

PHYTOPATHOLOGIE. — Réactions phénoliques et production de phytoalexine chez des plantules de *Lycopersicum* Mill. infectées par des souches de *Phytophthora de Bary*. Note (*) de MM. André Ravisé et Bernard Trique, présentée par M. Roger Heim.

L'inoculation de souches de *Phytophthora* provoque chez des plantules de *Lycopersicum* un important accroissement des teneurs en composés phénoliques, surtout au niveau du foyer d'infection. Simultanément est synthétisée une substance possédant les caractères d'une phytoalexine qui inhibe la croissance des *Phytophthora* et l'activité de leurs pectine-lyases à des concentrations voisines de 10^{-6} .

Nous avons observé chez plusieurs *Lycopersicum* des aptitudes à résister aux attaques de diverses souches de *Phytophthora* parasites de cultures tropicales [(4), (5)]. Cette étude des réactions de l'hôte au cours de la phase initiale de l'infection concerne l'évolution des substances phénoliques et quelques caractères de l'une d'entre elles.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — Les expériences sont réalisées avec des plantules de *Lycopersicum pimpinellifolium* Mill. possédant les gènes de résistance I au *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. *lycopersici* Snyder et Hansen et PH + S au *Phytophthora infestans* (Mont.) de By, ainsi que 2 variétés de tomate : West Virginia 63 (WVA 63) et un hybride à phénotype Marmande. Les plantules sont cultivées aseptiquement sur un milieu minéral précédemment décrit [(2), (4)]. Deux clones de *P. palmivora* (Butl.) Butl. et de *P. parasitica* Dastur servent aux inoculations expérimentales suivant une technique standardisée [(3), (5)]. Ils sont également employés comparativement à des souches de *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*, de *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth et de *V. dahliae* Kleb. isolées de tomate, pour étudier l'influence d'extraits phénoliques sur leurs microcultures réalisées en chambre à huile.

La fraction phénolique de plantules saines et infectées est extraite, ses composés purifiés et dosés par des méthodes décrites précédemment (7). Les enzymes pectinolytiques produites par les clones de *Phytophthora* (9) et actives *in vivo* (5) sont caractérisées sur des composés pectiques à différents degrés de méthylation par deux techniques complémentaires (8). La présence d'effecteur(s) dans diverses fractions d'extraits phénoliques a été recherchée sur ces mêmes enzymes par spectrophotométrie ainsi que sur des polyphénol-oxydases provenant de 2 variétés de tomate (5), sur des enzymes lyophilisées : β -glucosidase « Fluka » (6), α -amylase BDH (4) et par viscosimétrie (8) sur la pectinase « purum » « Fluka ».

RÉSULTATS. — L'invasion des tissus des plantules provoque dans la phase initiale des réactions identiques avec les 2 clones inoculés. Les teneurs en phénols totaux rapportées à un gramme de poids de tissus frais augmentent considérablement. Elles passent de 135 à 535 μg et de 175 à 320 μg respectivement chez le *L. pimpinellifolium* et le WVA 63. Chez le WVA 63 l'accumulation des acides hydroxycinnamiques estérifiés par le glucose est importante. La teneur en caféyl-1-glucose croît de 15 à 21 μg , celle de férulyl-1-glucose de 19,5 à 23 μg , celle de para-coumaryl-1-glucose de traces indosables à 16 μg (dosages J. Tanguy).

Pendant les 4 jours suivant l'inoculation, nous avons dosé l'évolution des teneurs en phénols dans les tiges à divers niveaux par rapport au foyer d'infection (tableau I) dans les plantules de l'hybride Marmande. Les plantules synthétisent d'importantes quantités d'hétérosides et d'esters d'acides phénols qui migrent vers la zone nécrosée.

L'un des produits résultant de la réaction au parasitisme possède des propriétés particulières. Cette substance, parfois décelée à l'état de traces dans les extraits de plantules saines, semble synthétisée après la pénétration du parasite. Elle est

21 AVR. 1972

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 5440

présente dans toutes les parties de la tige, surtout au niveau des lésions. La suppression de l'éclaircissement ne modifie pas sa production.

Elle se sépare par chromatographie sur papier ou sur couches minces de silice. Contrairement aux acides phénols elle ne migre pas dans les acides carboxyliques ou leurs dérivés (acétique, formique et formiate de sodium). Avec d'autres mélanges éluotropes, également dans le benzène, son R_f varie de 0,94 à 0,98.

Tableau 1.- Evolution des teneurs en composés phénoliques, exprimées en μg d'acide chlorogénique par g de tissus frais dans des plantules de l'hybride à phénotype "Harmande", 60 heures après l'infection expérimentale.

