence de caractères de résistance à des maladies cryptogamiques — Marmande, Supermarmande (tolérance en laboratoire à des *Phytophthora*) — ou par la présence de gènes de résistance — Roma (allèle I de résistance à la race 1 du *Fusarium oxysporum lycopersicum*), Piéraline (PH + S au *Phytophthora* infestans, V₆ au *Verticillium albo atrum*). Des recherches complémentaires sont réalisées avec le Poivron — cultivar Yolo wonder sensible au *P. capsici* —, la Pomme de terre — cultivars Bintje et Roseval sensibles au *P. infestans* —, le Haricot — 2 lignées isogéniques Coco RZA différant par leur réaction au *Colletotrichum lindemuthianum*.

Les plantes sont cultivées en pots sur de la vermiculite dans une enceinte à température constante, 24 °C, avec un éclairage de 14 h par jour fourni par des rampes « blanc industrie ». L'apport d'éléments minéraux est réalisé à l'aide d'une solution nutritive de Nitsch (Bilderling *et al.*, 1976).

2. — Les agents pathogènes

Les souches de *Phytophthora* proviennent des collections du laboratoire de Paris VI — *P. cactorum*, *P. cryptogea*, *P. fragariae*, *P. infestans*, *P. syringae* —, de l'O.R.S.T.O.M. — *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. cinnamomi* — et du C.B.S. à Baarn — *P. megasperma* var. *sojae*.

Pour les infections expérimentales, les implants de taille et d'âge standardisés, proviennent de cultures en boîtes de Petri sur milieu V8 gélosé et tamponné avec du phosphate bipotassique.

3. — Les tests d'activité du fongicide

Les essais d'inhibition concernent la croissance pondérale et la croissance radiale des différentes espèces de *Phytophthora in vitro*.

La croissance pondérale des souches de *Phytophthora*, avec ou sans TEPA, est évaluée après incubation dans des fioles cylindro-coniques de 50 ml contenant 19 ml de milieu synthétique liquide (Ravisé, 1972 ; Pellegrin, 1975). L'inoculum est constitué d'implants de 4 mm de diamètre prélevés en boîtes de Petri (cf. *supra*). Après 3 jours de culture, 1 ml d'eau distillée est rajouté dans les fioles témoins tandis que les flacons d'essais reçoivent 1 ml de solution de TEPA dont les concentrations finales varient de 10 à 1 000 μg par ml de milieu. Après 72 h d'incubation, la masse mycélienne est séparée par filtration sur verre fritté et sous vide, rincée trois fois à l'eau distillée stérile puis placée en étuve à 70 °C pendant 48 h. Le poids de mycélium sec recueilli est exprimé en mg par ml de milieu.

La modification de la croissance mycélienne linéaire par l'adjonction de TEPA est appréciée sur des cultures en boîtes de Petri contenant du milieu V8 à pH = 7. Les implants, identiques à ceux utilisés en milieu liquide, sont mis à incuber à 28 °C. Lorsque les thalles atteignent 10 mm de diamètre, ils sont prélevés avec une marge de 10 mm de gélose et transférés dans des boîtes de Petri contenant des solutions stériles de TEPA avec la même gamme de concentrations que ci-dessus. La croissance mycélienne, exprimée par la moyenne de deux diamètres perpendiculaires est mesurée chaque jour et comparée à celle de témoins placés sur eau distillée.

4. — Les infections expérimentales

Les techniques d'inoculation ont été décrites précédemment (Vo-Thi-Hai *et al.*, 1979). Les infections expérimentales sont réalisées sur des folioles de Tomate prélevées 30 à 40 jours après la levée. Il en est de même pour la Pomme de terre tandis que pour le Haricot les folioles sont prélevées sur des plants âgés de 3 semaines. Après une désinfection superficielle suivie de rinçages à l'eau distillée, les folioles sont placées en boîtes de Petri sur des solutions de TEPA à des concentrations de 10 à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tamponnées par l'acide morpholino-2-éthane sulfonique (MES) à 24 °C et sous éclairage constant de 500 lx/m². Des inoculations expérimentales sont également réalisées en chambre d'incubation sur le feuillage de plants de Tomate, au même stade de développement, afin de vérifier la reproductibilité des phénomènes observés sur les folioles en survie.

5. — Recherche des substances inhibitrices

Les tissus foliaires sont conservés dans l'acétate d'éthyle à — 18 °C en congélateur. Après dilacération à basse température à l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax, l'extrait

total est filtré sur millipore ; une partie des pigments est éliminée par précipitation dans l'hexane. L'extrait est ensuite chromatographié soit sur colonnes soit sur plaques. Les fractions recueillies sont analysées en chromatographie sur couche mince de silice et utilisées pour des tests de toxicité pour le *P. parasitica* et le *P. capsici* *in vitro*. Les dosages de substances toxiques sont réalisés selon les méthodes décrites précédemment (Davet et Ravisé, 1976; Vo-Thi-Hai *et al.*, 1979). Les groupes de produits actifs font l'objet de tentatives de purification par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec un appareil Chromatem équipé de colonnes de silice. Les éluants correspondent principalement à des mélanges benzène-acétate d'éthyle, hexane-acétate d'éthyl et méthanol en proportions variables. Les quantités de substances recueillies sont déterminées avec un détecteur spectrophotométrique dans l'ultra-violet puis, quand les quantités le permettent, par pesée.

6. — Etudes cytologiques et cytochimiques des interactions hôte-parasite

Ces travaux font l'objet d'une publication séparée où est exposé l'ensemble des techniques expérimentales (Durand et Salle, à paraître).

