

**UNIVERSITE DE PARIS-SUD**

**CENTRE D'ORSAY**

**T H E S E**

**PRESENTEE**

**POUR OBTENIR**

**LE TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE**

**SPECIALITE : PHYTOPATHOLOGIE**

**P A R**

**P.V. SUBBA RAO**

**LA ROUILLE DE L'ARACHIDE**

**ETUDE DE QUELQUES MECANISMES DE DEFENSE DE L'HOTE**

Soutenu le 21 Decembre 1987, devant la Commission d'examen :

MM. A. COLENO	:	PRESIDENT
J. EINHORN	:	RAPPORTEUR
A. RAVISE	:	"
G. BOMPEIX	:	EXAMINATEUR
Y. BRYGOO	:	"
J.P. GEIGER	:	"

TO MY PARENTS

TO MY WIFE AND SON

TO MY BROTHERS AND MY SISTER

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier tout d'abord **le Gouvernement Indien, le Gouvernement Français et le Gouvernement Ivoirien** de m'avoir permis de réaliser ces recherches en m'attribuant une bourse dans le cadre de la coopération culturelle et scientifique entre ces pays. Je remercie également **l'ICRISAT** (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, Inde) qui m'a accordé un congé d'étude et les graines de quelques génotypes cultivés et espèces sauvages d'Arachide pour la préparation de cette thèse, et **L'ORSTOM** (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération) de m'avoir accueilli dans ses structures et financé ces recherches.

Les travaux exposés dans le présent mémoire ont été réalisées au sein du **Laboratoire de Phytopathologie du centre ORSTOM d'Adiopodoumé en Côte d'Ivoire**.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur **A. RAVISE**, Directeur de Recherches à l'ORSTOM, à Bondy, qui a accepté de diriger cette thèse. Mon travail initial dans son Laboratoire, puis les relations et les discussions que nous avons eues durant mon séjour en Côte d'Ivoire, ont été très fructueuses pour moi. J'aimerais tout particulièrement le remercier ici et lui exprimer ma très sincère gratitude pour son aide scientifique et son soutien moral.

Au terme de ce travail, je remercie très sincèrement Monsieur **J.P. GEIGER**, Directeur de Recherches au centre d'Adiopodoumé, qui a accepté de diriger localement ce travail en me plaçant dans les meilleures conditions possibles. Sa rigueur scientifique, ses suggestions, ses recommandations ainsi que les discussions m'ont été d'une aide extrêmement précieuse. C'est un honneur qu'il me fait de juger aujourd'hui ce mémoire.

Je suis très reconnaissant à Monsieur **J. EINHORN**, Directeur de Recherches de l'INRA (Institut National de Recherches Agronomique) d'avoir accepté d'être Rapporteur de la présente thèse. Je le remercie tout particulièrement d'avoir, en

collaboration avec Monsieur **C. MALOSSE**, consacré un temps précieux à l'identification des nouvelles phytoalexines et fournis les molécules de synthèse en vue des tests de fongitoxicité.

J'exprime mes très vifs remerciements à Madame **VERNENGI**, chercheur au Laboratoire de Phytopathologie, ORSTOM, Bondy, qui a réalisé les purifications complémentaires de quelques phytoalexines.

L'expression de mes plus vifs remerciements vont à **Messieurs les Professeurs A. COLENO** (Institut National Agronomique, Paris), **G. BOMPEIX** (Département de Pathologie Végétale, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI), et **Y. BRYGOO** (Université Paris XI) de l'honneur qu'ils me font de juger ce travail et de l'intérêt qu'ils ont manifesté tout au cours de sa réalisation.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur **M. NICOLE**, qui a accepté de m'aider, pas à pas, dans la rédaction de ce mémoire; cela évidemment compte-tenu de ma connaissance imparfaite de la langue Française.

Je remercie très amicalement mon collègue Monsieur **S. SAVARY**, qui depuis quelques années a réalisé, à Adiopodoumé, des recherches sur l'épidémiologie de la rouille de l'Arachide. Son aide scientifique m'a permis de réaliser ce travail avec plus de confiance.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur **B. RIO** pour sa collaboration au plan biochimique durant ce travail.

J'exprime également toute ma sympathie et mes remerciements à mes collègues **D. NANDRIS**, **C. DECLERT** et **P. BLIZOUA-BI** pour l'atmosphère amicale et enthousiaste dont ils m'ont entouré.

Je remercie de même Monsieur **B. TAQUET**, chercheur à l'IRHO (Institut de Recherche sur les Huiles et Oléagineux), Dabou (Côte d'Ivoire), qui m'a très amicalement donné l'accès à son laboratoire pour les analyses en CLHP.

Mes remerciements vont également à **K. KOUASSI** et **S. DIGBEU** pour leur collaboration technique et à tout le personnel du laboratoire d'Adiopodoumé.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, à des titres divers, m'ont soutenu dans la réalisation de ce travail.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>I. Origine et historique de la culture</b>	<b>1</b>
<b>II. Intérêt de l'Arachide: Une culture des pays en développement</b>	<b>1</b>
<b>III. Conditions d'exploitation de l'Arachide</b>	<b>2</b>
<b>IV. La rouille de l'Arachide</b>	<b>3</b>
1. Position taxonomique de <i>P. arachidis</i>	5
2. Syptomatologie	5
3. Biologie de <i>P. arachidis</i>	6
4. Lutte contre la rouille	7
<b>V. Généralités sur les mécanismes de la résistance chez les plantes</b>	<b>8</b>
1. Les barrières physiques	9
2. Les barrières chimiques	9
<b>VI. Objectifs et progression des recherches</b>	<b>12</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>15</b>
<b>I. Matériel expérimental</b>	<b>15</b>
1. L'hôte	15
2. Le parasite	16
3. Techniques d'infections artificielles	17
4. Incubation	17
5. Nature et détermination des composantes de résistance	18
6. Modulation des réactions de défense de l'Arachide	18
<b>II. Etudes histologiques et histochimiques</b>	<b>20</b>
1. Estimation du nombre de spores sur la surface des feuilles	20
2. Estimation du nombre de spores germées, du nombre d'appressoria formées et du nombre de pénétrations	21
3. Observations des étapes du cycle parasitaire	21
4. Techniques cytologiques et histochimiques	21
5. Observations au microscope électronique	23
<b>III. Etude des peroxydases et dosage du pool protéique</b>	<b>25</b>
1. Etudes des peroxydases	25
2. Estimation du pool protéique	26

<b>IV.</b>	<b>Etude des phytoalexines et des composés phénoliques</b>	<b>27</b>
1.	Préparation des extraits bruts	27
2.	Tests biologiques	28
3.	Dosage des phénols totaux	29
4.	Caractérisation de certains composés	29
5.	Procédure de purification des phytoalexines	31
<b>V</b>	<b>Analyse statistique</b>	<b>35</b>
<b>CHAPITRE - I : Mise en évidence de quelques réactions de l'Arachide en réponse à l'infection par <i>P. arachidis</i></b>		<b>37</b>
<b>I.</b>	<b>Déroulement de la Pathogénèse</b>	<b>39</b>
<b>II.</b>	<b>Etudes de quelques réactions de l'Arachide à l'infection par <i>P. arachidis</i></b>	<b>42</b>
1.	Réactions histologiques et histochimiques	42
2.	Observations au microscope électronique	46
3.	Réactions au plan moléculaire	48
<b>III.</b>	<b>Mise en évidence de composés fongitoxiques</b>	<b>59</b>
1.	Test de toxicité pour <i>Cladosporium cladosporioides</i>	59
2.	Inhibition de la germination des spores de <i>P. arachidis</i>	60
<b>IV.</b>	<b>Effet de l'abscission des feuilles sur les composantes de résistance et différents paramètres biochimiques</b>	<b>63</b>
1.	Effet sur la teneur en composés phénols totaux	65
2.	Effet sur la composition des extraits en substances absorbant à 280 nm séparées en CLHP	72
3.	Effet sur la fongitoxicité des extraits	74
4.	Effet du détachement et de la mise en survie des feuilles sur les composantes de résistance	77
<b>V.</b>	<b>Discussion</b>	<b>81</b>
<b>CHAPITRE - II : Etude cinétique des réactions de l'hôte</b>		<b>87</b>
<b>I.</b>	<b>Analyse en CLHP des extraits de feuilles d'Arachide: effet de l'attaque parasitaire et de la durée de l'infection; effet génotypique</b>	<b>88</b>
1.	Rappel méthodologique; profil d'un diagramme d'élution en CLHP sur colonne de silice	88
2.	Effet de l'infection parasitaire et de sa durée sur le diagramme d'élution des extraits en CLHP, effet génotypique	90
3.	Effet sur la fraction 'α'	93

II.	Etude cinétique de l'évolution de la toxicité <i>in vitro</i> des extraits bruts	102
1.	Résultats	103
2.	Analyse statistique des résultats	105
III.	Discussion	108
<b>CHAPITRE - III : Isolement, purification et tentatives d'identification de phytoalexines</b>		<b>111</b>
I.	Matériel végétal, techniques d'extraction et de purification	112
1.	Matériel végétal	112
2.	Techniques d'extraction	112
3.	Techniques de purification	114
II.	Isolement de dérivés d'acides gras insaturés en C <sub>18</sub>	119
1.	Esters méthyliques d'acides gras insaturés en C <sub>18</sub>	120
2.	Dérivés oxygénés d'acides gras insaturés en C <sub>18</sub>	124
III.	Caractérisation d'une substance fongitoxique de structure aliphatique	128
IV.	Identification de phytoalexines de nature phénolique	130
1.	Hydroxystilbènes	130
2.	Médicarpine	131
3.	Nonyl phénols	131
4.	Alkyl bis phenyl éthers	134
V.	Produits fongitoxiques non identifiés	140
1.	Substance isolée de la phase insaponifiable	140
2.	Substances apolaires isolées de la phase hexane	142
3.	Substance extraite par la phase acétate d'éthyle	142
VI.	Discussion	143
<b>CHAPITRE - IV : Etude de la modulation des réactions de défense de l'hôte</b>		<b>145</b>
I.	Essai de modulation des réactions de l'hôte par l'AOA et le TEPA	146
1.	Effet sur la teneur en composés phénoliques totaux	147
2.	Effet sur la fraction 'α'	147
3.	Effet sur les composantes de résistance	151

<b>II.</b>	<b>Essai de prémunition de l'Arachide contre l'infection par <i>P. arachidis</i></b>	<b>159</b>
	1. Dosage des phénols totaux	160
	2. Estimation des composantes de résistance	160
<b>III.</b>	<b>Discussion</b>	<b>165</b>
	<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>173</b>
	<b>RESUME</b>	<b>181</b>
	<b>SUMMARY</b>	<b>183</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>185</b>

# INTRODUCTION

L'Arachide (*Arachis hypogaea* L.) est une plante oléagineuse de la famille des Légumineuses, appartenant au sous-groupe des Papilionacées, très largement répandue dans toutes les régions tropicales du monde. Sa zone de culture, comprise entre le 40° parallèle Nord et le 40° parallèle Sud (McDONALD, 1984) à l'exception des régions désertiques et sahéliennes, couvre une superficie d'environ 19 millions d'hectares (F.A.O., 1978). La production mondiale moyenne est estimée à 20,4 millions tonnes de gousses par an (IRHO/CIRAD, 1986).

## I - ORIGINE ET HISTORIQUE DE LA CULTURE

Selon HIGGINS (1951), l'Arachide serait originaire d'Amérique du Sud, de la région du Grand Chaco (Paraguay et Parana). La littérature rapporte son existence dès le 16<sup>e</sup> siècle, mais ce n'est qu'au cours du 18<sup>e</sup> siècle que cette plante fut signalée dans la plupart des pays tropicaux du monde (côtes d'Afrique, Jamaïque, Asie, îles du Pacifique) (GILLIER et SILVESTRE, 1969). Selon ces auteurs, les portugais auraient introduit l'Arachide au début du 16<sup>e</sup> siècle sur la côte occidentale d'Afrique, alors que les espagnols le firent, à peu près à la même époque, aux Philippines, à partir de la côte Ouest du Mexique. De là, cette culture se serait étendue vers la Chine, le Japon, le Sud-Est Asiatique, l'Inde et l'Australie. Et c'est probablement à partir du Sri Lanka (ex-Ceylan), ou de la Malaisie, qu'elle aurait ensuite atteint Madagascar et la côte orientale d'Afrique.

## II - INTERET DE L'ARACHIDE : UNE CULTURE IMPORTANTE POUR LES PAYS EN DEVELOPPEMENT

L'Arachide est une plante totalement comestible; la graine est consommée par l'homme, le reste par le bétail:

-la graine a une valeur nutritive trois fois supérieure à celle des céréales, du fait de sa forte teneur en huile (48 à 53%) et en protéines (25 à 34%). Dans les régions des zones tropicales où les oléagineux pérennes (Palmier et Cocotier) ne se développent pas, l'Arachide constitue la principale source d'huile; elle représente, du point de vue énergétique, 5.800 k.calories/kg contre 3.500 pour les céréales. En outre, elle renferme une forte teneur en protéines et acides gras essentiels, que l'organisme humain ne peut synthétiser.

-le tourteau (résidu de la graine après extraction de l'huile) riche en protéine (48 à 50%), a constitué pendant longtemps un élément important dans l'alimentation du bétail en Europe, et singulièrement en France.

-les fanes servent également à l'alimentation du bétail, à tel point que dans certaines régions, l'Arachide est cultivée pour la seule production de fanes.

Outre son intérêt au plan nutritionnel, il convient de signaler que les coques d'Arachide peuvent être largement utilisées comme combustible dans les pays en voie de développement où le problème de l'énergie est crucial.

La culture de l'Arachide revêt donc, pour certains pays, une importance considérable; ceci d'autant plus que l'huile extraite de la graine d'une part, et l'Arachide dite "de bouche" d'autre part, se vendent à des prix élevés par rapport aux autres produits alimentaires, ce qui place cette culture au rang des cultures rentables. A noter que la culture de l'Arachide est souvent pratiquée en rotation avec les céréales (tels que Mil et Sorgho) et le coton, dont l'apport nutritif (lipides, protéines) est complémentaire de celui des céréales (glucides) (IRHO/DOA, 1984).

### III - CONDITIONS D'EXPLOITATION DE L'ARACHIDE

Bien qu'il existe de nombreuses exploitations de type industriel, environ 67% de la production mondiale d'Arachide provient des petites exploitations paysannes des zones tropicales humides et semi-arides. Dans de telles exploitations, les rendements restent faibles, de l'ordre de 780 kg/ha de gousses

sèches, alors que, potentiellement, ils peuvent atteindre 5.000 kg/ha (McDONALD, 1984). En effet, de nombreuses contraintes limitent la production arachidière: maladies d'origine parasitaires, ravageurs, aléats climatiques. En ce qui concerne les maladies, celles d'origine parasitaire sont les plus importantes. Ainsi, en Côte d'Ivoire par exemple, où la culture de l'Arachide couvre 60.000 ha environ (source: Ministère de l'Agriculture, 1975), des enquêtes phytosanitaires ont permis de recenser seize champignons phytopathogènes différents, dont six sont largement répandus (SAVARY, 1987 a) et parmi lesquels *Puccinia arachidis*, *Cercospora arachidicola* et *Cercosporidium personatum* présentent un danger majeur.

#### IV - LA ROUILLE DE L'ARACHIDE

La rouille de l'Arachide est une maladie foliaire due à *P. arachidis*. Cette affection, prédominante dans de nombreuses régions arachidières, peut causer jusqu'à 50% de pertes de rendement dans les conditions traditionnelles de culture (SUBRAHMANYAM et McDONALD, 1983; SAVARY, 1984), et près de 79% en cas d'épidémie artificielle (MAYEE et BAHETI, 1983). Cette maladie a retenu l'attention des pathologistes, et des responsables du développement rural, en raison de sa progression rapide sur l'ensemble des grandes régions de production du monde. Avant 1969, l'aire de distribution de cette maladie était limitée à l'Amérique du Sud et aux Caraïbes. Depuis cette époque, elle s'est progressivement étendue à presque toutes les régions arachidières du globe [(SUBRAHMANYAM et al., 1983 a, 1983 b) (figure 1)]. En Afrique occidentale, et notamment en Côte d'Ivoire (SAVARY, 1984), elle est devenue, depuis quelques années, un facteur important de réduction des rendements (BROMFIELD, 1974; McDONALD et EMECHEBE, 1978). Au champ, elle se développe souvent avec deux autres parasites, *C. arachidicola* Hori, et *C. personatum* (Berk & Curt.) Deighton (figure 2) (Cercosporioses de l'Arachide) accentuant davantage encore la baisse de rendement.

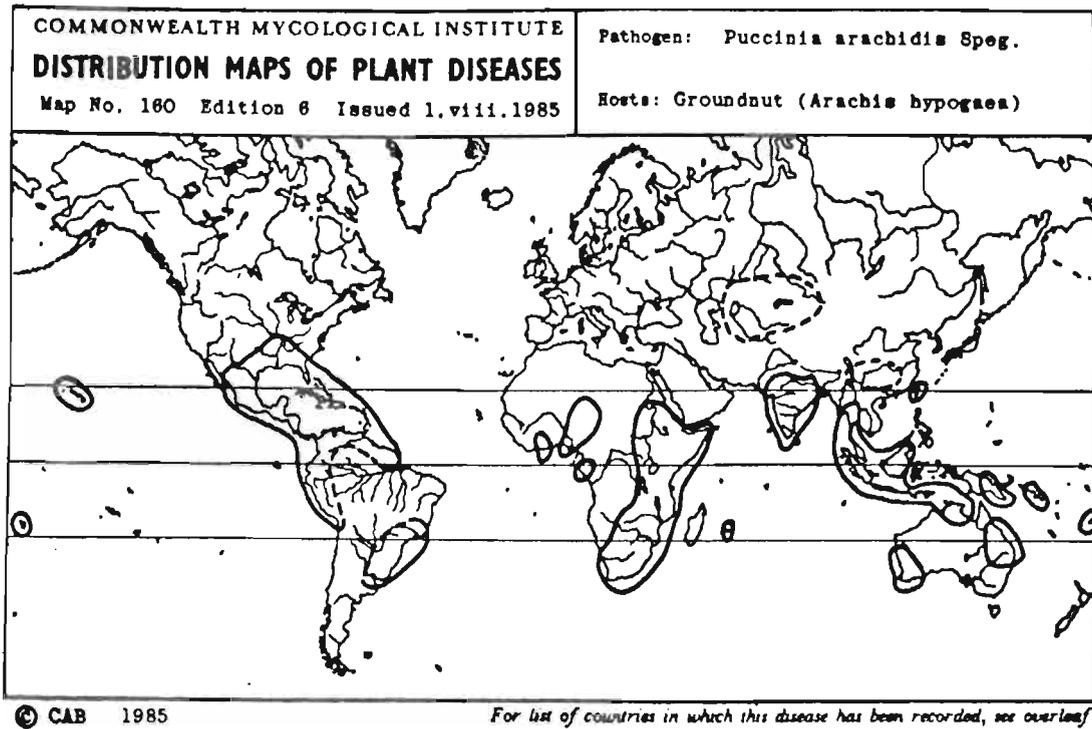


Figure 1: Répartition géographique mondiale de la rouille.

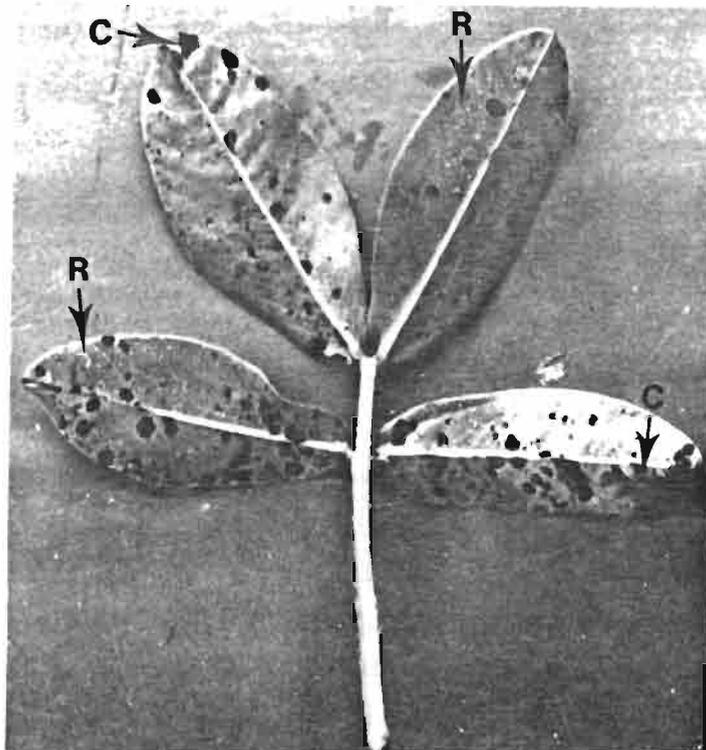


Figure 2: Une feuille d'Arachide du génotype Local (sensible) ayant des lésions de rouille (R) et de cercosporiose (C).

## 1. POSITION TAXONOMIQUE DE *Puccinia arachidis*

*P. arachidis* est un champignon Basidiomycète de l'ordre des Urédinales. Ce champignon a été décrit pour la première fois par SPEGAZZINI en 1884. Plusieurs autres descriptions ont toutefois été proposées avant l'adoption de la terminologie actuelle. Ce sont :

- \**Uredo arachidis* Lagerheim. 1894. Tromso. Mus. Aarsh. 17:106.
- \**Uromyces arachidis* P. Henn. 1896. Hedwigia 35 : 224
- \**Bullaria* (?) *arachidis* (Speg.) Arthur et Mains 1922. North American Flora 7 (7) : 484.

Les urédospores, de forme circulaire ou elliptique, sont de couleur brun foncé à maturité, et mesurent 16-22 (-24) x (21-) 23-29 (-30)  $\mu$ . Leur paroi, épaisse et ornementée, possède de 1 à 4 pores de germination (ARTHUR, 1934, et JACKSON et BELL, 1969). La viabilité de ces spores est faible (45 jours, MAYEE et EKBOTE, 1983; SUBRAHMANYAM, Comm. Pers.).

En général, le cycle biologique des agents de rouille est complexe. Celui de *P. arachidis* n'est principalement connu que par son stade urédospore. Toutefois, quelques auteurs ont décrit le stade téléospore, au cours duquel intervient la méiose; aucun hôte secondaire n'est, à ce jour, connu. La totalité de son cycle n'ayant pas été décrit, la position taxonomique de *P. arachidis* reste provisoire.

## 2. SYMPTOMATOLOGIE

La rouille est facilement identifiée grâce à ses urédosores (figure 3) brun-orangées. Habituellement disposées à la face inférieure des feuilles, les urédosores peuvent (dans le cas de variétés sensibles), également apparaître, ultérieurement, à la face supérieure. Elles sont circulaires et mesurent 0,5 à 1,4 mm de diamètre. Ces urédosores produisent de nombreuses urédospores, de même couleur, qui germent à la surface des feuilles lorsque l'humidité et la température sont favorables. Les tubes germinatifs différencient des appressoria, puis des hyphes

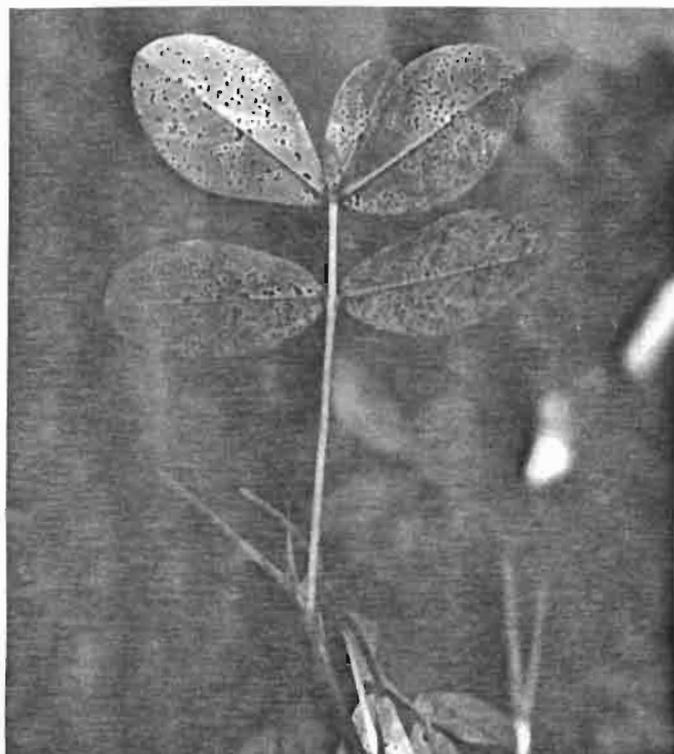


Figure 3: Une feuille d'Arachide du génotype Local (sensible) infectée par *Puccinia arachidis*.

d'infection qui pénètrent dans les tissus foliaires par les stomates. La période d'incubation de la maladie est variable, de 9 à 20 jours selon les conditions climatiques et la sensibilité de l'hôte (SUBRAHMANYAM et McDONALD, 1983). Les feuilles infectées par ce champignon se dessèchent sans se détacher de la tige.

### 3. BIOLOGIE DE *P. ARACHIDIS*

*P. arachidis* est classé parmi les parasites stricts bien que certains auteurs aient réussi, avec beaucoup de difficultés, à le cultiver. Il infecte plusieurs espèces appartenant au genre *Arachis*; d'autres hôtes n'ont jamais été décrits. Dans la nature, la dissémination des urédospores est anémochore et peut porter sur de grandes distances (WELLS, 1962; O'BRIEN, 1977; THOMPSON et SMITH, 1971; SUBRAHMANYAM et McDONALD, 1982). Cependant, la culture de l'Arachide en cycles successifs tout au long de l'année (dans les zones très humides) et son intensification, ainsi que la

présence de repousses après récolte favorisent le développement et la sévérité des épidémies (SUBRAHMANYAM et McDONALD, 1983; SAVARY, 1987 a).

#### 4. LUTTE CONTRE LA ROUILLE

Plusieurs méthodes de lutte sont actuellement envisageables.

##### 1°) LES METHODES AGRONOMIQUES

L'application des mesures suivantes permet de réduire considérablement l'incidence de la maladie:

- \* élimination complète des repousses,
- \* pratique de la jachère,
- \* élimination des mauvaises herbes,
- \* bonne gestion des dates de semis

En pratique, surtout en milieu "paysannal traditionnel" il est illusoire de se fier à la mise en oeuvre de telles mesures compte tenu des moyens disponibles très limités.

##### 2°) LA LUTTE CHIMIQUE

Plusieurs auteurs ont préconisé l'utilisation de produits chimiques pour lutter contre la rouille (PATIL et al., 1979; SMITH et LITTERELL, 1980; MAYEE, 1982; MAYEE et BAHETI, 1983; SAVARY, 1984; SUBRAHMANYAM et al., 1985). Parmi ces produits, la bouillie bordelaise, l'hydroxyde de fentin, le tridémorphe et le chlorothalonil sont les plus efficaces. Cependant les difficultés d'approvisionnement, leur coût élevé et les difficultés de la mise en oeuvre correcte des traitements limitent leur utilisation systématique dans les pays en développement (GIBBONS, 1980).

##### 3°) LA LUTTE BIOLOGIQUE

Malgré l'existence de plusieurs hyperparasites de la rouille (SUBRAHMANYAM et McDONALD, 1983) tels que *Verticillium lecanii*

(Zimmerm.) Viegas, *Penicillium islandicum* Sopp.; *Eudarlucac caricis* (Fr.) O. ericks, *Acremonium persicinum* (Nicot) W. Gamms, *Darlucac filum* (Biv.) et *Tuberculina costaricana* Syd., une seule étude, à notre connaissance, a été entreprise, visant à l'utilisation de certains de ces champignons à l'encontre de *P. arachidis* (ZAMBETTAKIS et al., 1985).

#### 4°) LA LUTTE GENETIQUE

C'est certainement l'une des meilleures méthodes de lutte actuellement connue contre cette maladie. Plusieurs équipes de chercheurs (ORSTOM, IRHO, ICRISAT, Univ. du Texas, Instituts de recherche agronomique de divers pays d'Afrique tels que INERA, ISRA...) contribuent, par leurs efforts, à l'amélioration variétale de l'Arachide contre la rouille. De nombreuses variétés résistantes ont ainsi été caractérisées. Les techniques de transfert des caractères de résistance (par hybridation) aux variétés sensibles (agronomiquement beaucoup plus productives) sont en cours d'élaboration (McDONALD, 1984; IRHO/DOA, 1984). Plusieurs problèmes demeurent cependant non résolus, tels que la conservation de la résistance dans ces variétés et l'existence éventuelle de races physiologiques du parasite capables de surmonter ces résistances partielles ou totales.

## V - GENERALITES SUR LES MECANISMES DE LA RESISTANCE CHEZ LES PLANTES

L'augmentation régulière de la population mondiale exige un accroissement constant des espaces cultivables ou de la productivité agricole dans le but de subvenir aux besoins alimentaires croissant de cette population. Le développement important des cultures vivrières a vu apparaître, parallèlement, de nombreuses maladies infectieuses provoquant une baisse spectaculaire des rendements. La lutte contre ces maladies s'avère donc indispensable; parmi les méthodes préconisées, la sélection de variétés résistantes semble représenter une solution

satisfaisante. Dans ce cadre, la compréhension des interactions hôte-parasite, en termes de mécanismes de défense, peut contribuer à la réalisation d'une telle approche.

Les mécanismes de défense des plantes ont très largement été étudiés, tant au plan moléculaire que cellulaire. D'après HEITEFUSS (1980), la résistance active des plantes à l'attaque par des microorganismes est la résultante de toute une série de processus interconnectés, induits dans la cellule-hôte suite à des phénomènes de reconnaissance intervenant entre la plante et son parasite. Les conséquences de cette réaction sont l'inhibition ou l'élimination du parasite potentiel. Les mécanismes actifs de défense se traduisent, chez la plante, par la formation de barrières physiques et/ou biochimiques.

## 1. LES BARRIERES PHYSIQUES

Parmi les barrières physiques différenciées par la plante en réponse à une agression parasitaire, citons la formation de calcs (KOUNOH et ISHIZAKI, 1976), la lignification et la subérification des parois (RIDE, 1975) et la formation de papilles dont le rôle dans la défense active est toutefois controversé (HEITEFUSS, 1980). Enfin, le phénomène d'encapsulation des hyphes d'infection ou des haustoria, bien connu chez les plantes parasitées par les agents de rouille, ou par certains *Colletotrichum* (DARGENT et TOUZE, 1974), est également considéré comme une barrière physique.

## 2. LES BARRIERES CHIMIQUES

Dans le cas des barrières chimiques, on distingue des substances "préformées" préexistantes à l'infection, et des substances, globalement désignées sous le terme de "phytoalexines" élaborées après infection. Les composés phénoliques et terpéniques constituent les principales barrières préexistantes aux infections. Ils ont été décrits chez de nombreuses plantes (SCHLÖSSER, 1980; SCHÖNBECK et SCHLÖSSER, 1976).

Cependant, les recherches menées sur les phytoalexines suscitent un intérêt majeur. En effet, près de 300 de ces composés, appartenant à différents groupes chimiques, ont été

identifiés chez une quinzaine de familles botaniques. La première phytoalexine, la pisatine, un ptérocarpane, a été isolée chez le Pois (*Pisum sativum*) (PERRIN et BOTTOMLEY, 1962). La phaséolline fut ensuite isolée chez *Phaseolus vulgaris* (CRUICKSHANK et PERRIN, 1963), suivie de nombreuses autres dont la 6- $\alpha$ -hydroxyphaséolline, extraite du soja infecté par *Phytophthora megasperma* var. *soja* (KEEN et al., 1971); le vignafurane chez *Vigna unguiculata* infecté par *Colletotrichum lindemuthianum* (PRESON et al., 1975) et dans les feuilles détachées de *Tetragonolobus maritimus* (L.) Roth inoculées par des conidies d'*Helminthosporium carbonum* (INGHAM et DEWICK, 1978). Enfin, chez l'Arachide (HIJWEGEN, 1973), des ptérocarpanes ont également été isolés.

De façon générale, on constate que les composés ayant une action toxique *in vitro* à l'encontre des micro-organismes sont nombreux chez les dicotylédones. Les isoflavonoïdes et autres dérivés s'accumulent principalement dans le cas des légumineuses infectées. Actuellement, une centaine de ces composés ont été caractérisés chez les Papilionacées (INGHAM, 1982).

En ce qui concerne **les plantes affectées par des rouilles**, les mécanismes de défense sont extrêmement variés.

Dans le cas de *Phaseolus vulgaris* inoculé par *Uromyces vigna* Barcl., la teneur élevée en composés phénoliques associés aux parois est responsable de l'arrêt de la croissance du champignon (HEATH et STUMPF, 1986), tout comme peut l'être une déficience en éléments nutritifs chez *Vigna sinensis*, infecté par *U. phaseoli* var. *vignae* (HEATH, 1972).

En revanche, chez les graminées et d'autres familles botaniques, les phytoalexines semblent constituer le support essentiel des mécanismes de défense, excepté chez l'Orge chez lequel un mécanisme inconnu empêche la formation d'haustoria de *Puccinia hordei* dans les variétés résistantes (NICKS, 1986). Trois phytoalexines, les avénaluminés (I, II, III) s'accumulent dans le cas des interactions incompatibles entre l'Avoine et *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* (MAYAMA et al., 1982). Des études très détaillées menées par LEATH et ROWELL (1966, 1969 et 1970) sur des interactions identiques entre le Maïs et *Puccinia graminis*, suggèrent l'intervention d'une phytoalexine (non

identifiée) comme facteur de résistance. Par ailleurs, KEEN (1979) constate que la production *de novo* de deux composés fongitoxiques, l'alcool et l'aldéhyde coniférylique, peut être considérée comme un mécanisme de résistance chez le Lin attaqué par *Melampsora lini*.

Concernant l'**Arachide**, de nombreux travaux font état de divers **mécanismes physiologiques** intervenant dans la pathogenèse induite par *P. arachidis*. SUBRAHMANYAM et al., (1976, 1978) observent une accumulation de sucres totaux et d'azote aminé, une diminution de l'évapotranspiration de la plante, ainsi qu'une augmentation de la respiration des feuilles parasitées. Dans ces mêmes feuilles, une augmentation de la teneur en protéines et en sucres solubles a également été observée, tandis que les quantités d'acide ascorbique, de chlorophylle et de phosphore diminuent (SIDDARAMAIAH et al., 1979). Par ailleurs, une diminution de la concentration en glycolipides et en phosphatidyl-glycérol coïncide avec une diminution de la teneur en chlorophylle, attribuée à la dégradation des membranes chloroplastiques (RAMAGOPAL et SREENIVASULU, 1983). Selon REDDY (1984), il n'y a aucune différence qualitative dans le contenu en acides phénoliques entre tissus parasités et sains. En revanche, l'infection provoque une augmentation de la teneur en composés phénoliques, comme les acides chlorogénique et caféique. Enfin, au cours de la période de latence de l'infection, on peut noter un accroissement de certaines activités enzymatiques (peroxydase, acide ascorbique oxydase et phénoloxydase; EKBOTE et MAYEE, 1984).

Les travaux sur les **phytoalexines produites par l'Arachide** ont été initiés par KEEN et INGHAM (1976). Ces chercheurs ont isolé les isomères *cis* et *trans* du 3,5,4'-trihydroxy stilbène, qui semblent dériver des *cis* et *trans* 3,5,4'-trihydroxy-4-isopentényl stilbènes, décrits par ailleurs chez une variété africaine d'Arachide (INGHAM, 1976). Deux autres phytostilbènes ont aussi été découverts dans les graines attaquées par divers microorganismes (AGUAMAH et al., 1981). L'induction de la biosynthèse du *trans*-résvératrol a également été observé chez trois variétés sensibles infectées par *Curvularia spicata* ou par *Helminthosporium oryzae* (NARAYANASWAMY et MAHADEVAN 1983 a et b).

Récemment, STRANGE et al., (1985) ont constaté que les folioles parasitées par *Cercospora arachidicola* ou *Phoma arachidicola* réagissent en produisant une phytoalexine, la médicarpine (3-hydroxy-9-méthoxyptérocarpane).

Ainsi, si les travaux sur les capacités de défense de l'Arachide à l'encontre de divers parasites sont relativement nombreux, on constate toutefois qu'aucune étude n'a été conduite sur les mécanismes de défenses élaborés par cette plante après infection par *P. arachidis*, ceci, malgré l'importance de ce parasite et la découverte de variétés résistantes. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier quelques-unes des réactions biochimiques et cytologiques de l'Arachide à *P. arachidis*, susceptibles d'intervenir dans la défense active de l'hôte.

## VI - OBJECTIFS ET PROGRESSION DES RECHERCHES

Dans le cadre de l'étude des réactions de défense élaborées par l'Arachide en réponse à l'infection par *P. arachidis*, nous avons tenté de répondre à plusieurs questions:

1. Quels types de réaction à l'infection l'Arachide élabore-t-elle? Concernant ces réactions, existe-t-il une différence entre l'agression dû à l'attaque parasitaire et une agression physique (stress) telle que l'abscission des feuilles?

2. Existe-t-il une induction des réactions en fonction du temps après l'infection et/ou en fonction de l'origine variétale? Quelle signification, peut-on attribuer à l'accumulation de produits fongitoxiques? Quelle est la nature de ces derniers; est-il légitime de les assimiler à des phytoalexines?

3. Est-il possible de moduler le déroulement de la pathogénèse par l'administration de composés chimiques (AOA, TEPA) ou par une inoculation préalable de la plante par un champignon non pathogène (prémunition)? Une telle interaction présente-t-elle un intérêt au plan pathologique ?

En pratique, le présent mémoire est structuré en quatre chapitres.

Le **premier chapitre**, intitulé "Mise en évidence de quelques réactions de l'Arachide en réponse à l'attaque par *P. arachidis* " se veut non pas un répertoire exhaustif des réactions de cette plante, mais plutôt un indicateur de certaines tendances dans des domaines conditionnant généralement l'établissement de relations hôte-parasite.

En effet, bien que nos recherches portent principalement sur l'étude des phytoalexines, il nous paraissait important d'élargir nos connaissances des réactions de l'Arachide dans le cas de l'agression par l'agent de la rouille, le couple Arachide-*P.arachidis* étant relativement peu étudié dans le domaine considéré. Nous examinerons donc successivement cinq aspects différents de la réaction de la plante: histo-cytologique, activité peroxydasique, protéines totales, phénols totaux et phytoalexines.

Concernant ces dernières nous avons, en outre, examiné un aspect qui nous paraissait important, en relation avec, d'une part, la notion même de phytoalexine (substance induite ou préformée?) et, d'autre part, la notion de stress et de ses effets (effet de l'abscission des feuilles). Il s'agit là d'une étude critique qui devait, entre autres, déterminer notre choix quant au matériel végétal à utiliser au cours de nos expérimentations: plantes entières ou feuilles détachées.

Le **chapitre II** rassemble les résultats concernant l'accumulation par l'Arachide de certains composés (dont les phytoalexines) en fonction (a) du génotype, et (b) du déroulement de l'infection (variation dans le temps). Cette étude est fondée sur deux types de données:

- celles résultant de l'analyse en CLHP d'extraits bruts de feuilles de différentes origines et ayant subi divers traitements.

- et celles issues de mesures de la toxicité des extraits vis à vis de spores de *P. arachidis* (inhibition de la germination).

Le **chapitre III** décrit l'isolement, la purification et l'identification de quelques phytoalexines produites par l'Arachide en réponse à l'agression par *P. arachidis*.

Bien que l'identification de nouvelles substances naturelles puisse constituer une fin en soi, elle ne doit être considérée dans le cas particulier de nos recherches, que comme une étape préliminaire. En effet, la caractérisation des produits fongitoxiques devrait grandement faciliter l'interprétation des diagrammes d'éluion en CLHP. Ceux-ci comportent de très nombreux "pics", et seul un nombre limité d'entre eux, correspondant aux composés identifiés et biologiquement actifs, présente un intérêt dans le cadre des recherches que nous avons initiées et qui devront être poursuivies, notamment quant à la modulation de leur biosynthèse et aux effets synergiques qu'ils peuvent développer.

Le **chapitre IV** aborde les problèmes liés à l'inhibition et à l'induction des mécanismes de défense par des interventions artificielles: application d'acide  $\alpha$ -oxyaminoacétique (AOA), de tris-o-éthyl phosphonate d'aluminium (TEPA), contamination par un champignon non pathogène pour l'Arachide (prémunition). Ici, l'effet est jugé non pas tant à l'échelle moléculaire, mais plutôt au niveau des réactions de la plante en regard de quatre composantes de résistance préalablement déterminées au cours des études de pathogenèse et d'épidémiologie de la rouille (SUBRAHMANYAM et al., 1983 a, SAVARY, 1986).

# MATERIELS ET METHODES

## I - MATERIEL EXPERIMENTAL

### 1. L'HOTE

De très nombreux génotypes d'Arachide sont connus; six d'entre eux (espèces cultivées) ont été retenus pour l'ensemble des expérimentations alors que trois autres (espèces sauvages) n'ont fait l'objet que d'études ponctuelles.

---

#### GENOTYPES CULTIVES

---

Type botanique	Nom de collection	Origine	Collection	Sensibilité à la rouille*
-	Local	Côte d'Ivoire	ORSTOM	S
<i>vulgaris</i>	TMV2	Inde	ICRISAT	S
<i>fastigiata</i>	PI 259747	Pérou	ICRISAT	R
<i>fastigiata</i>	NC Ac 17090	Pérou	ICRISAT	R
<i>hypogaea</i>	RMP-91	Burkina Faso	ICRISAT	S
<i>hypogaea</i>	69101	-	-	S

---

#### ESPECES SAUVAGES

---

<i>Arachis chacoense</i>	ICRISAT	I
<i>Arachis glabrata</i>	ICRISAT	I
<i>Arachis</i> sp. (GKP 9893)	ICRISAT	HR

---

Tableau 1. Matériel végétal utilisé au cours des expériences.

\* S : sensible; R : résistant; HR : hautement résistant; I : immune (ne développant aucun symptôme visible) (SUBRAMANYAM et al., 1983 a et c).

### Conditions de culture de l'Arachide :

Les plantes sont cultivées en pots (deux plantes par pot) remplis de terre, préalablement stérilisée à sec (16 h à 180°C), et arrosées quotidiennement. Jusqu'à l'âge d'un mois, elles sont maintenues à la température et sous éclairage naturel; pendant la période d'expérimentation, elles sont maintenues, durant 48 h, en chambre d'incubation dans les conditions suivantes: température  $25,5 \pm 1^\circ\text{C}$ ; éclairage: lampes fluorescentes (Philips), intensité lumineuse: 200 lux; photopériode: 12 heures; puis elles sont replacées en serre.

Le matériel végétal proprement dit est constitué soit de feuilles détachées (2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> rangs foliaires à partir de l'apex) mises en survie, soit de plantes entières âgées d'environ 1 mois.

En cas d'expérimentation sur folioles détachées, celles-ci sont placées dans des boîtes de Petri dont le fond est recouvert d'un papier filtre imbibé d'eau pour y assurer une humidité saturante (COOK, 1980 b; SAVARY, 1985 a). La face supérieure des folioles est posée au contact du papier filtre.

En cas d'expérimentations sur plante entière, les folioles ne sont détachées qu'au moment d'opérer le broyage. Les conditions de mise en survie des folioles et de maintien des plantes entières après infection artificielle sont celles indiquées plus loin (voir N° 4: Incubation).

## 2. LE PARASITE

Une souche de *P. arachidis* (urédospores) provenant du Sud de la Côte d'Ivoire est entretenue au laboratoire par réinfections successives de folioles détachées provenant d'un génotype sensible (Local). Elle est utilisée (SAVARY, 1985 b) comme souche de référence pour l'infection des plantes.

Les spores utilisées pour les infections expérimentales sont récoltées 12 à 14 jours après la date de contamination à l'aide d'un échantillonneur "cyclone spore" (ERI Instrument Shop, Iowa State University of Science and Technology, Iowa, USA), ou par grattage de la surface des folioles à l'aide d'une lame à rasoir.

### 3. TECHNIQUES D'INFECTION ARTIFICIELLE

Deux méthodes ont été utilisées en fonction de la nature des expériences à réaliser.

#### 1°) INFECTION PAR VOIE SECHE

Cette technique, utilisée pour toutes les études biochimiques, met en oeuvre un inoculum sous la forme d'un mélange de spores et de kaolin (15 mg de spores pour 1 000 mg). 200 mg de mélange de spores et de kaolin par boîte de Petri sont déposés sur la face inférieure des folioles à l'aide d'un pulvérisateur (SAVARY, 1985 a). Le poids de spores employé pour obtenir une dose optimale est calculé afin d'atteindre environ 270 spores/cm<sup>2</sup> de foliole. Dans tous les cas, 4 folioles par boîte ont été infectées.

#### 2°) INFECTION A L'AIDE D'UNE SUSPENSION DE SPORES

Les spores récoltées à l'aide d'un échantillonneur "cyclone spore" sont mises en suspension dans l'eau distillée additionnée d'une goutte de Triton X-100 1% (octyl phénoxy polyéthoxyéthanol - Sigma) en guise d'agent mouillant. La concentration en spores est estimée à l'hématimètre, puis ajustée de manière à obtenir une concentration de 50.000 spores/ml. Cette suspension est ensuite pulvérisée sur les deux faces des feuilles (SUBRAHMANYAM et al., 1983 a). Cette méthode est principalement employée pour réaliser les infections sur plantes entières.