Niveaux	Plants inoculés			Plants indemnes		
	A	B	C	A	B	C
I	288	507	414	152	222	208
II	240	423	372	154	205	203
III	272	418	369	130	163	169

A : extrait total.
 B : esters (hydrolyse alcaline).
 C : hétérosides (hydrolyse enzymatique).
 Niveaux : I = zone nécrosée,
 II = section contiguë,
 III = sommet de la tige.

Tableau 2.- Influence de la teneur en effecteur du milieu réactionnel sur 5 types d'activités enzymatiques exprimées en pourcentages du témoin.

Enzymes, origine	pH	%	Effecteur en $\mu\text{g}/\text{ml}$.
Endo-pectine trans éliminase du <i>F. palmivora</i> .	7,5	80	2
		55	3
		0	5
"Pectinase" Fluka.	7,3	100 50	5 12
Polyphénol oxydases de <i>L. osculentum</i> var. <i>Piersol(a)</i> , <i>Harmande(b)</i>	6,0	113(a)	1,3
		122(b)	1,3
Alpha-amylase bactérienne B.D.H.	6,0	100	2
		83	5
Bêta-glucosidase Fluka.	5,5	44 16	3 5

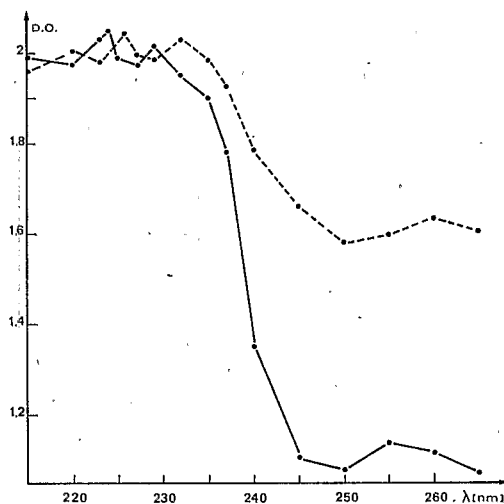


Fig. 1

Fig. 1. — Spectre d'absorption en ultraviolet de la phytoalexine en solution éthanolique à 95° GL (trait plein) et après alcalinisation (pointillé).

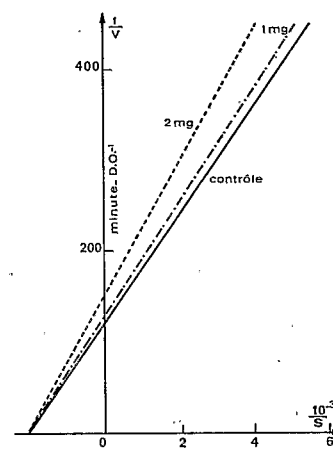


Fig. 2

Fig. 2. — Courbes de Lineweaver-Burk pour l'endopectine-transéliminase en l'absence (contrôle) ou en présence de phytoalexine à 1 et $2 \cdot 10^{-6}$.

Sous ultraviolet à 355 nm sa fluorescence est bleu-violet, bleu intense après exposition aux vapeurs ammoniacales ou pulvérisation de Na_2CO_3 . Le contact d'une solution sodique et l'exposition aux ultraviolets, contrairement aux coumarines, ne modifient pas sa fluorescence. Son spectre d'absorption dans l'éthanol à 95° GL présente 2 maximums à 224 et 229 nm, un épaulement à 255 nm. Après alcalinisation par la soude, les pics passent à 225 et 232 nm, l'épaulement à 260 nm, l'absorption entre 235 et 300 nm s'accroît (fig. 1).

Cette substance donne des réactions de nitrosation positives. Après pulvérisation de *p*-nitraniline apparaît une tache marron clair, virant au brun en présence de Na_2CO_3 . Avec le réactif d'Hoepner, la pigmentation est jaune bistre. La ninhydrine donne avec cette substance, après chauffage à 105 °C, une coloration rose caractéristique de plusieurs acides aminés et de peptides.

Des caractères de ce produit et son spectre ne sont pas modifiés par hydrolyse (β -glucosidase, NaOH N, HCl 6 N pendant 24 h à 40 °C). Comme un composé phénolique, il est dosable par la méthode de Folin Ciocalteu. La courbe de dosage semble presque analogue à celle de l'acide férulique. Nos résultats sont provisoirement exprimés en équivalents de cet acide phénol. Les dosages par la méthode de Lowry ne sont possibles qu'aux faibles concentrations à cause d'interférences avec les fonctions phénol. La substance est stable dans les solvants polaires et en solution aqueuse tamponnée. Dans l'eau, elle semble se transformer de façon réversible en un produit possédant également des propriétés phénoliques mais dont le spectre est différent.

