

ME

Action du tris-O-éthylphosphonate d'aluminium (phoséthyl d'aluminium) sur la pathogénie de *Plasmopara viticola* et sur la stimulation des réactions de défense de la vigne

G. RAYNAL, A. RAVISÉ *, G. BOMPEIX **

Laboratoire de Pathologie végétale, I.N.A.P.G.,
78850 Thiverval-Grignon

* Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM,
74, Route d'Aulnay,
93140 Bondy

** Laboratoire de Pathologie végétale, Université Pierre et Marie-Curie,
75230 Paris Cedex 05

Résumé

Le tris-O-éthylphosphonate d'aluminium (TEPA) ou phoséthyl d'aluminium possède une efficacité variable selon son moment d'application sur des feuilles de Vigne détachées du cultivar « Carignan », par rapport à l'infection avec *Plasmopara viticola*. Appliqué 1 à 4 jours avant l'infection, le traitement est inefficace même à 1 000 ppm. Appliqué au moment de l'infection, il supprime les symptômes dès 20 ppm. Si l'application a lieu 24 h après l'infection, le TEPA réduit fortement les taches de mildiou à 250 ppm et les annule à 1 000 ppm. Le produit conserve encore une certaine efficacité lorsqu'il est appliqué à 1 000 ppm, 4 jours après la contamination. Le TEPA empêche la libération des zoospores à 20 ppm ; ajouté à une suspension de zoospores mobiles, il provoque leur éclatement dès 10 ppm. Des dosages réalisés sur des feuilles traitées avec 250 ppm de m.a. (dose inefficace *in vitro* contre d'autres Phycomycètes) montrent que le TEPA renforce les réactions de défense des feuilles. *P. viticola* seul provoque un accroissement non fongistatique de la synthèse de substances phénoliques. Le TEPA ne produit pas à lui seul de modifications importantes du métabolisme de ces substances qui, par contre, sont fortement augmentées par un traitement effectué en même temps ou 24 h après l'infection. Des stilbènes (resvératrol, viniférines, stilbène non identifié), des C-glycosylflavones (vitexine, isoorientine) et des flavonols (glucoside 3-quercétine) s'accumulent dans les tissus. Des antibiogrammes montrent que les flavonoïdes et surtout les stilbènes inhibent la croissance de trois champignons-tests.

I. — Introduction

Le tris-O-éthylphosphonate d'aluminium (TEPA) également appelé phoséthyl d'aluminium montre, dans les conditions de la pratique, une excellente efficacité contre le Mildiou de la Vigne (provoqué par *Plasmopara viticola* (B.C.) Berlese et de Toni) due sans doute à une certaine action curative grâce à son pouvoir systémique (Bertrand *et al.*, 1977; Lafon *et al.*, 1977). Les essais dans les conditions naturelles ne permettent cependant pas d'expliquer les mécanismes de l'action du fongicide sur le complexe hôte/parasite. C'est pourquoi nous avons essayé de préciser en conditions artificielles l'action du TEPA sur le parasite et sur l'expression des symptômes de mil-

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 13, ex 1

Cote : B

diou en fonction de la date et de la dose de traitement, puis sur les possibilités de renforcement des réactions de défense des feuilles. Une telle stimulation a en effet été observée dans des feuilles de Tomate contaminées par *Phytophthora capsici* et traitées avec le TEPA (Vo-Thi-Hai *et al.*, 1979). La Vigne réagissant à l'attaque de *P. viticola* par la synthèse de phytoalexines (Langcake *et al.*, 1976, 1979), on pouvait donc se demander si l'action curative du TEPA n'était pas due à un phénomène identique à celui étudié sur Tomate.

II. — Matériel et méthodes

1. — Tests d'activité du fongicide

Des plants de Vigne du cultivar « Carignan » sont cultivés en pots et placés dans une serre avec des conditions de fertilisation et d'éclairage favorisant un développement rapide du feuillage. Les jeunes feuilles suffisamment développées (pesant chacune entre 0,5 et 1,2 g) sont prélevées et déposées dans des boîtes de Petri sur papier filtre humide pour une utilisation immédiate. L'inoculum est constitué par une suspension fraîche de sporocystes de *P. viticola* à environ 30 000 sp/ml, obtenue à partir de jeunes feuilles récemment contaminées. Il est déposé à la face inférieure des limbes par pulvérisation ou à l'aide d'une pipette Pasteur. La suspension de TEPA est appliquée à diverses doses par pulvérisation à la face inférieure des feuilles. Ces dernières sont ensuite placées à 18-20 °C sous un éclairage fluorescent de 6 000 lx. Les premiers symptômes apparaissent 4 j après la contamination, mais la notation n'est effectuée qu'au huitième jour.

2. — Recherche et identification de substances pouvant jouer un rôle dans les réactions de défense de la Vigne