### 4. INCUBATION

#### 1°) FOLIOLES DETACHEES

Les boîtes de Petri contenant les folioles infectées (ou non

infectées) sont placées dans une enceinte à température contrôlée, maintenue à  $25,5 \pm 1^\circ\text{C}$ , à l'obscurité pendant 24 h (car la lumière gêne la germination des spores - SUBRAHMANYAM, comm. pers.), puis sous un éclairage d'environ 200 lux avec une photopériode de 12 heures. L'éclairage est assuré par des lampes fluorescentes auxquelles deux ampoules ordinaires de 100 W sont ajoutées pour compléter le spectre lumineux.

## 2°) PLANTES EN POTS

Les plantes âgées d'environ un mois, sont séparées en deux lots; l'un sera infecté, l'autre servira de témoin. Les plantes sont ensuite conservées dans une chambre où l'humidité est maintenue à saturation. Les autres conditions de conservation sont les mêmes que celles décrites pour les folioles détachées.

## 5. NATURE ET DETERMINATION DES COMPOSANTES DE RESISTANCE

Au cours des expérimentations, nous avons étudié les composantes de résistance (ZADOKS, 1972 b) suivantes:

1°) PERIODE D'INCUBATION (PI): délai (en jours) qui sépare la contamination et l'apparition des premiers symptômes. En pratique, PI est estimé sur une population de lésions par la date à laquelle 50% des lésions sont visibles sous forme de points d'infection. (COOK, 1980 a; SAVARY, 1985 b; SUBRAHMANYAM et al., 1983 a).

2°) PERIODE DE LATENCE (PL): délai (en jours) qui sépare la contamination et la rupture de l'urédosore. En pratique PL est estimée sur une population de lésions par la date à laquelle 50% des pustules sont rompues, par rapport au nombre total d'urédosores sporulant à la fin de l'expérience (PARLEVLIT, 1975).

3°) FREQUENCE D'INFECTION (FI): nombre de lésions développées par unité de surface foliaire ( $\text{cm}^2$ ). FI est calculée en estimant la surface (S) de chaque foliole par la relation  $S = \pi (L \cdot l) / 4$  où L et l représentent la longueur et la largeur de la foliole.

4°) DIAMETRE DE LESION (DL): diamètre moyen (en millimètre) d'environ 30 lésions mesurées au hasard à la fin d'expérimentation. Celui-ci est mesuré grâce à un micromètre oculaire monté sur un microscope.

5°) INTENSITE DE SPORULATION (SP): estimée selon une échelle comportant cinq classes (1: pas de sporulation; 5: maximum de sporulation), avec au moins trois répétitions par traitement.

6°) POURCENTAGE DE LA SURFACE DE FEUILLES COLONISEES (% SFC): surface de la feuille couverte par les pustules et, éventuellement, leur halo chlorotique, exprimée en pourcentage par rapport à la surface totale.

7°) POURCENTAGE DE LESIONS NECROSEES (% LN): ce paramètre est exprimé en pourcentage du nombre de lésions nécrosées par rapport au nombre de lésions totales.

L'estimation des composantes 1°, 2° et 7° est réalisée grâce au décompte quotidien des lésions. Le comptage débute dès l'apparition de la première lésion et se poursuit jusqu'à l'arrêt du développement de nouvelles lésions (primaires).

## 6. MODULATION DES REACTIONS DE DEFENSE DE L'ARACHIDE

### 1°) TRAITEMENT PAR LE TRIS-O-ETHYL PHOSPHONATE D'ALUMINIUM (TEPA)

Ce traitement est réalisé en serre, exclusivement sur plantes entières, soit par pulvérisation foliaire à l'aide d'un

pulvérisateur en verre, soit par dépôt d'une solution adéquate au pied des plantes. Le traitement est effectué tous les 6 jours, il débute 6 jours avant la contamination artificielle; le prélèvement est effectué 10 jours après cette dernière. Deux doses différentes ont été utilisées au cours de nos expériences: 5 mg (dans 25 ml d'eau)/pot et 10 mg (dans 25 ml d'eau)/pot. Chaque pot contient deux plantes d'Arachide âgées environ d'un mois. Ces traitements ont été réalisés sur un génotype sensible (Local) puis sur un génotype résistant (NC Ac 17090).

## 2°) TRAITEMENT PAR L'ACIDE $\alpha$ - OXYAMINOACETIQUE (AOA):

L'AOA est appliqué au niveau du système racinaire des plantes cultivées en pots. L'âge des plantes utilisées est d'environ un mois. L'AOA est appliqué tous les deux jours à raison de 1,25 mg (dans 25 ml eau distillée)/pot. Le traitement début 6 jours avant la contamination artificielle et s'achève 10 jours plus tard.

## II - ETUDES HISTOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES

### 1. ESTIMATION DU NOMBRE DE SPORES DEPOSES SUR LA SURFACE DES FEUILLES

Deux heures environ après l'infection artificielle, le nombre de spores déposées est compté au microscope, directement sur les feuilles infectées.

Ces valeurs sont exprimées en nombre de spores déposées par  $\text{cm}^2$ . Environ 100 champs microscopiques sont observés pour chaque traitement.

## 2. ESTIMATION DES NOMBRES DE SPORES GERMEES, D'APPRESSORIA ET DE PENETRATIONS

Ces observations ont été réalisées sur des fragments de feuilles infectées, éclaircies dans une solution de Carnoy (alcool absolu: acide acétique glacial - 3/1 v/v) pendant 24 à 48 heures, puis coloré par le bleu de lactophénol pendant 24 heures.

## 3. OBSERVATIONS DES ETAPES DU CYCLE PARASITAIRE

Une technique particulière d'éclaircissement (SHIPTON & BROWN, 1962) a été développée pour l'étude cytologique des relations hôte-parasite chez les rouilles. Selon cette technique, les feuilles infectées sont coupées en petits morceaux de 2 cm de longueur et plongées dans 10 à 15 ml d'alcool lactophénol-bleu trypan (Lactophénol-bleu trypan alcool (95%) - 1/2 v/v). Le bleu de trypan-lactophénol est préparé comme suit :

Phénol	10 g
Glycérine	10 ml
Acide lactique	10 ml
Bleu du trypan	0.02 g
Eau distillée	10 ml.

Les fragments de feuilles sont portés à ébullition pendant 1 min, puis colorés pendant 48 heures, rincés à l'eau et placés dans de l'hydrate de chloral (5g/2ml d'eau) pendant 24 à 48 heures (Mc LEAN, 1979). Les morceaux de feuilles sont ensuite montés dans de la glycérine à 50% déposée sur une lame et observés au microscope photonique Orthoplan (ERNST LEITZ GMBH WETZELAR, R.F.A.).

## 4. TECHNIQUES CYTOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES

Les feuilles d'Arachide infectées par *P. arachidis* sont décolorées dans l'éthanol à 95% bouillant pendant 5 à 10 minutes. Les tissus ainsi obtenus sont conservés dans l'éthanol jusqu'au moment de l'observation.

## 1°) MISE EN EVIDENCE DE COMPOSES FLUORESCENTS

Pour la détection de la callose, des fragments de tissus du mésophylle contenant des lésions sont placés pendant 2 à 4 heures à 20°C dans une solution de bleu d'aniline à 0,01% dans du  $K_3PO_4$  M/15 à pH 9,5. Les tissus sont montés entre lame et lamelle et observés au microscope Leitz Orthoplan équipé d'une source U.V. réfléchie (filtre d'excitation BP 340-380 avec un maximum de transmission à 380 nm; un filtre d'arrêt LP 430; condensateur pour fond clair). Les dépôts de callose dans les tissus sont détectés par leur fluorescence jaune brillant.

Les segments de feuille sont d'abord examinés directement sous UV dans le but d'apprécier la fluorescence primaire de tissus.

## 2°) MISE EN EVIDENCE DES LIGNINES

### **a) Détection des lignines de type coniférylique (unités galacyl), coloration au phloroglucinol:**

A cet effet des fragments de tissus préalablement décolorés à l'éthanol sont traités pendant 3 à 6 minutes par une solution éthanolique saturée en phloroglucinol. Les lignines contenant des motifs coniféryliques se colorent en rouge violacé après révélation à l'acide chlorhydrique concentré.

### **b) Détection des lignines de type syringique; coloration de Maüle:**

Les tissus décolorés sont rincés à l'eau distillée puis immergés dans une solution aqueuse de  $KMnO_4$  à 1% pendant quelques minutes. Après un lavage à l'eau distillée, les tissus sont décolorés 5 min. dans une solution d'acide chlorhydrique 2N pendant 5 minutes. Les lignines sont révélées au  $NH_4Cl$  2N. La

réaction est positive pour les lignines contenant des unités syringylpropanes; elle se traduit par une coloration rouge pourpre très intense.

### 3°) MISE EN EVIDENCE DE LA SUBERINE (SHERWOOD ET VANCE, 1976)

Les tissus sont immergés dans du Soudan III B pendant 2 à 4 heures. Le colorant est une solution saturée de Soudan III B dans de l'éthanol à 95%.

## 5. OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET)

Les techniques classiques de préparation du matériel végétal (HALL, 1978) sont appliquées en vue de l'observation en microscopie électronique.

### 1°) PREPARATION DES ECHANTILLONS

#### a) Fixation

Le matériel végétal est prélevé et immédiatement immergé *in toto*, dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M, à pH 7,2, pendant 4 heures. Les feuilles sont par la suite fragmentées, en petits morceaux de 1 à 2 mm<sup>3</sup> qui sont maintenus 2 heures dans ce fixateur, puis abondamment lavés avec la solution tamponnée.

Après cette fixation, les fragments foliaires sont post-fixés durant deux heures avec le tétroxyde d'osmium en solution à 1% dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M, à pH 7,2 (NICOLE, 1984).

### **b) Inclusion**

Après déshydratation dans les bains d'alcool éthylique de concentration croissante et passage dans deux bains d'oxyde de propylène, les échantillons sont inclus dans l'Epon 812 selon le procédé décrit par LUFT (1961).

L'imprégnation, dont les temps varient de 5 à 24 heures, ont lieu à des températures allant de 25 à 40°C. La polymérisation des blocs s'effectue à 60°C durant 72 h.

### **c) Coupes**

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un couteau en verre ou en diamant, monté sur un ultramicrotome Porter Blum (LKB). Les coupes fines sont recueillies et disposées sur des grilles sur support de cuivre de 200 mesh.

### **d) Contrastes**

Une double coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb, a été réalisée. L'acétate d'uranyle est employé à 5% dans l'eau distillée durant 15 min. à température ambiante, et le citrate de plomb est utilisé selon la technique préconisé par REYNOLDS (1963).

### **e) Observations**

Les coupes contrastées sont observées au microscope électronique Siemens 102 du G.E.R.M.E. d'Abidjan, opérant à 80 Kv. Les images sont photographiées sur plan-film Agfa de format 6 x 9 cm. Les tirages des clichés sont réalisés sur papier Kodak Kodabrome II RC de graduation 3 à 5.

### III - ETUDE DES PEROXYDASES ET DOSAGE DU POOL PROTEIQUE

#### 1. ETUDE DES PEROXYDASES

##### 1°) PREPARATION DES EXTRAITS

Les feuilles d'Arachide, infectées ou saines, sont récoltées sur des plantes entières et broyées immédiatement dans du tampon phosphate de sodium 0,0125 M, à pH = 6,0 (10 ml/g.P.F). Le broyat est laissé à macérer pendant 6 à 12 h, puis filtré sur verre fritté et centrifugé à 15 000 g pendant 10 min. Sur ces extraits seront effectués la détermination de l'activité peroxydasique et le dosage des protéines totales.

##### 2°) MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'activité catalytique est mesurée à température ambiante en milieu tamponné (phosphate de sodium: 0,05 M à pH 6; volume final: 5 ml) contenant du gaïacol et de l'eau oxygénée respectivement à 0,2 et 0,1% en concentration finale. Le temps d'incubation est généralement égal à 1 minute. Pour la mesure des activités spécifiques, la réaction est toujours effectuée en milieu préparé extemporanément et le déroulement de la réaction (D0 420nm) est enregistré en continu; l'activité est calculée à partir de la portion linéaire du graphe. Lorsque l'on recherche l'effet des ions calcium sur l'activité peroxydasique, l'incubation est réalisée en tamponné tris-maléate 0,05 M à pH 6,8 avec (ou sans) chlorure de calcium à 0,005 M en concentration finale.

##### 3°) ELECTROPHORESE SUR GEL D'AMIDON

La méthode d'électrophorèse sur gel d'amidon employée dans le cadre de nos expérimentations est un système horizontal décrit par

SMITHIES (1955) et modifiée par SECOND et TROUSLOT (1980).

Les conditions d'électrophorèse sont les suivantes:

Ampérage	: 50 mA
Voltage	: 90 V
Tampon	: tris maléate (pH 6,5)
Température	: 4°C
Durée d'électrophorèse	: 20 heures environ

La position des isoperoxidases est révélée par leur activité catalytique qui, en présence d'eau oxygénée et de 3-amino-9-éthyl carbazole conduit à la formation d'un produit d'oxydation et de condensation de couleur brune.

La composition du milieu de révélation est la suivante:

Solution 1 :

3-amino-9-éthyl carbazole (substrat)	60 mg
Diméthyl formamide (dissolution du substrat)	4 ml

Solution 2 :

Tampon Acétate 0,05 M (pH : 5)	200 ml
Solution de CaCl <sub>2</sub> 0,01 M	4 ml
Solution de guïacol	0,4 ml
Solution de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 30%	0,1 ml

Les solutions 1 et 2 sont mélangées très rapidement pour éviter la floculation du substrat.

L'électrophorégramme est révélé par incubation durant un temps approprié; puis la réaction est arrêtée en rinçant le gel avec de l'acide acétique à 5%.

## 2. ESTIMATION DU POOL PROTEIQUE

Cette estimation est réalisée selon la méthode de BRADFORD (1976) dont le principe repose sur le couplage entre les protéines et un colorant, le bleu de coomassie G-250. Ce couplage provoque une modification de la longueur d'onde correspondant maximum d'absorption, (465 --> 595 nm), et permet donc le dosage des

protéines à cette dernière longueur d'onde. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de protéine/ml (ou par mg de tissus frais) par référence à une courbe d'étalonnage établie à l'aide de sérum albumine de boeuf.

La composition du réactif est la suivante :

Bleu de Coomassie 250 (Sigma)	100 mg
Ethanol (95%)	50 ml
Acide phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 85%	100 ml
Eau distillé	amené à 1 litre

#### Réalisation du dosage:

On mélange 100  $\mu\text{l}$  de l'échantillon (éventuellement dilué) à 5 ml de réactif et on laisse la coloration se développer au moins durant 2 minutes. La D.O. est lue à 595 nm; elle est stable durant 1 heure environ.

## IV - ETUDE DES PHYTOALEXINES ET DES COMPOSES PHENOLIQUES

### 1. PREPARATION DES EXTRAITS BRUTS

Les tissus frais infectés ou sains, provenant de plantes entières ou de folioles mises en survie, sont broyés après un lavage à l'eau et séchage avec du papier de filtre. Le broyage est réalisé dans du méthanol à 50% à raison de 7,5 ml/g tissus frais à l'aide d'un omnimixer Sorvall. Le broyat ainsi obtenu est laissé pour macération à l'obscurité pendant 48 heures.

Ce broyat est ensuite filtré sur verre fritté n°1. Le filtrat ainsi obtenu est évaporé à sec sous vide à la température de 40°C à l'aide d'un évaporateur Büchi, (Switzerland). L'extrait sec est ensuite repris par le méthanol (pur) dans des proportions volumiques de 1 ml pour un équivalent de 5 g de tissu frais. L'extrait méthanolique ainsi obtenu est conservé à la température

de 0°C. Cette procédure est utilisée dans tous les cas, à l'exception de ceux relatifs aux essais de purification que nous décrirons plus loin.

## 2. TESTS BIOLOGIQUES

Deux tests biologiques sont utilisés afin de repérer les substances fongitoxiques, d'une part, et, d'autre part, d'en estimer l'activité biologique dans les différents extraits.

### 1°) TEST DE TOXICITE POUR LE *CLADOSPORIUM CLADOSPORIODES*

Les extraits étudiés sont chromatographiés sur couche mince (CCM) de silice dans différents systèmes de solvants de migration. Après séchage des chromatogrammes, une suspension de spores de *C. cladosporioides* dans une solution à 2% de saccharose est pulvérisée sur la plaque, suivie par une pulvérisation de milieu nutritif gélosé (PDA). Les plaques sont ensuite mises à incuber 48 heures à 25°C ± 1°C en humidité saturante. Les zones toxiques pour *C. cladosporioides* se matérialisent sous la forme de plages blanches sur fond vert foncé. Cette coloration verte est due à la sporulation intense du champignon dans les zones dépourvues de substances toxiques.

### 2°) TEST D'INHIBITION DE GERMINATION DES SPORES DE *P. ARACHIDIS*

Cette technique permet de révéler la fongitoxicité d'un extrait à différentes concentrations. Le milieu germinatif utilisé est une solution stérile de saccharose à 2%. Les extraits sont testés aux concentrations finales correspondant à 0,62 mg, 1,25 mg et 2,50 mg (équivalent poids frais de feuilles extraites)/ml. Les spores sont incubées dans ce mélange durant 3 heures à 25°C ± 1°C à l'obscurité. Après ce délai, le décompte des spores germées est réalisé au microscope (Leitz-Orthoplan) sur deux séries d'échantillons, chacun d'au moins 300 spores en suspension dans

les milieux comportant la quantité d'extrait voulue et des milieux-témoin, sans extrait, mais comportant des volumes équivalents de solvant (un "témoin général" est également réalisé où le solvant est remplacé par un volume équivalent d'eau afin de tester la capacité de germination effective de chaque lot de spore et de quantifier l'effet solvant). A partir de ces données, est calculé le pourcentage d'inhibition de la germination.

### 3. DOSAGE DES PHENOLS TOTAUX

Le dosage des phénols totaux est réalisé selon la méthode de FOLIN-CIOCALTEU. Il correspond à la mesure de la D.O à 765nm résultant de l'oxydation des composés phénoliques par le réactif.

La concentration en phénols totaux est calculée par référence à une courbe étalon réalisée avec de l'acide chlorogénique (composé phénolique très répandu dans le règne végétal) bien que la sensibilité maximale du dosage ne soit pas obtenue avec ce composé. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de phénols (équivalents acide chlorogénique) par ml d'extrait ou par mg de tissus frais.

### 4. CARACTERISATION DE CERTAINS COMPOSES

#### 1°) ANALYSES SPECTRALES

Les spectres d'absorption sont généralement établis pour des longueurs d'onde comprises entre 400 et 220nm. Dans le cas de substances ionisables des déterminations du spectre différentiel d'ionisation sont également effectués par "lecture" des solutions alcalinisées contre les solutions acides correspondantes.

La détermination des caractéristiques spectrales présente un intérêt essentiellement dans le cas d'échantillons purifiés, dans la mesure où elle permet de les comparer à celles de substances de référence.

## 2°) REACTION COLOREE DE CERTAINS COMPOSES

Certains groupes de composés sont susceptibles d'être identifiés par des réactions colorées spécifiques. Deux types de réactifs ont été mis en oeuvre :

### a) Révélation à la paranitraniline diazotée

Ce réactif est constitué d'un mélange de 5 ml de paranitraniline à 0,5% dans de l'acide chlorhydrique 2N, 0,5 ml de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 5% et 15 ml d'acétate de sodium à 20%. Les chromatogrammes sont développés par pulvérisation de ce réactif sur les plaques de silice, suivie d'une pulvérisation d'une solution de carbonate de sodium à 20% (DAWSON et al., 1969). Les substances phénoliques aminées et certains composés hétérocycliques sont révélés sous la forme de taches jaunes ou orangées sur fond blanc.

### b) Révélation au chlorure d'antimoine ( $\text{SbCl}_3$ )

La mise en évidence de nombreuses substances, notamment de nature lipidique, est effectuée par pulvérisation d'une solution saturée de trichlorure d'antimoine dans du chloroforme. La plaque ainsi traitée est portée à 120°C pendant 15 min; les substances réactives sont révélées sous la forme de taches de couleur variée (bistre à violacée) sur fond blanc.

## 3°) CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CG-SM)

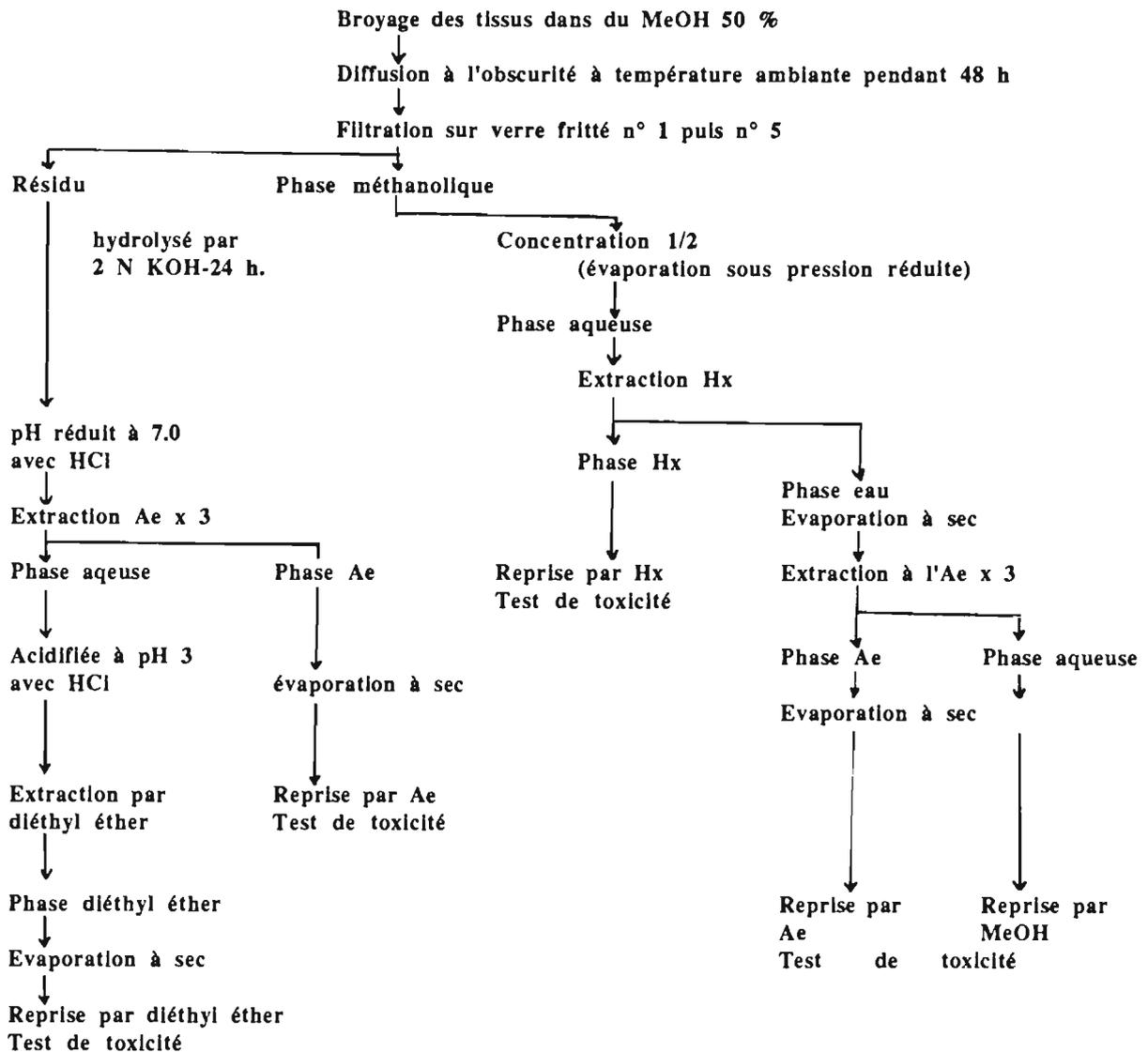
Les dérivés méthylés de certains composés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (Perkin Elmer 3920; détection par ionisation de flamme avec une colonne capillaire CP-Wax 57 CB-polaire de 50 m) couplée à un spectromètre de masse (Nermag R10-10c) piloté par ordinateur (travaux réalisés au laboratoire des médiateurs chimiques, Versailles). Les spectres de masse sont effectués en impact électronique, énergie des électrons = 70 eV,

et en ionisation chimique, énergie des électrons = 90 eV. La température de la source varie de 140°C à 250°C avec une progression de 10°C par minute.

## 5. PROCEDURE DE PURIFICATION DES PHYTOALEXINES

### 1°) METHODES D'EXTRACTION DES PRODUITS FONGITOXIQUES

Habituellement le protocole suivant est mis en oeuvre:



## 2°) CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE ATMOSPHERIQUE DE SILICE

Généralement la première étape de purification des phytoalexines consiste en une séparation des substances (contenues dans les phases organiques récupérées à l'issue de la procédure d'extraction que nous venons de décrire) sur une colonne de silice "atmosphérique" (ainsi dénommée par opposition à la technique CLHP réalisée sous haute pression). Les colonnes sont de dimensions variable: 25 à 60 cm de long et 1,5 à 2 cm de diamètre. Elles permettent de traiter des quantités importantes d'extrait et d'éliminer de nombreuses substances contaminantes (phénols, chlorophylle résiduelle...), préalable quasi indispensable à la mise en oeuvre de techniques plus fines (CCM et CLHP).

Les modalités spécifiques à chaque séparation seront décrites dans le chapitre III.

## 3°) CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

Cette technique est utilisée soit dans un but analytique sur des plaques de silice de 0,25 mm d'épaisseur, soit dans un but préparatif (purification des composés fongitoxiques) sur des plaques de silice de 0,5 mm. Ces dernières offrent la possibilité de traiter de grandes quantités de substances, avec cependant une résolution inférieure aux précédentes. En conditions analytiques, de nombreux systèmes de solvants ont été testés et utilisés suivant les besoins. Chaque substance est répertoriée par son  $R_f$ .

Systemes de solvants de migration :

1. n-hexane:acétate d'éthyle (Hx:Ae) - 2/1
2. n-pentane:diéthyl.éther:acide acétique glacial - (P:E:A.)  
75/25/3
3. Chloroforme:méthanol (Clf:MeOH) - 50/2
4. Chloroforme:méthanol (Clf:MeOH) - 50/1
5. Chloroforme:méthanol (Clf:MeOH) - 1/1
6. n-hexane:acétate d'éthyle:méthanol 90%- (Hx:Ae:MeOH)  
50/80/12

7. n-hexane:acétate d'éthyle:méthanol (90%) (Hx:Ae:MeOH) -  
50/80/06
8. Chloroforme:acétate d'éthyle:méthanol (Clf:Ae:MeOH) -  
50/50/10
9. Chloroforme:acétate d'éthyle:méthanol (Clf.Ae.MeOH) -  
50/50/0
10. Acétate d'éthyle:méthanol:eau (Ae:MeOH:E) - 100/10/3

En condition préparative, la phase mobile est le plus souvent constituée par le système chloroforme:méthanol : 50/2 v/v. Après migration des substances, séchage de la plaque et examen sous éclairage en lumière ultraviolette, la zone de la plaque contenant les composés à isoler est délimitée. La silice de cette zone est récupérée par grattage et les composés en sont élués par un mélange d'acétate d'éthyle et de méthanol (90/10). L'éluat est filtré, évaporé sous vide, puis les composés sont repris dans du méthanol absolu. Ces solutions sont conservées à -20°C.

#### 4°) CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ANALYTIQUE A HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

La séparation par CLHP est réalisée à l'aide d'un appareillage Beckmann comprenant deux pompes permettant d'effectuer des éluions en gradient continu. Très souvent, néanmoins, les séparations sont effectuées soit dans un système isochratique soit à l'aide d'un système de gradient discontinu. Les composés élués sont détectés à l'aide d'un détecteur (Beckmann 160) multicanaux (généralement la détection est faite à 280 nm). Enfin l'appareillage est complété par un intégrateur (Schimatzu CR-3A CHROMATOPAC). Cet ensemble constitue un outil de très grande qualité en raison de la finesse et de la reproductibilité des séparations qu'il autorise.

La séparation est réalisée soit sur des colonnes analytiques soit sur des colonnes préparatives qui ne diffèrent entre elles que par la taille et la capacité d'adsorption des substances étudiées. Deux types de supports sont mis en oeuvre, l'un constitué par de la silice (phase stationnaire polaire; système

encore appelé "phase normale"), l'autre par de la silice greffée en résidus C<sub>18</sub> (phase stationnaire apolaire système communément désigné sous les termes de "phase inverse").

#### **a) Utilisation à des fins analytiques**

Les analyses sont réalisées, systématiquement, sur une colonne de silice (5  $\mu$ ; 30 cm x 0,63 cm) et mettent en oeuvre des volumes d'extrait brut correspondant à 0,1 g de tissus frais. Cette procédure standardisée permet d'effectuer légitimement des comparaisons entre éluotogrammes de différents extraits.

L'éluotion est effectuée par un gradient discontinu obtenu par quatre systèmes de solvants constitués par un mélange, en proportion variable, des solvants suivants : hexane (Hx), acétate d'éthyle (Ae) et méthanol à 90% (MeOH) :

- |               |   |            |
|---------------|---|------------|
| 1) Hx:Ae:MeOH | : | 50/50/05   |
| 2) Hx:Ae:MeOH | : | 20/100/15  |
| 3) Hx:Ae:MeOH | : | 20/100/60  |
| 4) Hx:Ae:MeOH | : | 20/100/300 |

Le débit de la phase mobile est de 3 ml/min. Le diagramme d'éluotion est enregistré en continu et la surface relative des pics est calculée automatiquement (par un intégrateur). Les fractions correspondant aux quatre éluants sont désignées respectivement, sous la dénomination : fraction  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ .

#### **b) Utilisation à des fins préparatives**

Suivant la nature de la phase stationnaire, silice ou silice greffée en C<sub>18</sub>, la phase mobile est constituée d'un mélange d'hexane et d'acétate d'éthyle (65/35), soit d'un gradient de concentration en méthanol (50-99% dans l'acide acétique à 1%). Les différentes fractions isolées sont testées pour leur toxicité, puis évaporées à sec, reprises dans du méthanol et éventuellement rechromatographiées.

## V - ANALYSE STATISTIQUE

Nous avons utilisé principalement l'analyse de variance comme méthode statistique. Selon les données, nous avons employé soit l'analyse de variance à trois critères de classification [pour l'étude de l'effet du traitement par l'AOA ou le TEPA sur les composantes de résistance (CH-IV) et pour l'analyse du pourcentage d'inhibition de la germination des spores de *P. arachidis* (CH-II)], soit une analyse de variance à deux critères de classification [pour l'analyse de l'effet des mêmes traitement AOA-TEPA sur la composante "% de lésions nécrosées" (CH IV-I) et celle de la prémunition sur les composantes de résistance CH-IV-II)], (DAGNELIE, 1975).

Pour l'analyse des données concernant le pourcentage d'inhibition de la germination de *P. arachidis* par des extraits bruts d'Arachide, nous avons suivi une méthode d'analyse verticale, c'est à dire, après 2, 5 et 10j après l'infection (ZADOKS, 1972 b).



# CHAPITRE I

## MISE EN EVIDENCE DE QUELQUES REACTIONS DE L'ARACHIDE EN REPONSE A L'INFECTION PAR *P. ARACHIDIS*

Les plantes subissant une agression, en particulier d'origine infectieuse, réagissent le plus souvent par une modification au niveau de leur métabolisme général et/ou au niveau de certaines voies métaboliques particulières conduisant à l'accumulation de diverses substances chimiques, de protéines de structures ou enzymatiques, de polymères (lignines, subérines...) interférant avec le développement du parasite et/ou de la plante elle-même.

Parmi les réactions des plantes, les plus étudiées sont sans doute celles relatives à l'accumulation de composés fongitoxiques, (phytoalexines, substances phénoliques; AGUAMAH et al., 1981; KEEN, 1979, 1986; KEEN et INGHAM, 1976; NARAYANASWAMY et MAHADEVAN, 1983 a et b; STRANGE et al., 1985; TAQUET, 1985; VERNENGI, 1985), à la modification de barrières anatomiques et, corrélativement, à celle des enzymes impliquées dans leur biosynthèse (VAN SUMERE et al.), à la modification des équilibres ioniques et de la perméabilité membranaire (BATEMAN, 1964), aux capacités photosynthétisantes (ALLEN, 1942; MONTALBINI et BUCHANAN, 1974; TANI et al., 1973; WYNN, 1963), et enfin, au métabolisme respiratoire (DALY et al., 1961; SHAW, 1963) et énergétique en général.

Pour notre part, après une description rapide du déroulement de la pathogenèse, nous aborderons deux aspects:

- l'identification de quelques réactions de l'Arachide, en nous cantonnant aux domaines suivants: anatomie, histologie et biochimie (protéines et phénols totaux, activité peroxydasique, phytoalexines). Cette étude générale a été abordée en raison de



l'absence de données bien établies dans le cas du couple Arachide-*P. arachidis* .

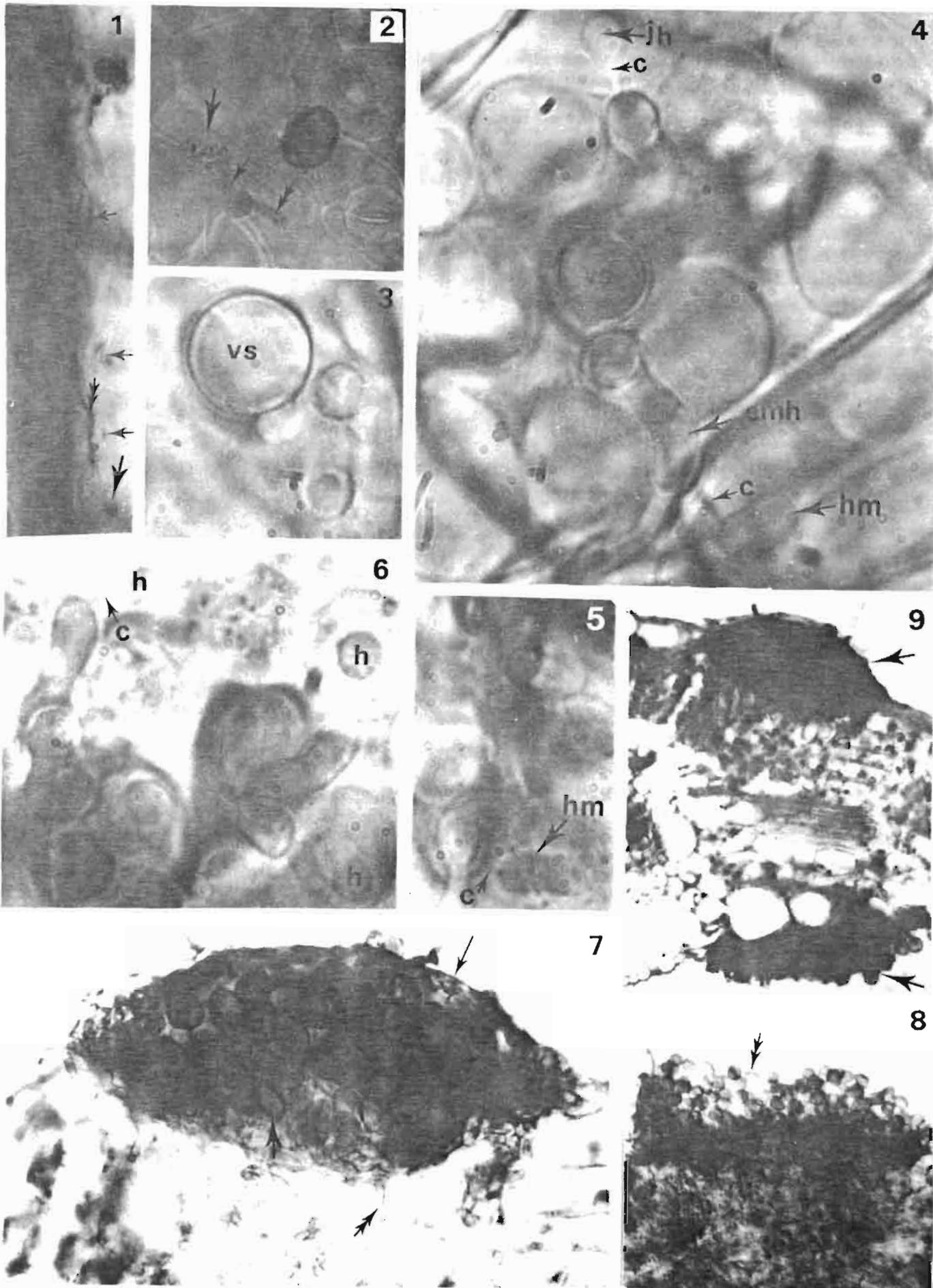
- l'effet de l'abscission des feuilles ou des folioles sur ces différents paramètres. Rappelons que cette partie des recherches répond à une double motivation: déterminer l'effet d'une agression purement mécanique (stress) et permettre de choisir le matériel végétal le mieux adapté aux objectifs de cette étude enfin d'éviter les interférences possibles entre les effets de l'abscission et ceux de l'infection.

## I - DEROULEMENT DE LA PATHOGENESE

Au cours du développement des épidémies de rouille, la source d'inoculum primaire provient de parcelles d'Arachide naturellement infectées par *P. arachidis* (SMITH et LITTRELL, 1980; SAVARY, 1987 a; SUBRAHMANYAM et MC DONALD, 1983; WELLS, 1962). La culture en continu, dans certaines zones favorables, son intensification et la repousse post-récolte, sont des facteurs essentiels dans le maintien de l'inoculum et l'extension des épidémies (SUBRAHMANYAM et MC DONALD, 1983; SAVARY, 1987 a et b). Par différents mécanismes de libération et de transport, les urédospores sont déposées sur les parties aériennes de la plante.

La première description du processus infectieux de *P. arachidis* date de 1980 (COOK a et b). Dans le cadre de cette étude, nous reprenons cette description afin de rappeler les principales étapes de l'infection auxquelles il sera souvent fait référence, explicitement ou implicitement, dans ce mémoire.

Lorsque l'humidité et la température sont favorables (SUBRAHMANYAM et Mc DONALD, 1983; SAVARY, 1985 b), les urédospores germent à la surface des feuilles, produisant, 6 heures plus tard, des tubes germinatifs habituellement dépourvus de ramification. La largeur de ces tubes est de 6  $\mu\text{m}$  environ (COOK, 1980 a); leur longueur varie sensiblement entre 100  $\mu\text{m}$  et 250 $\mu\text{m}$  (SUBBA RAO, non publié). Au contact d'un stomate, 12 h



après la contamination, le tube germinatif différencie un appressorium. La formation d'un appressorium n'est cependant pas nécessairement liée à la proximité du stomate (Planche I, photo 1). Après 24 heures, une coin d'infection, formé par l'appressorium (Planche I, photo 2), pénètre dans le stomate, et produit une vésicule dans la chambre sous-stomatique (Planche I, photo 3). Plusieurs hyphes d'infection se développent à partir de cette vésicule et différencient des haustoria qui coloniseront le mésophylle. Les jeunes haustoria ont une forme sphérique de 7  $\mu\text{m}$  de diamètre (Planche I, photo 4); ils prennent ensuite une forme légèrement allongée (7  $\mu\text{m}$  X 12  $\mu\text{m}$  environ, Planche I, photo 5). L'hyphe mycélienne se ramifie en arrière de chaque cellule-mère de l'haustorium, pour produire de nouveaux haustoria (Planche I, photo 6) jusqu'à ce que les tissus de l'hôte soient suffisamment colonisés pour nourrir le parasite (CHESTER, 1946). Plus tard, les hyphes convergent vers le centre de la feuille et s'étendent sous l'épiderme, en différenciant les cellules initiales des urédospores. La pression exercée par l'ensemble des jeunes urédospores (Planche I, photo 7) provoque la rupture de l'épiderme, les exposant ainsi à l'air libre où elles peuvent être libérées et dispersées (Planche I, photo 8).

-----  
 Planche I:

1. 24 heures après contamination, formation d'un appressorium (grande flèche) et pénétration du stomate par *P. arachidis*. Notez le tube germinatif (double flèche) passant au voisinage 3 stomates (petite flèche) sans les pénétrer (X 500).

2. 24 heures après contamination, pointe d'infection (petite flèche) différenciée par un appressorium (grande flèche). Notez la formation d'une hyphe d'infection (double flèche) (X 1250).

3. Formation d'une vésicule sous-stomatique (VS) (X 5000).

4 et 5. Formation des haustoria (h): haustorium jeune (jh) de forme sphérique et haustorium mature de forme allongée (hm). Notez la connection (c) entre la cellule mère de l'haustorium (cmh) et l'haustorium lui-même (X 5000).

6. Formation de plusieurs haustoria (h) (X 5000).

7. Formation de jeunes urédospores (grande flèche) dans un sore exerçant une pression sur l'épiderme (petite flèche); notez le mycélium inter-cellulaire (double flèche) (X 1250).

8. Rupture de l'épiderme et libération des urédospores (double flèche) (X 330).

9. Formation des sores (grande flèche) sur les deux faces de feuille (X 330).

Les premiers symptômes apparaissent à la surface inférieure des feuilles, 7 ou 8 jours après la contamination, sous forme de taches chlorotiques qui jaunissent pour prendre progressivement la couleur orangée caractéristique. Signalons que les variétés sensibles peuvent également développer des symptômes à la surface supérieure des feuilles (Planche I, photo 9).

## II - ETUDE DE QUELQUES REACTIONS DE L'ARACHIDE A L'INFECTION PAR *P. ARACHIDIS*

Les réactions de l'Arachide à l'infection par *P. arachidis* ont été étudiées au plan cellulaire (lignification, subérification, formation la callose etc.) et au plan moléculaire, [activité peroxydasique (AP), contenus proteique et phénolique]. Cette étude a été réalisée sur des plantes entières, infectées artificiellement, les feuilles n'étant détachées qu'au moment de l'observation et de l'analyse enzymatique ou chimique.

### 1. REACTIONS HISTOLOGIQUES ET HISTOCHIMIQUES

#### 1°) OBSERVATIONS AU MICROSCOPE OPTIQUE :

##### a) De la germination à la pénétration: étude des différentes étapes de l'infection en fonction du niveau de résistance des génotypes

Le but de ces observations est de mettre en évidence des modifications de comportement du parasite en fonction du niveau de sensibilité à la rouille chez cinq génotypes différents, depuis la contamination des feuilles jusqu'à la pénétration des coins d'infection dans les stomates.