Résultats

1. — Effet du Tepsa sur la croissance des *Phytophthora* spp.

Les résultats obtenus corroborent les études précédentes (Vo-Thi-Hai, 1979; Vo-Thi-Hai *et al.*, 1979). Ils sont analogues pour toutes les souches étudiées appartenant à dix espèces différentes.

Le TEPA, à des concentrations comprises entre 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$, n'influe pas sur la croissance radiale et sur la croissance pondérale. Celle-ci est plus affectée par des concentrations comprises entre 100 et 250 $\mu\text{g/ml}$ comme l'indique la figure 1. Des

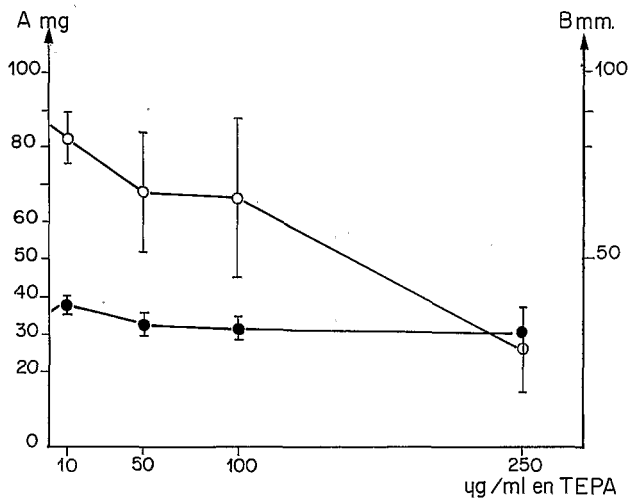


FIG. 1. — Effet de l'éthyl phosphite d'aluminium sur la croissance mycélienne *in vitro* du *P. capsici*.

- A : ○ — ○ croissance pondérale en 72 h exprimée en mg.
 B : ● — ● croissance linéaire en 72 h exprimée en mm.

concentrations en TEPA de 500 µg/ml ralentissent seulement la croissance radiale des souches étudiées.

2. — Effet du pH et de la nature des tampons

Nous avons vérifié que les interactions hôte-parasite provoquées par le TEPA dans les folioles en survie ne dépendent pas de phénomènes physico-chimiques. Pour cela, des folioles de Tomate inoculées par le *P. capsici* sont placées en incubation dans trois solutions tampons : de Sorensen (phosphates) aux pH de 5, 6, 6,5, 7,2, de Gomori (tris hydroxy-méthyl aminométhane) à pH = 7,2, de Walpole aux pH de 5, 6, 6,5 (acétate de sodium, acide acétique). Le tableau 1 indique l'évolution des nécroses

TABLEAU 1

Croissance mycélienne du P. capsici dans les folioles de tomate flottant sur différentes solutions tamponnées (22 °C lumière continue)

Tampons	pH	Nombre total de folioles	p. 100 infection	Vitesse de croissance en mm		Croissance totale sur 96 h
				0 à 48 ^e h	48 ^e à 96 ^e h	
MES	5,0	40	100	14,7 A	—	—
	6,0		100	15,7 A	—	—
	6,5		100	15,2 A	—	—
	7,2		100	13,3 A	—	—
TRIS	7,2	30	83,3	8,0 C	10,9 B	18,9 B
Sorensen	5,0	40	100	15,0 A	26,1 A	41,1 A
	6,0		100	15,9 A	25,8 A	41,7 A
	6,5		100	13,3 A	24,6 A	37,9 A
	7,2		100	15,8 A	30,6 A	46,4 A
Walpole	5,0	30	←———— phytotoxique —————→			
	6,0					
	6,5					
Eau distillée		50	36,0	11,8 B	13,5 B	25,3 B

(Les folioles utilisées dans cet essai sont âgées de 30 j.)

(Les valeurs suivies d'une lettre identique ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 0,05 p. 100.)

comparativement au tampon MES utilisé dans tous nos essais. La croissance du *P. capsici* est meilleure en présence des tampons Sorensen et MES. Le tampon de Gomori provoque un ralentissement de l'agent pathogène dans les tissus. Le tampon de Walpole est fortement phytotoxique pour les folioles de Tomate. Dans la gamme de pH utilisée, aucune variation n'a été observée après l'obtention des nécroses bloquantes.

3. — Effet de la concentration en TEPA sur l'évolution de la réaction de l'hôte

Les folioles de Tomate sont transférées sur des solutions de TEPA aux concentrations de 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500 et 1 000 µg/ml, aussitôt après le dépôt d'implants de *P. capsici*. Les observations sont pratiquées après 48 et 60 h d'incubation. Le tableau 2 récapitule les résultats obtenus avec trois tampons différents.

TABLEAU 2

Effet des concentrations en TEPA sur les folioles de Tomate

TABLEAU 2.		Concentration en TEPA en $\mu\text{g/ml}$				250 à 1000
		10	100	150	200	
TEPA + SORENSEN pH 7,2	48 h	0(5) — —	0(3) 0(2) —	0(5) —	0(5) —	0(5)
	60 h	0(3) 0(2) —	0(1) 0(4) —	0(5) —	0(5) —	0(5)
TEPA + TRIS pH 7,2	48 h	0(5) — —	0(3) 0(2) —	0(5) —	0(5) —	0(5)
	60 h	0(4) 0(1) —	0(3) 0(2) —	0(5) —	0(5) —	0(5)
TEPA + MES pH 7,2	48 h	0(5) — —	0 0(3) —	0(2) 0(3) —	0(5) —	0(5)
	60 h	0(3) 0(2) —	0 0(4) —	0 —	0(5) —	0(5)

0 : absence d'infection. 0 : progression parasitaire.