En microculture, la substance ralentit la croissance du *P. palmivora* à partir d'une concentration de 10^{-6} . Le seuil d'inhibition s'échelonne entre 2, 2,5, 3 et $5 \cdot 10^{-6}$ pour le *P. palmivora*, le *F. oxysporum*, le *V. albo-atrum* et le *V. dahliae*. La dose létale est de $5 \cdot 10^{-6}$ pour le *P. palmivora* : environ 6 h après l'incorporation de l'extrait, le cytoplasme se vacuolise puis intervient la dégénérescence lipidique. L'extrémité des hyphes en cours d'élongation devient vésiculeuse, émet de courts filaments coralloïdes ou des hyphes grêles subterminales. Pour les 3 autres parasites, la concentration létale varie de $7 \cdot 10^{-6}$ à 10^{-5} .

Pour les activités enzymatiques éprouvées, cette substance agit en effecteur à une concentration de 10^{-6} à 10^{-5} (tableau II). Elle inhibe fortement les pectine-lyases du parasite, la β -glucosidase et, à un moindre degré, la pectinase commerciale, l' α -amylase, pour des pH tamponnés proches de la neutralité. Par contre, les polyphénol-oxydases de tomate sont nettement activées entre 1 et $2 \cdot 10^{-6}$. L'établissement des courbes de Lineweaver-Burk (fig. 2) révèle que l'inhibition de l'endopectine transéliminase fongique est non compétitive. L'inhibition en milieu réactionnel très visqueux présente une phase de latence initiale levée par préincubation — 15 mn, 30 °C — de l'effecteur avec la préparation enzymatique.

DISCUSSION. CONCLUSION. — L'aptitude à résister au parasitisme des *Phytophthora* a été décelée, dès les premiers stades végétatifs, chez divers *Lycopersicum*. Elle correspond à la présence dans leur patrimoine génétique de facteurs de résistance soit au *P. infestans*, soit à plusieurs autres agents pathogènes (4). Dès l'invasion des tissus, parmi les réactions décelables, surviennent des modifications qualitatives et quantitatives des composés phénoliques. Le plus souvent, elles concernent la stimulation des synthèses d'hétérosides et d'esters d'acides hydroxycinnamiques. Leurs teneurs s'accroissent surtout dans les zones nécrosées. L'infection expérimentale des plantules peut évoluer différemment. Ainsi, chez le *L. pimpinellifolium*, en deçà de la limite de résistance, les activités pectinolytiques *in situ* diminuent puis disparaissent (5). Chez l'hybride à phénotype Marmande, plus sensible aux 2 souches de *Phytophthora*, les mêmes réactions se situent entre 36 et 54 h après

l'inoculation ; elles sont seulement surmontées par des quantités plus importantes de mycélium.

Au cours de ces processus apparaît une substance qui possède à la fois des fonctions phénol et amine. Elaborée dans des délais aussi courts que les autres composés phénoliques, elle est retrouvée dans toutes les parties de la tige. L'induction de sa synthèse est-elle aussi peu spécifique que la stimulation de celle des autres substances phénoliques ou bien résulte-t-elle de l'intervention d'un produit élaboré par l'agent pathogène ? Sa production n'est pas perturbée par la suppression de l'éclairement au début de l'infection. Aux doses limitant la croissance du *Phytophthora* et inhibant de façon non compétitive ses pectine-lyases, les systèmes enzymatiques des cellules de l'hôte, en particulier les polyphénol-oxydases, pourraient n'être que peu affectés.

La substance est synthétisée par des plantules possédant en commun les gènes PH et S de résistance au *P. infestans*. S'il n'existe aucun indice de sa spécificité, l'expérience prouve que la potentialité de sa synthèse est transmissible par hybridation. Ces caractéristiques correspondent au concept de phytoalexine. La connaissance des mécanismes de leur induction et de leur élaboration, celle des conditions de transfert et du mode d'action au niveau des cellules nécrosées contribueraient peut-être à améliorer la résistance des *Lycopersicum esculentum* au parasitisme des *Phytophthora*.

(*) Séance du 7 février 1972.

(1) M. PERTEN, *Cereal Chem.*, 43, 1966, p. 336-342.

(2) A. RAVISÉ, *Comptes rendus*, 267, Série D, 1968, p. 1821-1824.

(3) A. RAVISÉ, *Agron. Trop.*, 25, 1970, p. 1015-1031.

(4) A. RAVISÉ et J. TANGUY, *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 1252-1255.

(5) A. RAVISÉ et B. TRIQUE, *Agron. Trop.* (sous presse).

(6) E. T. REESE et A. M. MAGUIRE, *Can. J. Biochem.*, 46, 1968, p. 25-34.

(7) J. TANGUY, *Thèse de Sciences*, Paris, 1970.

(8) B. TRIQUE, *Oléagineux*, 26, 1971, p. 164-168.

(9) B. TRIQUE et A. RAVISÉ, *Comptes rendus*, 273, Série D, 1971, p. 1805-1808.

*Laboratoire de Biologie Végétale,
Université de Bretagne Occidentale, 29 N-Brest, Nord-Finistère ;
Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer,
24, rue Bayard, 75-Paris, 8^e.*