Les tissus foliaires sont tout d'abord broyés à froid dans l'éthanol 50° ; les pigments sont éliminés par partition dans le chloroforme (Darné, 1975). Après évaporation de l'éthanol, la phase aqueuse est reprise à l'acétate d'éthyle (Langcake et Pryce, 1976). Les séparations chromatographiques sur papier Whatman sont réalisées avec l'acide acétique (de 5 p. 100 à N), le méthanol 50, les mélanges butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) et butanol-éthanol-eau (4 : 1 : 2) (Chopin, 1966 ; Chopin et Bouillant 1975 ; Hathway, 1962 ; Henke, 1961 ; Hillis et Ishikura, 1968 ; Langcake et Pryce, 1976 ; Ravisé et Tanguy, 1973). Les chromatographies sur gel de silice Fluka sont effectuées avec les systèmes chloroforme-acétate d'éthyle (9 : 1), chloroforme-acide acétique (8 : 2) (Hillis et Inoue, 1968), chloroforme-acétate d'éthyle-acide formique (5 : 4 : 1), benzène-méthanol (9 : 1) (Hillis et Ishikura, 1968), dichlorométhane-méthanol (4 : 1 et 20 : 1) (Langcake et Pryce, 1977 ; Langcake *et al.*, 1979), acétate d'éthyle-méthanol-eau (63 : 12 : 9) (Ravisé et Chopin, 1978), chloroforme et chloroforme-acétone (4 : 1) (Ravisé et Kirkacharian, 1980), chloroforme-méthanol (1 : 6) (Ingham, 1976), hexane-acétate d'éthyle-méthanol (60 : 40 : 1) (Keen et Ingham, 1976). Les spectres dans l'ultraviolet sont réalisés avec un spectrophotomètre Beckman 25, les teneurs en composés phénoliques appréciées par pesée ou par dosage selon la méthode de Folin-Ciocalteu.

3. — Tests in vitro d'activité des substances de défense

Après essai de cinq champignons non pathogènes sur Vigne, trois ont été retenus pour tester leur sensibilité aux stilbènes : *Gloeosporium fructigenum*, *Penicillium expansum*, *Phoma exigua*. Les deux autres, *Monilia laxa* et *Phytophthora capsici*, se sont avérés soit peu commodes à utiliser, soit pas assez sensibles. Les ensemencements sont effectués par étalement de conidies. Chaque série comporte trois répétitions. Les tests sont de type antibiogramme, à 22 °C, soit avec des pastilles de papier filtre de 13 mm de diamètre imprégnées de 50 μ l de solution, soit par dépôt de 5 μ l de solution dans des puits de 6 mm de diamètre sur milieu gélosé en boîte de Petri (milieu de culture : extrait de malt Merck 1 p. 100, glucose 1 p. 100, gélose 2 p. 100). Les solutions contiennent environ 200 μ g par ml de substances testées. Pour la présentation des résultats, le diamètre de chaque zone d'inhibition est diminué de celui du puits ou de la pastille de dépôt.

III. — Résultats

1. — Mise au point des conditions optimales de contamination et de traitement des feuilles

Nous ne résumerons ici que les résultats essentiels de cette mise au point effectuée à la seule concentration de 250 ppm de matière active.

A la suite de la contamination par pulvérisation, les symptômes des témoins sont variables et plus ou moins bien répartis sur les limbes, ce qui entraîne une notation assez imprécise. Par contre, le dépôt de l'inoculum à la pipette Pasteur permet d'obtenir des symptômes localisés, très faciles à noter et à quantifier. Cette méthode sera donc utilisée par la suite sur toutes les feuilles maintenues en survie. La contamination par pulvérisation sera réservée aux feuilles en place sur les rameaux.

Les modes d'application du TEPA ont des efficacités diverses. Le trempage des feuilles dans une suspension de fongicide, de même que le dépôt à la face inférieure des limbes de pastilles de papier buvard imbibées de fongicide, sont totalement inefficaces. Par contre, si les feuilles sont placées pendant une nuit à la surface d'une suspension de fongicide et surtout si elles sont traitées par pulvérisation du TEPA sur leur face inférieure, on observe une forte réduction et même dans certains cas l'absence des symptômes de mildiou. Le traitement par pulvérisation se rapprochant des conditions de la pratique, nous lui avons donné la préférence dans les manipulations ultérieures. Enfin, le moment d'application du TEPA par rapport à la contamination n'est pas sans effet sur les symptômes. Nous développerons ultérieurement ce point.

2. — Action du TEPA sur la germination des sporocystes et la survie des zoospores

Les sporocystes de *Plasmopara viticola*, placés dans de l'eau distillée (pH 7,0) à 18-20 °C, libèrent des zoospores très mobiles. L'émission des zoospores débute environ une demi-heure à une heure après la mise en suspension des sporocystes

dans l'eau et se poursuit pendant 8 à 12 h, selon l'âge des sporocystes. Au contact du TEPA, les sporocystes et les zoospores voient leur activité se modifier. Jusqu'à la dose de 5 ppm de m.a., les sporocystes germent parfaitement et les zoospores ont un comportement normal. De 6 à 20 ppm environ, la production de zoospores diminue progressivement, elles sont alors peu mobiles et surtout éclatent dès la concentration de 10 ppm dans la demi-heure qui suit leur sortie. Au-dessus de 20 ppm, les sporocystes ne libèrent plus de zoospores. Des zoospores mobiles placées dans une solution à 10 ppm de TEPA éclatent. Ce phénomène est d'autant plus rapide que la dose est plus forte (100 p. 100 d'éclatements en une demi-heure entre 10 et 20 ppm, après 10 min à 50 ppm et immédiatement à 500 ppm). L'éclatement et la libération du protoplasme dans le milieu par rupture de la membrane plasmique sont précédés par l'immobilisation des zoospores qui gonflent. Le protoplasme devient très granuleux et les flagelles disparaissent. Cette action sur les zoospores n'est pas propre au TEPA, puisque nous avons vérifié (à la seule concentration de 50 ppm) que la bouillie bordelaise, le zinèbe, le manèbe, le mancozèbe, un mélange folpel + captafol (actifs contre le mildiou), mais également le bénomyl et la carboxine (non utilisés contre *P. viticola* dans le vignoble), de même que du chlorure de sodium, du glucose et un mouillant (Tween 20), provoquent en 20 min au maximum les mêmes phénomènes *in vitro*. Aux toxicités propres des matières actives doit donc s'ajouter l'effet physique par choc osmotique des mouillants et adjuvants des produits commerciaux. Si ces phénomènes ont lieu également à la surface des feuilles traitées, on peut se demander qu'elle est l'origine véritable de l'efficacité des matières actives utilisées en traitement préventif.