0 : progression parasitaire limitée par une nécrose bloquante.
(n) : effectifs de folioles exprimés en dizaines.

Au contact d'une solution de TEPA à 10 $\mu\text{g/ml}$, aucune nécrose bloquante ne se forme en 48 h ; les réactions nécrotiques interviennent le plus souvent vers 60 h d'incubation. Par contre, à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$, le TEPA provoque l'apparition de nécroses bloquantes en moins de 48 h. Aux concentrations en TEPA supérieures à 100 $\mu\text{g/ml}$, correspondent des symptômes de mildiou très atténués.

4. — Incidence de l'acide phosphoreux sur les phénomènes de résistance

D'après les travaux effectués par la Société Rhône Poulenc, les ions phosphite provenant de la dégradation du TEPA dans les tissus végétaux seraient les métabolites modifiant l'interaction entre l'hôte et le parasite. C'est pourquoi nous avons tenté d'apprécier le rôle de l'acide phosphoreux, malgré sa toxicité, en l'incorporant aux concentrations de 5, 10, 100, 250 et 500 $\mu\text{g/ml}$ dans un tampon MES à $\text{pH} = 7,2$. Les folioles sont transférées sur ces solutions aussitôt après leur inoculation. Dans ces

conditions expérimentales, des nécroses bloquantes apparaissent après 60 h d'incubation avec une concentration de 5 µg/ml. Leur délai de formation est réduit à 48 h aux concentrations de 10 et de 100 µg/ml ; au-delà, l'acide phosphoreux provoque rapidement des nécroses de tissus. Le tableau 3 illustre ces résultats.

TABLEAU 3

	Acide phosphoreux µg/ml				Phytotoxicité
	5	10	100	250 à 500	
48 h	0(5) — —	0(4) $\overline{0(1)}$ —	— $\overline{0(3)}$ 0(2)		
60 h	0(2) $\overline{0(3)}$ —	— $\overline{0(5)}$ —	— $\overline{0(5)}$ —		

Obtention de nécroses bloquantes avec l'acide phosphoreux sur le cv. Pieraline (5 folioles dans chaque condition). L'acide phosphoreux est en solution dans un tampon MES pH 7,2. Le transfert est direct.

0 correspond à une croissance in vivo de 2 à 3 mm. $\overline{0}$: nécrose bloquante.

Ainsi, l'acide phosphoreux possède des propriétés semblables à celles du TEPA formulé à 80 p. 100 de matière active. En procédant à des vérifications complémentaires avec du TEPA purifié, nous avons contrôlé que la « charge » du fongicide n'interfère pas avec ses propriétés biologiques et ne modifie pas sa toxicité. Il semble donc que la lente dégradation du TEPA en acide phosphoreux à la fois dans les solutions de tampon et dans les tissus des folioles atténue la phytotoxicité d'où la possibilité d'utilisation à des doses de 500 et de 1 000 µg/ml.

5. — Etude de l'antagonisme des ions phosphite-phosphate

Par ces essais présentés dans le tableau 4, nous avons voulu, d'une part, confirmer l'hypothèse du rôle biologique des ions phosphite et, d'autre part, démontrer *in situ* un éventuel antagonisme des ions phosphate possédant une structure voisine de celle des métabolites actifs.

TABLEAU 4

Annulation de l'effet du TEPA (250 µg/ml) par les ions phosphates sur feuilles de plants de 40 jours

Solutions	Nombre de folioles	48 h	96 h
Tampon phosphate 1/15 M (Sorensen) + TEPA	20	0(20) —————→	infection
Tampon phosphate	20	0(20) —————→ TEPA	————→ $\overline{0(20)}$
Eau distillée	20	0(20) —————→	infection
TEPA	20	0 —————→ Tampon phosphate	————→ 0 (non réversibilité)

Inoculé sur des folioles au contact de tampon phosphate, le *P. capsici* progresse à la même vitesse que dans les tissus de folioles en survie sur eau distillée. Alors que l'incubation sur tampon Sorensen à 1/100 M ne perturbe pas l'action du TEPA *in situ*, celle-ci est bloquée en présence du même tampon à une concentration de 1/15 M. L'action antagoniste des ions phosphate n'est pas rémanente : le transfert de folioles après 48 h d'incubation sur une solution de phosphate, dans une solution de TEPA déclenche alors, sans exception, la formation de nécroses bloquantes. Nous avons par ailleurs établi que l'évolution des réactions nécrotiques n'est pas perturbée par un retour sur solution de phosphate. L'action du TEPA dans les tissus persiste après 48 h de contact lors du transfert des folioles sur une solution de phosphate.

6. — Incidence du TEPA sur la réaction de la plante-hôte

Nous avons étudié l'action du TEPA dans deux types d'infections expérimentales :

a) le cas de cultivars, sensibles ou résistants, d'un même hôte — la Tomate — confrontés à dix espèces de *Phytophthora* parasites naturels ou non inféodés à cette plante ;

b) le cas de trois hôtes différentiels dont deux solanacées, le Poivron et la Pomme de terre, confrontés à au moins un *Phytophthora* inféodé à chacun d'eux. Le troisième hôte est le Haricot, attaqué par des *Phytophthora* du groupe *palmivora* en particulier au Moyen-Orient, confronté au *P. capsici*.