Les critères retenus pour cette étude sont les suivants:

- proportions de spores germées,
- proportions d'appressoria formés,
- proportions de pénétration observées

Malgré de fortes variations du nombre de spores déposées, en se fondant sur les proportions de spores franchissant avec succès chaque étape considérée du cycle parasitaire, les résultats (tableau 2) peuvent être interprétés de la manière suivante:

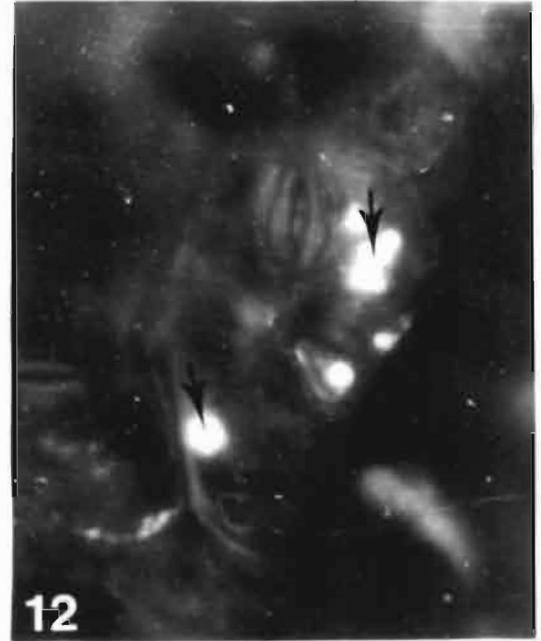
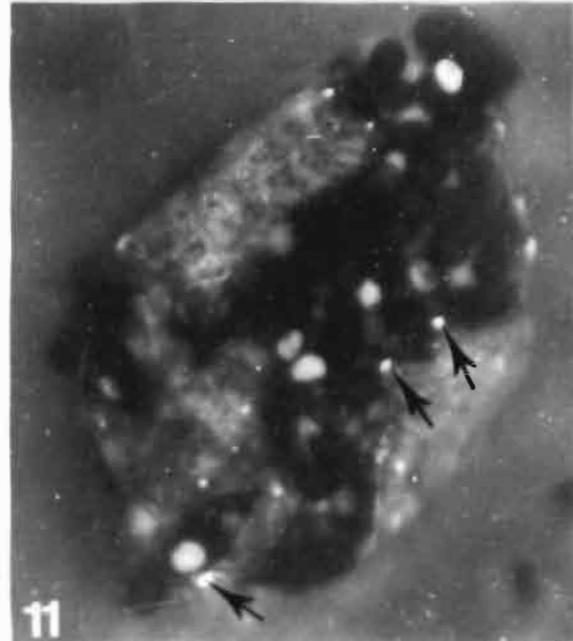
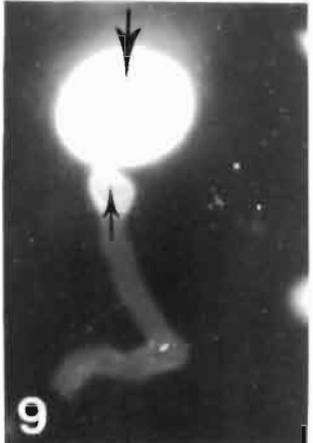
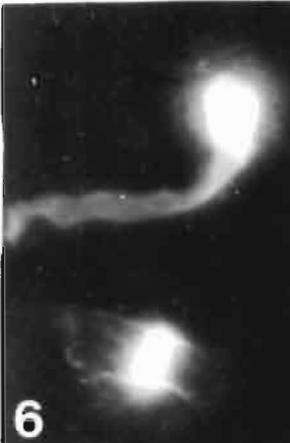
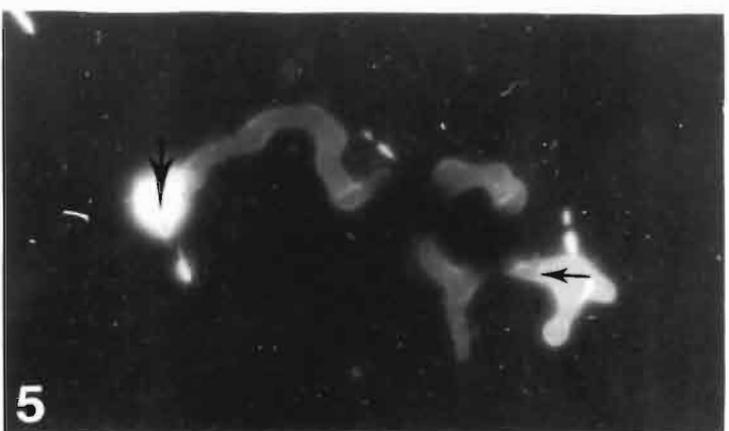
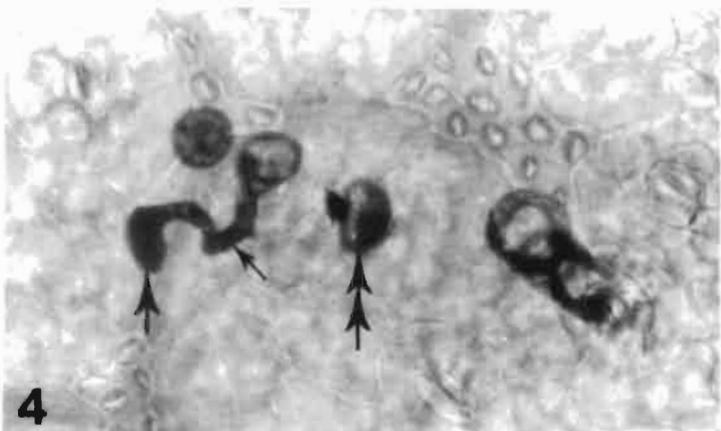
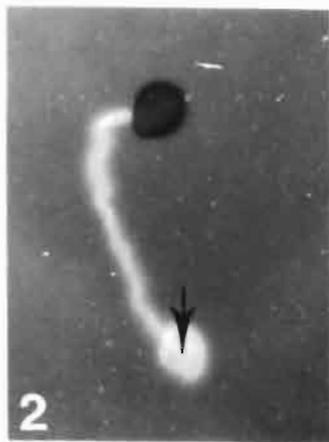
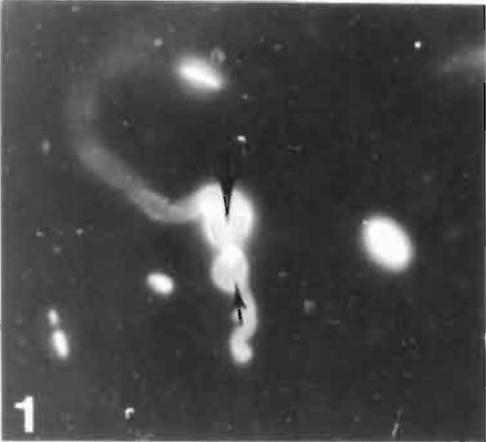
Génotype	Dépôt Spores /cm <sup>2</sup> §	G (%)*	AP (%)	P (%)	Nb. lésions par feuille**
Local (sensible)	63	100 <b>100</b>	100 <b>100</b>	100 <b>100</b>	1150 (g)
RMP 91 (moins sensible)	37	98 <b>100</b>	92 <b>93</b>	31 <b>34</b>	600 (g)
69101 (moins sensible)	41	91 <b>100</b>	82 <b>90</b>	25 <b>30</b>	991 (p)
PI 259747 (résistant)	74	93 <b>100</b>	81 <b>87</b>	39 <b>48</b>	402 (g)
NC Ac 17090 (résistant)	71	97 <b>100</b>	90 <b>93</b>	29 <b>32</b>	465 (g)

Tab. 2: Comparaison des première étapes de l'infection par *P. arachidis* des cinq génotypes retenus pour l'expérimentation, estimation par comptage au microscope [G (%) : Proportion de spores germées; AP (%) : Proportion d'appressoria formés; P (%) : Proportion de pénétrations observées]. \* : Valeurs maximales enregistrées; \*\* : Les valeurs enregistrées sont suivies par la caractéristique phénotypique des feuilles (g : grande; p : petite). § : Valeurs moyennes de 200 champs microscopiques sur quatre feuilles différentes. Les valeurs en gras représentent la proportion d'individus (spores) de la cohorte ayant franchi l'étape considérée.

- la proportion de spores germées et la proportion d'appressoria formés ne présentent aucune différence nette en fonction des génotypes quel que soit le niveau de sensibilité.

- il existe de grandes différences au niveau de la proportion de pénétration et au niveau du nombre de lésions développées par feuille à la fin du cycle parasitaire.

Il semble exister un mécanisme retardant, ou limitant, la pénétration du parasite dans les feuilles chez les génotypes résistants ou peu sensibles.



Ces observations confirment les résultats précédents (NEVILL, Comm. Pers.) mais, différent de ceux de COOK (1980 a) qui n'a pas observé de différences génotypiques au niveau de l'étape de pénétration.

### **b) Observations en fluorescence**

L'examen en lumière fluorescente permet de bien distinguer le tube germinatif, les appressoria et les points de pénétration du parasite (Planche II, photos : 1 à 5). Au moment de la pénétration de l'hyphe infectieuse dans les stomates (24 heures), apparaît un halo fluorescent (Planche II, photos : 6 à 10) bien visible chez le génotype sensible; ultérieurement les cellules de garde présentent, sous éclairage UV, une fluorescence bleutée dont l'intensité, bien que légèrement supérieure chez le génotype sensible, ne semble globalement pas différer d'un génotype à l'autre (Planche II, photo :9). Soixante douze heures après l'infection, l'intensité de la fluorescence

-----  
 Planche II:

1: Génotype NC Ac 17090, 24 heures après la contamination (X 830). Appressorium (grande flèche); pointe d'infection (petite flèche).

2 et 3. Génotype Local, 24 heures après la contamination (2: X 330; 3: 830). Appressorium (grande flèche); coin d'infection (petite flèche).

4. Génotype Local, 24 heures après la contamination. Coloration bleu de méthylène (X 830). Appressorium (grande flèche); Spore (double flèche); tube germinatif (petite flèche).

5. Génotype NC Ac 17090, 24 heures après la contamination (X 830). Appressorium (grande flèche). Notez l'existence d'une cloison (petite flèche) séparant le tube germinatif de l'appressorium.

6. Génotype Local, 24 heures après la contamination. Halo fluorescent autour d'un stomate (flèche) (recouvert par un appressorium) de la face inférieure d'une feuille (X 830).

7. Génotype NC Ac 17090, 24 heures après la contamination. Importante fluorescence des cellules de garde d'un stomate (flèches) vraisemblablement liée à la présence d'un appressorium (petite flèche) au niveau de l'ouverture stomatique (X 830).

8. Génotype RMP 91, 24 heures après la contamination. Fluorescence des stomates au moment de la pénétration (X 330).

9. Génotype 69101, 24 heures après la contamination. Importante fluorescence d'un stomate (grande flèche) au moment de la pénétration du coin d'infection différencié par l'appressorium (petite flèche) (X 830).

10. Génotype Local, 72 h après la contamination; les caractéristiques sont identiques à celles décrites pour la photo 9 (X 830).

11 et 12. Génotype Local, 10 j après la contamination (11: X 830; 12: 1320). Localisation de la callose par les taches fluorescentes (flèches).

diminue (Planche II, photo 10), pour disparaître 3 jours plus tard. Ces résultats ne mettent pas en évidence de relation directe entre la fluorescence des stomates et la résistance génotypique. De plus, cette technique ne permet pas de suivre le développement de l'haustorium et la colonisation des tissus, malgré des temps d'incubation prolongés dans le fluorochrome. Ces résultats concordent avec ceux de COHEN et al., (1987), mais diffèrent de ceux de NICKS (1983) et ROHRINGER (1977) qui, grâce à cette technique, observent les hyphes intercellulaires.

### **c) Mise en évidence de quelques réactions histologiques**

Parmi les réactions initiées par les plantes en réponse à l'infection, l'observation par les méthodes histologiques des phénomènes subérification, de lignification des parois ainsi que celle de la formation de callosités, ne présente généralement pas de difficulté majeure. L'application, aux feuilles infectées, des tests histologiques des constituants de la paroi végétale (entre 6 heures et 10 jours après la contamination) ne révèle, dans le modèle retenu pour cette étude, aucune réponse positive aux marqueurs spécifiques de la lignine et de la subérine, quel que soit le génotype utilisé. En revanche, durant cette même période, des dépôts de callose ont été observés dans les cellules hôtes au voisinage des urédosores (Planche II, photo 11 et 12) pour l'ensemble des 5 génotypes examinés.

Concernant ces caractères, non seulement aucune distinction ne peut donc être faite entre génotypes sensibles et résistants, mais encore aucune réaction très nette induite par l'infection parasitaire n'est décelable par ces méthodes.

## **2. OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE**

La microscopie électronique a été mise en oeuvre afin de déterminer l'effet de l'infection au niveau ultrastructural et, de mettre en évidence d'éventuelles réactions différentielles entre génotypes.

Malgré la forte densité d'inoculum utilisée, et malgré une grande rigueur dans le choix des échantillons au moment de la fixation, l'observation des coupes ultrafines réalisées sur des fragments de feuilles infectées, a systématiquement révélé l'absence de spores au contact de la cuticule.

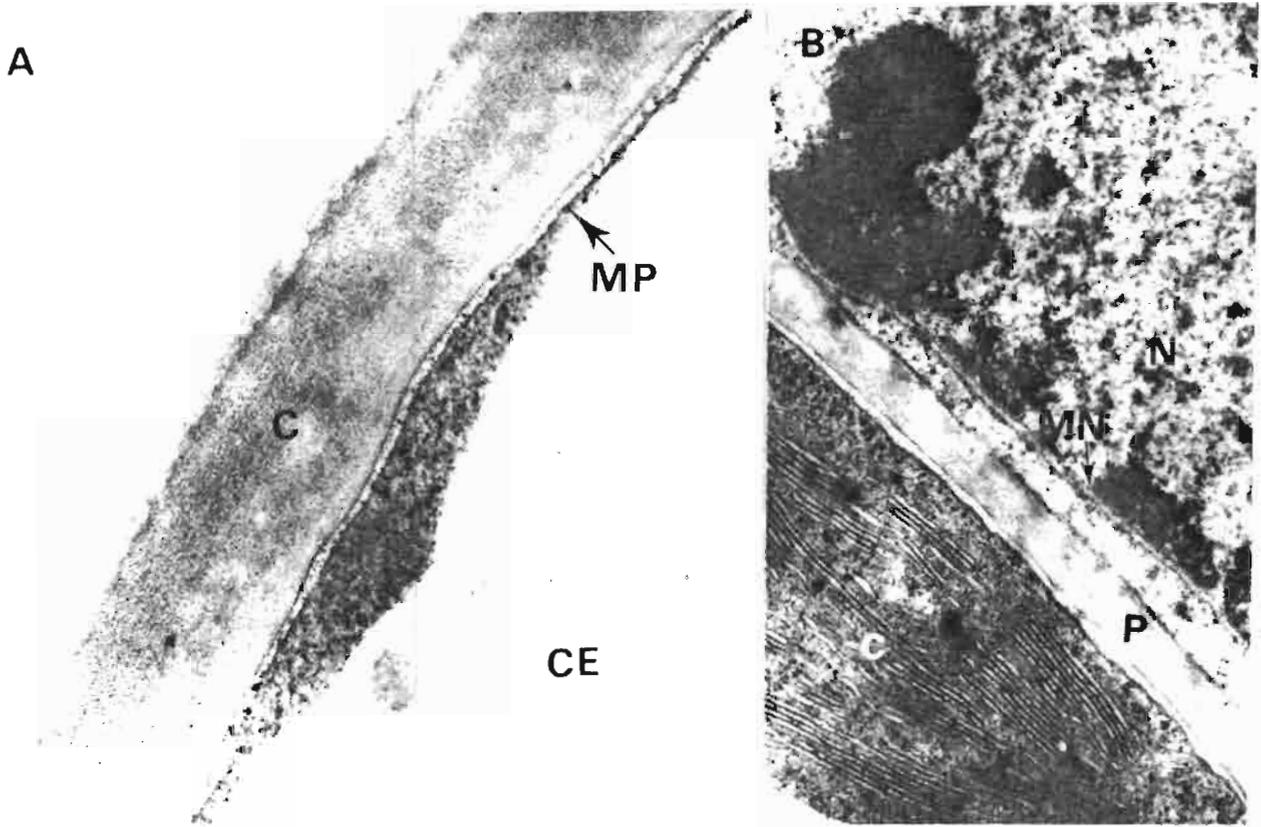


Figure 4: Observations au microscope électronique à transmission.

A: Cellule épidermique (CE) surmontée de la cuticule (C); (M.P: Membrane Plasmique) (X 25 500).

B: Les structures endomembranaires des cellules parenchymateuses des feuilles semblent bien conservées, ce qui traduit une bonne préparation des échantillons. (C: chloroplaste; N: noyau; MN: membrane nucléaire; P: paroi) (X 21 000).

L'examen de ces coupes a montré qu'en général, les conditions de fixation et d'inclusion du matériel étaient bonnes (figure 4 A et B), excluant, de ce fait, ces 2 étapes de la préparation des échantillons comme des causes susceptibles de compromettre la conservation des spores à la surface des feuilles. Dans ces conditions, l'absence de spores à la surface de la cuticule résulte vraisemblablement d'une certaine fragilité

de l'interface hôte-parasite. Ce qui suggère une "adhérence" insuffisante de la spore à la feuille pour résister à la déshydratation par l'alcool, l'une des étapes de la préparation des échantillons.

Enfin, le relevé bibliographique a montré une grande pauvreté des publications consacrées à l'ultrastructure des interactions Arachide-*P.arachidis*, suggérant l'existence d'un réel problème au niveau de la préparation du matériel, indépendant des conditions d'exécution de cette étude.

### 3. REACTIONS AU PLAN MOLECULAIRE

#### 1°) REACTION PEROXYDASIQUE :

L'étude de l'activité peroxydasique (AP) chez l'Arachide a été retenue dans cette étude pour les raisons suivantes :

- ces enzymes interviennent dans l'oxydation des composés phénoliques (FARKAS et KIRALY, 1958; KOSUGE, 1969), et, par conséquent, dans les mécanismes de défense développés par les plantes (FEHRMANN et DIMOND, 1967).

- elles catalysent la conversion de l'acide indole acétique (AIA) en 3-hydroxyméthyl oxindol (HINMAN et LANG, 1965) qui se transforme, par voie non-enzymatique, en 3-méthylène oxindiol (TULI et MOYED, 1967) dont la signification semble importante dans la compréhension de certaines interactions hôte-parasite (KOSUGE, 1969).

- elles sont impliquées dans la biosynthèse des lignines, notamment celles synthétisées par les plantes en réaction aux agressions parasitaires qu'elles subissent (TOUZE et ESQUERRE-TUGAYE, 1982; VANCE et al., 1976, 1980; COFFEY et CASSIDY, 1984).

- la stimulation de l'activité peroxydasique est considérée comme un facteur de résistance important du blé à *P. graminis* f.sp. *tritici* (MACKO et al., 1968).

Plusieurs études ont montré l'implication de l'activité peroxydasique en tant que facteur de résistance de l'hôte (MACKO et al., 1968; EKBOTE et MAYEE, 1984; TOUZE et ESQUERRE-TUGAYE,

1982; VANCE *et al.*, 1980; KOSUGE, 1969; HINMAN *et al.*, 1965; TULI *et al.*, 1967; SEEVERS *et al.*, 1971; REUVENI *et al.*, 1985; REUVENI *et al.*, 1985; GEIGER *et al.*, 1985, 1986). Le rôle fondamental de cette enzyme dans la lignification a été précisé par divers auteurs (OHGUCHI *et al.*, 1974, 1975). Cependant, si certains travaux associent directement sa stimulation à une résistance aux infections (HISLOP *et al.*, 1971; JOHNSON *et al.*, 1972; RETIG, 1974; VEGETTI *et al.*, 1975), d'autres, en revanche, n'ont pas mis en évidence de telles relations (GRZELINSKA, 1970; DALY, 1976; JOHNSON *et al.*, 1974). Enfin, concernant la stimulation de cette activité enzymatique, on note, selon les couples hôte-parasite, soit son accroissement relativement tardif (LEGRAND *et al.*, 1976), soit, au contraire, son induction précoce (HISLOP *et al.*, 1971).

Dans le cadre de nos études nous avons recherché l'évolution de l'activité enzymatique en fonction du temps sur deux génotypes sensibles (Local et RMP 91) et deux génotypes résistants (PI 259747 et NC Ac 17090) et vérifié l'effet de l'infection en comparant cette évolution sur des plantes saines et sur des plantes infectées.

#### **a) Variations de l'activité peroxydasique selon le génotype**

Les résultats (figure 5 a) montrent que parmi les quatre génotypes sains testés, le génotype PI 259747 (résistant) possède l'activité enzymatique la plus élevée (13 550 à 22 250 U/ml/min); elle est la plus faible chez le génotype NC Ac 17090, également résistant (5 650 à 12 150 U/ml/min). L'activité enzymatique chez les deux autres génotypes (Local et RMP 91) se situe entre ces deux extrêmes. Dans tous les cas, on note une tendance à un accroissement de l'activité avec l'âge des plantes. Il convient de noter que les niveaux d'activité peroxydasique mesurés chez les différents génotypes ne sont pas corrélés avec les niveaux de résistance. Après infection artificielle (figure 5 b), l'allure générale de l'activité peroxydasique reste inchangée. Elle augmente cependant, beaucoup plus nettement chez le génotype NC Ac 17090 (résistant) que chez les autres génotypes.

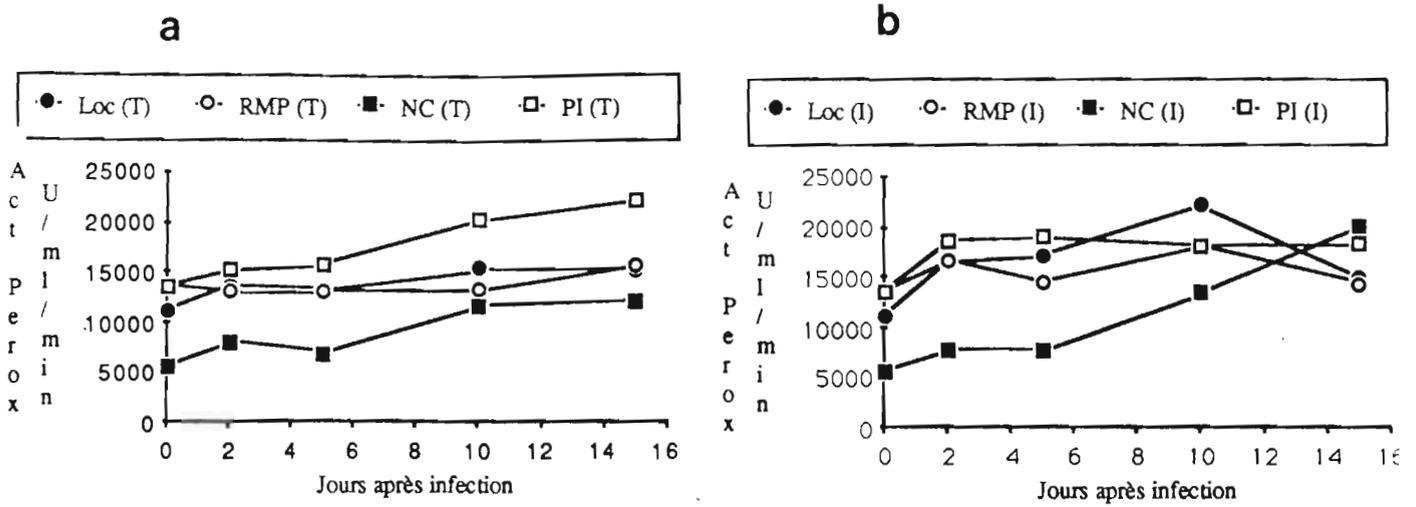


Fig. 5. Evolution de l'activité peroxydasique soluble dans des feuilles saines (a) et infectées par *P. arachidis* (b) pour quatre génotypes d'Arachide (Loc : Local; RMP : RMP 91; NC : NC Ac 17090; PI : PI 259747 (T : sains; I : Infectées).

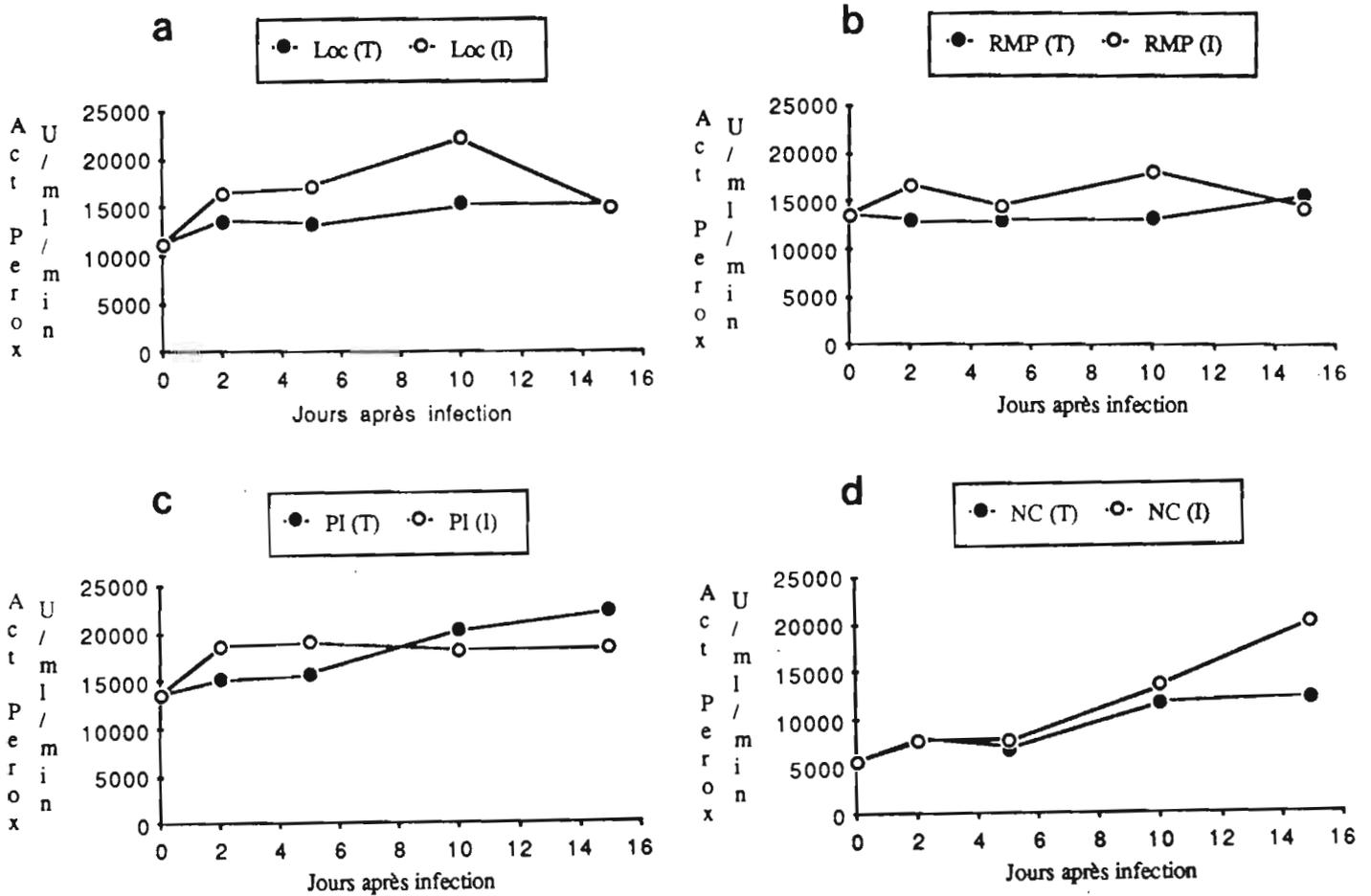


Fig. 6. Comparaison de l'évolution de l'activité peroxydasique dans des feuilles saines (T) ou infectées (I) pour quatre génotypes d'Arachide, a : Local; b : RMP 91; c : PI 259747; d : NC Ac 17090.

### **b) Effet de l'infection artificielle sur l'activité peroxydasique**

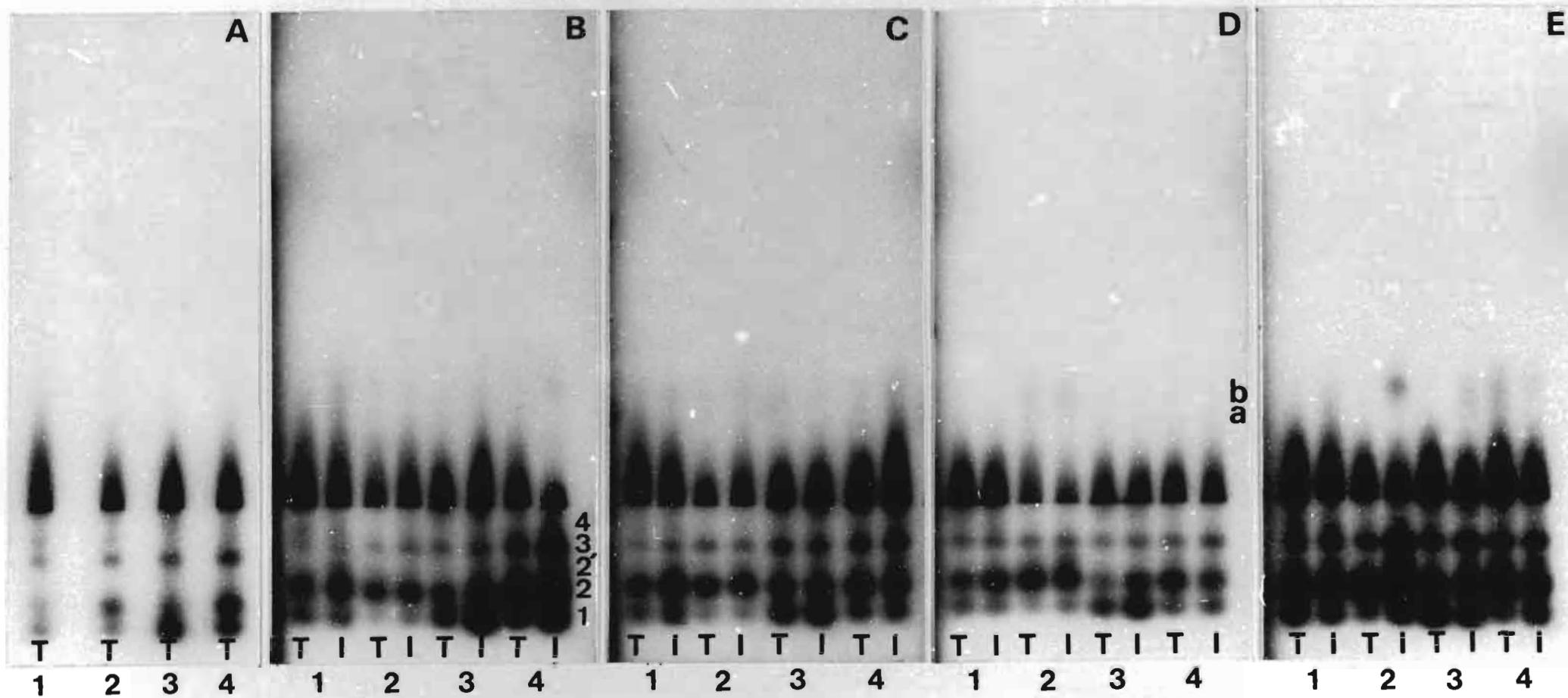
Lorsqu'on compare, génotype par génotype, l'effet de l'infection sur l'activité peroxydasique, force est de constater que cet effet est faible, parfois même négligeable (figure 6 a,b,c,d). A notre sens, des modifications de l'ordre de 20 à 30% de stimulation, 2 à 5 jours après infection artificielle ne devraient pas être considérées comme indiquant une évolution différente du processus pathologique. Les deux génotypes sensibles semblent présenter des capacités de réaction légèrement supérieures à celles des génotypes résistants. Mais, là encore, l'amplitude de la réaction est tellement modeste qu'il serait hasardeux d'en tirer une quelconque conclusion.

### **c) Effet de l'infection au niveau des isoenzymes**

Malgré l'absence de résultats probant au niveau de l'activité totale, nous avons néanmoins approfondi les investigations en recherchant l'existence d'un éventuel effet de l'infection sur la composition des extraits en isoenzymes. On ne pouvait, en effet, exclure que la réaction de l'Arachide se situe, non pas au niveau de la stimulation de l'activité totale, mais sélectivement au niveau de l'une ou l'autre des isoperoxydases. Une telle spécificité de la réaction de l'hôte existe chez d'autres couples hôte parasite (GEIGER, 1985).

Les isoperoxydases des différents extraits ont donc été séparées par électrophorèse. Les électrophorègrammes (Planche III) révèlent l'existence de plusieurs isoenzymes; 3 bandes cathodiques (numérotée 1,2,3) sont nettement visibles chez tous les génotypes {Planche III A ( $t_0$ )}; une quatrième (4) existe chez le génotype Local; elle est également présente à l'état de trace chez le génotype NC Ac 17090. Si l'on compare les extraits de tissus sains et les extraits des tissus parasités correspondants, aucune différence notable n'apparaît, ceci pour les 4 génotypes étudiés.

III



Au plus peut-on noter une intensité plus grande des bandes correspondant aux extraits de tissus parasités, et l'apparition d'une bande cathodique (2') et de deux bandes anodiques (a et b) nouvelles chez les génotypes NC Ac 17090, RMP 91 et PI 259747 (feuilles prélevées 10 et 15 j après le début de l'expérience). L'apparition de ces bandes (surtout 2' et b) est particulièrement nette dans le cas du génotype NC Ac 17090 où elle pourrait être considérée comme une conséquence de l'infection. Chez les deux autres génotypes, un effet "âge de la plante" ne peut être écarté.

## 2°) EVOLUTION DU CONTENU PROTEIQUE DES TISSUS

De nombreux travaux concernent l'évolution, aux plans quantitatif et qualitatif, du contenu protéique des plantes infectées par des champignons (STROBEL et SHARP, 1965; JOHNSON et al., 1966 et 1968; BUSHUK et WRIGLEY, 1971; URITANI, 1971; CHERRY et al., 1974). Certains auteurs ont fait état d'une relation entre le niveau de résistance ou de sensibilité de la plante et la teneur en protéines (RUDOLPH et STAHMANN, 1964; STAPLES et STAHMANN, 1964). Une étude ultérieure (CHERRY et al., 1974), réalisée sur des graines d'Arachide contaminées par *Aspergillus parasiticus*, a montré que les protéines subissaient trois types de transformations biochimiques:

- \* diminution quantitative et qualitative de leur teneur,
- \* disparition de l'activité de certaines enzymes (alcool déshydrogénase, phosphatase acide, par exemple),
- \* stimulation d'autres activités (estérase et peroxydase), et enfin, synthèse *de novo* d'isoenzymes.

---

### Planche III:

Séparation en électrophorèse sur gel d'amidon des isoperoxydases de différents extraits de feuilles de quatre génotypes (1: Local, 2: NC Ac 17090, 3: RMP 91, et 4: PI 259747) sains (T) ou infectées (I). L'analyse est faite à quatre étapes après infection (A: 0j, B: 2j, C: 5j, D: 10j, et E: 15j). Notez l'apparition d'une bande cathodique (2') et deux bandes anodiques (a et b) nouvelles chez les génotypes N° 2, 3 et 4 (10 j et 15 j après infection).

Génotype/ Traitement	Jours après infection			
	2	5	10	15
Loc (T)	2190	1990	1250	1740
Loc (I)	2080	1710	1660	1640
RMP (T)	3900	4110	3240	2700
RMP (I)	5580	4080	3410	4290
PI (T)	6660	3230	3030	1970
PI (I)	3640	2960	4090	4540
NC (T)	2910	2770	3570	2130
NC (I)	3840	2340	3560	2480

Tableau 3 a: Evolution en fonction du temps, du taux de protéines dans les feuilles d'Arachide. Au temps  $t = 0$  un lot de plantes est infecté (par voie sèche) et placé en chambre d'incubation. Aux temps 2,5,10 et 15 j des folioles (2e ou 3e rangs foliaire) sont prélevées sur les deux lots et broyées comme indiqué dans le chapitre matériel et méthodes. La quantité de protéine est exprimée en  $\mu\text{g/g}$  de tissu foliaire frais. Les données présentées correspondent à l'expérience n° 1 (page 55) effectuée sur quatre génotypes: Local et RMP 91 (sensibles); NC Ac 17090 et PI 259747 (résistants).

Génotype/ Traitement	Jours après infection			
	2	5	10	15
Loc (T)	1730	2350	2700	1780
Loc (I)	2250	2260	2560	1960
RMP (T)	2910	4830	4790	2780
RMP (I)	4090	4320	6190	5490
PI (T)	1500	2110	2980	2400
PI (I)	3170	3490	2820	2650
NC (T)	2320	3210	3780	2310
NC (I)	2290	3010	3170	2850

Tableau 3 b: Evolution en fonction du temps, du taux de protéines dans les feuilles d'Arachide. Résultats de l'expérience n° 2 (page 55) réalisée dans des conditions comparables à celles indiquées dans la légende du tableau 3 a.

Dans le cadre de nos travaux, deux expériences indépendantes ont été réalisées, afin de vérifier l'effet de l'infection de *P. arachidis* sur l'évolution de la teneur en protéines des feuilles d'Arachide.

Les résultats exposés dans les tableaux 3 a et b, montrent qu'il n'y a pas d'évolution nette, au cours du temps, du contenu protéique des feuilles infectées, quel que soit le génotype testé. Par ailleurs les résultats ne sont pas très homogènes. Chez RMP 91, il semble néanmoins que le contenu en protéines des plantes infectées soit systématiquement supérieur à celui des plantes saines sans que l'on puisse pour autant attribuer une signification précise à ce fait. De façon générale aucune conclusion particulière ne se dégage de la comparaison entre le taux de protéine des variétés sensibles et celui des variétés résistantes, quel que soit le temps écoulé depuis le début de l'infection. Il est certain que l'approche globale effectuée peut masquer des variations individuelles de la concentration de certaines protéines. C'est pourquoi il conviendrait d'approfondir ces travaux par une séparation électrophorétique des protéines qui permettrait la mise en évidence d'éventuelles variations au niveau moléculaire.

### 3°) EVOLUTION DES COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX

Les composés phénoliques totaux des plantes ont fait l'objet de très nombreuses études, notamment dans le contexte de travaux sur les relations plante-parasite (RAVISE et TRIQUE, 1972; BOMPEIX et BOUSQUET, 1974; CHATOPADHYAY et BERA, 1980; FRIEND, 1981; GLAZENER, 1982; REDDY, 1984; GUPTA et al., 1985; TAQUET, 1985; KUROSAKI et al., 1986 *inter alia*). L'accumulation des phénols dans des tissus infectés peut entraîner un ralentissement, ou un arrêt complet, de l'évolution de l'infection. Chez des légumineuses, telles que l'Arachide et le Pois chiche (SMITH, 1971), les phénols préformés paraissent jouer un rôle déterminant dans les mécanismes de défense de l'hôte, alors que chez la tomate, ce sont des composés néosynthétisés qui semblent remplir cette fonction (RAVISE et TRIQUE, 1972; GLAZENER, 1982).

Etant donné l'importance potentielle des composés phénoliques dans le déroulement de la pathogénèse, nous avons suivi leur évolution à la fois dans des feuilles d'Arachide saines et des feuilles atteintes de rouille.

Génotype	Jours après infection			
	2	5	10	15
Loc (T)	1223	2108	1635	2303
Loc (I)	1470	2483	2003	2715
RMP (T)	1733	3413	2100	2558
RMP (I)	1733	1883	1778	2760
PI (T)	1253	1508	1358	1643
PI (I)	1448	1673	1478	1725
NC (T)	1470	2018	1793	1388
NC (I)	1103	2400	2528	2093

Tableau 4: Evolution en fonction du temps de la teneur en composés phénoliques totaux ( $\mu\text{g/g.P.F}$ ) pour les quatre génotypes (Local, RMP 91, PI 259747 et NC Ac 17090); pour les conditions expérimentales, voir le tableau 3 a.

Pour les feuilles saines (tableau 4) aucune corrélation ne peut être établie entre le niveau de résistance génotypique et la teneur en composés phénoliques. Les génotypes résistants (PI 259747 et NC Ac 17090) ainsi que le génotype le plus sensible (Local) présentent les concentrations les plus faibles, tandis que le second génotype sensible (RMP 91) contient des taux de phénols nettement plus élevés. La réponse à l'infection est, elle aussi, hétérogène: diminution du taux de phénols chez l'un des génotypes sensibles (RMP 91), augmentation chez l'autre (Local). Chez les génotypes résistants, on constate, d'une part un effet négligeable (PI 259747) et, d'autre part, une augmentation sensible (NC Ac 17090 à partir du 5<sup>e</sup> j) de la concentration en composés phénoliques.

Ainsi, comme dans le cas des protéines, l'hétérogénéité existant au niveau des réponses des différents génotypes, ne permet pas de tirer de conclusion généralisable de ces résultats, au moins au plan d'un éventuel effet génotypique, pour les quatre génotypes testés.

On peut cependant noter que tous les génotypes, excepté RMP 91, réagissent à l'infection en accumulant des composés phénoliques; ce résultat est en accord avec les résultats de travaux antérieurs (REDDY, 1984; KUROSAKI *et al.*, 1986).

Nous avons renouvelé cette expérience, sur feuilles détachées, en comparant une variété cultivée sensible (TMV<sub>2</sub>) à trois espèces sauvages: *A. Sp.* (GKP 9893), hautement résistant (HR), *A. chacoense* et *A. glabrata* toutes deux immunes. Les dosages de phénols totaux ont été réalisés 10 jours après le début de l'expérimentation sur des feuilles provenant de plantes témoin et sur des feuilles infectées artificiellement.

Génotype/Espèce	Traitement: Témoin/ inoculé	Teneur en Phénols totaux µg/g.P.F	Variation de la teneur en phénols totaux (en %) suite à l'infection	Espèces sauvages: teneur en phénols par rapport à TMV2 (en %)
TMV 2 (Sensible)	Témoin	1424	-	-
	Inoculé	771	-46	-
<i>Arachis sp.</i> (GKP 9893) (Hautement résistant)	Témoin	7845	-	451
	Inoculé	9992	27	1196
<i>Arachis chacoense</i> (immune)	Témoin	6692	-	370
	Inoculé	6863	3	790
<i>Arachis glabrata</i> (immune)	Témoin	6702	-	371
	Inoculé	8846	32	1047

Tableau 5: Teneur en composés phénoliques totaux de feuilles d'Arachide saines (témoin) et inoculées prélevées sur un génotype cultivé d'*Arachis hypogaea*, sensible (TMV2) et trois espèces sauvages: *A. sp.* (hautement résistant), *A. chacoense* et *A. glabrata* (immunes). L'expérience est réalisée dans les conditions suivantes : au temps t = 0 les feuilles détachées et partagées, pour chaque espèce, en deux lots, l'un tient lieu de témoin, l'autre est immédiatement inoculé. Le dosage des phénols intervient après 10 j de mise en survie.

Les résultats (tableau 5) révèlent une différence considérable entre la variété sensible et les trois espèces sauvages hautement résistantes ou immunes, ceci à deux niveaux:

\* dans les feuilles saines le taux de composés phénoliques des trois espèces sauvages est environ 5 fois supérieur à celui de la variété sensible.

\* l'infection provoque, chez la variété sensible, une diminution du contenu phénolique alors que l'on observe un accroissement de ce contenu dans le cas des espèces résistantes ou immunes.

Si l'on considère l'effet de l'infection, il apparaît que chez les espèces sauvages, l'augmentation du taux de phénols n'est pas supérieure à celle enregistrée précédemment pour certaines génotypes cultivés; on ne peut donc lui accorder un niveau de signification plus élevé dans ce cas particulier. En revanche, la différence de teneur en phénols totaux dans les feuilles saines pourrait, elle, rendre compte au moins partiellement du degré élevé de résistance des espèces sauvages (SUBBA RAO, 1986). En effet, si l'on admet que les substances phénoliques participent effectivement aux mécanismes de défense de l'Arachide contre *P. arachidis*, on peut alors supposer qu'une teneur élevée en phénols préformés puisse constituer une barrière chimique suffisamment efficace pour bloquer le parasite dans les tous premiers stades de la pathogénèse. Dans ce cas, les phénols constitueraient une composante essentielle de la résistance. Le fait que la teneur en phénols augmente dans les feuilles infectées ne contribue pas nécessairement à accroître le niveau de résistance des plantes, il signifie néanmoins qu'un "signal" est perçu par elle.

Toutes ces hypothèses reposent sur des données quantitatives, le contenu phénolique, dans sa globalité, étant supposé participer à la résistance des plantes. Il est cependant vraisemblable que l'efficacité des substances composant ce contenu phénolique est variable. En particulier, de très faibles variations de composés hautement toxiques pour le champignon pourraient jouer un rôle bien plus important qu'une variation, même considérable de l'ensemble du pool. Au demeurant, les variations enregistrées ne rendent pas nécessairement compte du flux réel de ces composés pouvant être transformés en dérivés divers, et donc n'avoir qu'une "existence" transitoire. C'est pourquoi la démarche globale que nous avons réalisée demande à être complétée par une étude qualitative consistant à identifier certaines des composés phénoliques. Parmi ceux-ci on peut citer les composés de la série cinnamique directement impliqués dans la

lignification des tissus, processus fréquemment induit lors d'une agression parasitaire.

### III - MISE EN EVIDENCE DE COMPOSES FONGITOXIQUES

L'existence d'une activité fongitoxique a été mise en évidence, dans des extraits méthanoliques de feuilles d'Arachide, à l'aide de deux techniques différentes:

#### 1. TEST DE TOXICITE POUR *C. CLADOSPориOIDES* :

Ce test permet de visualiser l'emplacement des substances toxiques sur plaque de silice après chromatographie en couche mince. Plusieurs composés ont ainsi pu être décelés (figure 7 a); leur nombre dépend de la qualité de la séparation.

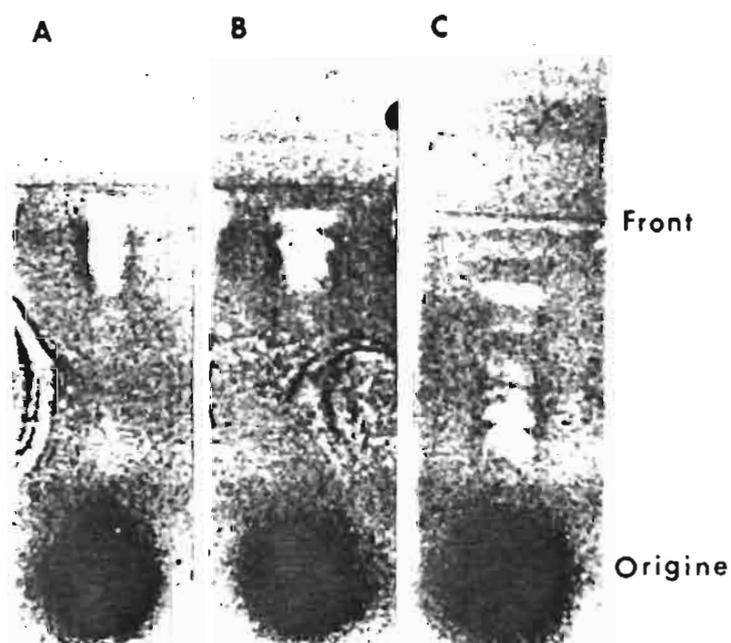


Figure 7 a: Mise en évidence de produits fongitoxiques dans un extrait brut de feuilles d'Arachide; Le même extrait déposé sur les plaque de CCM différentes est élué dans le système Hx : Ae : MeOH - 50/80/12 (A), 50/80/06 (B) et dans Clf : MeOH - 50/02 (C) v/v. Notez la meilleur séparation dans le système (C). Le test biologique est basé sur l'inhibition du développement des spores de *Cladosporium cladosporioides* pulvérisée sur la plaque après séparation chromatographique et séchage de la plaque (cliché près de 48 heures après pulvérisation des spores et incubation en chambre humide).

Les extraits de tissus sains ne semblent pas contenir de tels produits (figure 7 b) leur synthèse serait donc induite après infection, ce qui permet de les classer dans le groupe des phytoalexines.