3. — Effet de la dose de TEPA et du moment de l'application sur l'expression des symptômes sur feuilles en boîtes de Petri (tabl. 1)

Chaque essai porte sur au moins dix feuilles potentiellement sensibles au mildiou, à raison de vingt à cinquante sites de contamination par feuille, selon leur taille.

a) Traitement et contamination simultanés.

On les réalise en déposant à la face inférieure des feuilles une suspension du mélange sporocystes-fongicides à l'aide d'une pipette. Comme on pouvait s'y attendre, connaissant l'action du TEPA sur les sporocystes et les zoospores, les symptômes de mildiou sont très atténués aux faibles doses et nuls à 20 ppm. Aucune phytotoxicité n'est observée, même à 1 000 ppm.

Le TEPA étant un fongicide systémique, il est intéressant de voir s'il peut être absorbé et conservé un certain temps sous une forme active dans les feuilles, pour lutter contre une pénétration ultérieure du parasite. La réalisation du traitement par pulvérisation à la dose de 1 000 ppm avant la contamination nécessite quelques précautions. En effet, il est indispensable de laisser le produit en contact avec les feuilles pendant un temps suffisamment long (24 h) pour assurer son éventuelle pénétration. Immédiatement après, on doit laver et éponger soigneusement les feuilles afin de ne pas laisser, à la surface des limbes, du fongicide qui pourrait agir par simple contact sur les sporocystes et les zoospores et masquer la propriété systémique recherchée. Dans ces conditions, on constate une totale inefficacité du TEPA quel que soit l'intervalle de temps entre traitement et contamination. Les symptômes des feuilles traitées

TABLEAU 1

Intensité des symptômes de mildiou en fonction de la dose de TEPA et du moment de son application sur les feuilles en boîtes de Petri

Severity of downy mildew symptoms in function of ATEP concentration and time of application on leaves, in Petri dishes

Traitement et contamination simultanés :									
Doses de TEPA (en ppm)	5	10	20	50	100	250	500	1 000	Témoin
Symptômes (%)	78,5 *	53,6 *	0	0	0	0	0	0	100
Traitement précédant la contamination, à la dose de 1 000 ppm :									
Nbre de jours entre traitement et contamination					1	2	3	4	Témoin
Symptômes (%)					82,2	76,0	98,0	82,5	88,0
Traitement suivant la contamination :									
— Traitement 1 j après la contamination :									
Dose de TEPA (ppm)	...		250	500	1 000	Témoin			
Symptômes (%)		56,8	23,5 *	0,4 *	98,5			
— Traitement à 1 000 ppm (n) jours après la contamination :									
(n)		2	3	4	Témoin			
Symptômes (%)		20,3 *	28,1 *	46,8 *	82,0			

(%) Pourcentages de points de contamination ayant donné des symptômes de mildiou (* : traces de symptômes).

sont aussi sévères que ceux sur le témoin. D'après nos résultats, une application de TEPA antérieure à l'infection n'empêche donc pas l'établissement du parasite. On peut avancer plusieurs hypothèses pour expliquer l'inefficacité de ce type de traitement :

— Le TEPA ne pénètre pas ou en quantités insuffisamment actives dans les feuilles, même à la dose de 1 000 ppm. C'est peu vraisemblable étant donné la réussite des traitements après la contamination.

— Le TEPA est absorbé mais, dans nos conditions, diffuse mal dans les tissus, si bien que les points d'inoculation peuvent ne pas coïncider exactement avec les zones atteintes par les gouttelettes de fongicide. Nous avons effectivement vérifié que le produit diffuse très peu dans les organes en survie, en plaçant côte à côte des gouttes de fongicide et des gouttes d'inoculum, sans les mélanger. Les symptômes du mildiou sont alors intenses. Cependant, le traitement par pulvérisation couvrant de façon très homogène l'ensemble du limbe, les gouttes d'inoculum ont de grandes chances d'être déposées sur des endroits traités.

— Le TEPA est absorbé sans doute en faible quantité dans les feuilles en survie et est inactivé en l'absence d'infection par *P. viticola*. C'est, nous semble-t-il, l'hypothèse la plus plausible, qui devrait être vérifiée par des analyses biochimiques.

b) Traitements effectués après la contamination.

Rappelons que les feuilles sont lavées et séchées 24 h après le traitement. Les essais montrent que le TEPA possède une action curative non négligeable. On considère généralement que la pénétration de *P. viticola* par les stomates s'effectue rapidement