L'application de TEPA sur des folioles de Tomate maintenues en survie sur solution tamponnée provoque des réactions analogues avec des cultivars sensibles — Marmande — ou possédant des caractères de résistance au mildiou — Piéraline —. Des concentrations en TEPA de 100 à 250 µg/ml entraînent dans un délai de 1 à 3 jours l'arrêt de la croissance mycélienne dans les tissus des limbes. Les modalités de l'inhibition paraissent identiques quelle que soit l'espèce confrontée : *Phytophthora* parasites

TABLEAU 5

Résistance de divers cultivars de Tomate et de Pomme de terre, au *P. capsici* et au *P. infestans*, en présence de TEPA

Feuilles détachées des cultivars	<i>P. capsici</i> (isolé de Tomate)		<i>P. infestans</i> (isolé de Tomate)		
	pathogénie en présence du tampon MES	pathogénie après transfert sur TEPA 250 µg/ml	pathogénie en présence de tampon MES	pathogénie après transfert sur TEPA 250 µg/ml	
Tomate {	Piéraline (1)	S+	Ri	R	R
	Supermarmande (2)	S+	Ri	R	R
	Marmande (3)	S+	Ri	S	Ri
	Roma (3)	S+	Ri	S+	Ri
Pomme de terre {	Bintje	S+	S+	S+	S+
	Roseval	S	S	S	S

(1) Système polygonique de (Ph + S), résistant à *P. infestans*.

(2) Tolérance à divers *Phytophthora* spp., observée en laboratoire.

(3) Sensible à *P. infestans*.

S+ très sensible, S sensible, R résistance naturelle, Ri résistance induite par le TEPA.

de la Tomate tels que *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. capsici*, *P. infestans* ou bien adaptés à d'autres hôtes comme les *P. cactorum*, *P. cryptogea*, *P. fragariae*, *P. syringae*, *P. cinnamomi*, *P. megasperma* var. *sojae*.

Les réactions nécrotiques sur feuilles de Poivron maintenues en survie dans les mêmes conditions et inoculées avec le *P. capsici* sont identiques à celles observées ci-dessus. Sur feuilles détachées de Haricot — 2 lignées isogéniques de Coco RZA l'une sensible, l'autre résistante à l'antracnose — le *P. capsici* peut provoquer des nécroses bloquantes. Cette réaction de défense plus lente n'intervient que 4 à 5 jours après l'infection expérimentale. Elle dépend, en outre, de l'agressivité des deux isolats de *P. capsici* inoculés. Les nécroses bloquantes ne se forment qu'en présence de la souche la moins agressive.

Enfin, sur feuilles de Pomme de terre provenant des cultivars Bintje et Roseval, l'application de TEPA n'a jamais provoqué la formation de nécroses bloquantes en réaction aux infections provoquées par le *P. palmivora*, le *P. capsici* et le *P. infestans* (tabl. 5).

7. — Modifications physiologiques associées à l'action du TEPA

La mise en survie des folioles de Tomate sur TEPA ne modifie pas de façon significative les teneurs en composés phénoliques des tissus par rapport aux séries témoins maintenues sur eau distillée.

La réaction aux blessures se traduit par un doublement des concentrations en substances phénoliques. L'inoculation du *P. capsici*, après blessure, provoque une accumulation de ces composés dont les concentrations sont approximativement quadruplées par rapport au témoin. Toutefois, ces réactions n'entravent pas la progression des hyphes du parasite dans les tissus. Dans le cas des feuilles blessées et inoculées en survie sur solution de TEPA les stimulations de synthèse sont accrues : les teneurs en substances phénoliques sont multipliées par six par rapport au témoin dans la zone de la nécrose bloquante, par quatre à sa périphérie. Au stade actuel de nos investigations, les substances phénoliques accumulées en réaction aux blessures et aux infections expérimentales avec ou sans TEPA correspondent principalement à des acides cinnamiques comme nous l'avons observé précédemment (El Khatib *et al.*, 1974a). Au cours de l'incubation, il s'accumule aussi dans les feuilles inoculées des substances décrites comme des phytoalexines (Ravisé et Trique, 1972a et 1972b ; El Khatib *et al.*, 1974b). Elles correspondent à des composés phénoliques et à des substances terpéniques. D'une façon globale, leurs concentrations sont deux fois plus importantes dans les feuilles infectées placées sur TEPA que dans celles maintenues sur eau distillée. Deux groupes principaux de produits sont séparés par chromatographie sur plaques de silice avec l'hexane pour éluant à des R_f de l'ordre de 0,15 et de 0,80. Dans ce dernier cas, il s'agit de substances entraînées par des lipides, leur mode de liaison n'étant pas encore défini. Les séparations ultérieures en HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) mettent en évidence l'accumulation de produits non décelés dans les tissus des folioles servant de témoin. La figure 2 indique, à titre d'exemple, les produits obtenus lors de la séparation de fractions (préparées en CCM (chromatographie sur couche mince)) sur colonne de silice avec un mélange hexane-acétate d'éthyle (5:1) pour éluant. Lorsque les techniques de purification le permettront, ces substances feront l'objet d'études de chimie structurale.

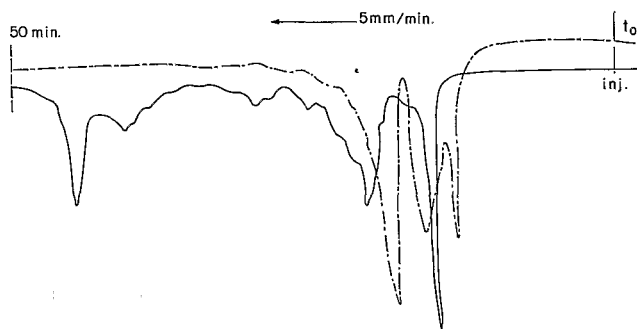


FIG. 2. — Chromatographie en HPLC d'extraits de folioles de tomate Piéraline après une première séparation en CCE dans un mélange heptane-acétate d'éthyle (100 : 15).