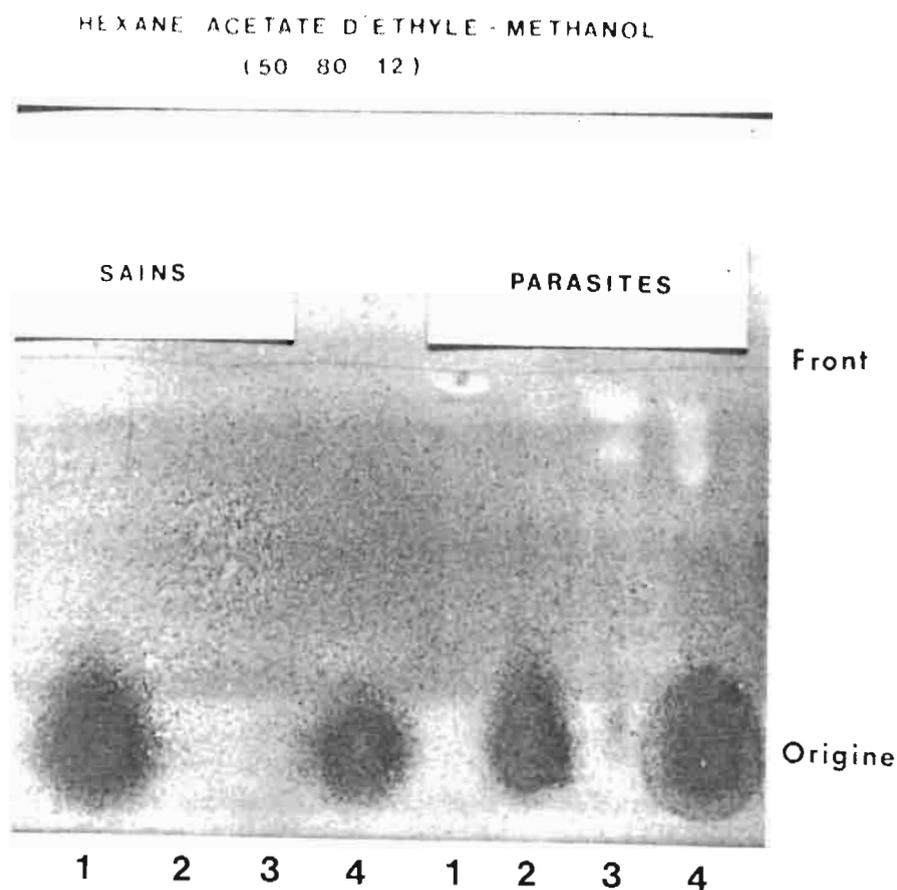


Figure 7 b: Comparaison du contenu en substances fongitoxiques d'extraits provenant des feuilles saines et parasitées par *P. arachidis* (1 à 4 correspondent à différents étapes du processus d'extraction; pour le test biologique, cf. Figure 7 a). Notez la présence des produits uniquement dans les feuilles parasitées.

## 2. INHIBITION DE LA GERMINATION DES SPORES DE *P. ARACHIDIS* :

Le test précédant présente l'inconvénient de faire appel à un champignon qui n'est pas un parasite de l'Arachide. Il ne permet donc pas d'avoir l'assurance que les substances détectées soient réellement toxiques à l'égard de l'agent pathogène responsable de la rouille. Nous avons donc vérifié l'effet

d'extraits de feuilles saines et parasitées, de différentes origines et à différentes concentrations, sur le taux de germination des spores de *P. arachidis* (tableau 6).

Génotype/Espèce	Traitement: Témoin/ inoculé	Inhibition in vitro (en %) de la germination de spores de <i>P. arachidis</i> aux concentrations croissantes			
		1,25 mg/ml	2,50 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml
TMV 2 (Sensible)	Témoin	20	31	45	47
	Inoculé	9	56	58	90
PI 259747 (résistant)	Témoin	82	96	99	98
	Inoculé	85	95	100	100
<i>Arachis</i> sp. (GKP 9893) (Hautement résistant)	Témoin	43	69	-	-
	Inoculé	88	92	-	-
<i>Arachis chacoense</i> (immune)	Témoin	81	94	-	-
	Inoculé	100	100	-	-

Tableau 6: Effet d'extraits de feuilles d'Arachide sur la germination de spores de *P. arachidis*. L'activité fongitoxique est exprimée en % d'inhibition de la germination d'un grand nombre de spores (300 au minimum pour chaque test). Matériel végétal utilisé: feuilles détachées au temps  $t = 0$ , séparée en deux lots, l'un mis en survie sans être inoculé, l'autre inoculé par *P. arachidis* puis mis en survie dans les mêmes conditions. Les feuilles ont été broyées et extraites dans une solution méthanolique à 50% au temps  $t = 10$  jours.

Les résultats montrent que:

a) les tissus sains de toutes les variétés contiennent des composés fongitoxiques. Cependant les extraits des variétés résistante et immune présentent une activité beaucoup plus forte que celle de la variété sensible, même à la concentration la plus élevée.

b) la variété sensible réagit à l'infection par une production accrue de phytoalexines. Dans le cas de la variété immune une telle induction existe également, quoique plus faible en apparence (le niveau d'activité élevé dans les tissus sains ne permettant vraisemblablement pas d'appréhender toute l'ampleur de cette stimulation).

Enfin, on constate que l'infection n'a apparemment pas d'effet stimulant sur la production de phytoalexines chez la variété résistante. Cette situation est tout à fait particulière dans la mesure, où pour d'autres couples hôte-parasite, les variétés résistantes se distinguent des variétés sensibles par leur capacité à réagir plus intensément et/ou plus précocément.

En définitive, et en se basant simplement sur cette expérimentation, on pourrait dire que les variétés sensibles, résistantes et immunes étudiées se distinguent les unes des autres:

- par leur taux de substances fongitoxiques preformées:
  - \* faible chez le génotype sensible
  - \* élevé chez le génotype résistant
- par leur capacité de réaction: élevée chez les espèces immunes

Ainsi le taux "initial" en phytoalexines, au moment de la contamination des tissus, semble jouer un rôle important dans la réussite de l'infection. Dans le cas des variétés sensibles ce taux n'atteint sans doute pas le seuil d'efficacité qui permettrait de contenir le champignon dans les premiers stades de l'infection; la plante réagit mais pas assez rapidement ou efficacement pour combler ce handicap. Dans le cas des génotypes résistants et espèces immunes, la teneur initiale des tissus en composés fongitoxiques pour *P. arachidis* paraît suffisante pour empêcher un envahissement notable des tissus; chez la variété immune s'ajoute, en plus, une capacité de réaction telle que l'infection est totalement bloquée.

La présence de composés fongitoxiques dans les tissus sains est en contradiction avec les résultats du test précédent. Cette contradiction n'est peut-être qu'apparente étant donné que dans le cas présent le matériel végétal utilisé était des feuilles "détachées" ayant, par conséquent, subi une agression mécanique susceptible d'avoir induit la production de phytoalexines même dans les organes non-infectés.

#### IV - EFFET DE L'ABSCISSION DES FEUILLES SUR LES COMPOSANTES DE RESISTANCE ET DIFFERENTS PARAMETRES BIOCHIMIQUES

Les expérimentations entreprises répondent à un double objectif:

- étudier l'effet d'une agression mécanique, l'abscission de la feuille, infligée à la plante et le comparer à celui résultant de l'agression par *P. arachidis*.

- orienter le choix quant au matériel végétal à adopter pour la poursuite de nos recherches.

Concernant ce second aspect, il faut rappeler que les études réalisées sur l'Arachide font souvent appel à des expérimentations sur folioles détachées, mises en survie en boîte de Petri sur papier filtre humidifié. L'intérêt pratique de cette procédure est au moins double: faible encombrement du matériel végétal et très grande homogénéité des infections artificielles [évitant des artefacts dus à des répartitions hétérogènes de l'inoculum comme cela se produit fréquemment lorsque l'on contamine des plantes entières possédant plusieurs rangs foliaires se recouvrant les uns les autres (SAVARY, 1987 c)].

L'utilisation d'un matériel végétal placé en survie soulève cependant une question fondamentale: cette intervention (mise en survie) est-elle sans effet sur les caractères que nous analysons ou bien, au contraire, risque-t-elle d'interférer avec l'effet de l'infection.

En pratique les expérimentations sont réalisées de la manière suivante: des graines de chaque génotype sont semées en même moment à raison de deux graines par pot. Lorsque les plantes ont atteint l'âge d'un mois, elles sont séparées en deux lots. Le premier est subdivisé en deux sous-groupes, l'un est infecté sur pied, l'autre tient lieu de témoin. Toutes les plantes sont disposées en chambre d'incubation.

Sur le second lot sont prélevées et mises en survie les feuilles des rangs deux et trois; la moitié d'entre elles est infectée, l'autre moitié sert de témoin.

Le temps  $t=0$  correspond au moment de la contamination (et donc au moment du détachement des feuilles). Aux temps  $t=2,5,10$  et 15 jours, des échantillons de chaque lot (ou sous-groupe) sont prélevés et traités de manière à permettre la réalisation de différents dosages et tests: phénols totaux, analyse en CLHP et fongitoxicité

Une partie des plantes entières et des feuilles infectées est conservée jusqu'à la fin du développement des lésions; sur ces échantillons sont mesurées, régulièrement, les composantes de résistance.

Deux séries d'expérimentation ont été réalisées, (tableau 7), mettant en oeuvre des génotypes différents.

Detaille	EXP 1	EXP 2
Génotypes testés	TMV 2 (sensible) RMP 91 (sensible) PI 259747 (résistant)	Local (sensible) NC Ac 17090 (résistant)
Matériel Végétal	Feuilles détachées et Plantes entières	Folioles detachées et Plantes entières
Méthode d'infection	Suspension de spores	Voie Sèche
Composantes de Resistance	- Période d'incubation Diamètre de lésion Surface de feuille colonisée (%) Intensité de sporulation	Période de latence Période d'incubation - - -
Dosages des Phénols	+	+
Test de fongitoxicité	-	+
Analyse en CLHP	+	-

Tableau 7: Schéma général de l'expérimentation réalisée dans le but de comparer les effets du détachement des feuilles à ceux de l'infection artificielle par *P. arachidis*.

L'effet du détachement des feuilles et de l'infection par *P. arachidis* est analysé pour l'ensemble des critères retenus. L'effet de la durée de leur maintien en survie, préalablement à l'infection, est testé, principalement, sur les composantes de résistance et, pour partie, sur la fongitoxicité des extraits.

A noter que dispositif expérimental permet à la fois d'analyser l'effet du détachement, de le comparer à celui de l'agression parasitaire et, enfin, de vérifier l'existence d'un éventuel effet cumulatif des deux types d'agression.

## 1. EFFET SUR LA TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX :

Les données obtenues sont présentées dans le tableau 8. Une première remarque concerne les résultats de l'infection sur plantes entières pour les génotypes RMP 91 et PI 259747: ces résultats sont en plein accord avec ceux obtenus lors de l'expérience décrite précédemment (tableau 4): diminution de la teneur chez RMP 91 et légère augmentation chez PI 259747.

Genotype	Nature du matériel végétal	Traitement	Teneur en Phénols Totaux ( $\mu\text{g/g.P.F}$ )	Variation due à l'infection	Variation due au détachement
TMV 2 (sensible)	Plante entière	T	1762		
		I	1692	-4%	
	Feuilles détachées	T	1356		-23%
		I	757	-44%	-55%
RMP 91 (moins sensible)	Plante entière	T	1861		
		I	1492	-20%	
	Feuilles détachées	T	1194		-36%
		I	1678	41%	13%
PI 259747 (résistant)	Plante entière	T	1513		
		I	1638	8%	
	Feuilles détachées	T	1879		24%
		I	1457	-23%	-11%

Tableau 8: Effet du détachement des feuilles et de l'inoculation sur la teneur en phénols totaux de 3 génotypes, 10 jours après infection artificielle. (T: Témoin; I: Inoculé)

La comparaison plantes entières - feuilles détachées révèle l'existence de deux situations dans le cas des témoins (non infectés); le détachement provoque une diminution des teneurs en phénols chez les deux génotypes sensibles, alors que chez le génotype résistant le taux de composés phénoliques augmente. Dans le cas des tissus infectés la réponse est hétérogène: diminution de la quantité de phénols chez TMV<sub>2</sub> (sensible) et PI 259747 (résistant) et augmentation chez le génotype RMP 91 (sensible).

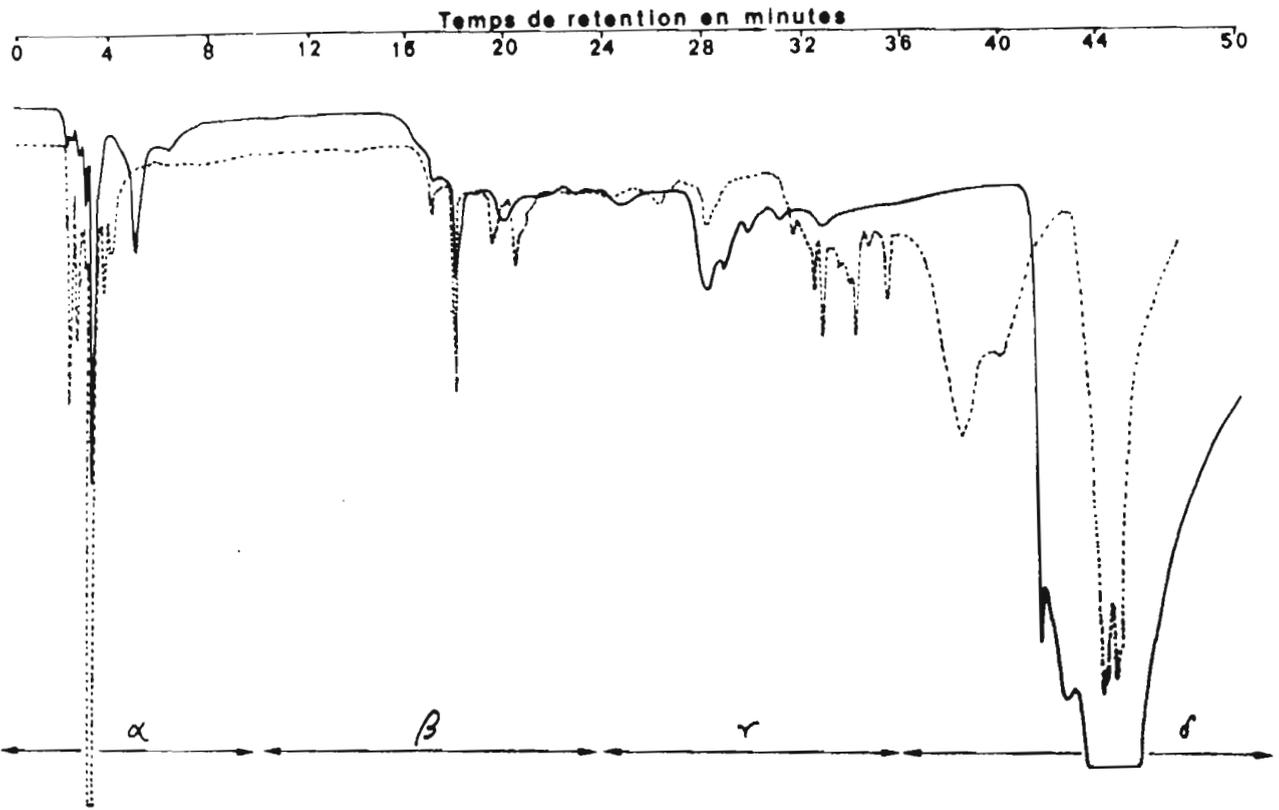


Fig.8A

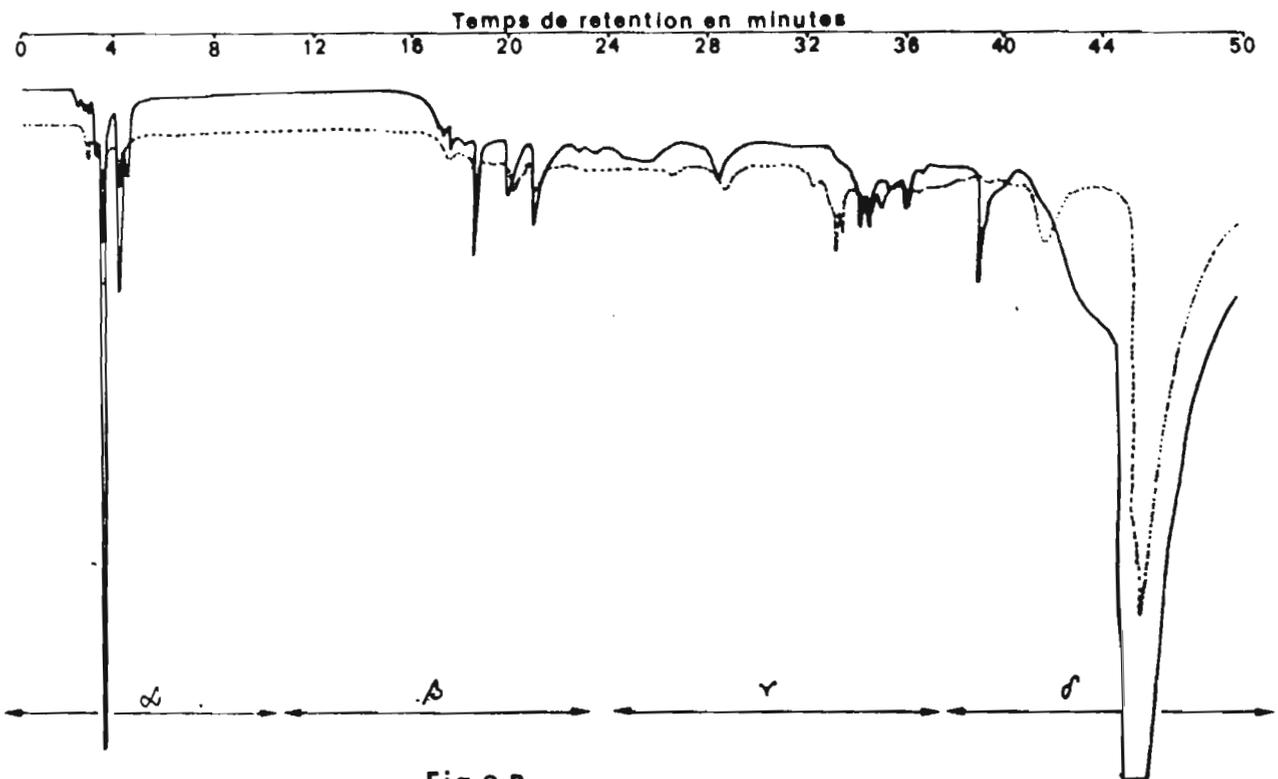


Fig.8 B

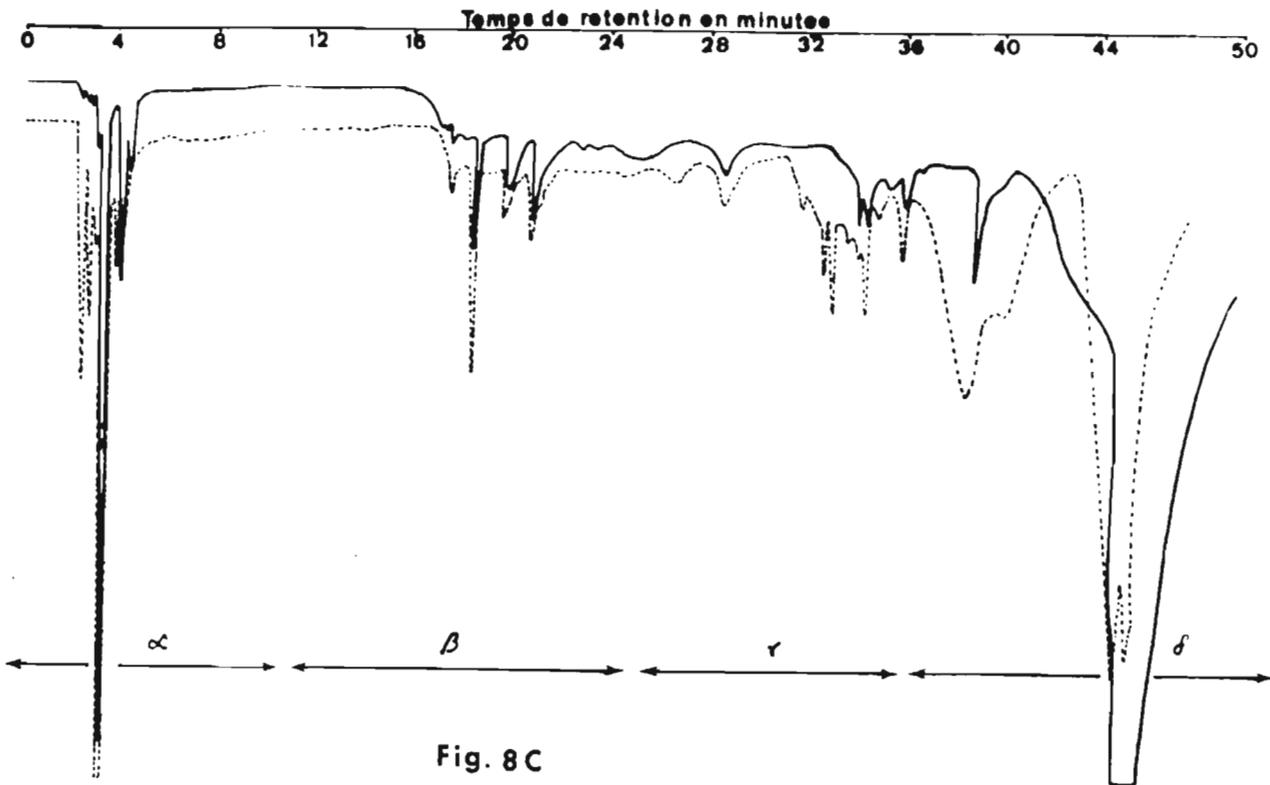


Fig. 8 C

Figures 8 à 10: Chromatographie comparative en CLHP d'extrait des matériel végétal 10 j après infection artificielle et séparés sur une colonne de silice ( $5\mu - 0,63 \times 30$  cm); Débit : 3,0 ml/min. Les quatre fractions principales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) sont éluées dans un mélange de solvants, Hx:Ae:MeOH (90%) aux proportions volumiques successives: 50/50/05; 20/100/15; 20/100/60; 20/100/300. La détection a été faite à 280 nm. Dans tous les cas l'extraction a été réalisée dans des conditions standardisées et l'analyse porte sur 20  $\mu$ l d'extrait correspondant à 0,1 g de poids frais de feuilles. L'enregistrement est effectué automatiquement à l'aide d'un enregistreur - integrateur toujours réglé de manière identique pour toutes les analyses. Outre le tracé du diagramme d'élution, cet appareil fournit le temps de retention des substances, la surface totale des pics, la surface de chaque pic et sa valeur relative (%) par rapport à la surface totale des pics (ces données n'ont intérêt qu'au niveau de l'étude comparative des différents diagrammes d'élution, à 280nm, des diverses substances dont les coefficients d'extinction peuvent cependant différer dans des proportions importantes). Matériel végétal analysé: voir le dispositif expérimental décrit, page: 63).

Figure 8: Extrait de feuilles du génotype TMV<sub>2</sub> (sensible); A. Matériel Sain; B: Matériel infecté.  
 — : Plante entière; ----- Feuille détachées. C: Comparaison entre les plantes entières infectées (—) et les feuilles détachées saines (-----).

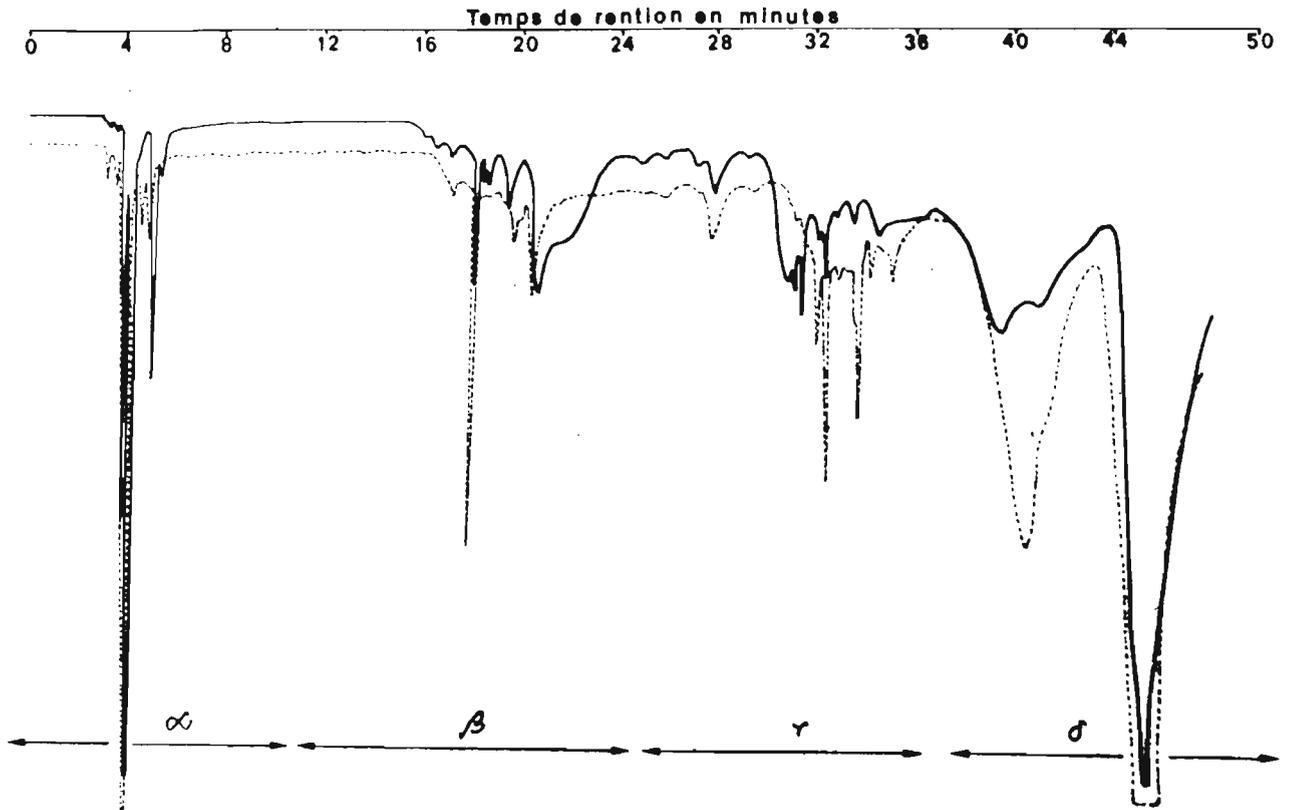


Fig.9A

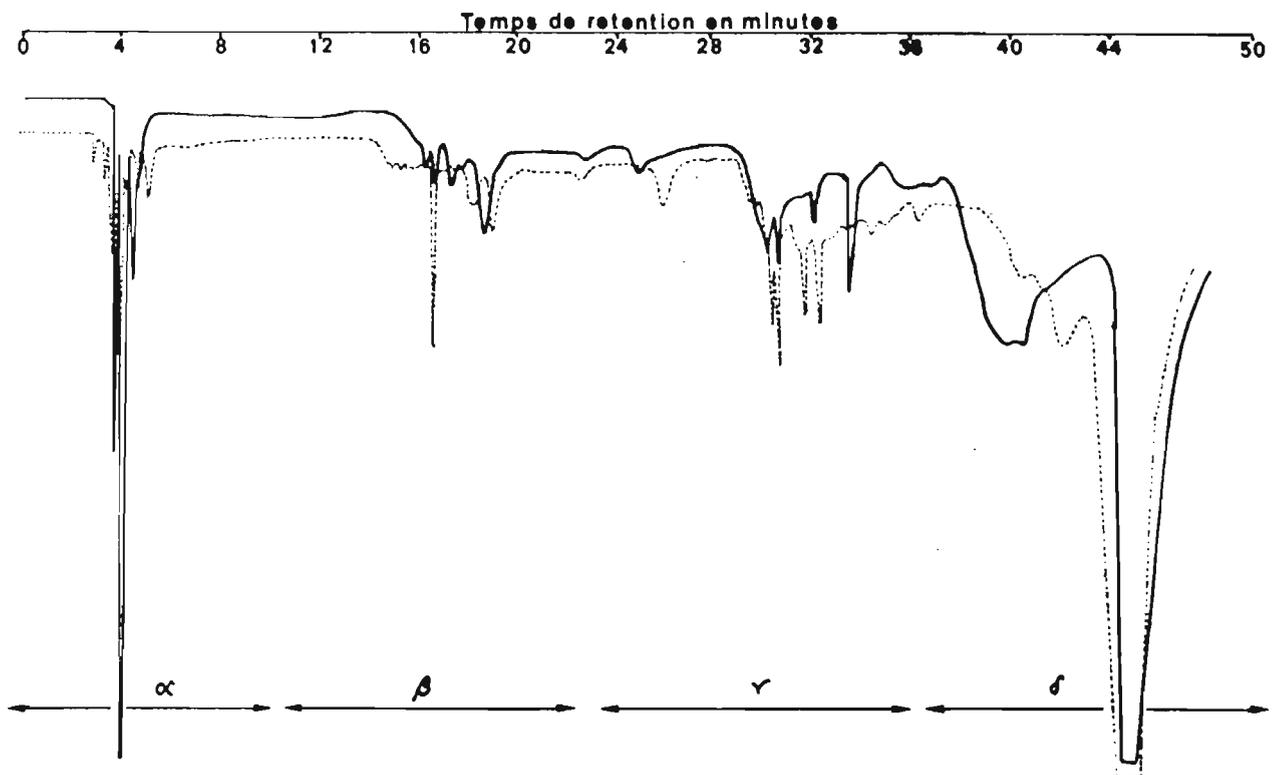


Fig.9 B

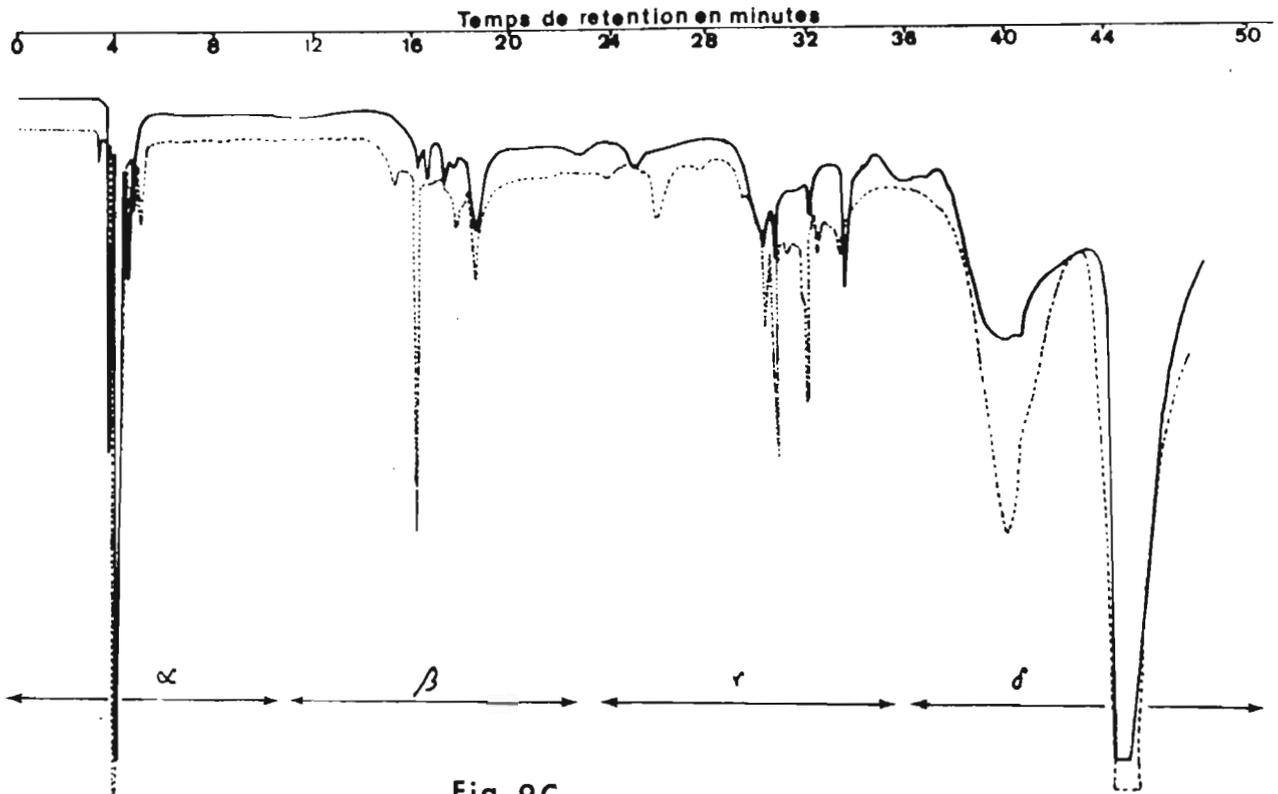
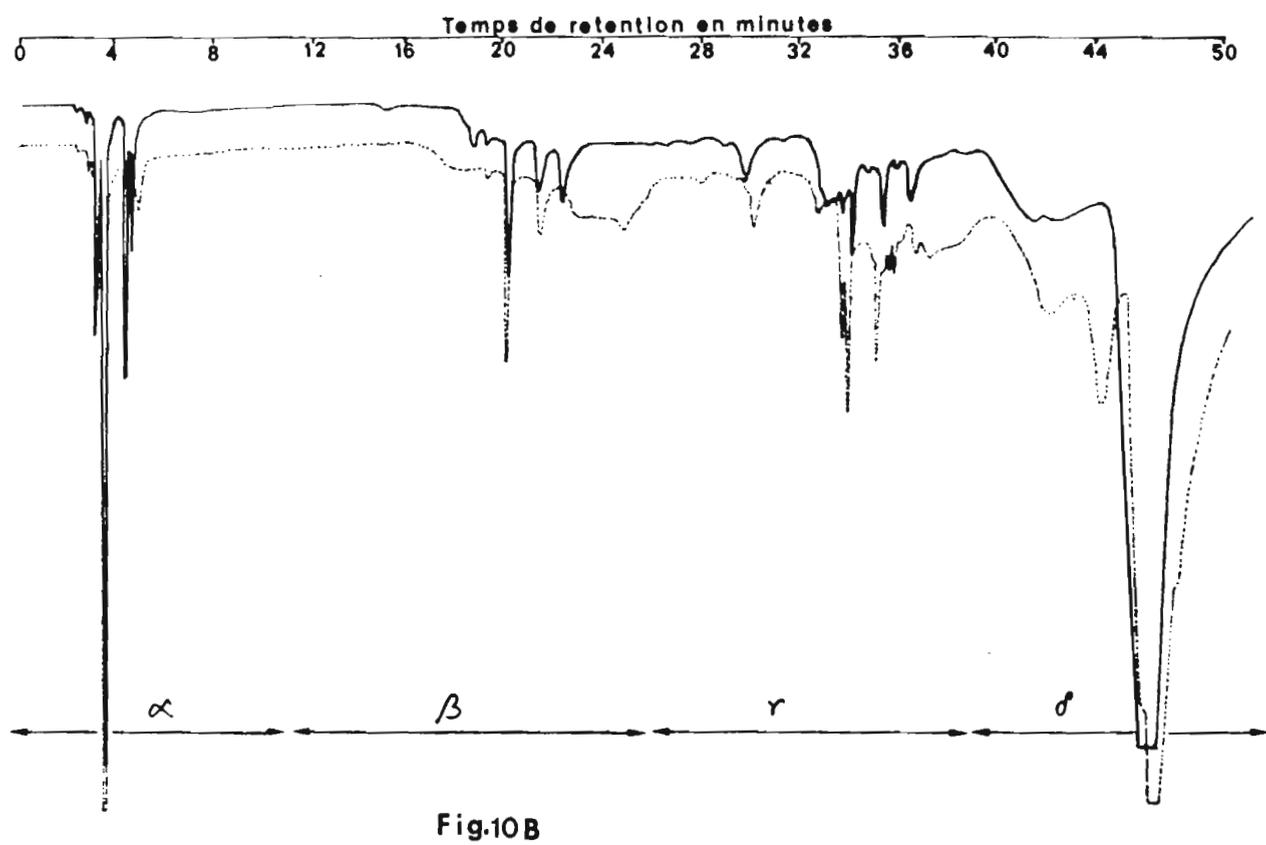
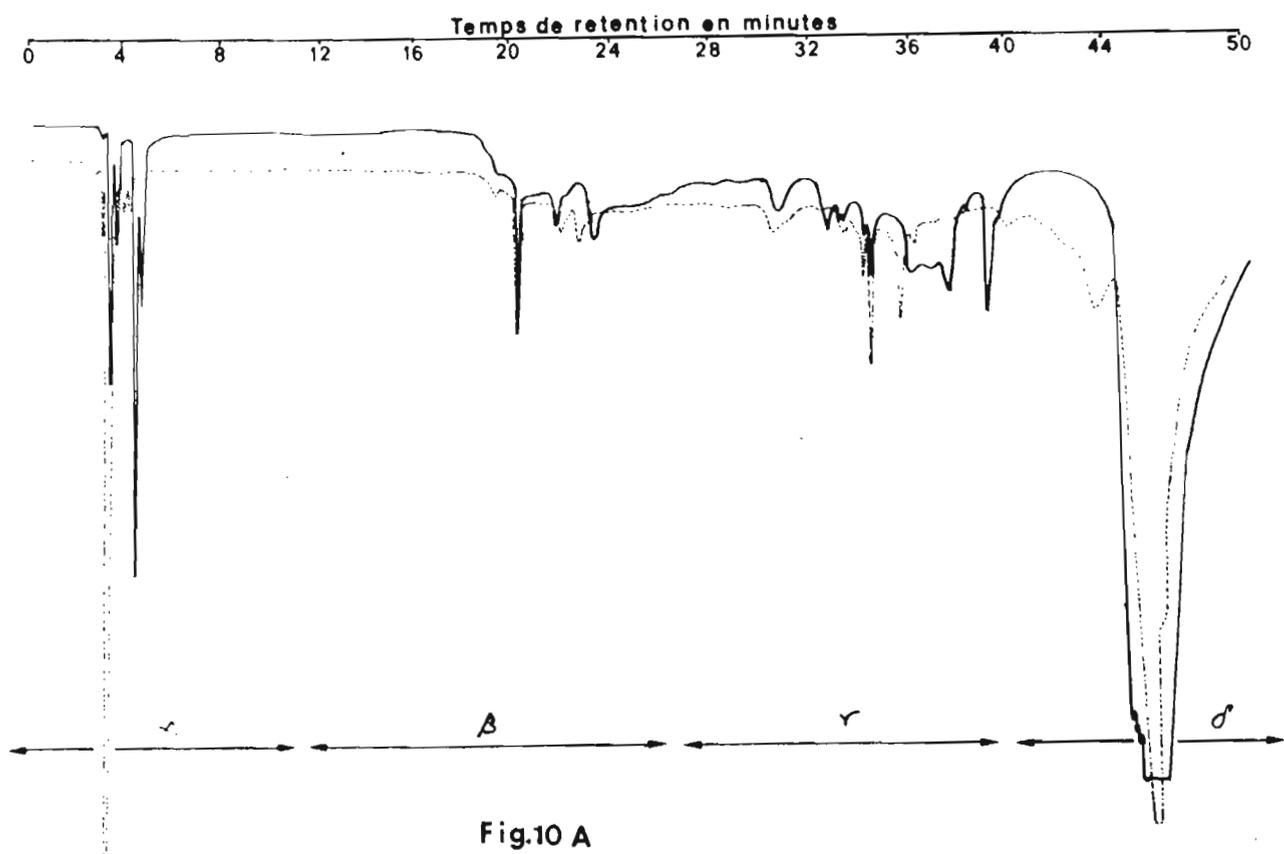


Figure 9: Extrait de feuilles du génotype PI 259747 (résistant); A. Matériel Sain; B: Matériel infecté. — : Plante entière; ----- Feuille détachées. C: Comparaison entre les plantes entières infectées (—) et les feuilles détachées saines (-----).



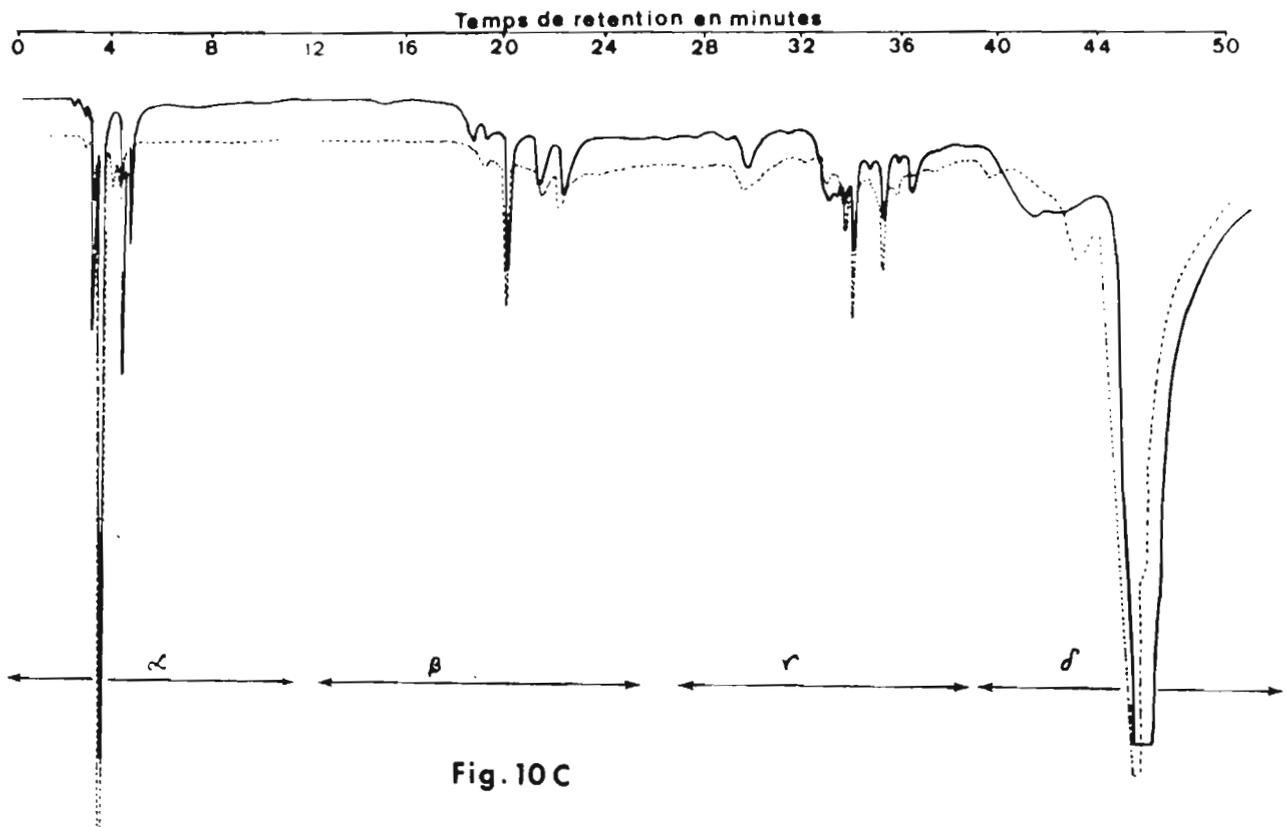


Figure 10: Extrait de feuilles du génotype RMP 91 (sensible). A. Matériel Sain; B: Matériel infecté. — : Plante entière; ----- Feuille détachées. C: Comparaison entre les plantes entières infectées (—) et les feuilles détachées saines (-----).

## 2. EFFET SUR LA COMPOSITION DES EXTRAITS EN SUBSTANCES ABSORBANT A 280nm SEPARÉES EN CLHP

L'investigation réalisée au niveau des phénols totaux constituait une première approche très globale. Aussi avons-nous tenté de préciser les phénomènes en soumettant les extraits à un fractionnement par CLHP sur colonne de silice. Les composés sont élués par un gradient discontinu formé par 4 systèmes de solvants de polarité croissante (correspondant aux fractions  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  indiquées sur les diagrammes d'éluat). La DO de l'éluat est enregistrée en continu à 280nm, longueur d'onde permettant de détecter essentiellement les composés aromatiques et leurs dérivés. Cette technique ne permet donc pas de mettre en évidence des variations au niveau de substances susceptibles de jouer un rôle important dans les réactions de défense des plantes telles que acides gras, leurs dérivés polyéniques ou oxygénés.... Par ailleurs chaque "pic" détecté ne correspond pas nécessairement à l'éluat d'une substance unique.

Malgré ces réserves, la comparaison des différents diagrammes d'éluat révèle que le simple fait de détacher les feuilles et de les mettre en survie (10 jours) induit manifestement chez tous les génotypes des modifications aux plans qualitatif et quantitatif, se traduisant par l'apparition ou la disparition de certains pics et l'augmentation ou la diminution de la taille de certains autres (figures 8 a, 9 a, 10 a). Il convient de noter que les différents génotypes ne réagissent pas de la même manière au niveau d'un pic (ou d'une fraction) déterminé(e). A titre d'exemple, et en se plaçant dans un cas simple, le détachement des feuilles provoque une très nette diminution de la fraction " $\delta$ " chez RMP 91 et TMV<sub>2</sub> alors que cette même fraction augmente chez PI 259747. Par ailleurs on observe, au moins pour un certain nombre de pics, que la mise en survie d'une feuille provoque un effet similaire à celui dû à l'infection sur plante entière (figures 8c, 9c, 10c).