après la mise en contact des gouttelettes d'inoculum avec le limbe (Boubals, 1957). Pour être actif, un traitement 24 h ou plus après la contamination implique donc que le fongicide pénètre dans les tissus et agisse directement ou indirectement sur le mycélium en croissance. C'est ce que l'on observe avec le TEPA. Si le traitement est différé de 24 h, les symptômes sont inexistants à 1 000 ppm, à peine visibles à 500 ppm et diminués de moitié par rapport au témoin à 250 ppm. A 1 000 ppm, le traitement appliqué 4 j après la contamination, au moment de l'apparition des symptômes, demeure assez efficace. Remarquons que lorsque le traitement est différé de 2 à 4 j, les sites d'inoculation portent des petits points nécrotiques accompagnés d'un léger jaunissement. Ces symptômes particuliers s'accroissent avec l'augmentation du délai d'application : des zones nécrosées se forment sur la plupart des sites contaminés. Ces réactions nécrotiques, de taille égale aux gouttelettes d'inoculum, sont très rapides. Elles apparaissent dans les 12 h qui suivent le traitement et rappellent des réactions d'hypersensibilité. Ceci laisse présumer que le TEPA doit agir sur la physiologie de la feuille malade. Remarquons que 8 j après la contamination, on observe quelques fructifications du champignon à la périphérie des zones nécrosées, sur un nombre d'autant plus important de points de contamination que le traitement est plus retardé. L'examen au microscope des organes aériens du champignon à ces endroits montre des déformations des sporocystophores, mais pas des sporocystes qui donnent des zoospores normales et infectieuses. La quantité de sporocystes récoltés à la fin de l'essai après traitement à 1 000 ppm est fortement diminuée par rapport au témoin : en moyenne, 100 000 sporocystes par tache sur le témoin, contre 0, 2 000, 3 000 et 4 000 avec les traitements retardés respectivement de 1, 2, 3 et 4 j. A cette dose, le TEPA pourrait donc freiner considérablement la progression de l'épidémie, même s'il est appliqué tardivement.

4. — *Activité du TEPA sur des Vignes cultivées en pots*

Les tests pratiqués sur feuilles en survie permettent une réalisation et des observations précises. Néanmoins, la physiologie de ces feuilles doit être différente de celle des feuilles en place : absence de transpiration et de flux de sève, photosynthèse et métabolisme perturbés. Il était donc nécessaire de vérifier si les résultats obtenus *in vitro* se retrouvaient *in vivo*, par la contamination et le traitement d'un petit nombre de vignes bien développées en pots (quatre vignes, soit entre cinquante et soixante-dix feuilles par essai). La contamination est effectuée en pulvérisant finement l'inoculum à la face inférieure de toutes les feuilles, quel que soit leur état de réceptivité au Mildiou. Le traitement a lieu en même temps que la contamination à la dose de 250 ppm (mélange inoculum + TEPA) ou est retardé de 1 j à la dose de 1 000 ppm. Dans les deux cas, les feuilles sont lavées et séchées 24 h après le traitement. Les pots sont placés sous bâche plastique en atmosphère saturée en humidité jusqu'à la notation. Les symptômes sont notés de 0 à 5 selon l'étendue et l'intensité de la maladie. Les pots témoins ont une note moyenne de 3,52 avec 15 p. 100 de feuilles « résistantes » (notes 0 et 1) et 85 p. 100 de feuilles « sensibles » (notes 2 à 5). Les vignes traitées et contaminées en même temps ne montrent aucun symptôme. Ceci est dû à l'effet direct du TEPA sur les sporocystes à 250 ppm. Les vignes traitées à 1 000 ppm 1 j après la contamination reçoivent une note moyenne de 1,45 pour 63 p. 100 de feuilles « résis-

tantes » et 37 p. 100 de feuilles « sensibles ». Les notes moyennes des feuilles « résistantes » et « sensibles » des témoins sont respectivement de 0,80 et 4,13 contre 0,58 et 3,10 pour les vignes traitées à 1 000 ppm.

Les résultats concordent donc parfaitement avec ceux obtenus en boîtes de Petri lorsque le traitement est appliqué au moment de la contamination. L'action du TEPA sur les organes de dissémination et d'infection du champignon est donc la même, que les feuilles soient en survie ou sur les rameaux. Par contre, le traitement à 1 000 ppm différé de 24 h, très efficace sur les feuilles en survie, l'est moins sur les feuilles en place, sans doute en raison du mode d'apport massif de l'inoculum et de la croissance des feuilles qui diminue vraisemblablement la concentration en TEPA dans les tissus. Néanmoins, la réduction de l'intensité des symptômes, voisine des deux tiers, devrait retarder considérablement l'évolution de l'épidémie.

5. — Action du TEPA sur les réactions de défense de l'hôte

Nous avons cherché à établir une relation entre les différents degrés de sensibilité ou de tolérance au mildiou en fonction des traitements avec le TEPA et les modifications des teneurs en substances pouvant contribuer à la protection de la Vigne.

Les extractions et les dosages sont réalisés 10 j après la contamination. Comme à des concentrations égales ou supérieures à 500 ppm le TEPA peut sans doute par lui-même ralentir l'évolution de l'agent pathogène dans les tissus, nos expériences sont réalisées avec des doses de 250 ppm qui, pour d'autres Phycomycètes comme les *Phytophthora* sp., ne modifient pas la croissance mycélienne *in vitro*. Vo-Thi-Hai (1979) a démontré que le TEPA à 50 ppm inhibe la formation et la germination des sporocystes de *P. palmivora* et *P. capsici*. Par contre, la mobilité des zoospores de ces deux espèces, de même que leur germination, ne sont bloquées qu'à des concentrations de 100 ppm.

Les conditions ci-dessous sont analysées (fig. 1) :

- a) feuilles saines non inoculées ;
- b) feuilles saines non inoculées traitées avec le TEPA ;
- c) feuilles inoculées et présentant des symptômes ;
- d) feuilles inoculées et traitées avec le TEPA, à 250 ppm, 24 h plus tard ;
- e) feuilles inoculées et traitées simultanément avec le TEPA à 250 ppm.

Les teneurs en substances phénoliques sont identiques chez les feuilles non inoculées, traitées ou pas. De plus, l'analyse de ces feuilles en début et en fin d'essai montre que leur teneur en phénylpropanoïdes est pratiquement stable au cours du temps.