· — · — · : Témoin non inoculé, folioles en survie sur eau distillée ;

— : folioles blessées et inoculées par le *P. capsici*, en survie sur solution de TEPA à 100 µg/ml.

La colonne, montée sur un appareil Chromatem, a un demi-pouce de diamètre et 50 cm de long, elle est chargée de silice de 10 µm.

L'éluant est un mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle (100 : 20) au débit de 2 ml/min.

Le détecteur spectrophotométrique est réglé à 300 nm.

L'enregistrement correspond à un défilement de 5 mm/min.

8. — Modifications cytologiques décelées au niveau des nécroses bloquantes

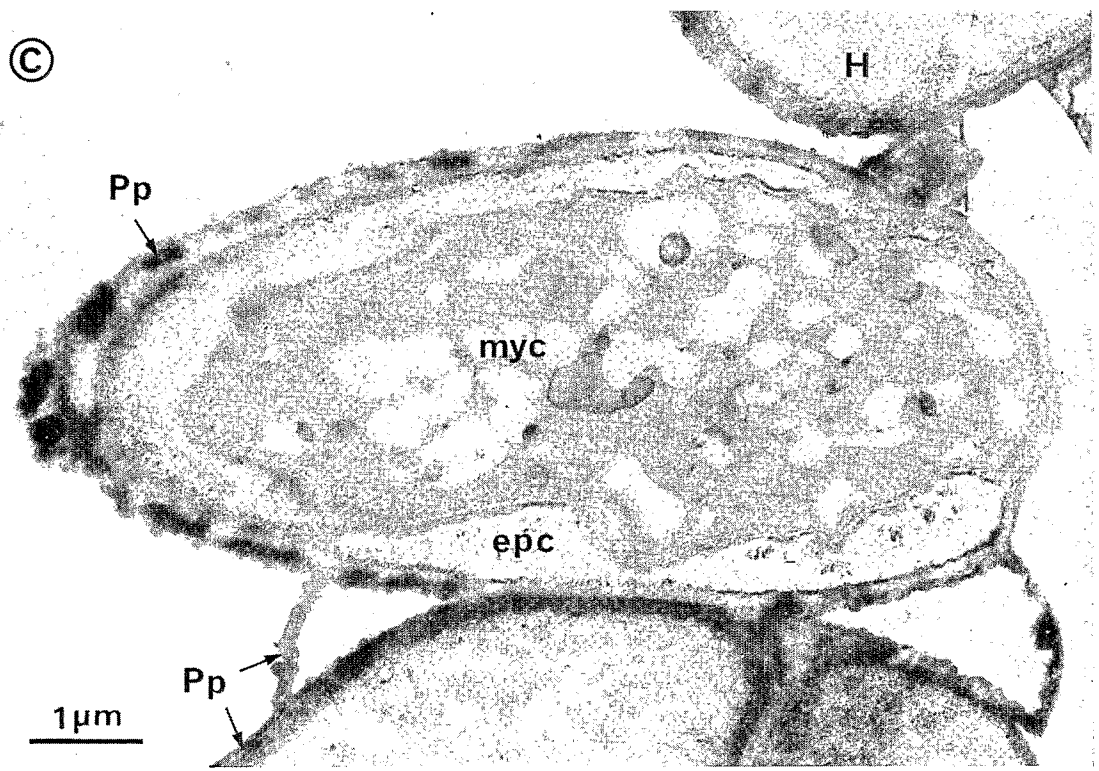
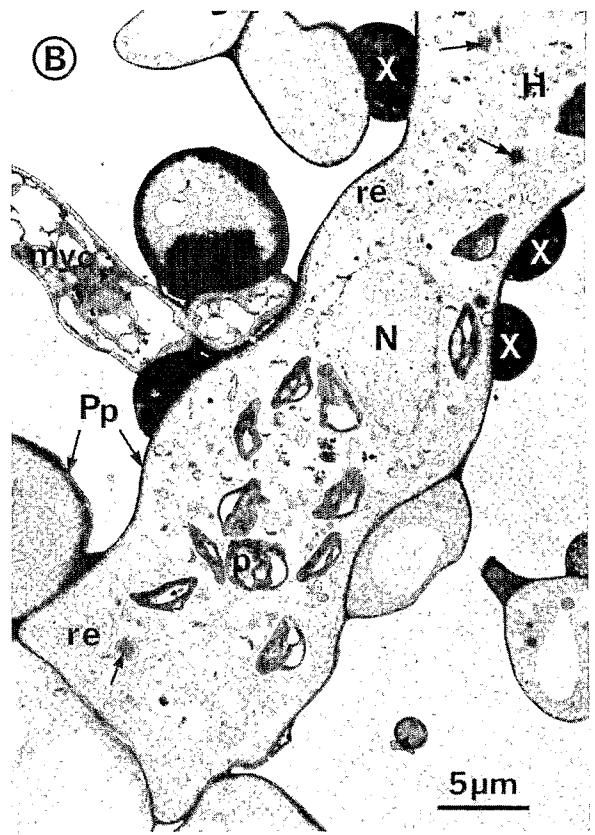
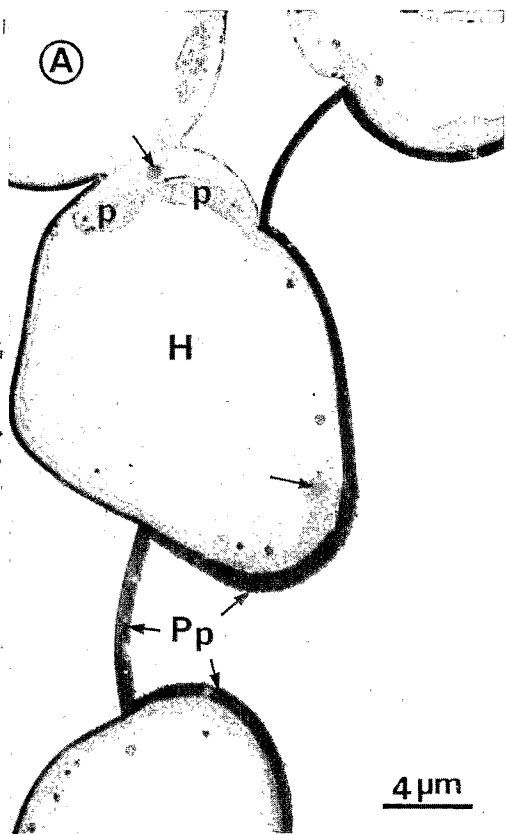
Bien que l'ensemble de cette étude fasse l'objet d'une publication séparée (Durand et Sallé, à paraître) nous en indiquons les principales conclusions illustrées par la figure 3 car elles corroborent les résultats des autres expériences.