A noter, enfin, que l'infection d'une feuille détachée peut ne pas modifier sensiblement l'allure du diagramme d'éluat (fig. 10 a et b, génotype RMP 91). Cette observation implique que

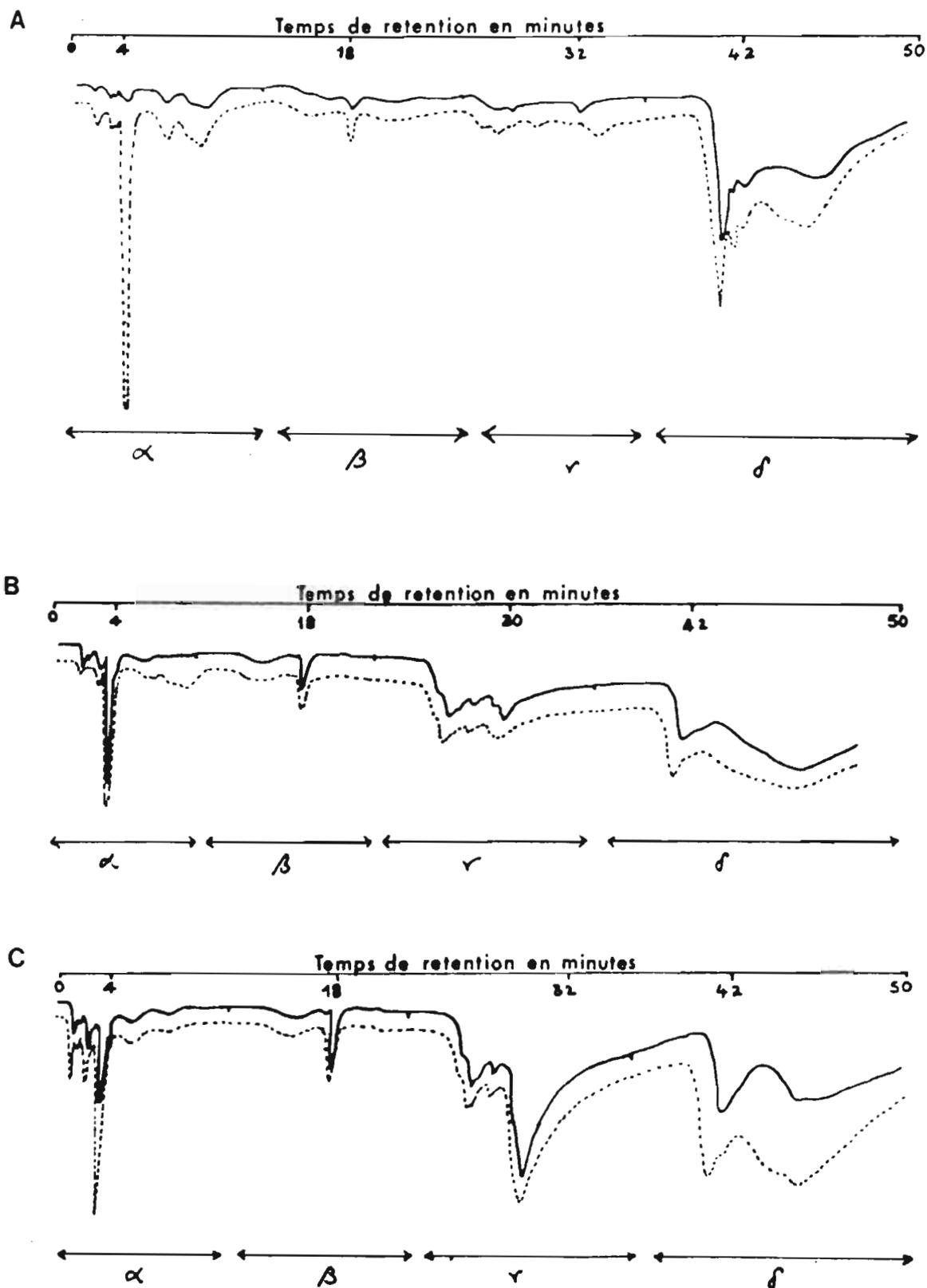


Figure 11: Chromatographie comparative en CLHP d'extrait des espèces sauvages d'Arachide 10 j après infection artificielle, séparés sur une colonne de silice ( $5\mu - 0,63 \times 30$  cm); Débit : 3,0 ml/min. Les quatre fractions principales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) sont éluées dans un mélange de solvants, Hx:Ae:MeOH (90%) aux proportions volumiques successives: 50/50/05; 20/100/15; 20/100/60; 20/100/300. A: *Arachis chacoense* (immune); B: *Arachis glabrata* (immune); C: *Arachis sp.* (GKP 9893 - hautement résistant). — : Matériel sain; - - - : Matériel infecté. L'analyse porte sur 20  $\mu$ l d'extrait correspondant à 0,025 g de poids frais de feuilles. Les conditions d'analyse sont les mêmes que celles décrits pour les figures 8 à 10.

les effets détachement et "infection artificielle" ne sont pas cumulatifs, au moins dans l'exemple cité. Une telle situation ne se retrouve cependant pas de manière systématique. Ainsi, la comparaison des diagrammes d'élution d'extraits de feuilles détachées, infectées et non-infectées, provenant des espèces sauvages, ne témoigne d'aucun effet notable de l'infection chez *A. glabrata* et *A. sp.* (GKP 9893) alors que l'on note une très forte accumulation des composés élués dans la fraction ' $\alpha$ ' chez *A. chacoense* (figures 11 A, B, C). Dans ce cas particulier et par référence à des données obtenues par des méthodes analytiques comparables (CLHP, colonne de silice, système d'élution) sur d'autres couples plante-parasite (TAQUET, 1985; VERNENGHI, 1985), les substances, dont la biosynthèse semble être stimulée, correspondraient à des dérivés phénoliques de la série benzoïque et/ou à des dérivés méthylés de la série cinnamique.

Enfin, les résultats que nous venons de rapporter sur les espèces sauvages semblent indiquer que la modification du diagramme d'élution, reflet de modifications au niveau des biosynthèses des composés correspondants, n'est pas liée au niveau de résistance des variétés puisque *A. chacoense* et *A. glabrata*, toutes deux immunes, "répondent" de manière différente à l'infection.

### 3. EFFET SUR LA FONGITOXICITE DES EXTRAITS

Une agression, même d'origine non parasitaire, peut conduire à une élicitation ou à une stimulation de la biosynthèse de phytoalexines (KUC et RUSH, 1985). Aussi avons-nous recherché l'effet de l'abscission des feuilles sur l'accumulation de tels composés et l'avons comparé à celui de l'infection par *P. arachidis*. Une première expérimentation a été réalisée en mettant en survie, durant des temps variables, des folioles du génotype Local, détachées de plantes âgées d'environ 1 mois. Après la mise en survie, les feuilles sont extraites par du méthanol à 50%; les extraits sont ensuite filtrés, centrifugés et concentrés dans des conditions standardisées. Cinquante  $\mu$ l de chaque extrait

concentré sont analysés en CCM; les substances fongitoxiques sont révélées par la technique du test de toxicité à l'égard du *Cladosporium*.

La figure 12 indique très nettement une augmentation de la toxicité des extraits en fonction de la durée de mise en survie (le temps  $t=0$  correspond au moment où les feuilles sont prélevées et broyées; à noter que cet extrait témoin contient des composés fongitoxiques préformés). L'augmentation présente un caractère non seulement quantitatif mais également qualitatif puisque après 3 et 4 jours de mise en survie on observe l'apparition de composés nouveaux.



Figure 12: Test de toxicité pour le *Cladosporium cladosporioides* en CCM: Génotype Local (sensible); Effet de la durée de mise en survie durant le temps variables (0/0: broyage immédiat; 0/3: broyage après 3 j de mise en survie; 0/4: broyage après 4 j de mise en survie). Notez l'augmentation de la fongitoxicité en fonction de la durée de mise en survie.

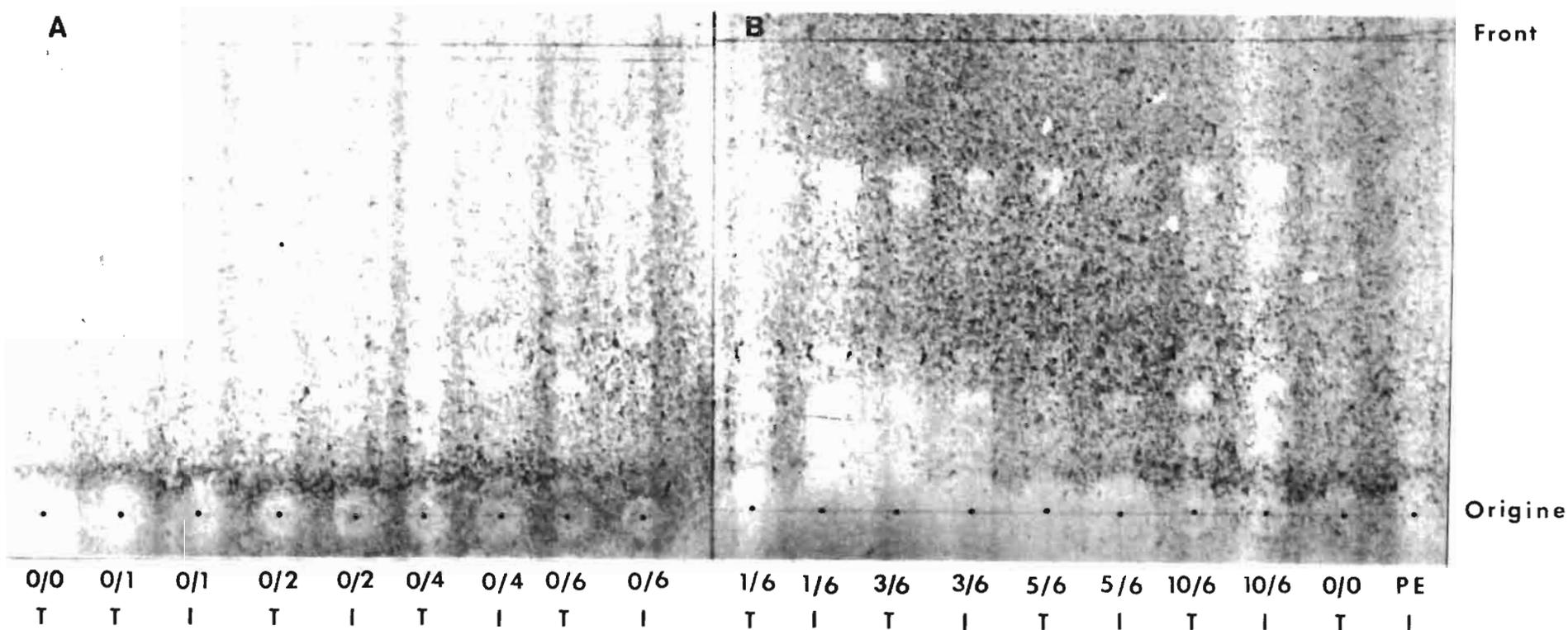


Figure 13 A et B: Estimation, par le test de fongitoxicité contre *Cladosporium cladosporioides* après séparation en CCM de différents paramètres (durée de mise en survie, infection, durée d'incubation) sur l'accumulation de substances fongitoxiques dans des feuilles d'Arachide détachées, du génotype NC Ac 17090 (résistant).

13 A: Effet du temps de mise en survie, de l'infection et du temps d'incubation après infection artificielle. 0/0 constitue le témoin général (feuilles détachées et immédiatement extraites). 0/1 T: broyage 24 h après détachement et mise en survie; 0/1 I: feuilles détachées, infectées au temps T = 0 et incubées durant 24 h; 0/2 .....

13 B: Effet du temps de mise en survie et de la durée de mise en survie préalable à l'infection artificielle. 1/6 T: feuilles détachées et mises en survie durant 7 jours au total; 1/6 I: feuilles détachées, mise en survie durant 24 h puis infectées et incubées pendant 6 jours... 0/0 T: témoin broyé immédiatement après détachement; PE: feuilles non détachées et broyées. Pour les motifs 10/6 T et 10/6 I, le dépôt a été fait à une concentration deux fois moins importante que pour les autres motifs.

Cet essai a été renouvelé et complété en mettant en oeuvre le génotype résistant NC Ac 17090. Ici, les feuilles ont été séparées en deux lots: un lot témoin mis en survie durant des temps variables et un lot infecté au temps  $t=0$  puis mis en survie durant des périodes identiques à celles des feuilles témoins.

Les figures 13 A et B montrent:

- une augmentation de la fongitoxicité en fonction de la durée de mise en survie (lots témoins notés 0/0, 0/1T, .....0/6T). Il est intéressant de relever que l'extrait 0/0, provenant de feuilles broyées immédiatement après le prélèvement sur la plante, ne contient que de faibles quantités de composés fongitoxiques.

- que, si l'on compare, pour chaque durée de mise en survie, l'extrait de feuille-témoin et l'extrait de feuille-infecté, l'infection ne produit pas d'effet supplémentaire notable. On peut également émettre l'hypothèse selon laquelle les deux types d'agression "détachement des feuilles" et "infection artificielle", produiraient un effet comparable sur l'accumulation des produits fongitoxiques et que, au moins chez le génotype NC Ac 17090, ces deux effets ne sont pas cumulatifs.

Par ailleurs, sur plante entière (0/0 T), les composés fongitoxiques, bien qu'à l'état de traces, ne semblent pas différer de ceux qui s'accumulent dans les feuilles après détachement. Enfin, l'infection par *P. arachidis* sur plante entière (PE I) ne paraît pas provoquer la synthèse de composés nouveaux. En résumé: le détachement des feuilles et leur mise en survie déclenchent des mécanismes physiologiques de nature comparable à ceux provoqués par l'infection (dans le domaine de la production de substances toxiques); celle-ci n'en modifie pas notablement l'intensité.

#### 4. EFFET DU DETACHEMENT ET DE LA MISE EN SURVIE DES FEUILLES SUR LES COMPOSANTES DE RESISTANCE

Après avoir déterminé l'effet de l'abscission sur différentes substances (ou classes de substances) synthétisées par la plante, nous avons effectué des observations au niveau de

quelques composantes de résistance. Il était, en effet, important d'observer, globalement, comment l'organe détaché réagit à l'agression provoquée par l'abscission, au travers de son comportement à l'égard de l'agent pathogène, ceci par comparaison avec le comportement de la feuille non détachée de la plante.

Au cours de cette expérimentation cinq composantes de résistance ont été notées dont nous rappelons la définition:

1. La période d'incubation (PI): correspond au délai (en jours) qui sépare la contamination de l'apparition des premiers symptômes. En pratique, elle est estimée sur une population de lésions par la date à laquelle 50% des lésions sont visibles sous forme de points d'infection. (COOK, 1980 a; SAVARY, 1985 b; SUBRAHMANYAM *et al.*, 1983 a).

2. La période de latence (PL): correspond au délai (en jours) qui sépare la contamination de la rupture de l'urédosore. Elle est estimée sur une population de lésions par la date à laquelle 50% des pustules sont rompues, par rapport au nombre total d'urédosores sporulant à la fin de l'expérience (PARLEVLIT, 1975).

3. Le diamètre des lésions (DL): correspond au diamètre moyen (en millimètres) d'environ 30 lésions prises au hasard le jour de l'arrêt du comptage des lésions totales. DL est déterminé à l'aide d'un micromètre oculaire monté sur un microscope.

4. L'intensité de sporulation (SP) est estimée selon une échelle comportant cinq classes (au moins trois répétitions par traitement).

5. Le pourcentage de la surface des feuilles colonisées (% SFC) est la surface couverte par les pustules et, éventuellement, leur halo chlorotique, exprimée en pourcentage par rapport à la surface totale.

La première expérimentation a été réalisée, sur des plantes âgées de 4 semaines, sur trois génotypes, deux sensibles (TMV<sub>2</sub> et RMP 91) et un génotype résistant (PI 259747).

Les résultats sont présentés dans le tableau 9. Le fait de détacher les feuilles provoque une augmentation importante de la sensibilité du matériel végétal: diminution de PI, augmentation

de DL, de SP et de % SFC. Cet accroissement de la sensibilité concerne tous les génotypes testés, les feuilles du génotype PI 259747 conservent néanmoins un niveau de résistance nettement supérieur à celui des feuilles des génotypes sensibles, ainsi qu'en témoignent une valeur de la période d'incubation nettement plus élevée et une valeur de l'intensité de la sporulation beaucoup plus faible que celles enregistrées chez les génotypes sensibles.

Genotype	Traitement	Période d'incubation (jours)*	Diamètre de lésion (mm)+	Intensité de Sporulation+	Surface de feuille Colonisée (%)*
TMV 2 (sensible)	Pl. ent.	11,8	0,86	3,5	4,9
	Feuil. dét.	9,6	0,95	4,8	23,3
RMP 91 (sensible)	Pl. ent.	12,2	0,54	2,7	2,4
	Feuil. dét.	10,8	0,74	4,2	10,7
PI 259747 (résistant)	Pl. ent.	13,5	0,31	1,5	0,6
	Feuil. dét.	12	0,66	2	18,3

Tableau 9: Effet du détachement des feuilles sur les composantes de résistance de l'Arachide (\*: moyenne de 5 répétitions; + : moyenne de 3 répétitions; Pl. ent. : Plante entière; Feuil. dét : Feuilles détachées). Les observations et comptage sont effectués journalièrement à partir du 8e jour après la contamination. La surface des feuilles colonisée est estimée à la fin d'expérimentation.

Cette expérience a été reprise en utilisant deux autres génotypes d'Arachide: Local (sensible) et NC Ac 17090 (résistant); l'effet sur les variables "Période d'incubation" et "Période de latence" a été déterminé (tableau 10 a).

Nous observons, ici également, une augmentation de la sensibilité des génotypes. Le génotype NC Ac 17090 conserve néanmoins une bonne résistance, la période de latence étant très supérieure à celle caractérisant le développement ou l'infection sur les génotypes sensibles (Local, RMP 91 et TMV<sub>2</sub>).

Composante	Local (sensible)		NC Ac 17090 (résistant)	
	Pl. ent.	F. D	Pl. ent.	F. D
PI (jours)	11	10	23,5	15,5
PL (jours)	11,4	10,5	-	-

Tableau 10 a: Effet du détachement des folioles sur deux composantes de résistance, PI : Période d'incubation; PL : Période de latence (Pl. ent : Plante entière; F.D : Folioles détachées). Les folioles sont immédiatement infectées après le détachement.

Durée de mise en survie (jours)	P. I (jours)*		P. L (jours)*	
	Local	NC Ac 17090	Local	NC Ac 17090
0	10	15	10,5	-
1	10	15,9	10,4	-
3	10,3	15,8	10,8	-
5	10	13,4	10,7	-
10	10	15,5	10,6	-

Tableau 10 b: Effet de la durée de mise en survie des folioles sur deux composantes de résistance (P.I : Période d' incubation; P.L: Période de latence). \*: Moyenne de 4 répétitions. Ici les folioles sont mises en survie durant 0, 1, 3, 5 et 10 j avant l'infection artificielle.

L'effet du temps de mise en survie des feuilles, préalablement à l'infection, a été testé sur la Période d'incubation et la Période de latence pour deux génotypes (Local et NC Ac 17090). Les résultats (tableau 10 b) montrent que chez les deux génotypes la durée de mise en survie n'affecte pas sensiblement les deux composantes de résistance étudiées.

## V - DISCUSSION

Après un rappel du processus pathogénique, nous avons effectué un recensement de quelques réactions de l'Arachide en réponse à l'infection par *P. arachidis*, aux plans histologique et biochimique.

L'histologie des interactions hôte-parasite entre les plantes et les agents de rouille, a très largement été étudiée (HILU, 1965; LEATH et ROWELL, 1966 et 1969; HEATH, 1971 et 1972; McLEAN, 1979; WINGFIELD et RIJKENBERG, 1981; NICKS, 1983).

La similitude observée entre les différents génotypes quant aux étapes se déroulant entre la contamination et la formation d'appressoria est confirmée par certains de ces travaux (McLEAN, 1979; HEATH, 1971; HILU, 1965). Ceci n'est pas le cas pour l'étape de pénétration et le nombre de lésions produites (tableau 2) qui semblent varier en fonction de la sensibilité génotypique.

Concernant les observations histochimiques, les résultats que nous avons acquis sont en accord avec ceux de LEATH et ROWELL (1969) qui suggèrent que la résistance ne s'exerce pas au travers de la synthèse de callose, de subérine ou de lignine. Il est néanmoins possible que les tests de mise en évidence de la lignine et de la subérine ne soient pas suffisamment sensibles pour permettre la détection de ces polymères au cas où ils ne seraient synthétisés qu'en très faibles quantités en réponse à l'infection. L'analyse biochimique selon la méthodologie adoptée par HAMMERSHMIDT *et al.*, 1982; RIDE, 1980 devrait infirmer ou confirmer ces résultats. Il n'en demeure pas moins que de nombreuses plantes réagissent à l'infection par l'édification de barrières physiques (HEATH, 1981). Le comportement particulier de l'Arachide serait-il lié à une capacité trop réduite en matière de biosynthèse des polymères appropriés?

Au plan général, les résultats relatifs à la fréquence des infections mettent en évidence une différence nette entre les génotypes résistants et les génotypes sensibles. Des capacités de

réactions existent donc chez l'Arachide; elles devraient se situer à un niveau différent de celui que nous venons d'explorer. C'est pourquoi nous avons reporté nos investigations sur un plan biochimique afin de vérifier la nature des réactions de l'Arachide au niveau moléculaire.

L'effet de l'infection sur l'activité peroxydasique, la teneur en protéines et la teneur en composés phénoliques totaux est d'ampleur limitée. De plus les réactions sont hétérogènes, parfois divergentes, interdisant de ce fait une interprétation généralisable des phénomènes (effet de l'infection et effet génotypique).

Globalement, et en ne considérant que les critères histologiques et biochimiques (activité peroxydasique, protéines et phénols totaux) étudiés, la réaction de l'Arachide semble différer très nettement de celle développée par la plupart de plantes subissant l'attaque par un agent pathogène. Dans la majorité des cas, on observe au moins l'un ou l'autre des effets suivants: (1) édification de barrières physiques (lignification ou subérisation des tissus), (2) accumulation de composés phénoliques (totaux ou spécifiques) ou (3) stimulation de l'activité peroxydasique ou de certaines isoperoxydases. Chez l'Arachide, aucune de ces réactions ne se développe de manière évidente lorsque l'agent infectant est *Puccinia arachidis*, alors que certaines d'entre elles se développent lorsque cette même plante est attaquée par d'autres champignons (GUPTA et al., 1985). Ce comportement particulier est-il lié à la nature de l'agent pathogène infectant, *P. arachidis*, agent biotrophe?

Il convient de noter ici que les points (1), (2) et (3) mentionnés se rapportent peu ou prou à certaines réactions du métabolisme secondaire lié à l'édification ou à la destruction de lignines, et que, précisément, dans le cas de l'interaction Arachide - *P. arachidis*, nous n'avons pas pu démontrer, au moins par les techniques utilisées, que les tissus infectés produisent en quantités importantes et/ou dans des délais restreints ces polymères en réponse à l'infection.

Pourtant, des variétés résistantes à cet agent pathogène existent; on peut donc se demander de quelle manière particulière

ces variétés se défendent: quels sont les facteurs de résistance et à quels niveaux ils interviennent.

Deux observations pourraient constituer des éléments de réponse:

a) La teneur très élevée en composés phénoliques des Arachides sauvages immunes ou hautement résistantes. Chez ces espèces elle pourrait constituer une barrière chimique efficace contre l'infection.

b) La présence, dans les feuilles d'Arachide de substances fongitoxiques.

L'existence de tels composés (et l'identification de certains d'entre eux) a déjà été décrite par d'autres auteurs qui les assimilent à des phytoalexines (KEEN et INGHAM, 1976; INGHAM, 1976; AGUAMAH *et al.*, 1981; STRANGE, 1985). Ces substances, quelles que soient leur structure chimique, sont considérées comme capables de moduler les réactions de défense des plantes et donc d'intervenir activement dans le déroulement de la pathogénèse (KEEN, 1986; MANSFIELD, 1982).

Il est intéressant de noter qu'à l'instar des composés phénoliques totaux, les substances fongitoxiques semblent nettement plus abondantes dans les feuilles des espèces sauvages hautement résistantes ou immunes que dans celles des génotypes cultivés.

La troisième partie de ce chapitre aborde le problème lié à l'influence du détachement des feuilles ou des folioles, et de leur mise en survie, sur un certain nombre de paramètres déjà pris en compte précédemment et sur quelques facteurs de résistance. Initialement cette étude était motivée par des considérations purement techniques et méthodologiques: était-il possible d'utiliser comme matériel végétal expérimental des feuilles mises en survie (dont la manipulation est beaucoup plus aisée que le matériel "plante entière")? Cette question en sous-tendait une autre présentant des implications théoriques d'importance fondamentale dans le cadre de nos recherches: le détachement des feuilles et leur mise en survie ne provoquent-ils chez la plante une réaction susceptible d'interférer, voire de masquer l'effet de l'attaque parasitaire?

A l'évidence, la réponse est positive. Plus précisément: le détachement provoque un effet défavorable sur les composantes de résistance sans toutefois modifier le classement des différentes variétés; en particulier les géotypes résistants conservent ce caractère, le niveau de résistance étant simplement diminué.

En revanche, le détachement semble avoir un effet favorable sur l'accumulation de composés toxiques qui, qualitativement, paraissent être identiques à ceux présents dans une plante infectée. Pour étudier l'effet de l'infection sur ce caractère, il est donc exclu de s'adresser à du matériel végétal mis en survie.

La mise en parallèle de ces deux observations: effet dépressif sur les facteurs de résistance et effet stimulant sur la synthèse des composés fongitoxiques soulève une autre question fondamentale: ces composés jouent-ils effectivement un rôle dans la pathogénèse pour le couple étudié? Si oui, on aurait pu penser que la mise en survie des feuilles, provoquant une augmentation du taux de substances toxiques, aurait pour effet d'accroître le niveau de résistance de ce matériel végétal. Or il n'en est rien puisque ce traitement, au contraire, diminue le niveau de résistance des différents géotypes.

Quatre hypothèses pourraient rendre compte de l'inefficacité apparente de l'accumulation des produits toxiques:

- le seuil d'efficacité n'est pas atteint,
- la compartimentation au sein des tissus est telle que les hyphes de *P. arachidis* ne sont pas en contact avec ces composés,
- l'agression provoque une synthèse diffuse dans tous les tissus des différents métabolites; les concentrations sont localement insuffisantes pour arrêter les hyphes de *P. arachidis*.
- *P. arachidis* est en fait insensible à l'action de composés dont l'activité n'a, jusqu'à présent, été testée qu'à l'encontre de *Cladosporium cladosporioides*.

L'existence de ces composés fongitoxiques dans des tissus sains, même en faible quantité, soulève un autre problème: ces composés répondent-ils à la définition classique d'une

phytoalexine (PAXTON, 1981; KEEN, 1986)? Rappelons que ce terme générique est en théorie réservé à des substances fongitoxiques synthétisées par la plante en réaction à une agression parasitaire; en principe ce terme ne s'applique pas à des substances préformées. Il est vrai que cette définition, à l'origine très restrictive, s'est élargie puisqu'on admet qu'une agression même d'origine non parasitaire, peut induire (ou stimuler) la biosynthèse de phytoalexines (STOESSEL et MAGNOLATO, 1983). Par ailleurs, une plante non infectée, même cultivée dans de bonnes conditions n'est pas à l'abri de toute agression. Ainsi, la présence de composés fongitoxiques dans les tissus "sains" pourrait être mise au compte d'une élicitation due à un stress "banal" non pris en compte par l'expérimentation. A cet égard, il convient de rappeler qu'au cours de certains essais les tissus sains étaient dépourvus de tout composé toxique, alors qu'au cours de certains autres de telles substances étaient aisément détectées. Cette différence de comportement de la part de plantes saines, de même génotype, montre que "l'apparence externe" d'une plante constitue un critère très insuffisant pour la déclarer saine ou non.

En résumé, de l'ensemble des essais que nous avons réalisés, il résulte que l'aspect de nos recherches concernant les phytoalexines méritait d'en être approfondi. Nous avons donc, en travaillant sur plante entière pour les raisons évoquées plus haut, étudié plus en détail (chapitre II) l'effet de l'infection et l'effet génotypique sur l'évolution, dans les feuilles, de :

- la fongitoxicité globale,
- la composition des extraits de feuilles par analyse en CLHP.



## CHAPITRE II

### ETUDE CINETIQUE DES REACTIONS DE L'HOTE

Les essais que nous venons de décrire avaient pour objectif de mettre en évidence quelques réactions de l'Arachide en réponse à l'infection par *P. arachidis* et résultant de l'abscission foliaire. Par ailleurs nous avons également recherché l'existence de réponses différentielles, suivant les variétés, en relation avec leur niveau de résistance à l'agent pathogène.

Les observations avaient été effectuées à un stade déterminé du développement de la maladie ou de l'agression et ne fournissaient de ce fait qu'une image statique d'un phénomène, la réaction de la plante, théoriquement en constante évolution.

Nous avons donc réalisé des expérimentations complémentaires dans le but d'apprécier les réponses de l'hôte en fonction du temps écoulé après l'infection. A la lumière des résultats antérieurs nous avons focalisé notre étude sur l'analyse en CLHP des extraits de tissus, la comparaison des différents diagrammes d'élution de composés décelables à 280 nm devant nous permettre de détecter les variations quantitatives et/ou qualitatives de la biosynthèse de ces composés ou groupes de composés.

# I - ANALYSE EN CLHP DES EXTRAITS DE FEUILLES D'ARACHIDE: EFFET DE L'ATTAQUE PARASITAIRE ET DE LA DUREE DE L'INFECTION; EFFET GENOTYPIQUE

## 1. RAPPEL METHODOLOGIQUE; PROFIL D'UN DIAGRAMME D'ELUTION EN CLHP SUR COLONNE DE SILICE:

L'analyse en CLHP est réalisée en injectant sur la colonne de silice 20 $\mu$ l d'extrait concentré correspondant à 40 mg de matériel végétal frais. L'élution des composés adsorbés sur la silice est réalisée en quatre étapes successives à l'aide de quatre mélanges ternaires de polarité croissante. Les quatre éluants font intervenir les solvants organiques suivants: hexane (Hx), acétate d'éthyle (Ae) et méthanol à 90%, successivement dans les proportions volumiques suivantes: 50/50/05, 20/100/15, 20/100/60 et 20/100/300.

Les fractions (comportant chacune généralement plusieurs pics d'absorption à 280nm) correspondant aux quatre systèmes d'élution sont désignées respectivement sous la dénomination de fraction  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  (figure 14).

D'après les données de la littérature (TAQUET, 1985; RAVISE, Comm. Pers.) et l'expérience acquise au cours d'analyses comparables effectuées sur des extraits méthanoliques d'autres plantes, saines ou infectées, la répartition des différentes classes de molécules serait la suivante:

### - Fraction ' $\alpha$ ':

la première partie de la fraction ' $\alpha$ ' pourrait correspondre à la zone d'élution d'acides gras insaturés (diénique ou triénique) et de leurs dérivés oxygénés; ces substances ont un coefficient d'absorption à 280nm très réduit ou nul; dans les conditions opératoires adoptées elles échappent donc à notre investigation. La deuxième partie contiendrait des dérivés phénoliques de la série benzoïque, les dérivés les plus méthylés, non glycosilés, de la série cinnamique et des stilbènes méthylés.

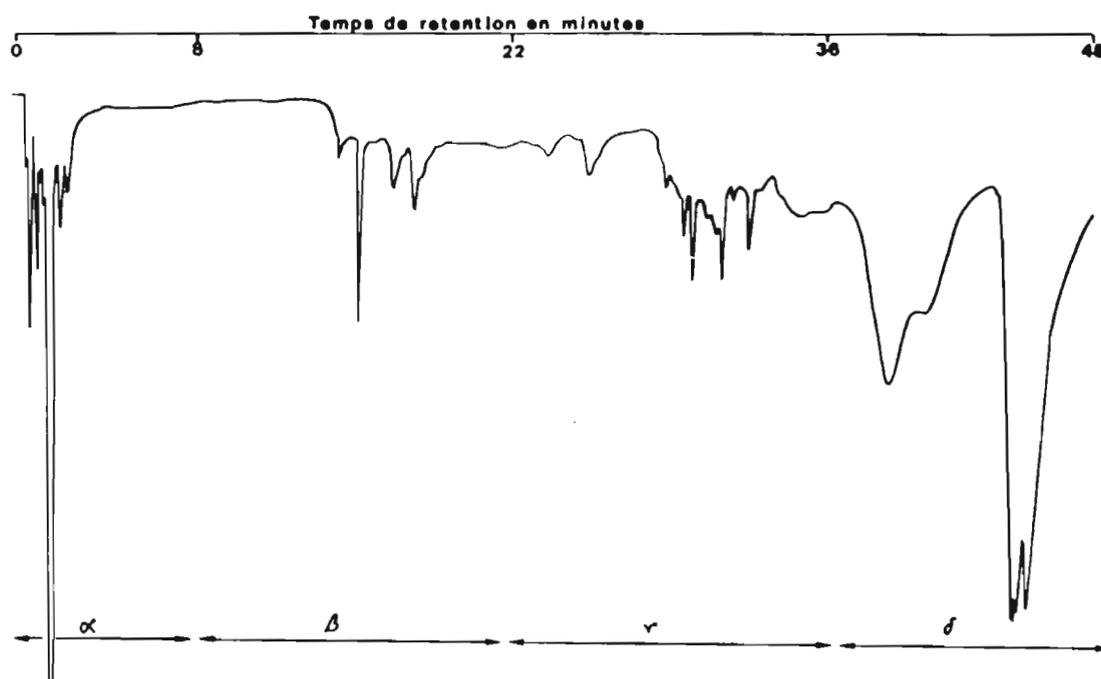


Figure 14: Chromatographie en CLHP d'extract de plantes saines du génotype TMV<sub>2</sub> (sensible). Colonne de silice (5 $\mu$  - 0,63 x 30 cm). Détection - UV à 280 nm; Débit: 3ml/min; Vitesse de déroulement du papier: 5 mm/min; Sensibilité: 0,16; Les quatre fractions principales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) sont éluées dans un mélange de solvants, Hx : Ae : MeOH(90%) aux proportions volumiques successives: 50/50/05; 20/100/15; 20/100/60; 20/100/300.

- la fraction ' $\beta$ ' contiendrait surtout des dérivés cinnamiques,
- la fraction ' $\gamma$ ' correspondrait à l'élué des iso-flavonoïdes ou flavonoïdes et des phénols glycosylés (RAVISE, comm. pers.),
- enfin, la fraction ' $\delta$ ' pourrait rassembler des produits secondaires de polymérisation ou de dégradation (TAQUET, 1985).

Les diagrammes d'élué sont directement enregistrés à l'aide d'un enregistreur-intégrateur qui fournit trois informations fondamentales auxquelles nous nous référerons régulièrement: temps de rétention, surface des pics et importance

relative de chaque pic (% de la surface par rapport à la surface totale intégrée au cours de chaque analyse).

La réalisation des différentes analyses (depuis l'extraction jusqu'à l'élution sur CLHP) dans des conditions standardisées permet donc, par simple comparaison de la surface des fractions (ou même des pics bien individualisés) ou de leur valeur relative, de suivre l'effet des différents paramètres testés. Au cours des analyses successives, qui se sont étalées sur plusieurs mois, il est évident que de légères variations du temps de rétention ont été observées. Ces variations sont aisément repérables, et donc susceptibles d'être corrigées, grâce à la présence systématique sur chaque diagramme d'élution de pics caractéristiques bien individualisés.

## 2. EFFET DE L'INFECTION PARASITAIRE ET DE SA DUREE SUR LE DIAGRAMME D'ELUTION DES EXTRAITS EN CLHP, EFFET GENOTYPIQUE

Une expérimentation a été réalisée sur plantes (entières) cultivées en pots comprenant quatre génotypes: Local (sensible), RMP 91 (moins sensible), NC Ac 17090 (résistant) et PI 259747 (résistant). Elle avait pour but de comparer l'effet de l'infection et de la durée d'incubation sur certaines caractéristiques biochimiques matérialisées par le diagramme d'élution des extraits de feuille selon la méthodologie décrite plus haut. Quatre prélèvements caractéristiques (t = 2, 5, 10 et 15 jours après l'infection) ont été effectués correspondant à différentes étapes du cycle infectieux:

- t = 2j : germination des spores, et pénétration des hyphes par les stomates,
- t = 5j : formation des haustoria et début de la colonisation des tissus
- t = 10j : apparition des premiers symptômes visibles
- t = 15j : maturation des lésions, multiplication et libération des urédospores.

Le tableau 11 a indique, pour chaque génotype, et à chaque étape de l'expérimentation, la surface des pics élués; le tableau 11 b résume les variations dues à l'infection.

Génotype	jours après infection			
	2	5	10	15
Local-T	0,96	0,98	0,76	1,46
Local-I	2,03	1,22	1,21	2,39
RMP 91-T	2,31	1,17	0,89	2,93
RMP 91-I	2,33	2,07	0,95	2,27
NC Ac 17090-T	2,1	0,95	0,9	1
NC Ac 17090-I	0,85	0,86	1,55	2,46
PI 259747-T	0,96	0,71	0,8	0,52
PI 259747-I	0,76	0,85	1,11	0,87

Tableau 11 a: Comparaison en fonction du temps de la surface totale des pics {ensemble de 4 fractions, ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) - en millions d'unités) éluées après injection de 20  $\mu$ l d'extrait brut provenant de feuilles saines et de feuilles infectées prélevées sur quatre génotypes d'Arachide.

Génotype	Variations (en %) de la surface totale des pics due à l'infection aux différents temps d'incubation			
	2	5	10	15
Local	112	25	60	64
RMP 91	1	77	7	-23
NC Ac 17090	-60	-10	72	146
PI 259747	-21	20	39	67

Tableau 11 b: Effet de l'infection, après temps variables d'infection sur la surface totale des pics. Les variations correspondant à l'augmentation ou à la diminution de la surface enregistrée pour des extraits de feuilles infectées par rapport celle des extraits de feuilles non-infectées. Ces variations sont exprimées en % (le signe '-' indique une diminution de 'x' % par rapport témoin correspondant).

L'analyse globale de ces deux tableaux suggère que le génotype sensible (Local) réagit le plus intensément durant les premières phases de l'infection, tandis que les deux génotypes

résistants semblent répondre plus progressivement mais de manière continue (tableau 11 b). Il est à noter que NC Ac 17090 (résistant) et RMP 91 (sensible) contiennent, à l'état sain, des quantités de composés (absorbant à 280 nm) relativement plus élevées que les deux autres génotypes. Considéré sous cet angle, aucun effet génotypique ne peut être dégagé.

De même, l'analyse des résultats, fraction par fraction (tableau 12) ne permet pas de tirer de conclusion précise quant à l'effet de la durée de l'infection ou à l'influence génotypique.

Fraction ' $\alpha$ '				
Génotype	Variation de la surface à 'x' jours après infection			
	2	5	10	15
Locale	-20	2	14	0
RMP 91	-4	-11	5	0
NC Ac 17090	19	3	23	-30
PI 259747	3	8	-1	-14

Fraction ' $\beta$ '				
Génotype	Variation de la surface à 'x' jours après infection			
	2	5	10	15
Locale	-11	-9	-11	-8
RMP 91	2	-5	-8	-9
NC Ac 17090	19	0	-10	-6
PI 259747	17	-8	1	0

Fraction ' $\gamma$ '				
Génotype	Variation de la surface à 'x' jours après infection			
	2	5	10	15
Locale	46	1	-1	15
RMP 91	6	29	0	6
NC Ac 17090	-42	1	-4	39
PI 259747	-29	1	2	4

Fraction ' $\delta$ '				
Génotype	Variation de la surface à 'x' jours après infection			
	2	5	10	15
Locale	-16	6	-3	-20
RMP 91	-4	-13	3	2
NC Ac 17090	4	-4	-10	-4
PI 259747	9	-2	-2	10

Tableau 12: Effet de l'infection sur la composition des différentes fractions ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) exprimée par la variation de la surface de chaque fraction (% surface Inf. - % surface Témoin). Analyse en fonction du temps d'infection pour quatre génotypes.

### 3. EFFET SUR LA FRACTION ' $\alpha$ '

Nous avons porté une attention particulière à la fraction ' $\alpha$ '. Celle-ci contenant la plupart des composés fongitoxiques extraits des feuilles d'Arachide (figure 15). Cette situation est d'ailleurs comparable à celle qui prévaut chez le Palmier à huile (TAQUET, 1985).



Figure 15: Test de fongitoxicité au *Cladosporium cladosporioides* des quatre fractions principales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) séparées en CLHP à partir d'un extrait brut de tissu infecté par *P. arachidis*. Notez que la fongitoxicité correspond à la fraction ' $\alpha$ '.

#### 1°) ANALYSE GLOBALE:

A titre d'exemple les figures 16 et 17 présentent les diagrammes d'éluion de la fraction ' $\alpha$ ' pour deux génotypes (Local-sensible, NC Ac 17090-résistant) et à deux étapes du cycle infectieux (prélèvement respectivement 2 et 10 jours après infection).

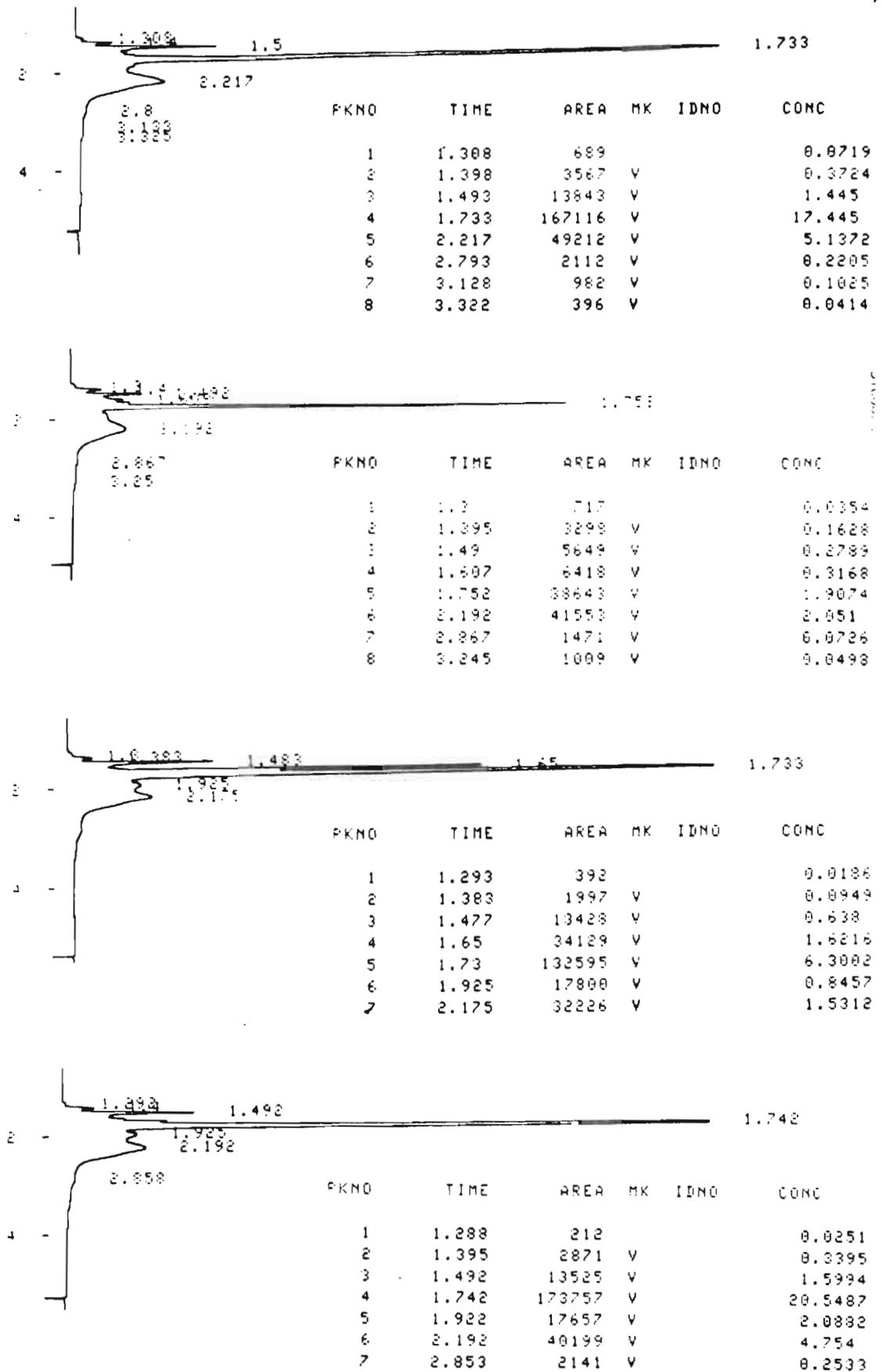


Figure 16: Comparaison des diagrammes d'élution (détection à 280 nm) de la fraction 'α' obtenus par analyse en CLHP {Colonne: Silice (5μ) Sphéri-5, Brownlee Labs; (0,46 x 25 cm;) Débit: 2,2 ml/min) d'extraits bruts provenant des plantes saines ou infectées par *P. arachidis*; Prélèvement et analyse 2 j après infection artificielle. A: Génotype Local - non infecté; B: Génotype Local - Infecté; C: Génotype NC Ac 17090 - non infecté; D: Génotype NC Ac 17090 - Infecté. Temps de rétention de chacun des pics, et concentration dans l'ensemble de l'extrait : 20 μl correspondant à 40 mg de matériel végétal.