La présence de l'agent pathogène stimule dans les tissus foliaires la synthèse de plusieurs groupes de substances phénoliques à des concentrations non fongistatiques. Cet accroissement est plus important après un traitement au TEPA. La figure 1 montre les variations des teneurs en composés phénoliques à la fin des différents essais. Au blocage des symptômes et/ou de la sporulation correspond l'accumulation de flavonols (notamment glucoside-3 quercétine), dans une moindre mesure de C-glycosyl flavones (principalement vitexine et isoorientine) et de stilbènes (resvératrol, vinitérines et d'un stilbène non identifié).

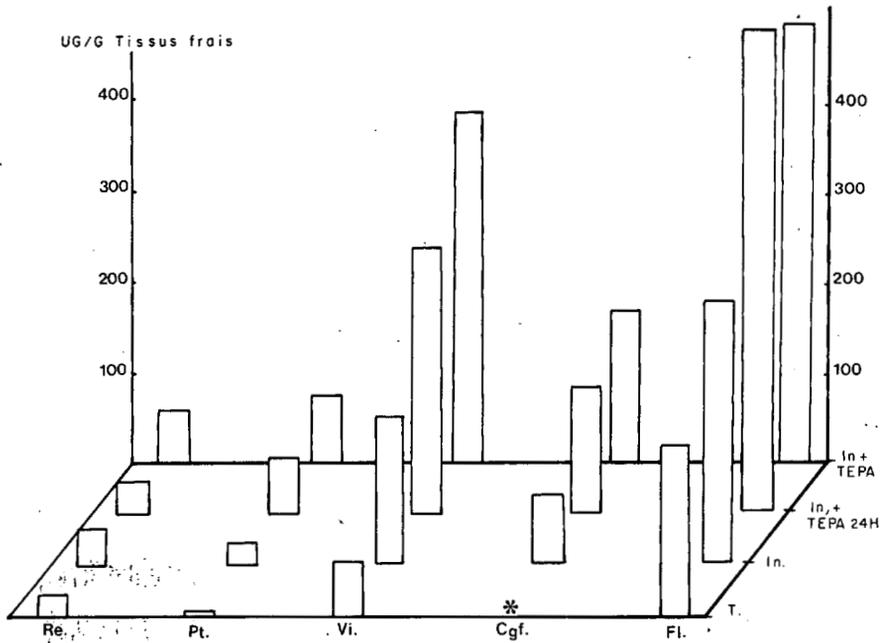


FIG. 1. — Teneurs des feuilles en substances éventuellement impliquées dans la résistance de la Vigne à *P. viticola* dans diverses conditions.

T : témoin, feuilles non traitées non inoculées, équivalent aux feuilles traitées non inoculées ; In : feuilles inoculées ; In + TEPA 24 h : inoculation avec TEPA différé de 24 h ; In + TEPA : inoculation et traitement simultanés avec TEPA. Re : Resvératrol ; Pt : Stilbène non identifié ; Vi : Viniférine ; Cgf : C-glycosylflavones ; Fl : Flavones. * Cgf : Les C-glycosylflavones sont dosées avec les flavonols dans le témoin.

Leaf contents in substances eventually implicated in Grape resistance to *P. viticola* in various conditions.

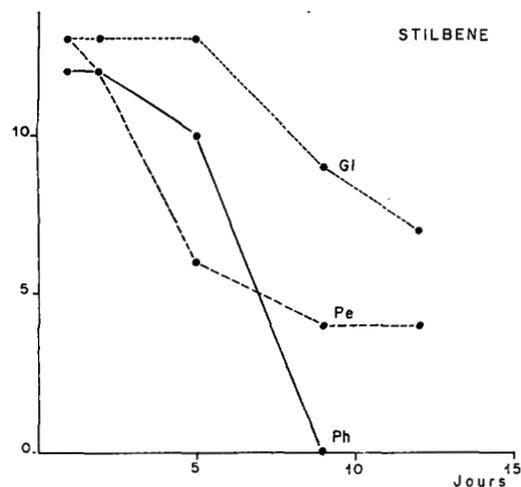
T : check, leaves not treated and not inoculated, equivalent to non inoculated treated leaves ; In : inoculated leaves ; In + TEPA 24 h : inoculation with TEPA treatment 24 h later ; In + TEPA : simultaneous inoculation and TEPA treatment. * Cgf : C-glycosylflavones are dosed with flavonols in check.

Bien que l'application de TEPA lors de l'inoculation détruise les sporocystes de *P. viticola* à la surface des limbes, la réaction phénolique dans les feuilles est de même importance que lors d'un traitement postérieur de 24 h à l'infection. Le fongicide ne semble pas provoquer seul les processus de synthèse. En outre, pulvérisé sur l'épiderme supérieur, le TEPA pénètre mal dans les tissus ; dans ce cas le parasite colonise partiellement les zones traitées dont la réaction phénolique diffère peu de celle du témoin sensible.

6. — Etude in vitro de la toxicité des substances isolées pour divers parasites fongiques (fig. 2)

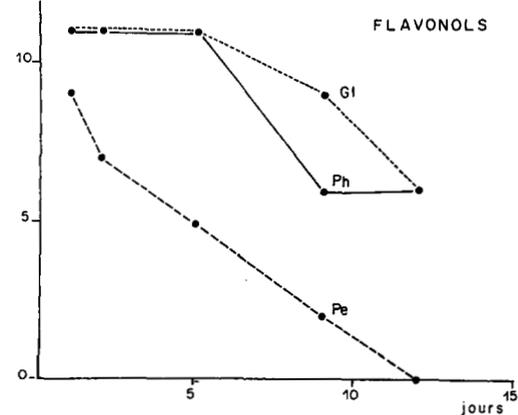
En ce qui concerne le stilbène non identifié, les trois champignons (*Gloeosporium*, *Penicillium*, *Phoma*) sont fortement inhibés (fig. 2a). Pour les flavonols, les sensibilités de *Gloeosporium fructigenum* et de *Phoma exigua* sont semblables (fig. 2b). *G. fructigenum* est le meilleur organisme pour tester les C-glycosyl flavones (fig. 2c). Enfin,