La nécrose bloquante est caractérisée par la formation autour des cellules de la plante-hôte et des hyphes du parasite d'une bande osmiophile et de glomérules — corps X — également osmiophiles, contenant d'après les tests cytochimiques des substances phénoliques. Nous rappelons succinctement que les folioles du témoin traitées par le TEPA ne présentent pas de bande osmiophile ni de corps X. Ces éléments sont peu nombreux dans les tissus des cultivars sensibles, inoculés par des *Phytophthora* spp. et maintenus en survie sur eau distillée. Par contre, des réactions similaires sont observées dans les phénomènes de résistance spécifique à la cladosporiose.

Le dépôt de ces substances à la surface externe des parois des cellules hôtes s'accompagne de modifications du cytoplasme notamment une forte augmentation

FIG. 3. — Zone nécrotique bloquante, 72 h après traitement par le TEPA de la foliole infectée.

- A. Aspect du dépôt de polyphénols à la surface des cellules-hôtes situées à la limite externe des nécroses bloquantes : H = cellule-hôte ; flèches = microbodies ; Pp = polyphénols osmiophiles ; p = plastes.
- B. Cellule du parenchyme lacuneux avec de nombreux corps X à la surface : x = corps X ; N = noyau ; re = réticulum endoplasmique (noter sa richesse) ; autres références, cf. *supra*.
- C. Détail de l'aspect d'un hyphe de l'agent pathogène après un test PATAG : epc = espace péricellulaire très dilaté, contenant une substance légèrement réactive, vraisemblablement de la callose ; myc = mycélium ; Pp = les polyphénols entourant l'hyphe mycélien et les cellules hôtes adjacentes réagissent à ce test.



du nombre des profils du réticulum endoplasmique ainsi que l'accumulation de produits de nature phénolique dans les vacuoles puis dans l'espace périplasmique dilaté. Il semble que les substances phénoliques d'abord accumulées dans les vacuoles migrent à travers le cytoplasme avant d'être regroupées dans l'espace périplasmique et enfin de traverser la paroi. La formation de globules osmiophiles puis de la bande osmiophile résulterait de leur polymérisation.

Les glomérules — corps X — traités à l'acide périodique ou par une solution de protéinate d'argent sont plus contrastés dans la zone nécrotique bloquante qu'en avant de celle-ci. Ces observations indiquent une accumulation de composés phénoliques dans les corps X essentiellement au niveau de la nécrose bloquante.

Lorsque le mycélium entre en contact avec les produits osmiophiles, une substance qui est vraisemblablement de la callose se dépose entre le plasmalemma et la paroi du champignon ; cette paroi des hyphes est souvent épaissie. Ces indices suggèrent la mise en place par le parasite d'une réaction de défense contre l'effet toxique de la bande osmiophile. Cependant, la réaction ne s'avère pas suffisamment efficace pour assurer une protection des hyphes mycéliens. Au-delà de 48 h la majorité des filaments est entourée par la bande osmiophile, leur cytoplasme est très vacuolisé, les crêtes des mitochondries ne sont pas visibles. Trois jours après le traitement par le TEPA, les hyphes mycéliens ne sont jamais rencontrés en avant de la zone nécrotique bloquante et sont très peu nombreux dans celle-ci. Tous les filaments entourés par la bande osmiophile sont dégénérescents ; il en est de même de ceux situés dans l'espace intercellulaire et sans contact avec les sécrétions osmiophiles. Cette observation nous laisse présumer la diffusion des substances toxiques agissant comme des phytoalexines.

Discussion. Conclusion

La reprise des études de toxicité du TEPA sur plusieurs espèces de *Phytophthora* confirme les résultats acquis antérieurement (Vo-Thi-Hai, 1979 ; Vo-Thi-Hai *et al.*, 1979). En particulier, aux plus faibles concentrations — de 10 à 50 $\mu\text{g/ml}$ — déclenchant la formation des nécroses bloquantes, le TEPA ne réduit pas la croissance radiale et faiblement la croissance pondérale du *P. capsici in vitro*. Dans les folioles de Tomate, les variations de la cinétique d'établissement de la nécrose bloquante aux concentrations en TEPA de 10 à 100 $\mu\text{g/ml}$ tendent à indiquer que celle-ci ne résulte pas d'un ralentissement de la croissance du parasite *in situ*.