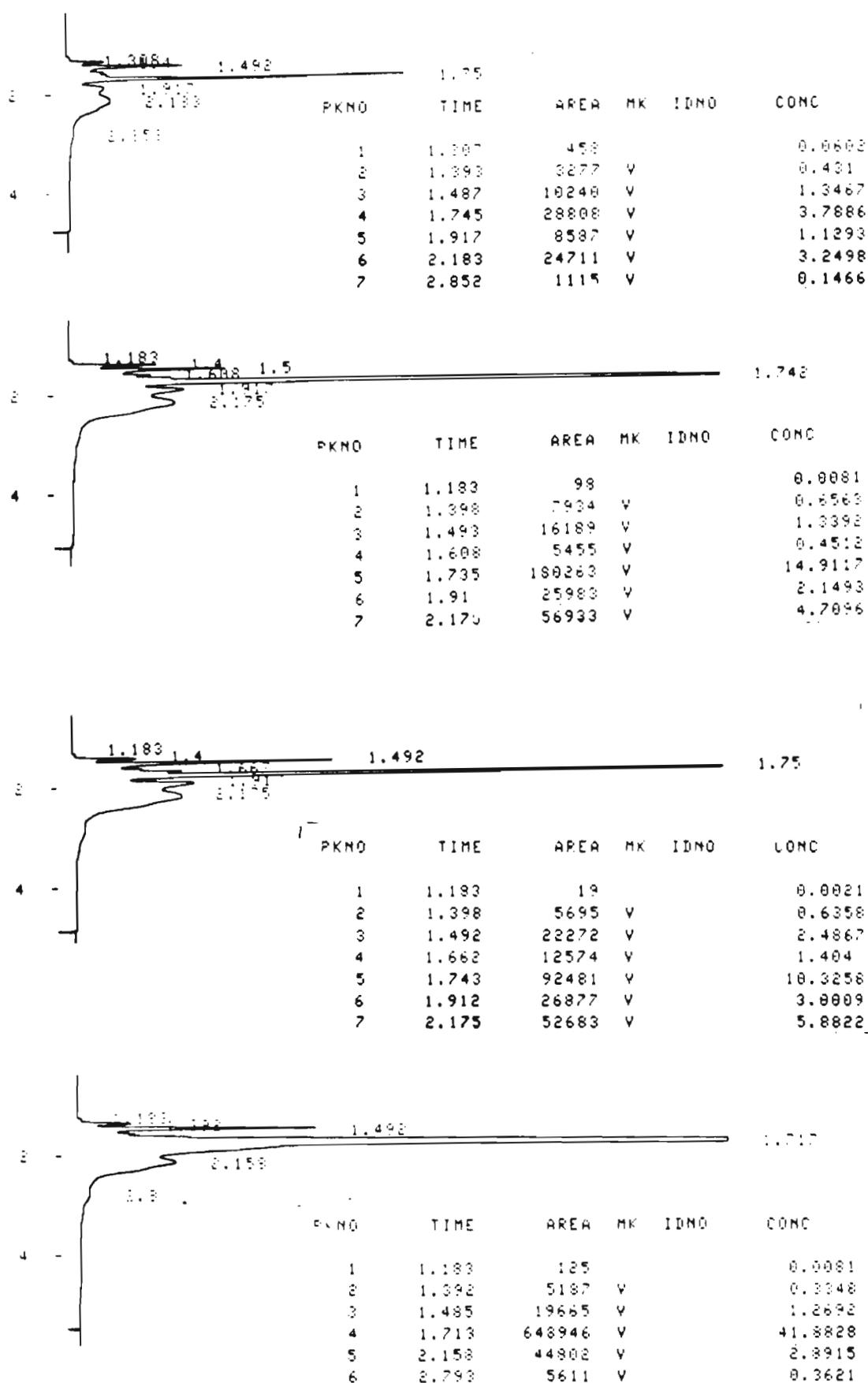


Figure 17: Comparaison des diagrammes d'éluion (détection à 280 nm) de la fraction 'α' obtenus par analyse en CLHP d'extraits bruts provenant des plantes saines ou infectées par *P. arachidis*; Prélèvement et analyse 10 j après infection artificielle. A: Génotype Local - non infecté; B: Génotype Local - Infecté; C: Génotype NC Ac 17090 - non infecté; D: Génotype NC Ac 17090 - Infecté. Les conditions expérimentales sont identiques à celles présentées dans la figure 16.

Génotype	Traitement	Date du prélèvement*	Surface ' $\alpha$ '	Surface ' $\alpha$ ' - Infecté
				Surface ' $\alpha$ ' - sain = y
Local	Sain	2	0,24	
		5	0,14	
		10	0,08	
		15	0,24	
	Infecté	2	0,1	0,41
		5	0,19	1,36
		10	0,29	3,63
		15	0,4	1,67
RMP 91	Sain	2	0,4	
		5	0,27	
		10	0,38	
		15	0,51	
	Infecté	2	0,32	0,8
		5	0,24	0,89
		10	0,45	1,18
		15	0,4	0,78
PI 259747	Sain	2	0,19	
		5	0,09	
		10	0,2	
		15	0,2	
	Infecté	2	0,18	0,95
		5	0,27	3
		10	0,26	1,3
		15	0,2	1
NC Ac 17090	Sain	2	0,23	
		5	0,19	
		10	0,17	
		15	0,42	
	Infecté	2	0,25	1,08
		5	0,2	1,05
		10	0,72	4,24
		15	0,3	0,71

Tableau 13: Etude de la fraction ' $\alpha$ '; \* : date du prélèvement correspond au temps écoulé, en jours, entre le prélèvement 'x' et le moment de l'infection; y: surface ' $\alpha$ ' infecté/ surface ' $\alpha$ ' témoin.

Les résultats d'ensemble sont présentés dans le tableau 13 qui regroupe deux informations: d'une part les valeurs réelles des surfaces de la fraction ' $\alpha$ ' enregistrées aux différentes phases de l'expérimentation et, d'autre part, la valeur du

rapport 'y' obtenu en divisant la valeur de la surface de cette fraction dans le cas des feuilles infectées par celle du témoin correspondant. Cette manière procéder permet d'éliminer *de facto*, l'effet perturbateur d'un certain nombre de variables, notamment celles liées à l'accroissement de l'âge de la plante durant la période d'expérimentation.

La figure 18 reprend sous une forme graphique les valeurs de ce rapport 'y' en fonction du délai écoulé à partir du temps  $t=0$  correspondant à l'infection et ceci pour les quatre génotypes testés: deux sensibles (Local et RMP 91) et deux résistants (NC Ac 17090 et PI 259747).

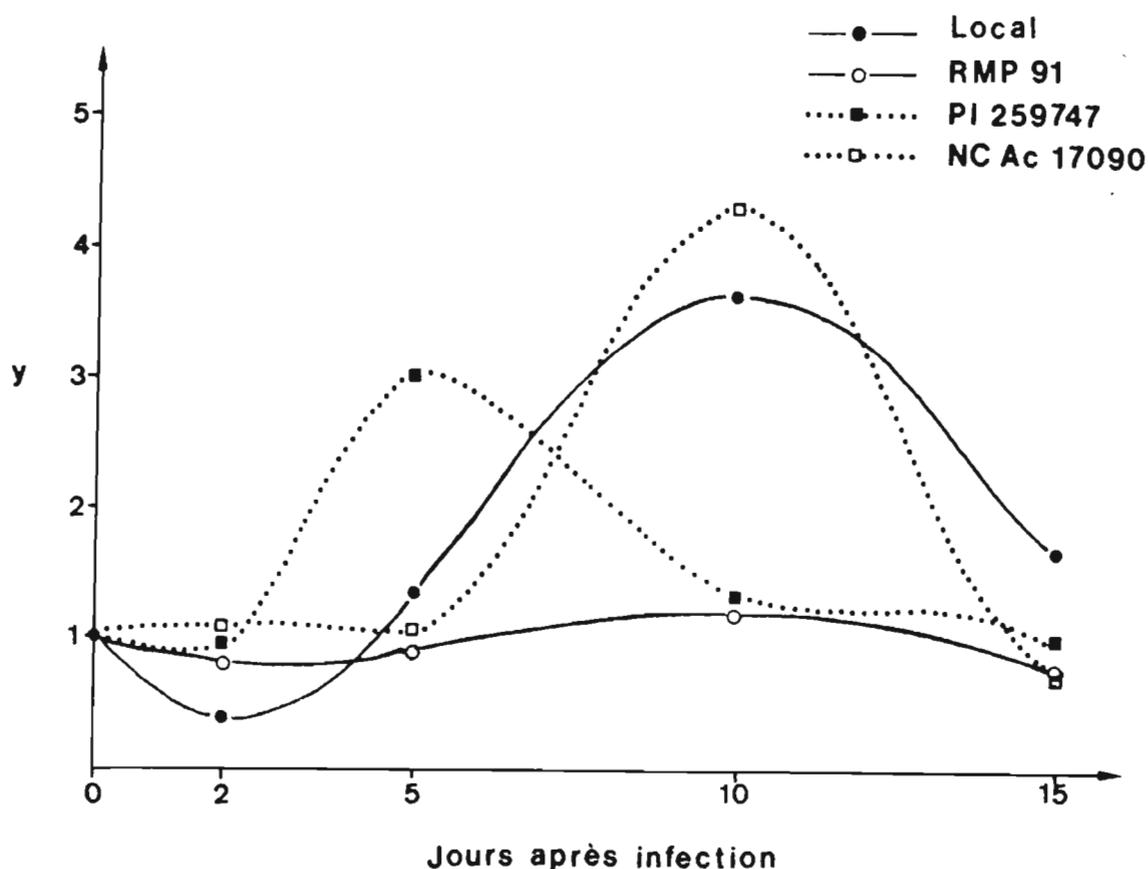


Figure 18: Représentation graphique de la valeur 'y' (i.e., Surface 'α' infecté/Surface 'α'sain) caractérisant quatre génotypes (Local et RMP 91: sensibles; NC Ac 17090 et PI 259747: résistants), en fonction du temps écoulé (en jours) après infection artificielle. Notez une diminution de la valeur initiale pour les génotypes sensibles et une stimulation de taux pour les génotypes résistants.

Dans l'hypothèse d'une intervention effective des composés de la fraction ' $\alpha$ ' dans la résistance génotypique, trois paramètres semblent jouer un rôle majeur:

- a) absence d'une réduction de la teneur en ces composés en début d'infection
- b) précocité de l'accumulation des composés actifs
- c) amplitude de la stimulation

En pratique, si l'on compare les caractéristiques des quatre génotypes, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle les phénomènes initiaux sont prépondérants, mais non suffisants, pour conférer la résistance; ce caractère doit être lié à l'un des deux autres: stimulation élevée de la biosynthèse des composés de la fraction ' $\alpha$ ' ou stimulation, même d'amplitude moyenne, mais précoce de cette même fraction.

Ainsi, la différence entre le génotype Local (sensible) et le génotype NC Ac 17090 (résistant) semble uniquement résider dans le fait que ce dernier, par rapport au témoin sain, ne voit pas sa fraction ' $\alpha$ ' diminuer en début du cycle parasitaire. L'augmentation relative, ultérieure, de cette fraction chez le génotype Local est comparable à celle constatée chez NC Ac 17090; elle ne lui confère pourtant aucun caractère de résistance.

Le génotype PI 259747 semble tirer sa résistance du fait de l'absence de la réduction relative de la fraction ' $\alpha$ ' **et** de son augmentation ultérieure. Cette augmentation relative est moins importante que chez le génotype Local mais plus précoce.

Enfin chez le génotype RMP 91, sensible, les phénomènes initiaux sont comparables à ceux des deux génotypes résistants, mais non suivis d'une stimulation ultérieure.

Ainsi, si l'on considère les trois caractères énoncés plus haut, en tant que facteurs de résistance, et en se basant sur les exemples expérimentaux choisis, seules les combinaisons des facteurs:

- (a) + (b) : chez PI 259747
- (a) + (c) : chez NC Ac 17090

semblent caractériser la résistance. Il s'agit là d'une tentative d'interprétation des phénomènes sur la base des informations dont nous disposons; celles-ci ne servaient que partielles pour plusieurs raisons:

a) la surface totale intégrée pour les différentes fractions a pour support l'enregistrement de la D.O. à 280 nm, longueur d'onde ne correspondant certainement pas au maximum d'extinction de toutes les substances éluées. Ainsi les dérivés d'acides gras (dont on verra plus loin qu'ils contribuent à la fongitoxicité des extraits) sont élués avec la fraction ' $\alpha$ ' mais ne sont pas décelés à la longueur d'onde utilisée. Ils échappent donc à notre analyse et à notre interprétation.

b) Les différents composés sont susceptibles d'agir de manière synergique de sorte que des variations de leur teneur relative dans les extraits peuvent entraîner des effets d'une amplitude très supérieure à celle des variations quantitatives des différents composés eux-mêmes.

Margré ces réserves, nous pensons que l'interprétation que nous proposons constitue une base de discussion et d'expérimentations futures.

## 2°) ANALYSE AU NIVEAU DES "PICS" COMPOSANT LA FRACTION ' $\alpha$ '

L'effet de l'infection et celui du génotype ne se manifestent pas de manière homogène sur l'ensemble des pics composant la fraction ' $\alpha$ '. Les tableaux 14 et 15 établis pour deux génotypes suggèrent, au contraire, que chez chaque génotype, trois types de situations existent pour les substances composant ces pics: accumulation, répression (ou modification de leur structure chimique) et absence d'effet; ces modifications peuvent intervenir à des étapes différentes de la pathogénèse.

Numéro du produit	Temps de retention en minutes	2 jours				5 jours				10 jours				15 jours			
		Local		NC Ac 17090		Local		NC Ac 17090		Local		NC Ac 17090		Local		NC Ac 17090	
		Témoin	Infecté	Témoin	Infecté	Témoin	Infecté	Témoin	Infecté	Témoin	Infecté	Témoin	Infecté	Témoin	Infecté	Témoin	Infecté
1	1,167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>143</b>	-	-
2	1,183	-	-	-	-	<b>67</b>	-	-	-	-	<b>98</b>	19	125*	-	-	139	-
3	1,291	689	717	392	212	266	614*	318	-	458	-	-	-	665	-	-	-
4	1,347	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>6261</b>
5	1,393	3567	3298	1997	2871*	2384	3678*	4009	5194*	3277	7934*	5695	5187	5000	10209*	4911	-
6	1,491	13843	5649	13428	13525	8377	8613*	12519	-	10240	16189*	22272	19665	20821	20228	14775	23882*
7	1,542	-	-	-	-	-	4390	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	1,607	-	<b>6418</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>5455</b>	-	-	<b>5160</b>	-	-	<b>16493</b>
9	1,662	-	-	<b>34129</b>	-	<b>7854</b>	-	10761	13177*	-	-	12574	-	-	<b>37843</b>	-	-
10	1,733	167116	38643	132595	173757*	51734	108912*	89523	71024	28808	180263*	92481	648946*	151259	227865*	381011	162768
11	1,925	-	-	<b>17800</b>	<b>17657</b>	<b>23474</b>	<b>17839</b>	22476	26560*	8587	25983*	26877	-	17869	26998*	946	25631*
12	2,217	49212	41553	32226	40199*	47300	48579	52348	62109*	24711	56933*	52683	44802	42447	68496*	16373	52506*
13	2,793	2112	1471	-	2141	-	-	180	390*	-	-	-	<b>5611</b>	-	-	-	-
14	3,128	982	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	206	<b>6295*</b>
15	3,322	396	1009*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>606</b>	-	-
16	4,662	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>9389</b>	-	-

Tableau 14: Evolution de la surface de chacun des pics de la fraction 'C' en fonction du temps (prélèvements à 2, 5, 10 et 15 j); en caractères Standard: Pic dont la surface n'est pas modifiée dans les extraits de plantes infectées (par rapport à celle du pic correspondant enregistré après analyse de l'extrait de feuilles saines). Caractères standard gras: surface d'un pic n'ayant pas d'équivalent chez le témoin; italique: Surface plus faible par rapport à celle du témoin; -: Absence du pic; Gras + italique: nouveau pic par comparaison avec le génotype

Jours après infection	Nom du Géotype	Variation par rapport témoin ou Local			
		Stimulation	Apparition - nouveau	Diminution	Absence
2 jours	Locale	un pic : 3,322	un pic : 1,607	Tous les pics, excepté : 1,291; 1,607 et 3,322	un pic : 3,128
	NC Ac 17090	trois pics : 1,393; 1,733; 2,217	deux pics : 1,925 et 2,793	un pic : 1,291	un pic : 1,662
5 jours	Locale	quatre pics : 1,291; 1,393; 1,491 et 1,733	un pic : 1,542	un pic : 1,925	deux pics : 1,183 et 1,662
	NC Ac 17090	cinq pics : 1,393; 1,662; 1,925; 2,217 et 2,793	-	un pic : 1,733	deux pics : 1,291 et 1,491
10 jours	Locale	cinq pics : 1,393; 1,491; 1,733 1,925 et 2,217	deux pics : 1,183 et 1,607	-	un pic : 1,291
	NC Ac 17090	deux pics : 1,183 et 1,733	un pic : 2,793	trois pics : 1,393; 1,491 et 2,217	deux pics : 1,662 et 1,925
15 jours	Locale	quatre pics : 1,393; 1,733; 1,925 et 2,217	quatre pics : 1,167; 1,662; 3,322 et 4,662	-	deux pics : 1,291 et 1,607
	NC Ac 17090	quatre pics : 1,491; 1,925; 2,217 et 3,128	trois pics : 1,347; 1,607; 3,128	un pic : 1,733	deux pics : 1,183; 1,393

Tableau 15: Evolution de la variation des pics de la fraction 'α' en fonction du temps (prélèvements à 2, 5, 10, 15 j après infection) en comparaison avec les plantes non-infectées ou avec les plantes du génotype Local.

Il est clair que l'étude individuelle des pics rend l'interprétation des phénomènes extrêmement complexe et délicate. Mais peut-être l'explication, au moins partielle, des différences de niveau de résistance génotypique pourrait-elle résider dans la variation quantitative de certains de ces pics, et donc dans celles de la biosynthèse des composés naturels qu'ils représentent. Il convient, à ce sujet de rappeler que les diagrammes d'élution sont enregistrés à 280nm, laissant dans l'ombre toutes les substances présentes dans l'extrait méthanolique mais n'absorbant pas à cette longueur d'onde.

Seule la multiplication des essais prenant en compte un nombre plus élevé de génotypes différant par leur niveau de résistance permettrait, de vérifier la reproductibilité des phénomènes et leur signification éventuelle au plan pathologique.

Une autre approche est cependant possible, qui consisterait à isoler les composés fongitoxiques, à identifier leur structure chimique et leur caractéristiques chromatographiques. Une telle caractérisation permettrait de préciser les conditions de leur élution et, ainsi, de les repérer sur les diagrammes (enregistrés à des longueurs d'ondes adéquates). Le suivi de leur évolution en fonction de la durée d'infection et la comparaison des réponses au niveau génotypique en serait facilitée.

Les résultats que l'on est en droit d'espérer d'une telle démarche conduiraient, en outre, à une vérification du rôle effectif joué par ces substances fongitoxiques dans la résistance génotypique et faciliterait le tri variétal précoce des croisements pour leur résistance ou leur tolérance à la rouille.

Une telle approche fera l'objet du chapitre III de notre mémoire.

## II - ETUDE CINETIQUE DE L'EVOLUTION DE LA TOXICITE *IN VITRO* DES EXTRAITS BRUTS

L'existence, dans les extraits bruts de feuilles d'Arachide, d'une activité fongitoxique, avait été mise en évidence grâce par le test de toxicité à l'égard de *Cladosporium* consistant à visualiser, après chromatographie sur plaque, l'emplacement des composés inhibant la sporulation de ce champignon. Le reproche que l'on peut émettre à l'encontre de cette procédure réside dans le fait que l'activité fongitoxique soit révélée à l'aide d'un champignon différent de l'agent pathogène étudié.

C'est pourquoi nous avons réalisé la présente étude en nous fondant sur le test d'inhibition de la germination des urédospores de *P. arachidis*. L'objectif est à la fois de suivre l'évolution de la fongitoxicité des extraits bruts en fonction du temps écoulé depuis l'inoculation et d'évaluer le niveau de cette toxicité selon les génotypes.

En pratique, la fongitoxicité des extraits bruts de quatre génotypes (Local, NC Ac 17090, RMP 91 et PI 259747) à différentes concentrations (0,62, 1,25 et 2,50 mg-équivalent de tissus frais/ml) a été évaluée sur des extraits de tissus prélevés 2, 5 et 10 jours après l'infection artificielle.

## 1. RESULTATS

Les résultats globaux obtenus sont exposés dans le tableau 16 et la figure 19 (qui reprend, sous une forme graphique, plus illustrative, une partie des données de tableau 16 b).

L'analyse de la figure 19 révèle un certain nombre de tendances. En effet, si l'on compare, génotype par génotype, le pourcentage d'inhibition des extraits de feuilles infectées à celui correspondant aux extraits de feuilles témoin, les évolutions suivantes sont notées:

### 1°) GENOTYPE LOCAL (SENSIBLE)

Deux jours après infection, la toxicité des extraits de feuilles infectées est inférieure à celle des extraits de feuilles saines. La toxicité relative des premières augmente ensuite pour être, 8 j plus tard, très supérieure à celle des témoins.

### 2°) GENOTYPE RMP 91 (SENSIBLE)

La réaction de ce génotype est différente de celle du précédent: l'infection semble stimuler légèrement l'accumulation de produits fongitoxiques en début d'infection, puis le niveau relatif de la toxicité diminue, pour remonter ensuite vers la fin du cycle infectieux.

	Gén./Trait.	Extrait brut à 0,62 mg/ml concentration		
		Jours après infection		
		2	5	10
a	Loc-T	0	32	11
	Loc-I	11	16	31
	RMP-T	16	46	69
	RMP-I	17	28	29
	PI-T	10	46	37
	PI-I	18	53	70
	NC-T	0	21	51
	NC-I	0	46	35

	Gén./Trait.	Extrait brut à 1,25 mg/ml concentration		
		Jours après infection		
		2	5	10
b	Loc-T	76	63	21
	Loc-I	67	65	55
	RMP-T	88	89	76
	RMP-I	91	75	84
	PI-T	81	97	47
	PI-I	91	99,9	91
	NC-T	76	92	81
	NC-I	92	95	87

	Gén./Trait.	Extrait brut à 2,50 mg/ml concentration		
		Jours après infection		
		2	5	10
c	Loc-T	92	74	58
	Loc-I	74	87	60
	RMP-T	100	91	96
	RMP-I	98	89	99,9
	PI-T	93	99,9	55
	PI-I	83	99,9	97
	NC-T	93	92	73
	NC-I	100	98	94

Tableau 16: Inhibition (%) in vitro de la germination des spores de *F. arachidis* en fonction du génotype (Gén.) de la plante, du temps d'infection (2, 5 et 10 j après infection) et de la concentration de l'extrait 0,62 (a), 1,25 (b) et 2,5 (c) équivalent mg de tissu/ml. L'estimation est faite sur 300 spores, au minimum, par motif (T: Sain; I: Infecté).

### 3°) GENOTYPES NC Ac 17090 ET PI 259747 (RESISTANTS)

On observe une similitude dans la réaction de ces deux génotypes. Pour les trois dates de comparaison (2, 5 et 10 j), la toxicité des extraits bruts des plantes inoculées est toujours supérieure à celles des plantes non inoculées, bien que la différence soit le plus souvent de faible amplitude.

De manière très générale, les génotypes résistants se distinguent des génotypes sensibles par une capacité à réagir positivement à l'infection en augmentant le taux de composés fongitoxiques, dès le premier stade de l'infection, tout en maintenant ce taux tout au long du cycle infectieux. Les génotypes sensibles, soit ne possèdent pas cette capacité à réagir rapidement (génotype Local) soit la perdent dans un second temps (RMP 91); une réaction tardive ne semble pas efficace.

Enfin tous les génotypes présentent des taux relativement élevés de composés fongitoxiques préformés. Ceci ne suffit pas à leur conférer le caractère de résistance. En outre cette observation pose à nouveau le problème de la légitimité de la désignation de ces composés sous le terme de "phytoalexine".

## 2. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

Une analyse de variance a été réalisée sur les pourcentages d'inhibition de la germination des spores de *P. arachidis*, prenant en compte trois variables: nature du génotype (A), concentration en extrait (B) et infection (C). Cette étude statistique porte sur les données enregistrées à chacune des dates de prélèvement (2, 5, et 10 jours après infection).

L'hypothèse à tester est qu'il existe, chez les génotypes d'Arachide résistants, une réaction à l'infection par *P. arachidis* qui aboutit à une réduction de l'activité du parasite, et qui peut être représentée par une réduction de la germination des spores.

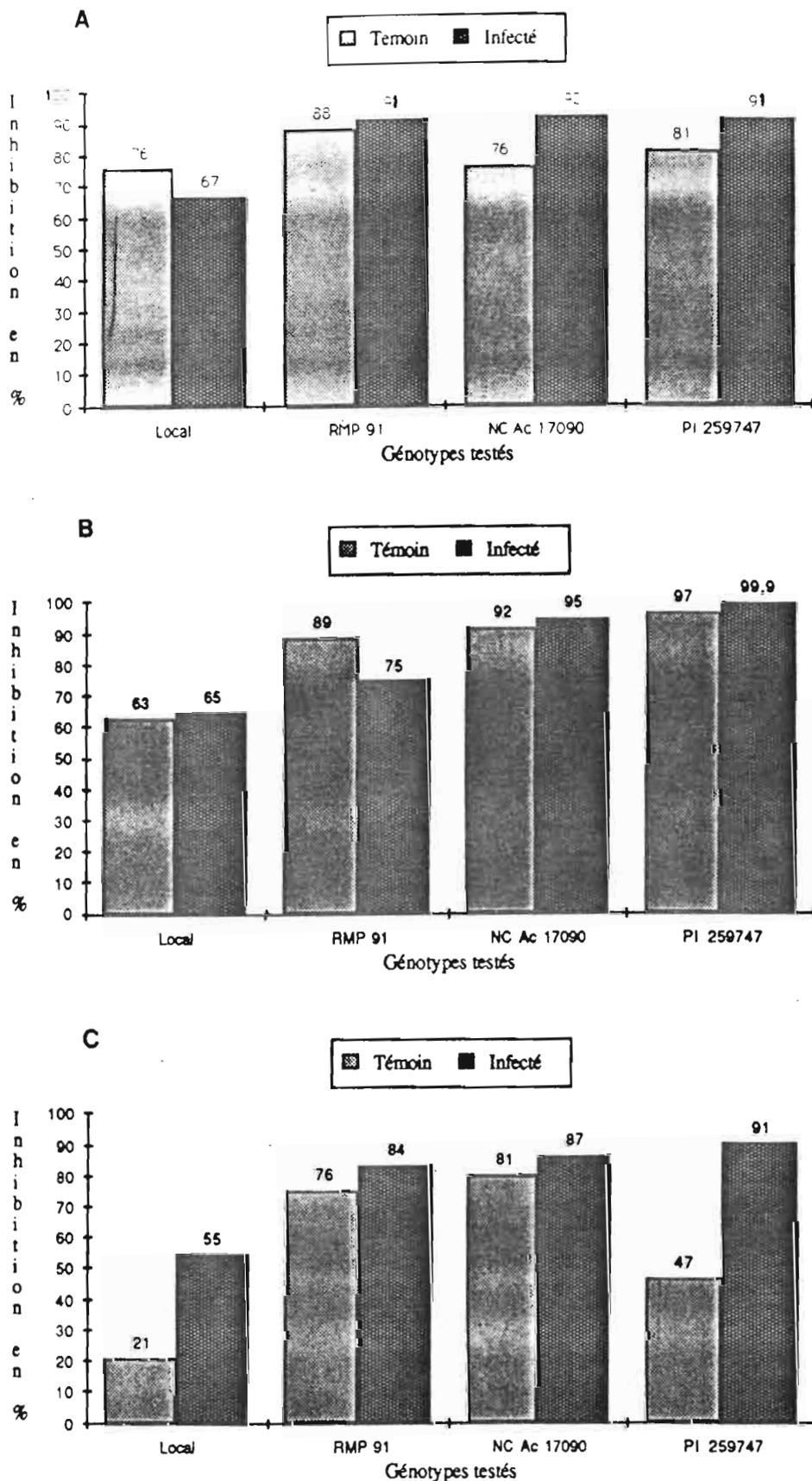


Figure 19: Représentation graphique de l'inhibition *in vitro* de la germination des spores de *P. arachidis* par des extraits bruts de quatre génotypes (Local et RMP 91: sensibles; NC Ac 17090 et PI 259747: résistants), à une concentration de 1,25 mg poids frais de matériel végétal/ml de milieu. Prélèvements d'extrait - A: 2j, B: 5j, C: 10j après infection artificielle.

Source de variation	degré de liberté	T = 2 j				T = 5 j				T = 10 j			
		SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P
A (Gén.)	3	1,361	0,454	6,2	<0,025	1,885	0,628	19,6	<0,001	3,997	1,332	16,4	<0,001
B (Conc.)	3	35,238	11,746	160,9	<0,001	15,885	5,295	165,5	<0,001	10,779	3,593	44,4	<0,001
C (Inoc.)	1	0,003	0,003	0,4		0,007	0,007	0,2		0,421	0,421	5,2	<0,025
A x B	9	1,086	0,12	1,6		0,546	0,061	1,91		0,688	0,076	0,9	
A x C	3	0,17	0,057	0,8		0,326	0,109	3,4	<0,10	1,064	0,355	4,4	<0,05
B x C	3	0,264	0,088	1,2		0,038	0,013	0,4		0,721	0,24	3	<0,10
A x B x C	9	0,656	0,073			0,288	0,032			0,726			
Totaux	31	38,778				18,975				18,396			

Tableau 17: Analyse de variance sur les pourcentages d'inhibition de la germination de spores de *P. arachidis*. \*: temps après infection; SCE: Somme de carrés des Ecart à la moyenne; CM: Carré moyen; F: Le 'F' de Fisher; P: Risque de 1er espèce; Gén: Génotype; Conc: Concentration des extraits; Inf: Infection artificielle.

Les résultats de cette analyse (tableau 17) établissent :

- à  $t = 2j$  : un effet significatif des génotypes (A) ( $p \leq 0,025$ ) et de la concentration de l'extrait (B) ( $p \leq 0,001$ ) sur l'inhibition de la germination (ou la non-germination) des spores.

- à  $t = 5j$  : un effet significatif des génotypes (A) ( $p \leq 0,001$ ), de la concentration de l'extrait (B) ( $p \leq 0,001$ ). En outre, il se dégage une tendance positive au niveau de l'interaction des génotypes (Gén. x Inf. (A x C :  $p \leq 0,10$ )).

- à  $t = 10j$  : les effets des génotypes (A) ( $p \leq 0,001$ ) et de la concentration de l'extrait (B) sont toujours hautement significatifs ( $p \leq 0,001$ ); l'effet de l'infection (C) devient également significatif ( $p \leq 0,025$ ), de même que l'interaction Génotype x Infection (A x C) ( $p \leq 0,05$ ). Enfin, l'interaction Concentration x Infection (B x C) ( $p \leq 0,10$ ) tend à devenir significative.

L'analyse statistique présente un double intérêt :

- le premier, d'ordre technique, concerne la démonstration de la validité des résultats; ceux-ci sont basés sur des données dont les différences sont réellement significatives.

- le second réside dans le fait que le degré de signification augmente en fonction du temps après infection artificielle.

Ceci signifie qu'il existe bien une accumulation, en fonction du temps, de composés fongitoxiques contribuant à rendre les génotypes PI 259747 et NC Ac 17090 résistants. Il y a donc stimulation, post infection, de la synthèse de composés toxiques qui, selon ce critère, peuvent être assimilés à des phytoalexines.

### III - DISCUSSION

Trois niveaux d'investigation ont été envisagés afin de déterminer l'effet génotypique, l'effet de l'infection et l'effet de la durée de l'infection sur l'accumulation d'un certain nombre de composés, dont des substances fongitoxiques, et tenter d'établir une corrélation entre accumulation de ces substances et résistance.

Les trois niveaux d'investigation sont les suivants:

- étude des substances, absorbant à 280 nm, extraites par le méthanol, sur la base des caractéristiques d'élution en CLHP sur colonne de silice.

- analyse particulière de la fraction 'A'.

- cinétique d'accumulation de substances fongitoxiques.

De manière très générale, les résultats suggèrent que des composés fongitoxiques interviennent bien dans le déroulement de

la pathogénèse, dans un sens tendant à réduire l'effet de l'infection. Considéré sous cet angle, on peut estimer que ces substances, qu'elles agissent individuellement ou de manière synergique (VERNENGI *et al.*, 1987), constituent des facteurs de résistance.

Chez tous les génotypes, ces substances fongitoxiques sont présentes dans les tissus non infectés; il s'agit donc de substances préformées. Cependant, au moins chez les génotypes résistants, il existe une stimulation de la biosynthèse de ces produits (peut-être également un éliciteur de la biosynthèse de substances nouvelles) ainsi qu'en témoigne l'augmentation relative de la fongitoxicité dans les feuilles infectées. La stimulation est appréciée globalement; des variations beaucoup plus importantes au niveau de chacune des substances contribuant à la toxicité (au moins six composés fongitoxiques ont été mis en évidence après séparation en CCM) sont donc susceptibles d'exister. De telles variations (y compris la biosynthèse de molécules nouvelles et la répression de celle de substances préformées) ont été clairement observée au cours de l'analyse des pics constituant la fraction 'α'.

Concernant les divers composés en tant que facteurs de résistance, il semblerait que leur taux initial joue un rôle moindre que la capacité des plantes à réagir rapidement par une accélération de leur biosynthèse. Enfin l'analyse, notamment de la fraction 'α', montre clairement que la résistance peut se développer selon différentes modalités d'un génotype à l'autre.

Ces résultats mettent en évidence tout l'intérêt à isoler et identifier les phytoalexines, première étape vers une meilleure compréhension des événements que nous venons de décrire.



## CHAPITRE III

### ISOLEMENT, PURIFICATION ET TENTATIVES

### D'IDENTIFICATION DE PHYTOALEXINES

Les résultats décrits dans les chapitres précédents ont révélés la nécessité d'approfondir les investigations, en particulier dans le domaine des phytoalexines. En effet, les recherches sur les supports de la résistance ainsi que celles concernant la réponse de l'Arachide à l'infection par *P. arachidis* indiquent que, au moins en apparence, les barrières mécaniques ne jouent pas de rôle prépondérant; celles-ci sont quasi inexistantes dans les tissus sains, quel que soit le génotype étudiée. Par ailleurs l'édification de telles barrières ne semble pas élicitée ou stimulée par l'attaque parasitaire; en tout état de cause les méthodes histo- et cytochimiques n'ont pas permis de les révéler.

Dans ces conditions il apparaissait vraisemblable que des barrières chimiques devaient intervenir pour ralentir voire stopper le déroulement de la pathogénèse, en particulier dans le cas des génotypes résistants. Les recherches menées dans ce domaine ont montré qu'il existe bien des modifications du taux de certaines substances notamment phénoliques, consécutives à l'infection. Les analyses en CLHP ont confirmé ces résultats et ont mis en évidence non seulement des variations quantitatives mais également qualitatives de certains composés ou groupes de composés.

Des résultats comparables ont été enregistrés pour les substances fongitoxiques synthétisées par les plantes. La présence de tels composés revêt un intérêt majeur dans la mesure où ils sont susceptibles de participer aux mécanismes de défense

de l'hôte. La connaissance de la modulation de leur biosynthèse sous l'effet de l'infection (KESSMANN et BARZ, 1986) constitue donc un objectif important. Pour atteindre cet objectif il était cependant nécessaire de bien identifier les phytoalexines impliquées. C'est pourquoi nous avons entrepris leur isolement à partir de tissus d'Arachide infectés par *P. arachidis*. Pour certaines d'entre elles la structure chimique a été établie.

*[Les résultats exposés dans ce chapitre sont le fruit d'une collaboration étroite entre différents laboratoires: Phytopathologie de l'ORSTOM d'Adiopodoumé, Côte d'Ivoire (Isolement et purification, test de fongitoxicité); Phytopathologie de l'ORSTOM, de Bondy (A. RAVISE et Madame VERNENGHI; compléments de purification); Médiateurs chimiques, Saint Rémy-lès-Chevreuse (J. EINHORN et C. MALOSSE; détermination des structures de la majorité des substances); Chimie organique structurale, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI (J.C. TABET; identification d'alkyl bis phényl éthers)]*

## I - MATERIEL VEGETAL, TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION

### 1. MATERIEL VEGETAL

Les composés fongitoxiques sont extraits de feuilles d'Arachide infectées naturellement au champ par *P. arachidis*. Théoriquement leur extraction peut être réalisée soit à l'aide de chloroforme ou d'une solution méthanolique. Cependant, seule la seconde technique a donné satisfaction et a donc été retenue. De novembre 1985 à février 1986, cinq récoltes de feuilles malades du génotype Local, provenant de cultures paysannes, ont été effectuées.

### 2. TECHNIQUES D'EXTRACTION

Les techniques d'extractions sont résumées dans la figure 20. Généralement 400 g de tissus frais sont broyés dans du

méthanol à 50 % à raison de 7,5 ml par g de matériel végétal frais. La diffusion des produits recherchés est réalisée à l'obscurité pendant 48 h à température ambiante (22°C).

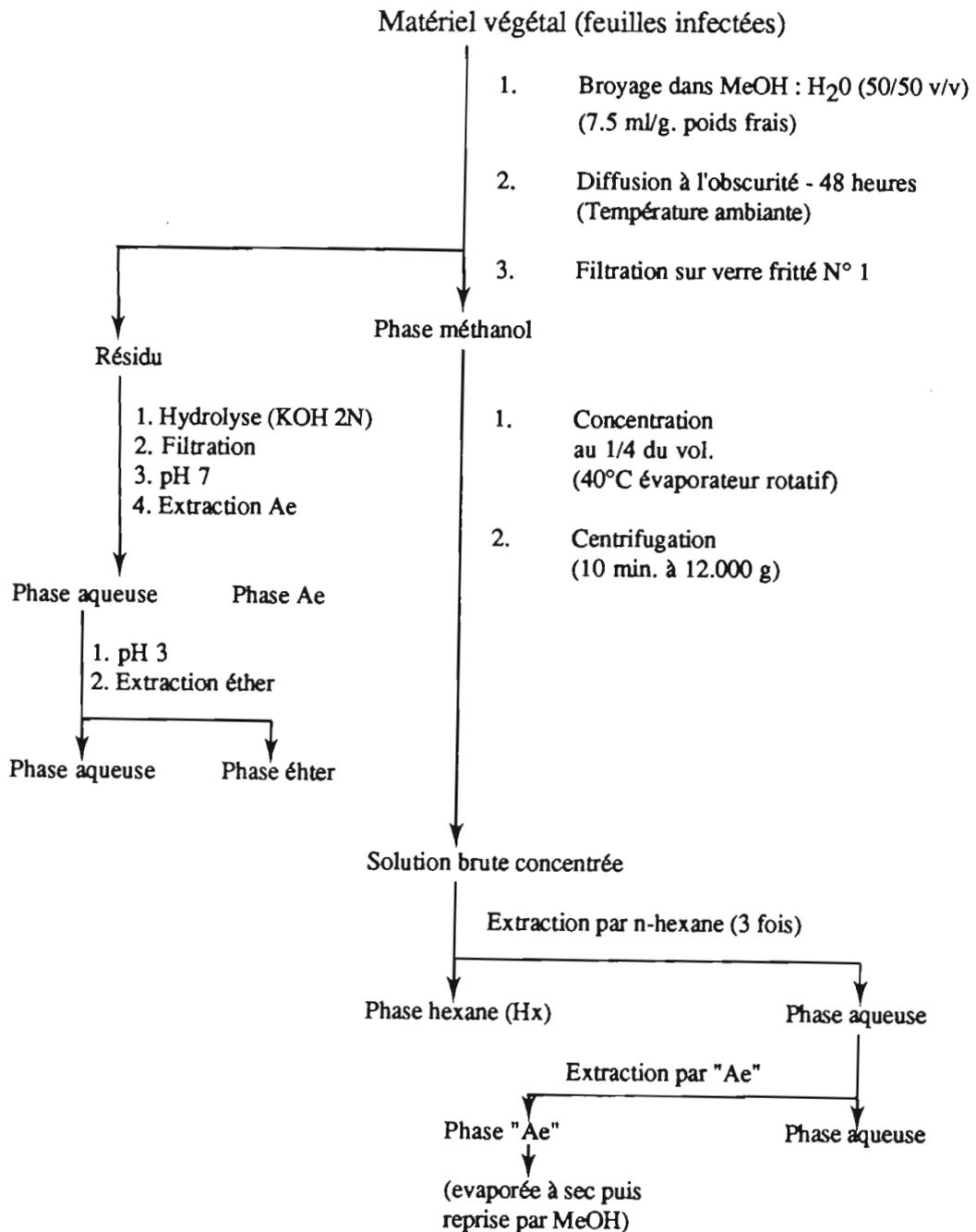


Figure 20: Schéma d'extraction des tissus d'*Arachis hypogaea*.

Après filtration sur verre fritté n°1 et concentration partielle pour évaporer le méthanol, les pigments et les particules sont éliminés de la phase aqueuse par centrifugation à 12.000 g pendant 10 minutes. Puis la phase aqueuse subit plusieurs extractions, d'abord par l'hexane ensuite par l'acétate d'éthyle. En fin de séquence, la phase acétate d'éthyle est évaporée à sec et reprise par du méthanol.

Par ailleurs, les broyats de tissus recueillis après filtration de l'extrait brut sont hydrolysés dans une solution de KOH 2N, sous atmosphère inerte. La phase insaponifiable est extraite de l'hydrolysate par de l'acétate d'éthyle, après filtration et ajustement du pH à 7. Cette phase aqueuse est ensuite acidifiée à pH 3 et réextraite par du diéthyl éther afin de séparer certains composés phénoliques et éventuellement les acides organiques contribuant à la fongitoxicité.

### 3. TECHNIQUES DE PURIFICATION

Les tests biologiques de toxicité en CCM révèlent la présence, dans chacune des fractions, de plusieurs composés fongitoxiques. C'est pourquoi, indépendamment de l'origine de la fraction, sont mis en oeuvre des procédés de concentration et de purification.

La chromatographie sur colonne atmosphérique de silice permet d'éliminer une partie des substances dépourvues d'activité biologique. Cependant, les phénomènes de co-entraînement - en grande partie liés aux fortes teneurs en lipides - provoquent l'élution dans plusieurs fractions successives des produits recherchés. Dans tous les cas, la répétition de la chromatographie sur colonne affine les séparations. Ainsi, la figure 21 illustre la séparation d'une phase acétate d'éthyle (évaporée à sec et reprise dans du méthanol) sur une colonne de 60 x 1,5 cm de silice éluée par un mélange Hx:Ae:MeOH (50/50/05) puis par du MeOH:H<sub>2</sub>O (90/10); la répartition des substances fongitoxiques dans différentes fractions de l'éluat est visualisée par leur toxicité à l'égard du *C. cladosporioides* après chromatographie sur couche mince de silice (figure 22).

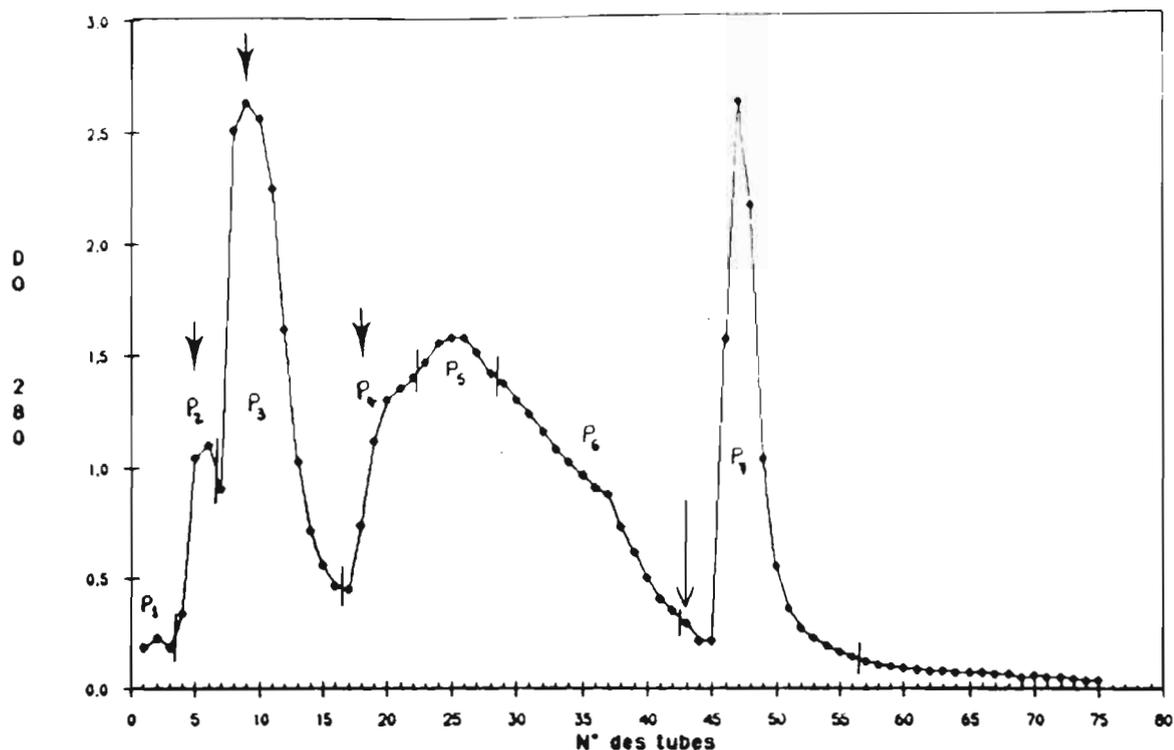


Figure 21: Purification d'un extrait (phase acétate d'éthyle, évaporée à sec et reprise par du méthanol) de feuilles d'Arachide (géotype Local) infectées au champ par *P. arachidis*, sur une colonne atmosphérique (silice; 60 x 1,5 cm). Elution par Hx:Ac:MeOH (50/50/05 v/v): fractions 1 à 43; MeOH:H<sub>2</sub>O (90/10 v/v): fractions 44 à 75. Les D.O sont mesurées à 280 nm. Les flèches indiquent les fractions présentant une activité fongitoxique.