Ø Zones d'Inhibition (MM)



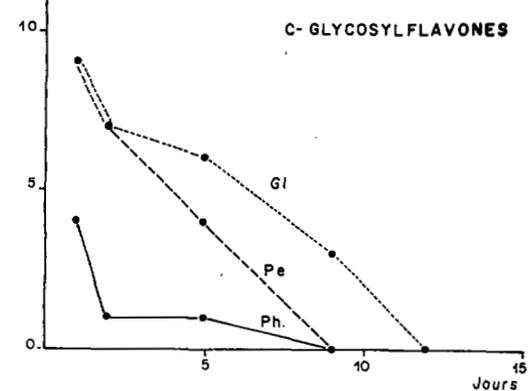
2a

Ø Zones d'Inhibition (MM)



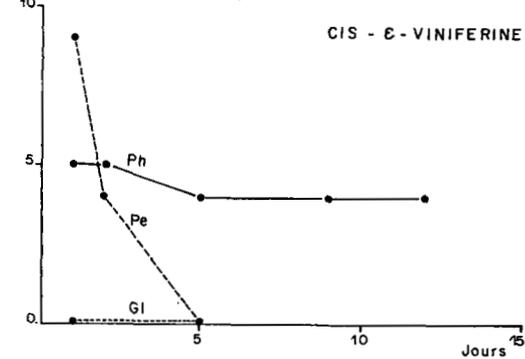
2b

Ø Zones d'Inhibition (MM)



2c

Ø Zones d'Inhibition (MM)



2d

FIG. 2. — Antibiogrammes : évolution de la dimension des zones d'inhibition de croissance au cours du temps avec :

2a : le stilbène non identifié ; 2b : les flavonols ; 2c : les C-glycosylflavones ; 2d : la cis-ε-viniférine.

GI : *Gloeosporium fructigenum* ; Pe : *Penicillium expansum* ; Ph : *Phoma exigua*.

Antibiograms : evolution with time of dimension of growth-inhibiting zones, with :

2a : not identified stilbene ; 2b : flavonols ; 2c : C-glycosylflavones ; 2d : cis-ε-viniferin.

avec la cis-ε viniférine, il est préférable d'utiliser *Phoma exigua* (fig. 2d). On remarque que les zones d'inhibition ne sont pas toujours stables au cours du temps ; en règle générale, la lecture après 24 h d'incubation semble la plus fiable.

Le stilbène non identifié apparaît, d'une part, nettement comme la substance la

plus toxique bien que tous les produits étudiés puissent contribuer aux mécanismes de défense, notamment les flavonols. D'autre part, la sensibilité de la méthode semble élevée puisqu'on peut mettre en évidence l'activité d'un μg de stilbène non identifié. Des tests complémentaires réalisés en milieu liquide permettent d'obtenir l'inhibition totale de la croissance du *Phoma exigua* avec moins de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de stilbène et avec 10 à 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de flavonols (ces substances sont dosées par spectrométrie). En comparaison, un apport sensiblement équivalent de 1 μg par puits d'isoorientine (C-glycosylflavone pure de référence) dosée en solution poids/volume, n'est pas toxique.

IV. — Discussion, conclusion

1. — Action du TEPA sur la pathogénie de *P. viticola*

Nos manipulations sur le TEPA utilisé sur feuilles de Vigne en survie et sur plantes en pots montrent la bonne efficacité du produit sur *P. viticola* à des doses bien inférieures à celles employées dans le vignoble, étant entendu que les modes d'application sont difficilement comparables. L'activité du TEPA est excellente à des doses très faibles (à partir de 20 ppm) lorsqu'il est appliqué en même temps que l'inoculum. A ces doses, le TEPA inhibe la germination des sporocystes et détruit les zoospores. On conçoit donc qu'il puisse avoir une excellente action préventive, à condition qu'il ne soit pas lessivé. L'action curative du TEPA utilisé après la contamination est également vérifiée dans les feuilles malades, à des doses de 500 à 1 000 ppm. Ces résultats corroborent ceux de Lafon *et al.* (*loc. cit.*) obtenus dans des parcelles d'essais. Cependant, à la différence de ces auteurs et de Bertrand *et al.* (*loc. cit.*), nous n'avons pas mis en évidence une protection des feuilles *in vitro* lorsque le traitement a lieu avec la contamination. Pour expliquer ce phénomène, en dehors d'une moins bonne pénétration du TEPA dans les feuilles en survie, une des hypothèses possibles serait la perturbation du métabolisme de ces feuilles, conduisant à l'inactivation rapide du TEPA en l'absence de mildiou. De plus, Langcake et Pryce (*loc. cit.*) ont montré que la synthèse des phytoalexines chez la Vigne est déclenchée par les ultraviolets. Il est donc possible que dans les conditions naturelles, les feuilles synthétisent constamment de faibles quantités de phytoalexines. Si une des actions du TEPA est bien de stimuler cette synthèse lorsqu'elle est déclenchée, on conçoit que même en l'absence de *P. viticola*, les feuilles traitées puissent acquérir des concentrations en phytoalexines capables de les protéger vis-à-vis d'une contamination ultérieure. Ce phénomène n'existerait pas en conditions artificielles, où les feuilles sont placées sous des tubes fluorescents pauvres en ultraviolets. De même, il est possible que dans les parcelles d'essais, contrairement à ce qui se passe dans nos manipulations, le lessivage du TEPA ait été incomplet malgré la brumisation ; de très faibles quantités de fongicide ont pu rester sur le feuillage bien après le traitement et agir en inactivant les sporocystes. Notons enfin que les formulations récentes du TEPA dont l'emploi est conseillé dans le vignoble, font appel à l'association avec du folpel et du mancozèbe (Chalendon *et al.*, 1979). Cette association présente une activité renforcée par rapport au seul TEPA. Il serait intéressant de déterminer les raisons de cette synergie.