Nos expériences tendent à indiquer que le produit actif serait l'acide phosphoreux provenant de la lente dégradation du TEPA dans les solutions tamponnées ou dans les fissus. Le produit de dégradation du TEPA *in vitro* n'est pas fongistatique dans la gamme de concentrations en produit commercial utilisées. Dans ces mêmes conditions, le TEPA ou ses dérivés ne perturbent pratiquement pas le métabolisme dans les folioles de Tomate traitées mais non inoculées.

Au stade actuel des investigations, le TEPA semble agir sur la confrontation des métabolismes de l'hôte et du parasite. L'expression de cette potentialité paraît durable puisque la nécrose bloquante peut être déclenchée soit lors de l'inoculation expérimentale soit à différents stades de l'infection. Toutefois, l'action du TEPA peut être annulée à toutes ces étapes par l'apport simultané d'ions phosphate. Étant donné les fonctions et localisations de ces ions, deux hypothèses seraient à envisager pour la

recherche chez l'hôte de la cible du TEPA soit au niveau membranaire (Grunwald, 1975) soit au niveau nucléaire (Hadwiger et Schwochau, 1971 ; Hadwiger, von Broemb-sen et Eddy, 1973 ; Hadwiger et Adams, 1978).

Les résultats des applications de TEPA sur une gamme d'hôtes — Tomate, Poivron, Pomme de terre, Haricot — inoculés avec des *Phytophthora* leur étant inféo-dés ou non pathogènes, tendent à démontrer que la formation des nécroses bloquantes dépend plus du patrimoine de l'hôte que de celui du parasite. En effet, les souches de *Phytophthora* inoculées possèdent les mêmes systèmes d'éliciteurs et de répresseurs qui, dans les interactions naturelles, peuvent déclencher les réactions de défense de l'hôte. Or, si le TEPA provoque une réaction de défense au *P. capsici* ou au *P. infestans* chez des cultivars de Tomate et de Poivron sensibles à ces parasites, il est sans effet lors de la confrontation de deux cultivars de Pomme de terre avec le *P. infestans* ainsi qu'avec deux autres *Phytophthora*. Avec les deux lignées isogéniques de Haricot, différant par leur sensibilité à l'antracnose, le TEPA a provoqué des réactions semblables, l'éta-blisement de la nécrose bloquante dépendant de l'agressivité des souches de *P. cap-sici* inoculées. Ces résultats font présumer que le TEPA interfère différemment avec les caractères de résistance de ces plantes et qu'à la limite, dans le cas de la Pomme de terre, la stimulation des mécanismes de défense ne soit pas induite.

Chez la Tomate, les processus d'établissement des nécroses bloquantes sont identiques quelles que soient les souches inoculées appartenant à dix espèces de *Phytophthora*. L'application de TEPA provoque une réaction de défense chez des cul-tivars dépourvus de caractères de résistance. Les modifications physiologiques qui en résultent sont comparables à celles intervenant dans la confrontation de cultivars possédant soit des allèles de résistance au *P. infestans* soit différents systèmes poly-géniques de résistance à plusieurs agents pathogènes (Ravisé et Trique, 1972a ; El Khatib *et al.*, 1974a ; Davet et Ravisé, 1976). Enfin, nos études cytologiques et cyto-chimiques confirment l'identité des réactions de défense induites par le TEPA avec celles de résistance spécifique de la Tomate à la cladosporiose (Lazarovits et Higgins, 1976a et b) où interviennent également des phytoalexines (de Wit et Flach, 1979).

C'est pourquoi nous envisageons d'approfondir l'étude du mode d'action du TEPA sur les interactions entre des phycomycètes et leurs plantes-hôtes en vue d'élu-cider certains des mécanismes contribuant au déclenchement des réactions naturelles de défense chez les plantes cultivées.

Summary

Blocking necrosis formation in Tomato leaves infected by Phytophthora spp. after treatment by aluminium tris-O-ethyl phosphonate (ATEP)

Applied on Tomato leaves with concentrations ranging from 10 to 250 µg/ml, at the time of ino-culation by *Phytophthora* spp. or 1 to 4 days after, ATEP strongly reduces the infection which is stopped in 48 hrs by a blocking necrosis. *In vitro* the growth of the pathogen is not inhibited by these concen-trations of ATEP. Phosphorous acid, a product of degradation of ATEP, is also effective against *Phyto-phthora*. The mechanisms of defence induced by ATEP are also suppressed by phosphate ions. Compara-tive infections by ten species of *Phytophthora* show that ATEP interferes more with the hosts' metabolism than with the parasites' metabolism. We observe blocking necrosis formation with Tomato, Pepper, French Bean, but ATEP is unable to trigger the same reaction in Potato leaves. The data of physiological, cytological and cytochemical studies support the hypothesis that the mechanisms of defence induced by ATEP are similar to those of natural reactions of plants against parasitic fungi.