Figure 22: Révélation après CCM des substances fongitoxiques par le test d'inhibition du *Cladosporium cladosporioides*. Les fractions testées sont celles éluées sur colonne (atmosphérique) selon les indications de la figure 21. Eluant: chloroforme:méthanol - 50/02 v/v.

La figure 23 illustre une autre séparation d'une phase acétate d'éthyle sur le même type de colonne, l'élué étant réalisée par le mélange Clf:MeOH 50/01 puis par le mélange Clf:MeOH 50/10 v/v. La figure 24 indique la répartition des substances toxiques dans les différentes fractions.

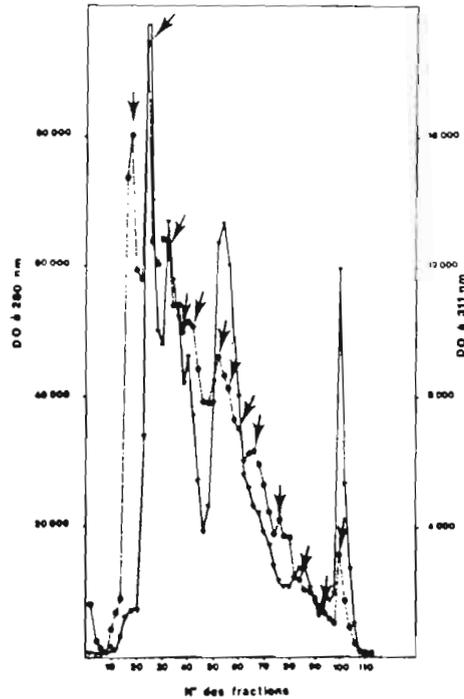


Figure 23: Purification de la phase acétate d'éthyle provenant d'un extrait de tissus de feuilles d'Arachide (génotype Local), sur une colonne atmosphérique de silice (60 x 1,5 cm; débit: 2,3 ml/min). Elution par Clf:MeOH - 50/01 (fractions 1 à 86) puis 50/10 (fractions 87 à 110). Les D.O sont mesurées à 280 et à 311 nm. Les flèches indiquent les fractions testées pour leur fongitoxicité (fig. 24).

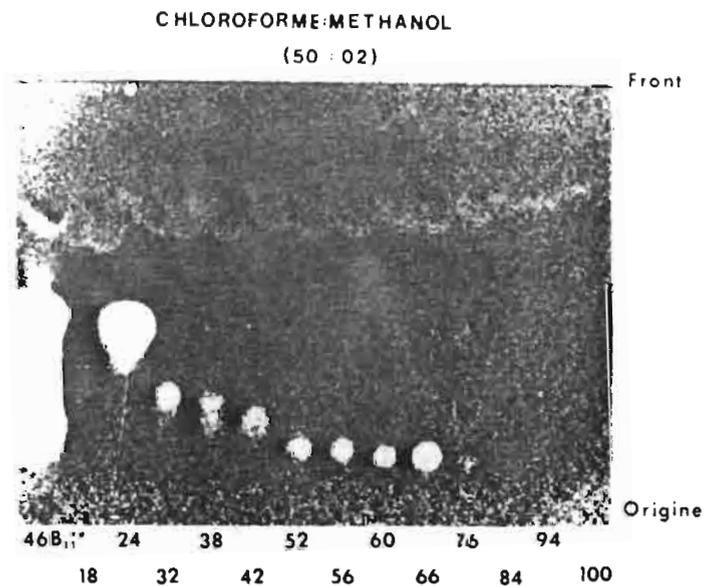


Figure 24: Révélation après CCM des substances fongitoxiques par le test d'inhibition du *Cladosporium cladosporioides*. Les fractions testées sont celles éluées sur colonne (atmosphérique) selon les indications de la fig. 23. Eluant: chloroforme:méthanol - 50/02 v/v.

Les substances de la phase hexane ont également été séparées par chromatographie sur colonne de silice dans des conditions similaires à la précédente. Les figures 25 et 26 illustrent les résultats d'une telle séparation.

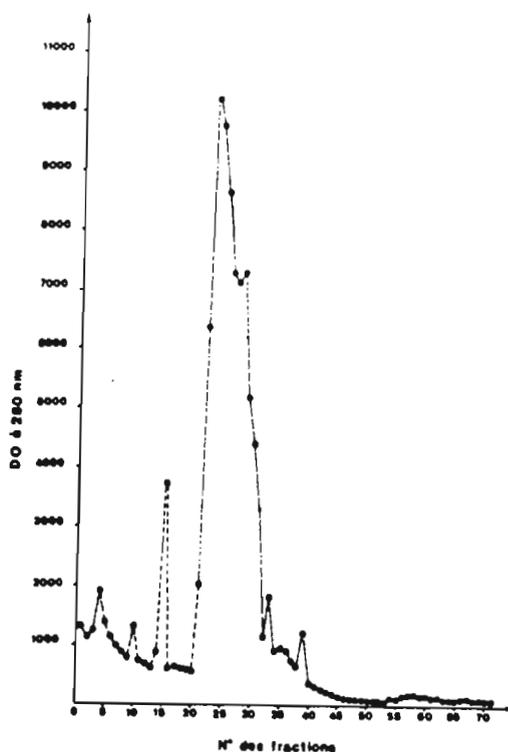


Figure 25: Purification de la phase hexane provenant d'un extrait de tissus de feuilles d'Arachide (géotype Local) sur une colonne atmosphérique (pour conditions d'élution voir fig. 23). Elution par Clf:MeOH - 50/01 (fractions 1 à 49) puis Clf:MeOH - 50/05 (fractions 50 à 71). Les D.O sont mesurées à 280nm. Les fractions testées pour leur fongitoxicité (fig. 26) sont les suivantes: P<sub>1</sub> (1-12); P<sub>2</sub> (13-15); P<sub>3</sub> (16-20); P<sub>4</sub> (21-24); P<sub>5</sub> (25); P<sub>6</sub> (26); P<sub>7</sub> (27-29); P<sub>8</sub> (30-31); P<sub>9</sub> (32-36); P<sub>10</sub> (37-41); P<sub>11</sub> (42-49); P<sub>12</sub> (50-71).

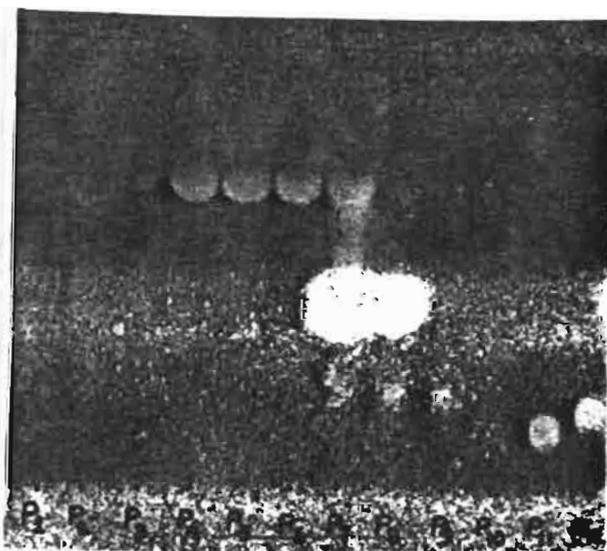


Figure 26: Révélation après CCM des substances fongitoxiques par le test d'inhibition du *Cladosporium cladosporioides*. Les fractions testées sont celles éluées sur colonne (atmosphérique) selon les indications de la fig. 25. Eluant: chloroforme:méthanol - 50/02 v/v.

A ce stade deux remarques s'imposent :

\* Le fractionnement sur colonne de silice atmosphérique est très imparfait; le plus souvent chaque fraction présentant une activité biologique regroupe plusieurs substances. Ainsi une étude détaillée de la composition des fractions P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub> séparées sur la colonne dont le spectre d'éluion est présenté dans la figure 21 révèle la présence de très nombreux composés fongitoxiques sur couche mince de silice (tableau 18).

\* La présence d'une substance toxique n'est pas nécessairement liée à une fraction présentant une densité optique élevée à 280 ou 311 nm, longueurs d'onde servant généralement à l'établissement du diagramme d'éluion des colonnes chromatographiques. Ceci est tout à fait logique dans la mesure où l'on sait que de nombreuses phytoalexines présentent un coefficient d'extinction de valeur négligeable ou nulle à ces longueurs d'onde. Ceci a pour corolaire la nécessité de tester toutes les fractions de l'éluat pour leur éventuelle fongitoxicité.

En pratique après un premier "criblage" des substances fongitoxiques par chromatographie sur colonne atmosphérique, permettant de traiter des quantités importantes de produits, la purification des composés contenus dans chaque fractions, est poursuivie par chromatographie liquide à haute performance sur colonne de silice éluee par des solvants organiques ou sur support de silice greffée en C<sub>18</sub> éluee par des solutions acétiques à 1% avec gradient de méthanol.

Fréquemment, l'utilisation successive des deux supports atténue partiellement les phénomènes de co-éluion des substances fongitoxiques avec d'autres substances naturelles le plus souvent de nature lipidique.

FRACTION	SYSTEME D'ELUTION											
	Clf. Me			Hx : Ae : Me		Hx : Me		Hx : Ae				
	50/2	50/1	50/05	50/50/5	80/50/4	50/2	50/1	70/30	55/45	40/60	25/75	10/90
P2	0.32- 0.38					0.00- 0.12	0.00- 0.11					
	0.38- 0.42					0.13- 0.24	0.12- 0.19	0.16- 0.27	0.19- 0.26	0.15- 0.20		
	0.42- 0.51	0.42- 0.51							0.30- 0.40	0.29- 0.37	0.30- 0.37	0.30- 0.38
	0.56- 0.61	0.52- 0.60							0.44- 0.52	0.39- 0.52	0.48- 0.61	0.48- 0.64
	0.70- 0.77		0.65- 0.76		0.76- 0.82							
			0.80- 0.89	0.80- 0.96	0.83- 0.98							
P3	0.01- 0.27	0.10- 0.15				0.00- 0.08	0.00- 0.07	0.00- 0.23	0.05- 0.13			
	0.28- 0.33	0.16- 0.31	0.14- 0.23			0.09- 0.17			0.14- 0.40	0.16- 0.23		
	0.34- 0.47	0.32- 0.41	0.24- 0.46									
	0.48- 0.50	0.44- 0.52	0.51- 0.59	0.49- 0.61	0.42- 0.50							
	0.56- 0.61			0.62- 0.92	0.51- 0.59							
	0.70- 0.77				0.60- 0.68							
					0.69- 0.88							
					0.89- 0.94							
P4	0.06- 0.50			0.52- 0.68								

Tableau 18: Exemple de répartition des substances fongitoxiques dans un extrait (phase acétate d'éthyle) de feuilles d'Arachide infecté au champ (génotype Local). Les fractions P2, P3 et P4 correspondent aux fractions rassemblées après chromatographie sur colonne atmosphérique de silice selon les indications de la figure 21.

## II - ISOLEMENT DE DERIVES D'ACIDES GRAS INSATURES EN C<sub>18</sub>

Bien que la plupart des études récentes sur les facteurs de résistance de l'Arachide à des infections cryptogamiques (KEEN et INGHAM, 1976, INGHAM, 1976; AUGUAMAH *et al.*, 1981; STRANGE *et al.*, 1985) concernent des composés phénoliques, il est apparu au cours de nos recherches que d'autres produits contribuent aux mécanismes de défense. En particulier, des substances apolaires extraites par l'hexane ou par l'acétate d'éthyle, révélées par

les tests de toxicité pour le *C. cladosporioides*, inhibent *in vitro* la germination des spores du *P. arachidis*.

La figure 21 (voir plus haut) correspond à une chromatographie sur colonne de silice d'un extrait de tissus infectés, repris par l'actétate d'éthyle. Les substances correspondant aux acides gras insaturés en  $C_{18}$  et à leurs dérivés sont éluées dans la fraction  $P_2$  avec le mélange hexane:acétate d'éthyle:méthanol (50/50/5) pour éluant.

### 1. ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS INSATURES EN $C_{18}$

Leur purification partielle est obtenue, à partir de la fraction  $P_2$ , en CLHP à l'échelon préparatif sur colonne de silice (3/8' x 30 cm) avec pour éluant un mélange hexane-acétate d'éthyle (65:35). Deux fractions principales ont été séparées (notées  $P_{2A}$  et  $P_{2B}$ ) contenant des composés fongitoxiques (figure 27). A l'issue des étapes complémentaires de purification et d'analyse il s'est avéré que deux esters méthyliques, le linoléate de méthyle et le linolénate de méthyle, étaient présents dans la seconde fraction ( $P_{2B}$ ). Cependant, à ce stade la contamination était encore importante. Une nette amélioration de la purification est obtenue en chromatographiant cette fraction en CLHP sur colonne du silice greffée en  $C_{18}$  (figure 28). A ce stade, la concentration en esters méthyliques des deux acides gras s'est avérée suffisante pour permettre une analyse structurale en spectrométrie de masse.

La teneur en linoléate de méthyle, d'après l'analyse en chromatographie en phase gazeuse, est environ double de celle en linolénate de méthyle qui s'avère seul toxique *in vitro* pour le *P. arachidis*.

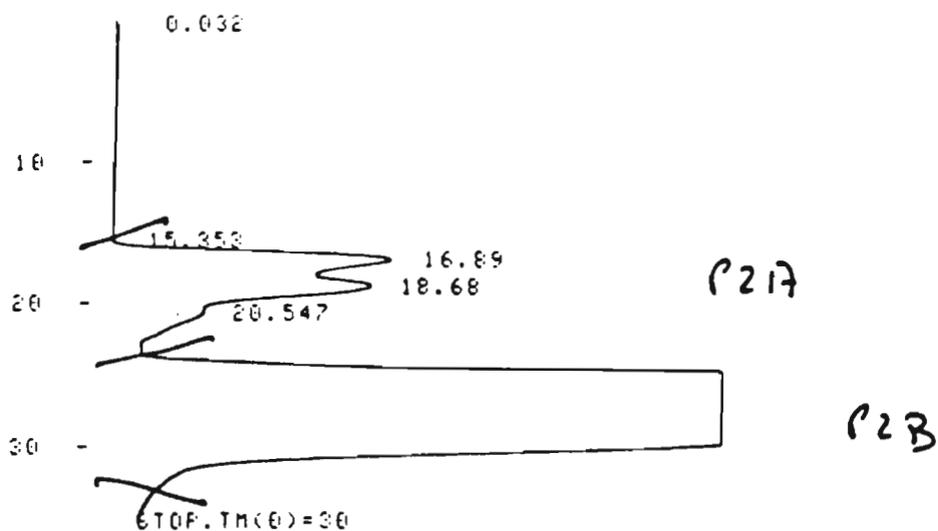


Figure 27: Chromatographie en CLHP de la fraction P<sub>2</sub> (cf. fig. 21) sur une colonne de silice (3/8' x 30 cm) - 5 $\mu$ , dans le mélange Hx:Ac (65/35 v/v). Détection UV à 280 nm; Débit: 2 ml/min. Les substances toxiques se trouvent essentiellement dans deux fractions appelées P<sub>2A</sub> et P<sub>2B</sub>.

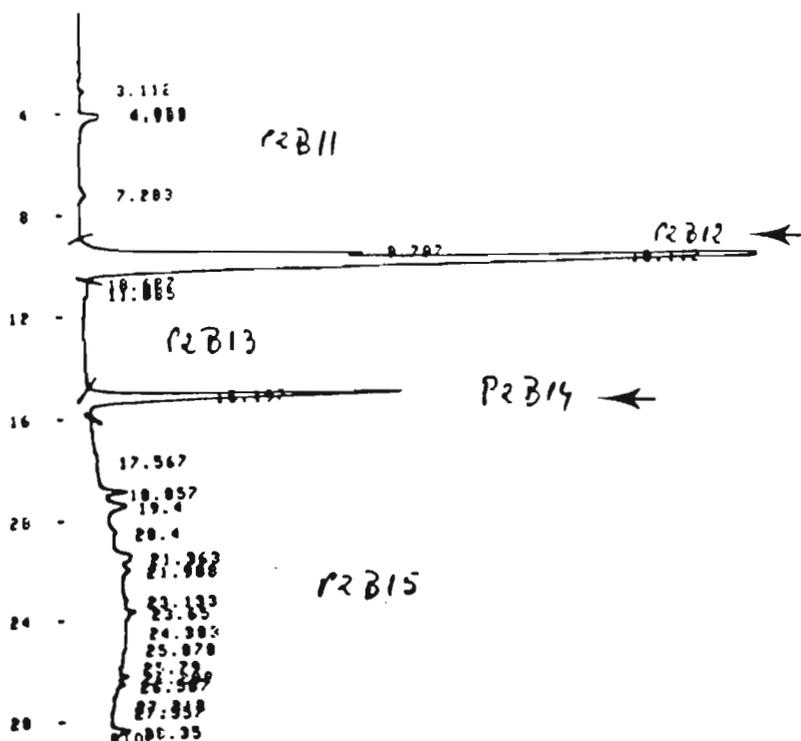


Figure 28: Purification en CLHP de la fraction (P<sub>2B</sub>, contenant des substances fongitoxiques, cf. figure 27) sur une colonne de silice greffée en C<sub>18</sub> (5 $\mu$ ; 3/8' x 30 cm) dans le mélange H<sub>2</sub>O:MEOH (50/50 v/v) avec 1% acide acétique, suivie par un gradient de méthanol 50% à 99% établi en 20 min. Deux fractions fongitoxiques (indiquées par les flèches) sont éluées respectivement à 75% de méthanol (pic ayant un temps de rétention de 10,1 min.) et à 87,5% de méthanol (pic ayant un temps de rétention de 16,2 min.).

## CARACTERISATION

### 1°) CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE

Les caractéristiques du linoléate de méthyle en CCM sont:  $R_f = 0,90$  dans le système Hx:Ae:MeOH (50/50/05; v/v) et  $R_f = 0,44$  dans le système Clf:MeOH (50/02; v/v); le spot se colore en brun avec le réactif au  $SbCl_3$  et en jaune avec le réactif à la paranitroaniline.

### 2°) SPECTRE UV

Ce produit ne présente pas de fluorescence sous éclaircissement UV à 254 et 350 nm. Le spectre UV dans le méthanol indique deux pics d'absorption à 230 et à 286 nm, tandis que le spectre différentiel ne révèle qu'un seul pic d'absorption à 285 nm.

### 3°) SPECTROMETRIE DE MASSE

Le linoléate de méthyle a été d'abord identifié au spectromètre de masse par le mode d'impact d'électrons:  $M^+$  292;  $m/z$  261, 236, 108, 93, 79, 74, 67, 59, 55 (figure 29).

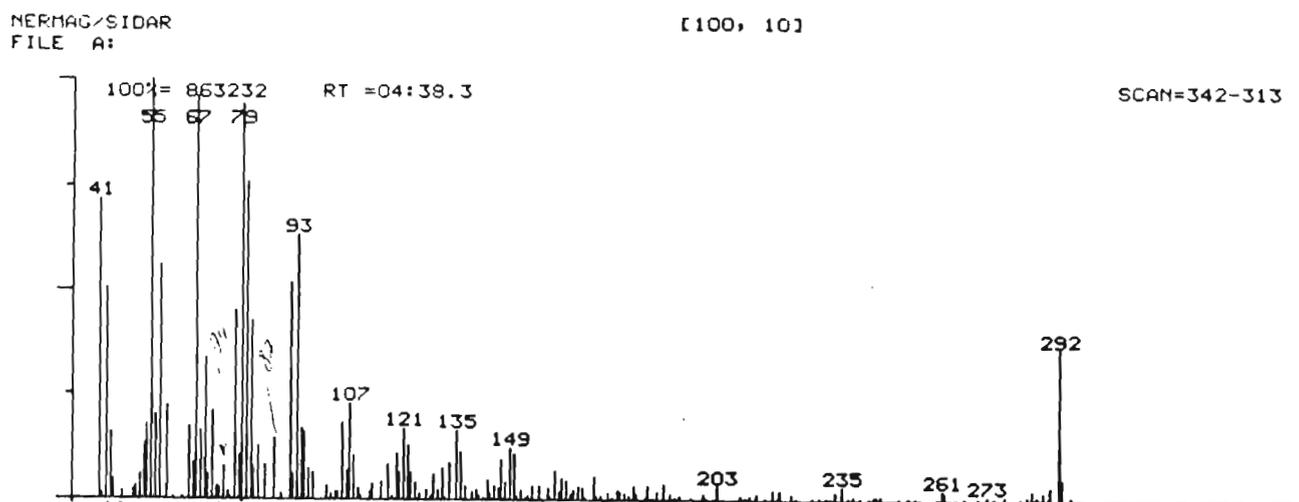


Figure 29: Spectre de masse du linoléate de méthyle établi en impact électronique (70 eV).

Le poids moléculaire et la position du système homoconjugué insaturé ont été confirmés en utilisant les conditions CI-NO (BRAUNER et al., 1982): les ions diagnostiqués sont à  $m/z$  322 ou  $\{M + NO\}^+$ , 236, 108. Le temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse est identique à celui du produit de synthèse (Sigma, USA). La structure chimique de ce produit est présentée dans la figure 30.



Figure 30: Structure du linoléate de méthyle.

#### 4°) TESTS BIOLOGIQUES

Les tests d'inhibition de la germination de spores de *P. arachidis* par le produit de synthèse indiquent que sa capacité d'inhibition varie entre 32% pour une concentration de  $25\mu\text{l/ml}$  et plus de 90% pour  $300\mu\text{g/ml}$  (tableau 19), ce qui suggère une forte activité fongitoxique du linoléate de méthyle (SUBBA RAO et al., 1987 a).

Concentration en linoléate de méthyle ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition de la germination des urédospores (%)
25	32
50	64
100	78
200	85
300	91

Tableau 19: Inhibition *in vitro* de la germination des urédospores de *P. arachidis* en fonction de concentrations croissantes en linoléate de méthyle.

## 2. DERIVES OXYGENES D'ACIDES GRAS INSATURES EN C<sub>18</sub>

Il s'agit essentiellement de l'hydroxy-9 octadécadien-10,12 oate de méthyle dont les analyses en spectrométrie de masse indiquent la présence de plusieurs isomères. Dans les échantillons analysés, il s'accumule en moindres quantités de l'hydroxy-13 octadécadien-9,11 oate de méthyle.

Avec le couplage CG-SM sur colonne capillaire chargée en phase polaire CP Wax, les diénols sont élués à 220°C. Les spectres de masse établis en impact électronique indiquent une masse  $M^+ = 310$ . Les principaux ions caractéristiques sont  $m/z$  298 (M-18), 185,155,153,97,95,83,81,79,69,67,55. Les isomères de l'hydroxy-9 octadécadien-10,12 oate de méthyle sont caractérisés par  $M^+ = 310$ ,  $m/z$  292,185,153,125,97,83. Les ions caractéristiques de l'hydroxy-13 octadécadien-9,11 oate de méthyle correspondent à  $m/z$  292,155,99.

La figure 31 représente la structure de ces diénols.

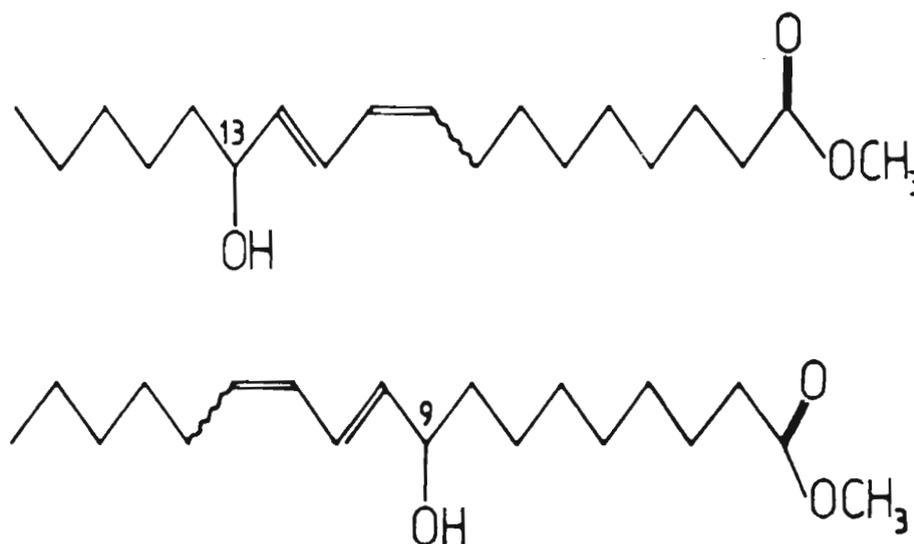


Figure 31: Représentation schématique de diénols extraits de feuilles d'Arachide infectées. L'hydroxy-9 octadécadien-10, 12 oate de méthyle semble prédominant dans les extraits.

Les résultats de ces recherches en impact électronique sont confortés par ceux obtenus antérieurement lors de la détermination de diénols chez la tomate (VERNENGI, 1985; VERNENGI et al., 1985, 1986) puis chez le palmier à huile

(VERNENGGHI et al., 1987). Ces travaux s'appuient également sur les synthèses sélectives de différents isomères de diénols et leur étude spectrométrique en CG-SM et en RMN (DUFFAULT, 1987). Ces systèmes sont maintenant bien connus grâce à l'élaboration de méthodologies spécifiques mises au point par EINHORN et al., (1987 a, b). Avec ces produits de référence, des spectres sont également réalisés en ionisation chimique (IC) soit par l'ammoniac soit par le monoxyde d'azote. Les résultats des analyses des produits naturels et des diénols (13-OH E,Z) de synthèse (DUFFAULT, 1987) sont analogues. En particulier lors de l'IC/NO se distinguent les ions  $(M + NO)^+ = 340$ ,  $M^+ = 310$ ,  $m/z$  308 (M-2), 298 (M-18), 185, 155. La formation de l'ion  $(M-2)^+$  est liée à la présence d'un alcool dont la réactivité avec le monoxyde d'azote est connue pour donner des produits d'oxydation. En IC/NH<sub>3</sub> les ions caractéristiques correspondent à  $M + 18 = 328$ ,  $M^+ = 310$ ,  $M + 1 = 311$  ;  $m/z$  293.

La figure 32 indique les spectres de masse d'isomères de diénols obtenus par synthèse établis en impact électronique (RAVISE, 1987; DUFFAULT, 1987).

Précédemment, des diénols de synthèse, et ceux extraits de tomate puis du palmier à huile, avaient subi des hydrogénations catalytiques - avec de l'oxyde de platine dans le méthanol ou avec du charbon palladié - et ont été transformés en triènes par traitement au chlorure d'acétyle (VERNENGGHI, 1985).

## 1°) CARACTERISTIQUES CHROMATOGRAPHIQUES EN CCM

Dans le système Hx:Ae:MeOH (50/50/5) les diénols migrant à  $R_f: 0,87-0,90$  correspondent à des isomères. Ces isomères se distinguent en formant également deux bandes dans des éluants à base d'hexane et d'acétate d'éthyle:

- Hx:Ae (5/1)  $R_f: 0,48 - 0,52$
- Hx:Ae (2/1)  $R_f: 0,65 - 0,67$

Les diénols sont colorés en bistre foncé par le trichlorure d'antimoine à saturation dans le chloroforme après chauffage à 110°C pendant 20 min.

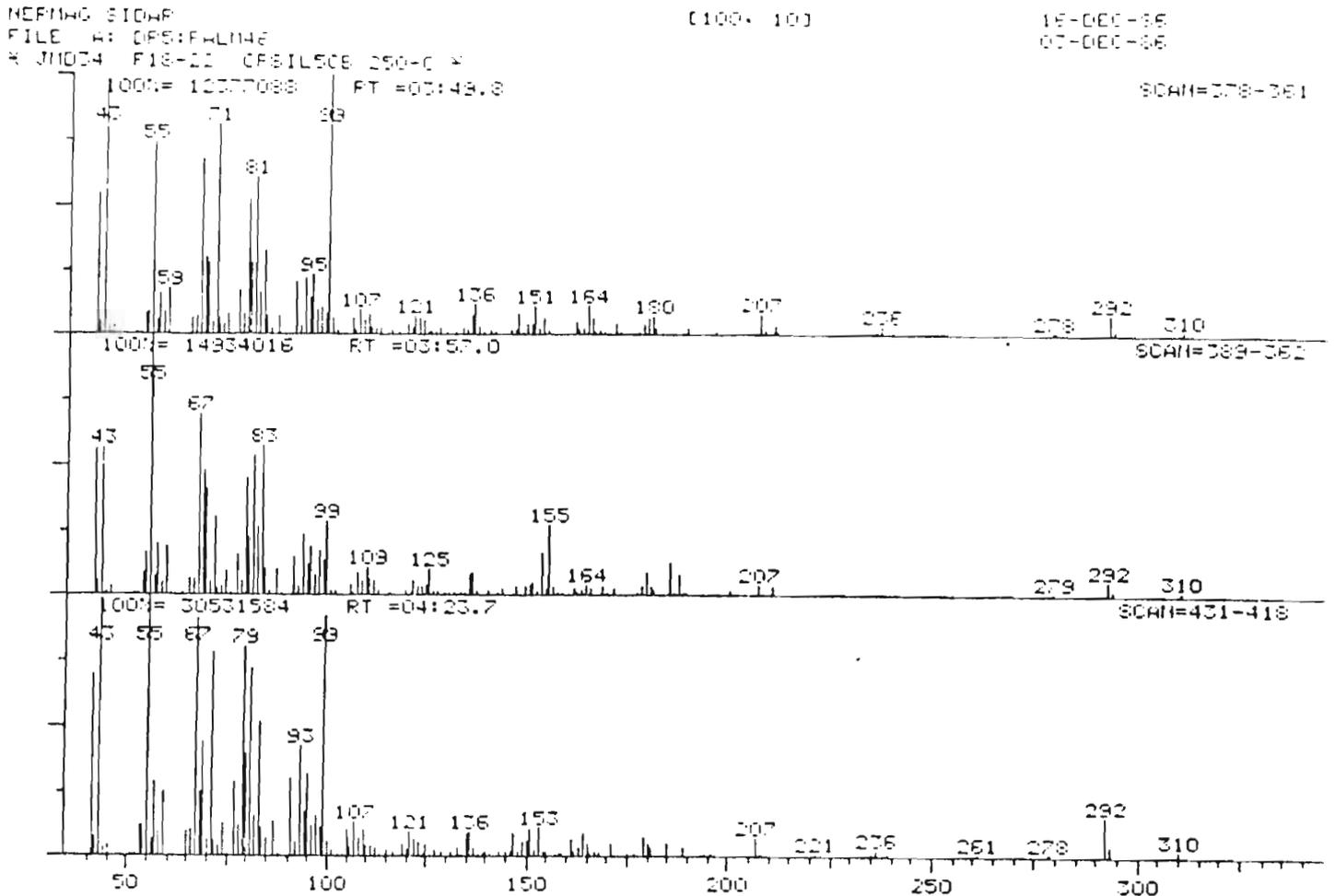


Figure 32: Spectres de masse, en impact électronique (70 eV) de diénols de synthèse (scan 378-361: hydroxy-13 octadécadien 9Z, 11E oate de méthyle; scan 389-362: hydroxy-9 octadécadien 10E, 12Z oate de méthyle; Scan 431-418: hydroxy-13 octadécadien 9E, 11Z de méthyle).

## 2°) FONGITOXICITE DE DIENOLS DE SYNTHESE POUR LE *P. ARACHIDIS*

D'après les tests de toxicité réalisés au laboratoire (tableau 20), ce composé inhibe très fortement la germination des spores. Son effet inhibiteur est également très net sur la croissance du tube germinatif (des spores ayant réussies à germer); à la concentration correspondant à 2,0 µg/ml il provoque une inhibition d'environ 50% de cette croissance, alors qu'à

cette même concentration son effet est nul sur la germination des spores. L'inhibition de la germination des spores est totale pour une concentration de 10 µg/ml.

Concentration en diénol (en µg/ml)	Inhibition de la germination(%)	Longueur moyenne du tube germinatif (mm)
Témoin	0	0,21
0,5	3	0,18
1,0	4	0,19
2,0	0	0,11
5,0	74	0,03
10,0	100	0,00

Tableau 20: Effet du diénol de synthèse (hydroxy-13 octadécadien-9, 11 oate de méthyle) sur le taux de germination des spores et sur la croissance du tube germinatif des urédospores de *P. arachidis* après 3 heures d'incubation à l'obscurité (moyenne pour 300 spores et 100 tubes germinatifs). Note: Les concentrations sont surestimées, le composé ne s'étant pas entièrement dissous dans le volume de méthanol utilisé comme solvant.

Les recherches réalisées par VERNENGHI et RAVISE (1987, comm. pers.) tendent à indiquer que les différents isomères géométriques de l'hydroxy-9 octadécadien-10,12 oate de méthyle et de l'hydroxy-13 octadécadien-9,11 oate de méthyle manifestent la même toxicité pour différents micromycètes *in vitro*. A noter que en tant qu'agents fongitoxiques ces substances sont au minimum 20 fois plus efficaces que le linoléate de méthyle.

### III - CARACTERISATION D'UNE SUBSTANCE FONGITOXIQUE DE STRUCTURE ALIPHATIQUE

Ce produit est extrait de la phase hexane à partir de tissus de feuilles infectées avec *P. arachidis*. Il s'agit du triester butylique de l'acide propane-1,2,3(2 acétyl oxy)tricarboxylique.

- En CCM ses caractères chromatographiques sont les suivantes:
- système hexane:acétate d'éthyle (3/1) Rf: 0,45,
  - système hexane:acétate d'éthyle:méthanol (60/40/01) Rf: 0,75.

Il est coloré en bistre par le trichlorure d'antimoine à chaud.

En CLHP sur colonne de silice (3/8' x 30 cm) il est élué dans la fraction hexane:acétate d'éthyle (100/20) avec un temps de rétention de 16 min.

La spectrométrie de masse en impact électronique indique un ion moléculaire à  $M^+ = 402$ . La masse moléculaire a été confirmée dans le mode IC-NH<sub>3</sub> où les ions  $M+H^+$  et  $M+NH_4^+$  sont observés respectivement aux valeurs m/z de 403 et de 420.

En impact électronique, les ions principaux correspondent à m/z 329, 301, 273, 259, 217, 213, **185**, 157, 139, 129, 102. L'ion m/z 259 correspond à  $[M-(CH_2COOR_1)-COO]$ . Le spectre de masse établi en impact électronique (figure 33) est identique à celui décrit dans la littérature pour le triester butylique de l'acide propane-1,2,3 (2 acétyloxy)tricarboxylique:



où :  $R_1 = C_4H_9$  et  $R_2 = COCH_3$

NERMAG/SIDAR  
 FILE A: ARACH54  
 \* 2E 0,6MG 23-9-87 CPSIL5CB 240XC \*  
 LIBRARY: UL:BIGLIB

[100, 10]

23-SEP-87  
 23-SEP-87

2

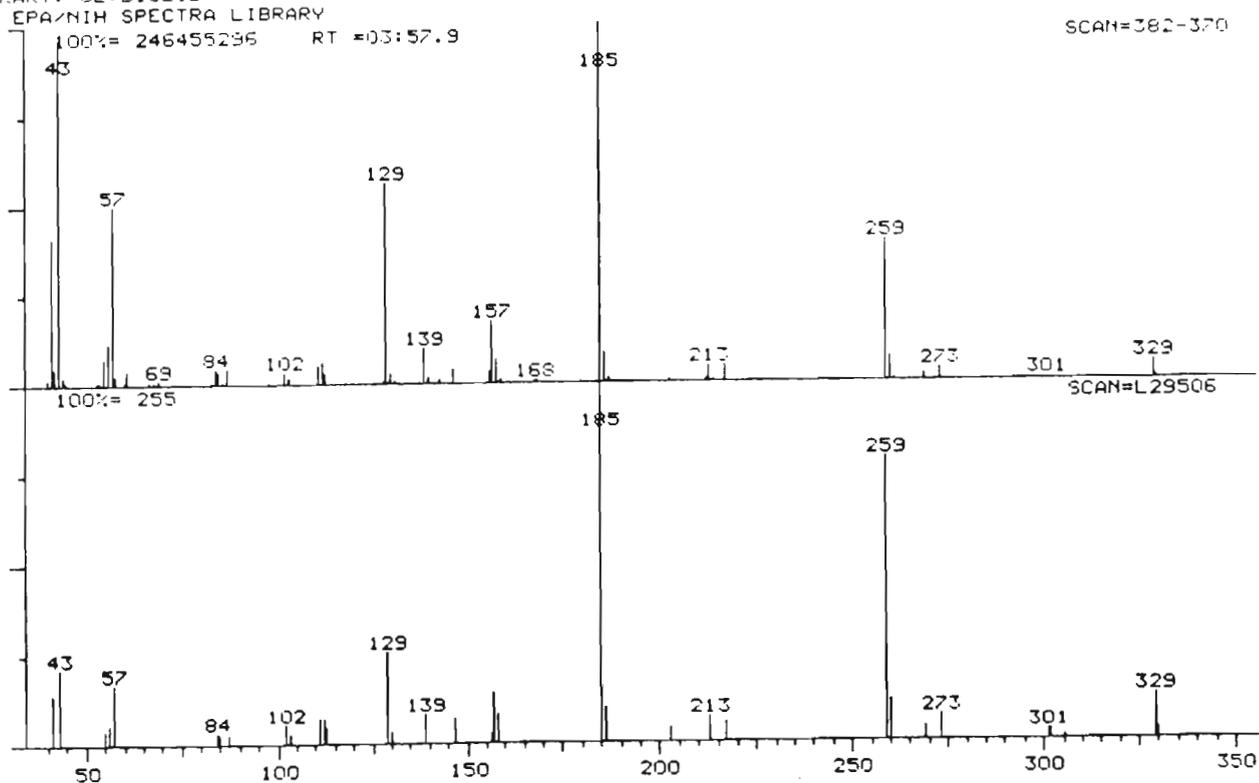


Figure 33: Comparaison entre le spectre de masse (en impact électronique) du triester butylique de l'acide propane - 1, 2, 3 (2 acétyloxy) tricarboxylique (scan: 382-370) et celui du produit de référence (scan: L 29506).

Des produits naturels très proches, correspondant à l'acide tricarballylique ou à son sel de sodium, sont connus chez l'Erable et chez la Betterave à sucre à l'état constitutif.

### TEST DE FONGITOXICITE

Le produit purifié en CG préparative au laboratoire des médiateurs chimiques par C. MALOSSE n'a pas pu être éprouvé à l'égard du *P. arachidis*. En revanche des tests de toxicité *in*

*vitro*, en lames à concavité ont été réalisés pour une souche de *Phytophthora parasitica*. Pour une concentration de quelques dizaines de µg/ml ce produit inhibe, en 24 heures, la croissance de la quasi totalité des hyphes; les filaments survivant ont une croissance environ 10 fois plus réduite que celle du témoin et subissent ultérieurement une lyse cytoplasmique.

#### IV - IDENTIFICATION DE PHYTOALEXINES DE NATURE PHENOLIQUE

##### 1. HYDROXYSTILBENES

Ces substances sont citées par INGHAM (1976), KEEN et INGHAM (1976), AGUAMAH et al. (1981) comme étant des phytoalexines produites par l'Arachide atteinte de cercosporiose.

Dans les expériences réalisées avec *P. arachidis*, ces substances ne semblent pas s'accumuler à d'aussi fortes concentrations que celles mentionnées par les auteurs ci-dessus.

Le 3,5,4' trihydroxy-4 isopentényl stilbène est décelé en quantités non dosables dans les extraits à l'acétate d'éthyle de feuilles infectées.

Les caractéristiques chromatographiques en CCM - Rf de 0,47 dans le mélange hexane:acétate d'éthyle:méthanol (60/40/01) - concordent avec les données bibliographiques. Le produit fluoresce en bleu sous lumière ultraviolette (254 nm); il est coloré en jaune par le réactif à la p. nitroaniline. Le spectre UV établi dans le méthanol présente 2 pics, respectivement, à 290 et 330 nm, et des épaulements à 245, 310 et 340 nm.

## 2. MEDICARPINE

Ce ptérocarpane est décrit par STRANGE et al. (1985) qui l'ont décelé dans les feuilles d'Arachide infectées par *Cercospora arachidicola* et par *Phoma arachidicola*. Dans nos essais, il est décelé à l'état de traces.

En CCM, il migre à Rf:0,55 dans le système chloroforme-méthanol (100/02) et vire au jaune après traitement à la p. nitroaniline. En spectrométrie dans l'ultra-violet, avec le méthanol comme solvant, le pic principal se situe à 287 nm, des épaulements sont observés à 228, 282 et 293 nm; ces données sont conformes à celles de la littérature (BAILEY et MANSFIELD, 1982).

## 3. NONYL PHENOLS

Actuellement, trois isomères de masse  $M^+ = 220$  sont identifiés, ils se distinguent par leur pic de base et leurs fragmentations en spectrométrie de masse.

Les nonyl-phénols sont extraits des tissus infectés par les phases hexane et acétate d'éthyle. Les caractéristiques chromatographiques sont :

### En CCM

- Rf 0,85 dans le système hexane:acétate d'éthyle:méthanol (60/40/1),

- Rf 0,63 dans le système hexane-acétate d'éthyle (3/1).

Le traitement par le trichlorure d'antimoine donne une coloration brunâtre après chauffage à 120°C. Le test phosphomolybdique donne une coloration bleue après un bref chauffage.

En CLHP, sur colonne de silice (3/8' x 30 cm) éluée par le mélange Hexane:acétate d'éthyle (95/5) à 1 ml/mn, le temps de rétention est de 18 min.

Les spectres de masse établis en impact électronique sont caractérisés par un pic de masse  $M^+ = 220$ . La formule brute

correspond à  $C_{15}H_{24}O$ . Selon les isomères, l'ion majoritaire correspond à  $m/z = 135$  (figure 34) ou à  $m/z = 121$  résultant de la perte d'un radical alkyl  $-(CH_2)_nCH_3-$  à partir de l'ion moléculaire. Les ions caractéristiques sont principalement  $m/z$  191 ( $M-C_2H_5$ ), 149 ( $M-C_5H_{11}$ ), 135 ( $M-C_6H_{13}$ ), 121 ( $M-C_7H_{15}$ ), 107 ( $M-C_8H_{17}$ ).

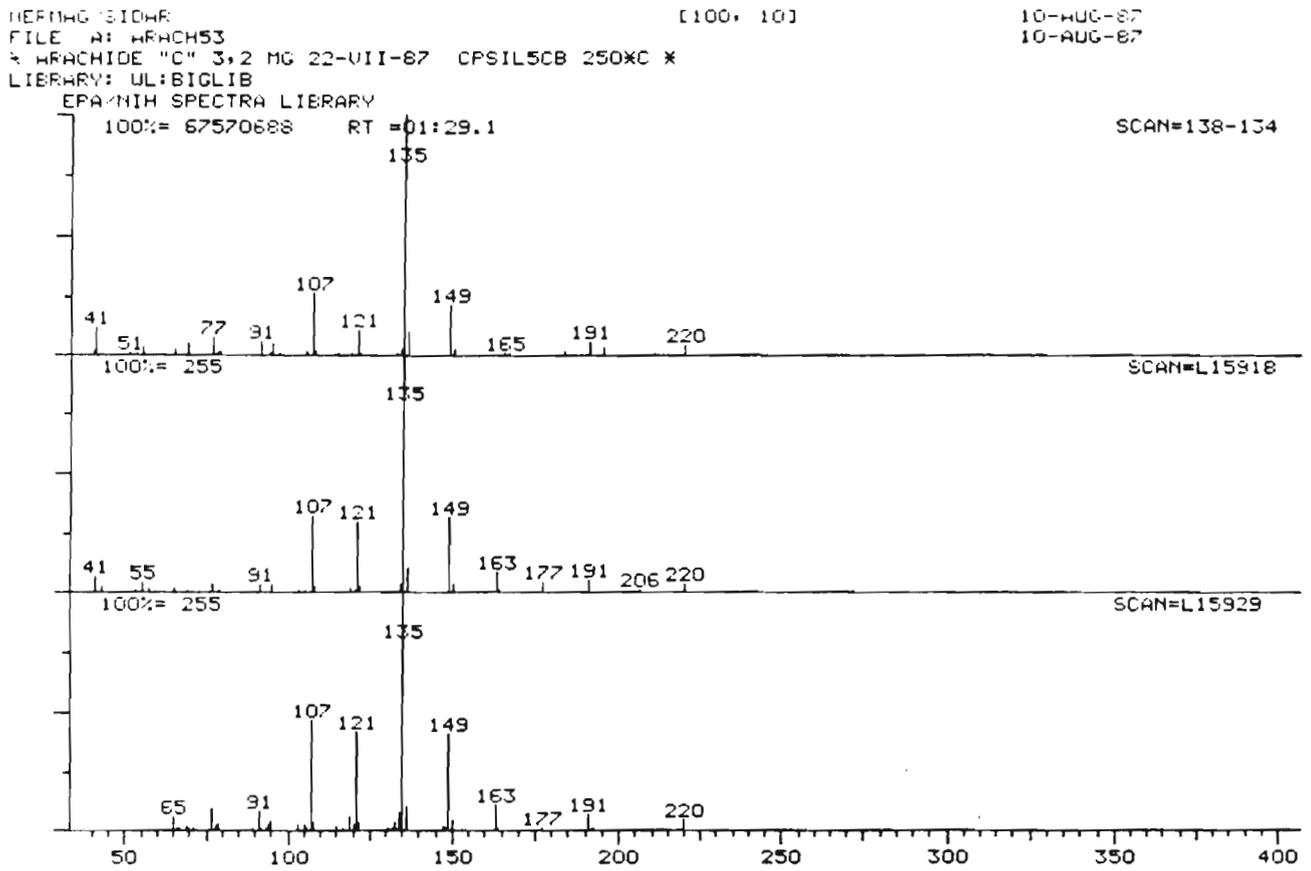


Figure 34: Comparaison entre le spectre de masse (en impact électronique) d'un nonyl-phénol extrait de feuilles d'Arachide (scan: 138-134) présentant un pic de base à  $m/z$  135, et ceux de produits de référence, l'un étant un para nonyl phénol (scan: L 15918), l'autre différant par la chaîne latérale (scan: L 15929).