2. — Rôle du TEPA dans la stimulation des mécanismes de défense

Dans les tissus inoculés et non traités, la réponse de l'hôte semble insuffisante quantitativement et qualitativement pour inhiber le développement de *P. viticola*. Pour Langcake *et al.* (1976, 1977a et b, 1979), divers champignons pathogènes ainsi que le rayonnement ultraviolet induisent la synthèse de phytoalexines (différents stilbènes) dans les feuilles de Vigne. *P. viticola*, dans les mêmes conditions, réprimerait partiellement cette synthèse, d'où sa pathogénie selon ces auteurs.

Dans nos expériences, l'application du TEPA seul n'induit pas de changements importants dans le métabolisme de ces substances. En revanche, son application, lors de la contamination ou 24 h après, entraîne une accumulation différentielle de composés phénoliques. Elle concerne non seulement des stilbènes comme l'ont établi Langcake et Pryce (*loc. cit.*) mais aussi des flavonoïdes qui peuvent s'accumuler dans d'autres maladies de la Vigne (Henke, 1961 ; Wagner *et al.*, 1967 ; Yap et Reichardt, 1964). Parallèlement on observe le blocage de l'infection.

Nos tests *in vitro* indiquent que les flavonoïdes et les stilbènes inhibent la croissance de plusieurs champignons pathogènes sur d'autres plantes que la Vigne ; en particulier un stilbène non identifié semble agir à faible concentration. Si ces substances ont une action similaire *in vivo* sur *P. viticola*, elles pourraient contribuer ensemble à son inhibition dans les tissus. Leur activité pourrait être renforcée par le contact immédiat avec les nombreux suçoirs intracellulaires que le parasite émet pour se nourrir.

Les concentrations en substances inhibitrices sont exprimées sur la figure 1 en μg par g de tissus frais. En réalité, les sites infectieux extériorisant les symptômes de blocage des nécroses représentent approximativement 10 à 15 p. 100 de la surface foliaire totale. Si l'on place côte à côte des gouttes d'inoculum contenant ou non du TEPA, on constate après incubation que des taches nécrotiques sans mildiou voisinent avec des lésions sporulantes. Cela semblerait indiquer une localisation ponctuelle des substances contribuant à la réaction de défense. Dans ces conditions, au niveau des taches d'infection inhibée, les concentrations en produits pourraient être de sept à dix fois plus élevées que celles indiquées sur la figure 1 dans les cas d'inoculation avec apport de TEPA simultané ou différé.

Le TEPA ne provoque la réaction de défense qu'en présence de l'agent pathogène : zoospores lors du traitement simultané, hyphes infectieux lors de l'application différée. Dans les deux cas, l'accroissement des teneurs en composés phénoliques pourrait être la conséquence d'une amplification de la réponse métabolique de l'hôte à un éliciteur fongique. Ou bien, selon la conception de Langcake *et al.* (*loc. cit.*), cela pourrait correspondre à une levée de répression de cette réaction. Globalement, le résultat du traitement avec le TEPA, comme dans le cas de la Tomate, se traduit par le passage de la sensibilité vers la résistance. Cette évolution semble confirmée par nos tests d'inhibition *in vitro* qui corroborent les résultats obtenus avec des flavonols (Ravisé et Tanguy, 1973) ainsi qu'avec des phénanthrènes et des stilbènes (Ward *et al.*, 1975 ; Langcake *et al.*, *loc. cit.*).

Reçu pour publication le 31.03.1980.

Accepté pour publication le 02.06.1980.

Summary

Action of aluminium tris-O-ethylphosphonate on Plasmopara viticola pathogenicity and on stimulation of defence reactions of Grapevine

Aluminium tris-O-éthylphosphonate (ATEP) shows a variable activity according to its time of application on detached leaves of cultivar « Carignan », in relation to infection with *Plasmopara viticola*. Applied 1 to 4 days before infection, treatment is ineffective even at 1 000 ppm. Applied at the time of infection, it suppresses symptoms at 20 ppm. If application occurs 24 hrs after infection, ATEP strongly reduces downy mildew at 250 ppm and suppresses it at 1 000 ppm 4 days after contamination. ATEP prevents zoospores liberation at 20 ppm ; when added to a suspension of motile zoospores, it causes their disruption at 10 ppm. Chemical analysis of 250 ppm sprayed leaves shows that ATEP increases the defence reactions of tissues (dose of 250 ppm is ineffective *in vitro* against other Phycomycetes). *P. viticola* alone leads to a non fungistatic increase of phenolic compounds. ATEP alone does not cause important modifications in metabolism of these substances, which yet are greatly enhanced by a spraying made at the time of infection or 24 hrs later. Stilbenes (resveratrol, viniferins, not identified stilbene), C-glycosylflavones (vitexin, isoorientin) and flavonols (glucoside 3-quercetin) accumulate in tissues. Antibiograms show that flavonoids and especially stilbenes inhibit growth of three test fungi.