Références bibliographiques

- BERTRAND A., DUCRET J., DEBOURGE J. C., HORRIÈRE D., 1977. Etude des propriétés d'une nouvelle famille de fongicides : les mono-éthyl phosphites métalliques. Caractéristiques physicochimiques et propriétés biologiques. *Phytiatr.-Phytopharm.*, **26**, 3-18.
- BILDERLING N., LOURTIOUX A., 1976. Quinze années de phytotronique, étude de biologie végétale. « Hommage au Professeur Pierre Chouard », Paris, 331-341.
- CHALANDON A., CRISINEL P., HORRIÈRE D., 1979. Control of Vine downy mildew with formulations of aluminium tris (ethyl phosphonate). Proceedings 1969 British Crop Protection Conference, *Pests diseases*, **2**, 347-352.
- CHAZALET M., CRISINEL P., HORRIÈRE D., THIOLLIÈRE J., 1977. Résultats de l'expérimentation réalisée avec les éthyl-phosphites contre différentes maladies de la Vigne. *Phytiatr. - Phytopharm.*, **26**, 41-54.
- CLERGEAU M., BEYRIES A., 1977. Etude comparée de l'action préventive et du pouvoir systémique de quelques fongicides nouveaux (phosphite, prothiocarbe). *Phytiatr.-Phytopharm.*, **26**, 73-83.
- DAVET P., RAVISÉ A., 1976. Inhibition du *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes, du *Pyrenochaeta lycopersici* Schneider et Gerlach et de leurs enzymes pectinolytiques par les substances élaborées chez quelques *Lycopersicum* Mill. en réaction à l'infection par le complexe parasitaire des racines. *C. R. Acad. Sci., Sér. D*, **282**, 1351-1354.
- DURAND M. C., SALLÉ G., 1981. Effet du tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium sur le couple *Lycopersicum esculentum* Mill. (var. Piéraline)-*Phytophthora capsici* Léon. Etude cytologique et cytochimique. *Agronomie* (sous presse).
- EL KHATIB A., ARAMOUNI A., HASSAN A., RAVISÉ A., 1974a. Réactions aux attaques fongiques chez quelques variétés de tomates et évolution de leur teneur en composés phénoliques et phytoalexines. *C. R. Acad. Sci., Sér. D*, **278**, 2795-2798.
- EL KHATIB A., ARAMOUNI A., HASSAN A., RAVISÉ A., 1974b. Accumulation de composés phénoliques et de phytoalexines par des variétés de Tomate cultivée sur des sols infectés au Liban. *Phytopathol. Z.*, **81**, 23-37.
- FROSSARD P., HAURY A., LAVILLE E., 1977. Résultats préliminaires concernant l'activité de l'éthyl phosphite d'aluminium sur les maladies à *Phytophthora* des Agrumes, de l'Avocatier et de l'Ananas. *Phytiatr.-Phytopharm.*, **26**, 55-61.
- GRUNWALD C., 1975. Plant sterols. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 209-236.
- HADWIGER L. A., SCHWOCHAU M. E., 1971. Specificity of DNA intercalating compounds in the control of phenylalanine ammonia lyase and pisatin levels. *Plant Physiol.*, **47**, 588-590.
- HADWIGER L. A., von BROEMBSEN S., EDDY R. jr, 1973. Increased template activity in chromatin from cadmium chloride treated pea tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **50**, 1120-1128.
- HADWIGER L. A., ADAMS M. J., 1978. Nuclear changes associated with the host-parasite interaction between *Fusarium solani* and peas. *Physiol. Plant Pathol.*, **12**, 63-72.
- LAFON R., BUGARET Y., BULIT J., 1977. Nouvelles perspectives de lutte contre le mildiou de la Vigne (*Plasmopara viticola* (B. C.) Berlese et de Toni) avec un fongicide systémique, l'éthyl-phosphite d'aluminium. *Phytiatr.-Phytopharm.*, **26**, 19-40.
- LAZAROVITS G., HIGGINS V. J., 1976a. Histological comparison of *Cladosporium fulvum* race 1 on immune, resistant and susceptible Tomato varieties. *Can. J. Bot.*, **54**, 224-234.
- LAZAROVITS G., HIGGINS V. G., 1976b. Ultrastructure of susceptible, resistant and immune reactions of Tomato to races of *Cladosporium fulvum*. *Can. J. Bot.*, **54**, 235-249.
- PELLEGRIN F., 1975. Etude du degré de ploïdie chez *Phytophthora palmivora* et *Phytophthora parasitica*. DEA, Amélior. plantes, Orsay.
- RAVISÉ A., 1972. Observations sur la nutrition de souches de *Phytophthora* de Bary parasites de cultures tropicales. *Agron. Trop.*, **27**, 310-320.
- RAVISÉ A., TRIQUE B., 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.
- RAVISÉ A., TRIQUE B., 1972b. Réactions de plantules de *Gossypium* L. au parasitisme de *Phytophthora* de By. Propriétés de composés phénoliques élaborés par des plantules de *Gossypium* L. et de *Lycopersicum* Mill. *Coton et Fib. Trop.*, **27**, 295-310.
- RAYNAL G., RAVISÉ A., BOMPEIX G., 1980. Action du tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium (phosétyl d'aluminium) sur la pathogénie de *Plasmopara viticola* et sur la stimulation des réactions de défense de la Vigne. *Ann. Phytopathol.*, **12** (3).
- VEGH I., BAILLOT F., ROY J., 1977. Etude de l'activité de l'éthyl phosphite d'aluminium LS vis-à-vis de *Phytophthora cinnamomi* Rands, agent du dépérissement des arbustes d'ornement. *Phytiatr.-Phytopharm.*, **26**, 85-96.

- VO-THI-HAI, 1979. *Fongicides et germination des semences : étude de quelques effets phytotoxiques et protection contre les parasites fongiques*. Thèse doctorat 3^e cycle, Univ. Paris VI.
- VO-THI-HAI, BOMPEIX G., RAVISÉ A., 1979. Rôle du tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium dans la stimulation des réactions de défense des tissus de Tomate contre le *Phytophthora capsici*. *C. R. Acad. Sci.*, **288**, 1171-1174.
- de WIT P. J. M., FLACH W., 1979. Differential accumulation of phytoalexins in Tomato leaves but not in fruits after inoculation with virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Physiol. Plant Pathol.*, **15**, 257-267.
-