Références bibliographiques

- BERTRAND A., DUCRET J., DEBOURGE J. C., HORRIÈRE D., 1977. Etude des propriétés d'une nouvelle famille de fongicides : les monoéthyl phosphites métalliques. Caractéristiques physicochimiques et propriétés biologiques. *Phytiatr. Phytopharm.*, **26**, 3-17.
- BOUBALS D., 1957. Sur le comportement des Vitacées à l'égard du Mildiou de la Vigne (*Plasmopara viticola* (B. et C.) Berlese et de Toni). *C. R. Acad. Sci. Paris, sér. D*, **244** (11), 1535-1537.
- CHALENDON A., CRISINEL P., HORRIÈRE D., 1979. Control of vine downy mildew with formulations of Aluminium tris (ethyl phosphonate). Proceedings 1979 British Crop Protect. Confer., *Pests and Diseases*, **2**, 347-352.
- CHOPIN J., 1966. Les C-glycoflavonoïdes, *In Actualités de Phytochimie fondamentale*, MENTZER, 44-72, éd. Masson, Paris.
- CHOPIN J., BOUILLANT M. L., 1975. C-glycosylflavonoïdes, *In* HARBORNE J. B. MABRY, *The Flavonoids*, 632-691, Chapman and Hall, London.
- DARNÉ G., 1975. *Recherches sur l'évolution des composés phénoliques totaux et des leucoanthocyanes des sarments de vigne au cours du cycle végétatif et des boutures au cours de la rhizogenèse*. Thèse doctorat 3^e cycle, Université de Bordeaux I, n° 1244.
- HART J. H., HILLIS W. E., 1974. Inhibition of wood-rotting fungi by stilbenes and other polyphenol in *Eucalyptus sideroxylon*. *Phytopathology*, **64**, 939-948.
- HATHWAY D. E., 1962. The use of hydroxystilbene compounds as taxonomic tracers in the genus *Eucalyptus*. *Biochem. J.*, **83**, 80-84.
- HENKE O., 1961. Über die Bedeutung der Stickstoffverbindungen für die stoffwechselfysiologischen Beziehung zwischen Parasit und Wirt am Beispiel Reblaus-Rebe. *Phytopathol. Z.*, **41**, 387-426.
- HILLIS W. E., INOUE T., 1968. The formation of polyphenols in trees. IV. — The polyphenols formed in *Pinus radiata* after *Sirex* attack. *Phytochemistry*, **7**, 13-22.
- HILLIS W. E., ISHIKURA N., 1968. The chromatographic and spectral properties of stilbene derivatives. *J. Chromatogr.*, **32**, 323-336.
- INGHAM J. L., 1976. 3, 5, 4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogea*). *Phytochemistry*, **15**, 1791-1793.
- KEEN N. T., INGHAM J. L., 1976. New stilbene phytoalexins from american cultivars of *Arachis hypogea*. *Phytochemistry*, **15**, 1794-1795.
- 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'éthylphosphite d'aluminium. *Phytiatr. Phytopharm.*, **26**, 19-40.
- LANGCAKE P., PRYCE R. J., 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.*, **9**, 77-86.
- LANGCAKE P., PRYCE R. J., 1977a. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, **33**, 151-152.
- LANGCAKE P., PRYCE R. J., 1977b. Oxidative dimerisation of 4-hydroxystilbenes *in vitro* : production of a grapevine phytoalexin mimic. *J. chem. Soc., chem. Com.*, **7**, 208-210.
- LANGCAKE P., PRYCE R. J., 1977c. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*, **16**, 1193-1196.

- LANGCAKE P., CORNFORD C. A., PRYCE R. J., 1979. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry*, **18**, 1025-1027.
- RAVISÉ A., CHOPIN J., 1978. Etude *in vitro* des propriétés inhibitrices de C-glycosyl flavones pour le *Verticillium albo atrum* Rke et Berth., le *Phytophthora parasitica* Dast. et des enzymes pectinolytiques. *C. R. Acad. Sci., Paris*, sér. D, **286**, 1885-1888.
- RAVISÉ A., KIRKACHARIAN B. S., 1980. Influence de la structure de composés phénoliques sur l'inhibition du *Phytophthora parasitica* et d'enzymes participant aux processus parasitaires. IV. — Néoflavonoïdes. *Phytopathol. Z.*, **97**, 219-233.
- RAVISÉ A., TANGUY J., 1973. Etude des réactions phénoliques de plantules de *Nicotiana* inoculées par des souches de *Phytophthora* de Bary. *Phytopathol. Z.*, **76**, 253-264.
- SMITH P. M., 1979. A study of the effects of fungitoxic compounds on *Phytophthora cinnamomi* in water. *Ann. appl. Biol.*, **93**, 149-157.
- 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. Fac. Sci. Paris VI.
- VO-THI-HAI, BOMPEIX G., RAVISÉ A., 1979. Rôle du tris-O-éthylphosphonate d'aluminium dans la stimulation des réactions de défense des tissus de Tomate contre le *Phytophthora capsici*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, sér. D, **288**, 1171-1174.
- WAGNER H. *et al.*, 1967. Flavon-C-glykoside in den Blättern von *Vitis cinerea* Darwin. *Z. Naturforsch.*, **22b**, 988-989.
- WARD E. W. B., UNWIN C. H., STOESSL A., 1975. Postinfectious inhibitors from plants. XV. — Antifungal activity of the phytoalexin orcinol and related phenanthrenes and stilbenes. *Can. J. Bot.*, **53**, 964-971.
- YAP F., REICHARDT A., 1964. Vergleichende Untersuchungen der Flavonoide und Oxyzimtsäuren in den Blättern artreiner *Vitis*-Sorten und ihrer Bastarde. *Züchter*, **34**, 143-156.
-