La figure 35 fournit une représentation schématique de la structure des nonyl phénols, sans présumer de la position de la chaîne latérale probablement selon les cas en ortho, méta et para, d'où trois isomères.

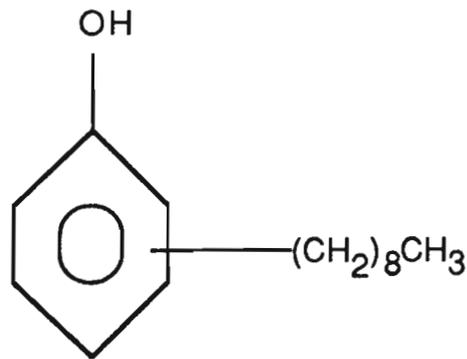


Figure 35: Représentation schématique de la structure des nonyl phénols, de formule brute  $C_{15}H_{24}O$  de masse  $M^+ = 220$ . A noter que la position de la chaîne latérale n'est pas déterminée.

Il existe une concordance rigoureuse entre le spectre de masse, étali en impact électronique, du nonyl phénol à pic de base 135 et ceux de deux nonyl phénols de référence (cf. figure 34).

Les nonyl phénols ont été obtenus par GC préparative et testés pour leur toxicité *in vitro* en lame à concavité pour le *P. parasitica* (les spores de *C. cladosporioides* germant mal dans ces conditions). On note, pour des concentrations inférieures à 50  $\mu\text{g/ml}$ , un blocage de la croissance des filaments pendant 24 heures puis pendant quelques heures une élongation de quelques dizaines de microns (pour moins de 1% d'entre eux) suivie d'une lyse cytoplasmique généralisée.

## 4. IDENTIFICATION D'ALKYL BIS PHENYL ETHERS

Cette famille de produits se trouve dans la phase acétate d'éthyle; elle subit un début de purification par chromatographie sur colonne atmosphérique de silice (voir figure 23).

Les composés sont séparés en CLHP sur colonne de silice par un mélange hexane : acétate d'éthyle (70/30) (figure 36); la purification est poursuivie en CLHP sur colonne de silice greffée en C<sub>18</sub> éluee par un gradient en méthanol.

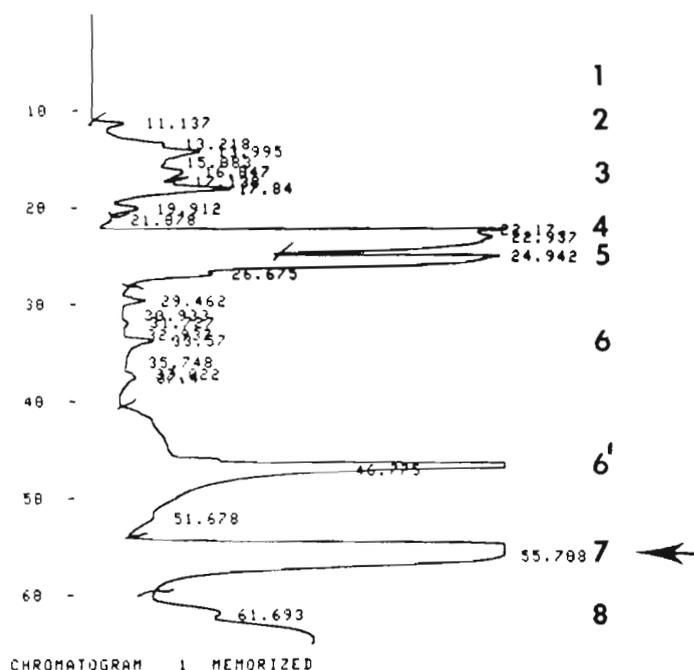


Figure 36: Chromatographie en CLHP de la fraction P IV [fractions 48-70, préalablement isolées par chromatographie sur colonne atmosphérique de silice (cf. figure 23)] sur une colonne de silice (3/8' x 30 cm) - 5 $\mu$ , dans le mélange de Hx:Ae (d'abord 100/0 puis par un gradient en acétate d'éthyle - 70/30 v/v établi en 20 min). Détection UV à 280 nm; Débit: 1 ml/min. Le flèche indique la fraction fongitoxique.

## 1°) CARACTERES CHROMATOGRAPHIQUES

- en CCM avec le mélange Clf - MeOH (50:2): Rf:0,22. Le spot vire au jaune après traitement au trichlorure d'antimoine et chauffage.

- en CLHP avec élution d'abord par le mélange hexane:acétate d'éthyle (100/0) suivie par un gradient en acétate d'éthyle (70/30) établi en 20 min. (débit: 1 ml/min.), le temps de rétention est de 55 min;

## 2°) CARACTERISATION EN SPECTROMETRIE DE MASSE

Les études se sont avérées délicates et ont nécessité l'utilisation du couplage de deux spectromètres de masse (SM-SM) pour l'analyse des principaux ions.

Par CG-SM, en impact électronique se distingue nettement un pic de base à  $m/z = 94$ . Les ions les plus caractéristiques correspondent à  $m/z$  85, 83, 71, 69, 57, 55, 43, 41. Certains ions sont décelés sous forme de traces soit à  $m/z$  182 ou  $m/z$  196 et 168 ou encore à  $m/z$  210.

Dans le mode ionisation de champ par l'ammoniac, des pics de masse  $M+18$  correspondent aux ions 358, 372 et 386. Les masses moléculaires sont confirmées par spectrométrie en ionisation de champ avec le monoxyde d'azote qui, d'autre part, interagit avec les éthers et les noyaux phénoliques.

L'hydrogénation catalytique est réalisée en présence d'oxyde de platine dans le méthanol, pendant une minute, à température ambiante. Les produits résultant de la réaction ne sont pas détectés. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Parmi celles-ci: la formation, au cours de la réaction d'hydrogénolyse, de produits très polaires adsorbés sur la colonne de CG, ou bien encore la formation de substances très volatiles et/ou polymérisées.

L'hypothèse de la présence d'une chaîne linéaire polyinsaturée est écartée d'après résultats des réactions suivantes:

- l'époxydation, pendant deux heures dans l'acide métachloroperbenzoylique en excès, ne provoque pas de changement.

- l'ozonolyse, pendant une minute par  $O_3$  dans le mélange dichlorométhane-hexane à la température de moins  $78^\circ C$ , ne modifie pas la structure.

La présence d'une fonction alcool primaire ou secondaire est également à écarter, le produit n'étant pas modifié par le traitement au chlorure d'acétyle.

La présence du pic de base  $m/z = 94$  peut alors être interprétée comme résultant de la formation en phase gazeuse d'un ion phénol dans la source (par exemple, le phényl octyl éther a un pic de base  $m/z = 94$ ). Ceci conduit à envisager deux hypothèses pour la structure de ces composés:

- un phénol substitué
- un phényl alkyl éther.

D'après la littérature, la première hypothèse, celle d'un phénol substitué est à écarter car le pic de base correspond à un ion impair (figure 37). Par contre, dans le cas du phényl alkyl éther de masse  $M^+ = 206$ , le spectre contient un pic de base à  $m/z = 94$  (figure 38).

Cette hypothèse selon laquelle l'ion  $m/z 94$  correspondrait à une structure phénolique a été vérifiée par des expériences réalisées par couplage de deux spectromètres de masse (couplage SM-SM). Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un triple quadripole sur spectromètre NERMAG R30-10C au laboratoire de chimie organique structurale en collaboration avec le Professeur J.C. TABET de l'Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. L'ion  $m/z 94$  étant sélectionné par le premier analyseur conduit à un spectre de décomposition - sous collision en présence d'argon - identique à celui généré par l'ion moléculaire du phénol. Comme l'indique la figure 39, on observe la formation des ions caractéristiques à  $m/z 66, 65, 55, 39, 38, 27$ .



Les spectres de fragmentation du phénol et du produit naturel à pic de base  $m/z$  94 - figure 40 sont strictement superposables.

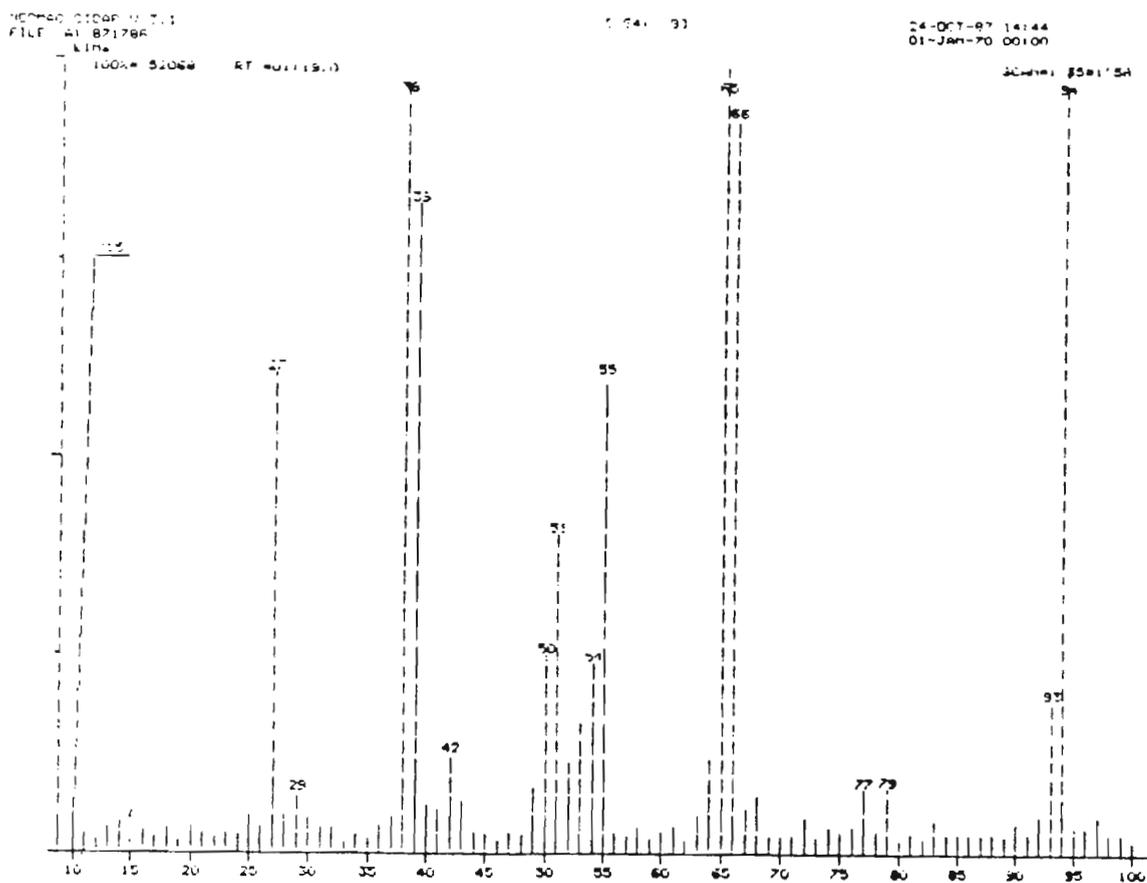


Figure 40: Analyse par couplage SM-SM (en impact électronique), en atmosphère d'argon, de la fragmentation du phénol et du produit naturel à pic de base  $m/z = 94$ .

A partir de ces données analytiques, il apparaît une relation de structure avec un phényl alkyl éther quoique la structure de la substance élaborée par l'Arachide en réaction à l'infection soit plus complexe. Par ailleurs, en SM-SM, les spectres de collision des ions pseudomoléculaires  $m/z$  358 et 372, dans les conditions d'IC-NH<sub>3</sub> indiquent la présence d'une chaîne hydrocarbonée. La figure 41 correspond au spectre de collision de

l'ion  $m/z$  372 dans les conditions d'IC-NH<sub>3</sub>. La présence d'ions intenses à  $m/z$  57, 71, 85 est en faveur de l'existence d'un maillon hydrocarboné à longue chaîne.

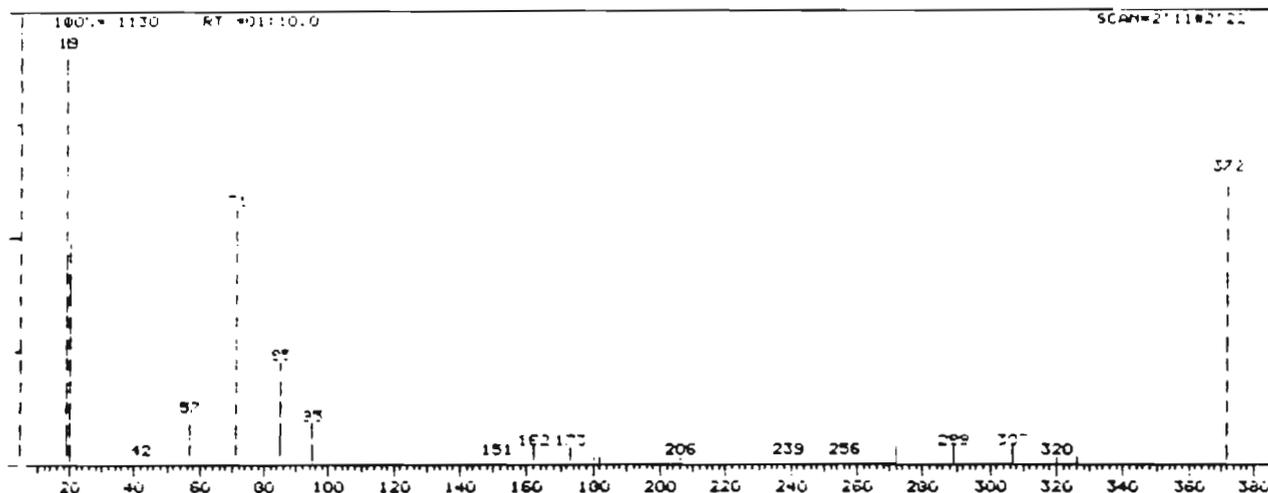


Figure 41: Analyse par couplage SM-SM, dans le mode ionisation de champ par l'ammoniac, de la fragmentation l'ion  $m/z = 372$  sélectionné par le premier analyseur. La présence d'ions intenses à  $m/z$  57, 71 et 85 indique la présence d'un maillon hydrocarboné à longue chaîne.

L'hypothèse la plus probable pour la masse moléculaire est celle des valeurs  $m/z$  340, 358, et 372, ces ions étant détectés sous forme de traces dans les spectres obtenus en impact électronique. La structure la plus compatible avec les masses mentionnées est donc du type phénol-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-phénol représentée sur la figure 42, où le nombre de carbones de la chaîne aliphatique peut prendre trois valeurs différentes: 11, 12 et 13. Les structures qui en dérivent correspondent alors respectivement aux masses  $M^+ = 340, 354$  et 368.

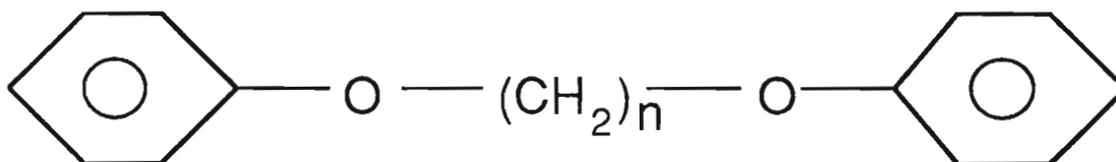


Figure 42: Structure des alkyl bis phenyl éthers.

Enfin, l'analyse en CG-SM indique la présence de plusieurs isomères pour une même masse moléculaire. Ceux-ci peuvent s'expliquer dans certains cas par la présence d'une ou de plusieurs ramifications.

## V - PRODUITS FONGITOXIQUES NON IDENTIFIES

Parmi les substances accumulées en réaction à l'infection par le *P. arachidis* (cf. tableau 21), nous décrivons succinctement quatre produits en cours de séparation.

Caractère/Test	1	2	3a	3b	3c	4
Poids sec (mg)	8,1	-	13	17,1	2,4	7,7
Test Clado. RF-Clf:MeOH(50:2)	1. 0,18 2. 0,23	0,64	0,26	0,26	0,26	0,43
Test SbCl3	bistre-1. clair 2. foncée	brun	0	0	0	jaune
Test DPN	0	0	0	0	0	orange
Fluorescence (uv):						
254nm:	0	0	0	0	0	0
350nm:	oui	oui	0	0	0	oui
Spectres(uv):						
max-pH Acide:	231,5 nm	272,9 nm	280 nm	280 nm	0	285,1 et 246,9 nm
max-pH Basique :	idem	idem	245,9 nm	245,9 nm	242,9 et 214,9 nm	295 et 249,3 nm

Tableau 21: Caractères chromatographiques et spectrométriques des produits partiellement purifiés, non identifiés. 1 : Provient de la phase insaponifiable; 2 et 3a-c : sont des substances apolaires diffusant dans l'hexane (3a-c : sont des isomères); 4 : est extrait dans la phase acétate d'éthyle.

### 1. SUBSTANCE ISOLEE DE LA PHASE INSAPONIFIABLE

En fin d'hydrolyse potassique, l'insaponifiable est extrait par de l'acétate d'éthyle après ajustement du pH à 7. Après un premier fractionnement sur colonne atmosphérique de silice éluée par un mélange de chloroforme:méthanol (50/01 puis 50/10, voir figure 23), la fraction toxique est purifiée en CLHP d'abord sur colonne de silice avec le mélange hexane:acétate d'éthyle (70/30)

puis sur colonne de silice greffée en  $C_{18}$  éluée avec un gradient de méthanol dans une solution acétique à 1 % (figure 43). La fraction toxique migre en CCM à  $R_f$  0,18 et 0,23 dans le système chloroforme:méthanol (50/2); ces spots sont colorés en bistre clair ( $R_f$ :0,18) et foncé ( $R_f$ :0,23) par le trichlorure d'antimoine. Le spectre établi dans l'ultraviolet ne révèle qu'un pic d'absorption à 231 nm (tableau 21).

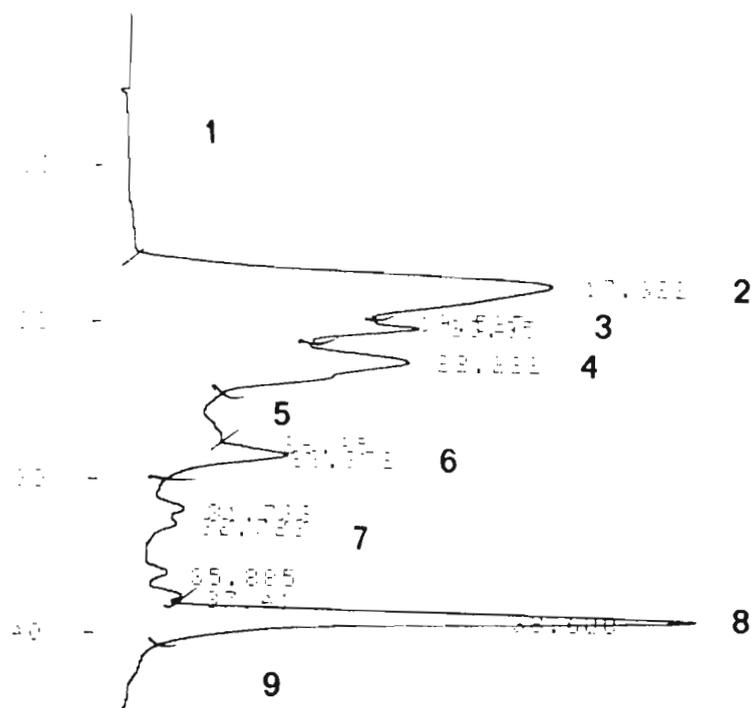


Figure 43: Purification en CLHP de la fraction toxique, extraite de l'insaponifiable, sur une colonne de silice greffée en  $C_{18}$  dans le mélange de  $H_2O$ :MeOH (50/50 v/v) avec 1% acide acétique suivi par un gradient de méthanol 50% à 99% établi en 30 min. La fraction '8' est fongitoxique.

## 2. SUBSTANCES APOLAIRES ISOLEES DE LA PHASE HEXANE

En suivant une progression sensiblement voisine de celle appliquée à l'insaponifiable, un groupe de trois isomères est obtenu en quantité non négligeable et une substance à l'état de traces (tableau 21). Celle-ci migre à  $R_f:0,40$  dans le système Clf:MeOH (50/2), elle est colorée en brun par le réactif au trichlorure d'antimoine. Le spectre établi dans le méthanol en ultra-violet révèle un pic à 273 nm qui n'est pas déplacé à pH basique.

Les trois isomères ont un  $R_f$  moyen de 0,26 dans le mélange Clf:MeOH (50/2). Deux d'entre eux présentent en spectrométrie dans l'ultra-violet un pic d'absorption à 280 nm, à pH basique les trois substances forment un pic entre 243 et 246 nm.

## 3. SUBSTANCE EXTRAITE PAR LA PHASE ACETATE D'ETHYLE

Elle est obtenue dans la même fraction que le produit aliphatique insaturé de masse  $M^+ = 402$  (figure 33).

La purification est réalisée sur une colonne de silice (3/8' x 30 cm) - 5 $\mu$ - en CLHP; élution par un gradient Hx:Ae - 100/0 --> 70/30 v/v établi en 20 min); débit: 1ml/min. Le pic correspondant à la fongitoxicité est isolé puis rechromatographié sur la même colonne, avec le système d'élution Hx:Ae - 70/30 v/v. Le produit fongitoxique obtenu correspond au pic majeur (temps de rétention de 21,4 min). Ce pic n'est pas symétrique, il présente un épaulement (temps de rétention: 20,6 min) indiquant la présence d'un contaminant. De fait une chromatographie sur plaque de silice révèle l'existence de 2 taches sous éclairément UV (366 nm). Le produit majoritaire, de  $R_f$  0,43 dans le système Clf:MeOH (50/2) fluoresce à 366 nm. Il réagit avec la p-nitraniline qui la colore en orange tandis qu'il vire au jaune à chaud après traitement par le trichlorure d'antimoine. Le spectre ultraviolet établi dans le méthanol indique deux pics l'un à 247 nm, l'autre à 285 nm, faiblement déplacés à pH basique (tableau 21).

## VI - DISCUSSION

Les essais d'isolement et d'identification de produits fongitoxiques ont conduit à la caractérisation d'une dizaine de substances élaborées par la plante. La structure de certaines molécules a été totalement identifiée, pour d'autres la nature des isomères reste à préciser. Enfin six composés ont été détectés dont la structure reste à préciser. A l'exception de la medicarpine et de certains hydroxystilbènes toutes ces molécules sont décrites pour la première fois chez l'Arachide.

Parmi celles-ci, le linoléate de méthyle présente une activité fongitoxique non négligeable envers *P. arachidis* (SUBBARAO et al., 1987 b). La molécule la plus active décelée jusqu'à présent est cependant l'hydroxy-13 octadécadiène-9,11 oate de méthyle, qui semble environ 20 fois plus toxique que la précédente (inhibition de la germination de 75% des spores pour une concentration inférieure à 5 µg/ml). Les autres substances identifiées devront être produites en quantités suffisantes avant que l'on puisse les tester. Ce travail devra donc être poursuivi.

L'intérêt de la caractérisation des phytoalexines de l'Arachide a été discuté plus haut. Rappelons que, dans le cadre de nos recherches, l'identification précise de ces substances devra permettre d'en suivre la production au cours des différentes étapes de la pathogénèse afin de vérifier si elles interviennent effectivement au niveau des mécanismes de défense de la plante. D'ores et déjà il semblerait que certaines des phytoalexines détectées chez l'Arachide existent chez d'autres plantes, Tomate, Palmier à huile (TAQUET, 1985; VERNENGHI, 1985) où leur participation aux réactions de défense est reconnue.



## CHAPITRE IV

### ETUDE DE LA MODULATION DES REACTIONS DE DEFENSE DE L'HOTE

Nous avons décrit, dans les chapitres précédents, différentes réactions de l'Arachide à l'infection par *P. arachidis*, au niveau de la teneur en composés phénoliques totaux et de la composition des extraits bruts telle qu'établie par chromatographie en CLHP sur colonne de silice.

Une manière de vérifier l'intervention éventuelle de ces substances dans les mécanismes de défense pouvait consister à moduler, artificiellement, ces réactions, soit en les inhibant, soit en les stimulant.

Pour cela nous avons utilisé trois techniques:

- administration d'AOA (acide  $\alpha$ -oxyaminoacétique), inhibiteur compétitif de la phénylalanine ammoniac lyase (PAL) (MASSALA et al., 1980), enzyme clef de la biosynthèse des phénols de la série cinnamique intervenant dans la biosynthèse des lignines.
- administration de tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium (TEPA). Ce produit est un fongicide inhibant faiblement la croissance des oomycètes *in vitro* mais possédant, en revanche, de bonnes propriétés préventives ou curatives *in vivo*. Outre son action directe en tant qu'agent fongicide, le TEPA pourrait moduler l'interface hôte-

parasite dans le sens d'une plus grande résistance.

- prémunition: elle consiste à stimuler les mécanismes de défense d'une plante en lui inoculant un agent non pathogène ou une souche peu agressive de l'agent pathogène, avant d'infecter la plante par le parasite lui-même (ou avant le déclenchement d'une épidémie au champ, KUC, 1983). Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé *Puccinia sorghi*, agent de la rouille du Maïs, en tant qu'agent de prémunition.

## I - ESSAI DE MODULATION DES REACTIONS DE L'HOTE PAR L'AOA ET LE TEPA

Deux séries d'expériences indépendantes [notées Exp. 1 et Exp.2 comportant, chacune, deux dates de prélèvement désignées A: arrêt de traitement et prélèvement après 5 traitements par l'AOA et 2 traitements par le TEPA; B: arrêt de traitement et prélèvement après 8 traitements par l'AOA et 3 traitements par le TEPA] ont été réalisées sur deux génotypes, l'un sensible (Local) l'autre très résistant (NC Ac 17090). Dans chaque cas, l'effet de l'AOA et du TEPA a été vérifié sur la teneur en phénols totaux et sur l'importance quantitative de la fraction ' $\alpha$ ' (estimée par sa surface enregistrée à l'intégrateur) éluée en CLHP selon les modalités opératoires déjà décrites (Chapitre II). Le traitement par le TEPA est fait par dépôt au pied de la plante dans le cadre de l'expérience 1, tandis que la pulvérisation foliaire est utilisée comme méthode de traitement pour l'expérience 2. Au plan de la pathogénèse, la modulation des réactions de défense a été mesurée par l'effet de ces deux produits sur les composantes de

résistance (période d'incubation, période de latence, fréquence d'infection et diamètre des lésions; ces mesures n'ont été faites que dans le cadre de l'expérience 2).

## 1. EFFET SUR LA TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX

La réponse de l'Arachide à l'application tant de l'AOA que du TEPA se caractérise par une grande hétérogénéité (tableau 22). L'AOA, en particulier, que l'on sait provoquer, normalement, une diminution du pool phénolique dans les organes traités, n'a pas, systématiquement, l'effet escompté. Dans l'ensemble, la variabilité enregistrée ressemble davantage à une variabilité inter-plantes qu'à un effet réel des substances chimiques testées. Deux hypothèses peuvent être proposées pour rendre compte de cette situation: ou bien l'AOA n'agit pas parce que non absorbé par la plante (ou appliquée en concentration insuffisante), ou bien il n'agit que sur la synthèse de certains phénols et cet effet n'apparaît pas au niveau de l'estimation des phénols totaux. Il est possible également que l'application des différents composés induise chez la plante une agression dont l'effet perturbe les résultats.

## 2. EFFET SUR LA FRACTION ' $\alpha$ '

La même hétérogénéité de la réaction de l'Arachide existe au niveau de la fraction ' $\alpha$ ' (tableau 23). Globalement pour certains motifs son importance quantitative croît tandis que pour d'autres elle décroît sans que, *a priori*, l'on puisse tirer de ces variations une règle générale. Théoriquement, au moins dans le cas du traitement par l'AOA, la réponse tend vers une diminution de la surface de cette fraction.

Génotype	Traitement	Phénols totaux ( $\mu\text{g/g.P.F}$ )			
		Expérience 1		Expérience 2	
		A	B	A	B
Local	T	1580	1586	931	1262
	T + AOA	1399	1572	1364	1175
	T + TEPA	1235	1289	1128	821
	I	2596	1402	926	943
	I + AOA	1471	1514	953	1131
	I + TEPA	1119	1304	1106	1123
	I + TEPA*	-	-	-	1117
NC Ac 17090	T	1938	1274	1105	950
	T + AOA	1515	1306	388	990
	T + TEPA	1381	1284	1124	706
	I	1364	1391	1439	935
	I + AOA	1843	1735	1216	625
	I + TEPA	1611	1528	502	1685
	I + TEPA*	-	-	-	1486

Tableau 22: Dosage des phénols totaux dans des extraits bruts de deux génotypes (Local et NC Ac 17090) soumis à des traitements différents. A: prélèvement après 5 traitements par l'AOA et 2 traitements par le TEPA; B: prélèvement après 8 traitements par l'AOA et 3 traitements par le TEPA. Début de traitement: 6 j avant infection. Traitement AOA: tous les 2 j dépôt au pied de la plante (Concentration: 1,25 mg/25 ml par 2 plantes i.e., 0,005%); Traitement TEPA: dépôt au pied de la plante (Exp. 1), pulvérisation foliaire (Exp. 2) tous les 6 j (Concentration: 5mg/25 ml par 2 plantes, i.e., 0,02%); I + TEPA\*: traitement à double dose, i. e., 10 mg/ 25ml par 2 plantes ou 0,04% déposé au pied des plantes.

Génotype	Traitement	Surface de la fraction 'α'			
		Expérience 1		Expérience 2	
		A	B	A	B
Local	T	40019	52141	37012	11910
	T + AOA	16299	60127	30177	13475
	T + TEPA	31475	51118	44891	17401
	I	68795	30876	18078	15295
	I + AOA	20571	23157	23089	20789
	I + TEPA	22692	47903	33329	13839
	I + TEPA*	-	-	-	21444
NC Ac 17090	T	19545	41775	26106	57377
	T + AOA	13096	31498	12982	81034
	T + TEPA	42452	13745	31538	57511
	I	20790	72074	50553	64774
	I + AOA	117237	52002	54468	47003
	I + TEPA	38317	51615	37379	99150
	I + TEPA*	-	-	-	20835

Tableau 23: Surface de la fraction 'α', mesurée en CLHP, de deux génotypes (Local et NC Ac 17090) selon les traitements (cf. tableau 22). {Elution : Hx: Ae:MeOH (90%) - 50/50/05; Détection : 280 nm; Débit : 1,5 ml/min}.

L'analyse de l'effet des différents traitements au niveau des pics individuels de la fraction ' $\alpha$ ' est à peine plus instructive. On note néanmoins, pour la (les) substance(s) éluée(s) au temps  $t = 2,1$  min. (figure 44; tableau 24), une diminution notable de la surface du pic sous l'effet de l'application de l'AOA, et, au contraire, une augmentation suite au traitement par le TEPA.

Traitement	A				B			
	Local		NC Ac 17090		Local		NC Ac 17090	
	Surface	% Var.	Surface	% Var.	Surface	% Var.	Surface	% Var.
In	2545	-	2238	-	2196	-	8646	-
In + AOA	1347	-47	2684	90	1820	-17	4829	-44
In + TEPA	2251	-11	13327	495	5141	134	9014	4

Tableau 24: Surface du pic 'x' (caractérisée par un temps de rétention de 2,1 min) de la fraction ' $\alpha$ ' selon les traitements et les géniteurs à deux prélèvements (cf. tableau 22). % Var: variation par rapport au motif 'In' (infecté seul) considéré comme base de la comparaison. (Données-Exp.2).

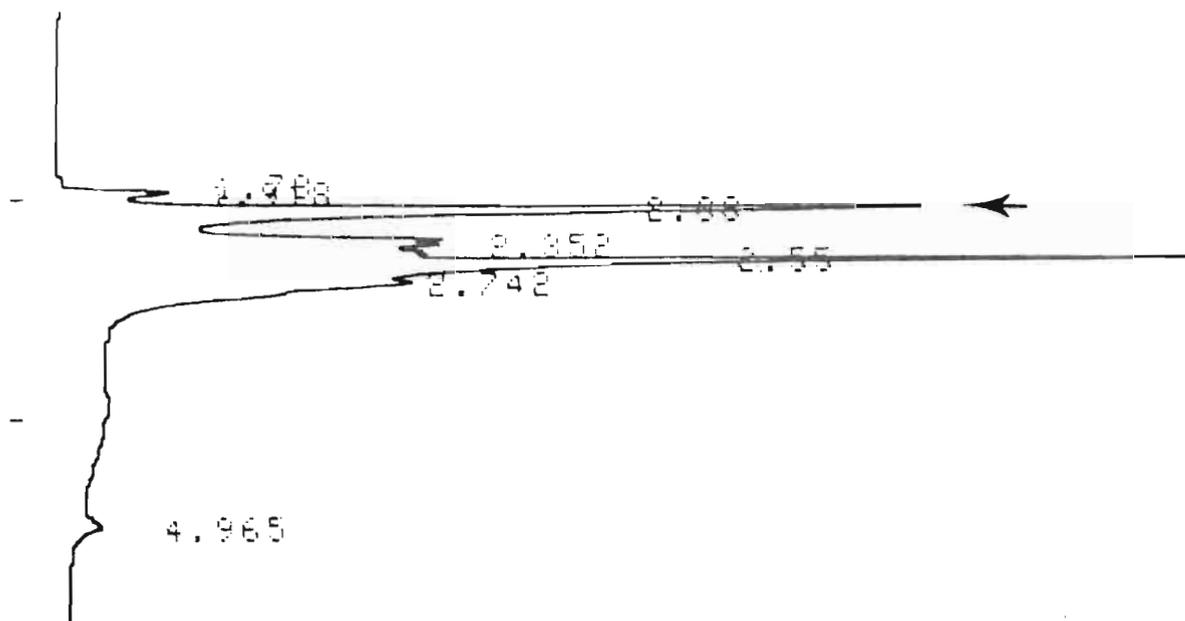


Figure 44: Diagramme d'élution de la fraction ' $\alpha$ ' obtenu par analyse en CLHP d'un extrait de feuilles d'Arachide parasitées. Les conditions d'élution sont comparables à celles décrites dans le tableau 23. Notez le pic (flèche) caractérisé par un temps de rétention de 2,1 min.

Un tel résultat confirme l'hypothèse que nous avons proposée précédemment selon laquelle les réactions de l'hôte ne se manifestent pas à un niveau global mais concerneraient des substances bien précises. En d'autres termes, les traitements effectués auraient pour effet de modifier la biosynthèse de quelques composés particuliers qui, eux, pourraient jouer un rôle actif dans les mécanismes de défense de la plante; ces modifications échapperaient aux investigations réalisées à un niveau trop global. Il est probable que cette situation prévalait également lors l'étude des réactions de la plante à l'infection ou de celle des réactions différentielles suivant les génotypes.

### 3. EFFET SUR LES COMPOSANTES DE RESISTANCE

L'influence de l'AOA et du TEPA sur les composantes de résistance (Période d'incubation, Période de latence, Fréquence d'infection, Diamètre des lésions et % de Lésions nécrosées), a été mesurée sur des feuilles du 3<sup>e</sup> rang foliaire; les traitements ont été effectués sur plante entière (à raison de 3 répétitions par traitement).

Les résultats de cette expérimentation sont exposés dans le tableau 25, et ont été soumis à une analyse statistique (analyse de variance à trois dimensions; analyse de variance bidimensionnelle pour % LN) dans le but de mettre mieux en évidence l'effet du TEPA et de l'AOA sur chacune des composantes de résistance des génotypes utilisés.

## 1°) RESULTATS

L'examen du tableau 25 permet de dégager des conclusions à plusieurs niveaux.

## Géotype Local

Traitement	Composantes de résistance**							
	P.I (jours)		P.L (jours)		F.I (Nb. lés/cm <sup>2</sup> )		D.L (mm)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
In (seul)	11	11	14	13	11,65	10,43	0,71	0,74
In + AOA	11	11	13	12,67	15,42	15,35	0,79	0,85
In + TEPA	11,33	11	14	14,33	12,76	9,3	0,59	0,64
In + TEPA*	-	11	-	15,33	-	9,72	-	0,75

## Géotype NC Ac 17090

Traitement	Composantes de résistance**									
	P.I (jours)		P.L (jours)		F.I (Nb. lés/cm <sup>2</sup> )		D.L (mm)		% L.N	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
In (seul)	21	22	27,3	27,67	3,67	4,53	0,71	0,66	42,1	50,2
In + AOA	23,33	20	28	25	6,17	6,83	0,74	0,6	40,9	70,9
In + TEPA	22	21,33	28,3	28,3	2,63	4,83	0,46	0,46	59,1	72,43
In + TEPA*	-	22,5	-	29,5	-	2,13	-	0,44	-	64,03

Tableau 25 : Influence, de l'AOA et du TEPA sur les composantes de résistance (P.I : Période d'incubation; P.L: Période de latence; F.I : Fréquence d'infection exprimée par le nombre de lésions par cm<sup>2</sup>; D.L : Diamètre des lésions; % L.N : Lésions nécrosées en pourcentage. \*\*: valeurs moyennes de 3 répétitions). A: Prélèvements après 5 traitements par l'AOA et 2 traitements par le TEPA; B: Prélèvement après 8 traitements par l'AOA et 3 traitements par le TEPA; Début de traitement : 6 j avant infection; Traitement-AOA : tous les 2 jours (25 ml à 0,005% pour 2 plantes; Traitement-TEPA : tous les 6 jours (25ml ou 0,02% pour 2 plantes); Début du comptage de lésions : 8 j après infection artificielle. \*: Traitement par le TEPA à double dose apporté au pied des plantes.

**a) Effet sur les composantes de résistance:**

$\alpha$ ) Traitement par l'AOA:

L'administration de l'AOA ne modifie pas sensiblement la composante période d'incubation; en revanche son effet est sensible sur la Période de latence (génotype NC Ac 17090) et, surtout, sur la Fréquence d'infection qui augmente de façon considérable chez les deux génotypes; enfin la composante Diamètre des lésions est elle aussi affectée.

Tous ces résultats indiquent que l'AOA exerce un effet dépressif sur les mécanismes de résistance conduisant à une "fragilisation" de la plante vis à vis du parasite. Une donnée qui nous semble aberrante est cependant à noter: l'augmentation du Pourcentage de lésions nécrosées (NC Ac 17090; Prélèvement B) ne paraît pas s'inscrire logiquement dans le cadre de l'action présumée de l'AOA.

$\beta$ ) Traitement par le TEPA:

Ce traitement a pour effet de modifier la valeur des composantes de résistance suivantes: Période de latence, Diamètre des lésions et Pourcentage de lésions nécrosées (dans le cas de NC Ac 17090). Sauf exception toutes les variations enregistrées (par rapport aux valeurs des composantes de résistance observées sur le motif inoculé seul) témoignent d'un accroissement de la résistance des plantes traitées.

**b) Effet du génotype**

Les essais précédents ont mis en oeuvre deux génotypes l'un sensible (Local) l'autre résistant (NC Ac 17090). Cette différence de sensibilité apparaît clairement lorsque l'on compare, pour le motif témoin (infection sans traitement complémentaire), la valeur des différentes composantes de résistance. Chez NC Ac 17090, et par rapport au comportement du

génotype Local, la Période d'incubation et la Période de latence sont beaucoup plus longues, en revanche la Fréquence d'infection est beaucoup plus basse. Le Diamètre des lésions demeure pratiquement inchangé.

L'application de l'un ou l'autre traitement provoque, qualitativement, le même effet chez les deux génotypes. Cependant NC Ac 17090, génotype résistant, semble réagir plus vigoureusement que le génotype Local au traitement par le TEPA, particulièrement en ce qui concerne la Fréquence d'infection et le Diamètre des lésions.

### c) Modes d'application du TEPA

Le traitement de la plante par le TEPA par pulvérisation foliaire soulève une question importante dans la mesure où le composé est un fongicide et que, par conséquent, la modification des composantes de résistance pourrait témoigner, non pas d'une réaction de la plante, mais plutôt d'une d'action directe sur l'agent pathogène.

La fongitoxicité du TEPA pour *P. arachidis* est bien réelle. Nos contrôles montrent qu'à la concentration de 50 µg/ml de matière active il provoque l'inhibition de la germination d'environ 80% des spores et qu'il suffit d'une concentration de 20 µg/ml de ce produit pour réduire de moitié la vitesse de croissance des tubes germinatifs (tableau 26 et figure 45).

Ces résultats nous ont conduit à tester un autre procédé d'application qui consiste à verser au pied des plantes une solution de TEPA (25 ml à 0,04% par pot contenant 2 plantes).

Les effets de ce type de traitement sont tout à fait comparables à ceux enregistrés pour un traitement foliaire. Si l'on considère que la migration du TEPA à l'intérieur de la plante est faible et que sa concentration ne dépasse pas 10 µg par gramme de tissus frais (RAVISE, comm. pers.), il faut alors admettre que les modifications observées au niveau des composantes de résistance ne sont pas à attribuer à une action directe du TEPA sur le parasite (dans le cas d'un traitement au niveau racinaire).

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibition (%)
10	21
20	14
30	26
50	82
100	88,5
150	99,5
200	99,9
250	100
300	100

Tableau 26: Inhibition (%) de la germination de P. arachidis en fonction de la concentration en TEPA.

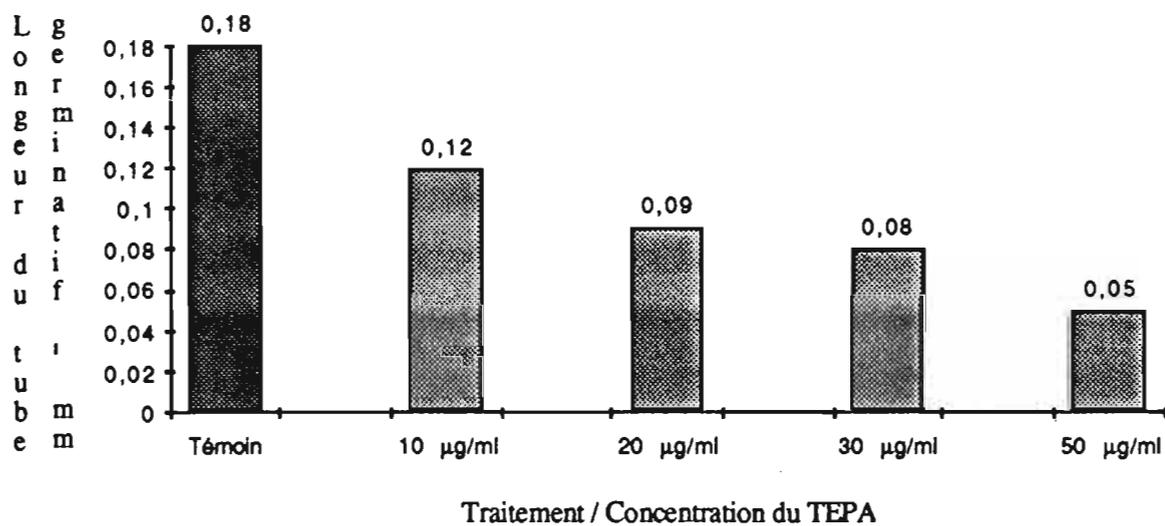


Figure 45: Inhibition in vitro de la croissance du tube germinatif de P. arachidis en fonction de la concentration en TEPA.

Source de variation	degré de liberté	Période d'incubation (PI)				Période de latence (PL)				Fréquence d'infection (FI)				Diamètre de lésion (DL)			
		SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P
A (trait.)	2	0,054	0,027	0,02		4,9032	2,4516	2,38	<0,50	32,135	16,068	9,9	<0,10	0,097	0,048	32	<0,05
B (Prél.)	1	0,924	0,924	0,75		1,0981	1,0981	1,07	<0,50	0,089	0,089	0,06		0,0002	0,0002	0,13	
C (Gén.)	1	334,224	334,224	271,95	<0,005	581,995	582,995	567	<0,005	178,256	178,256	109,83	<0,01	0,0397	0,0397	26,43	<0,05
A x B	2	2,348	1,174	0,96		1,8007	0,9004	0,88		0,428	0,214	0,132		0,002	0,001	0,66	
A x C	2	0,0184	0,009	0,01		0,1154	0,0577	0,06		2,141	1,071	0,659		0,009	0,005	3	<0,25
B x C	1	0,5941	0,594	0,48		0,2214	0,2214	0,22		5,977	5,977	3,683	<0,25	0,009	0,009	6	<0,25
A x B x C	2	2,457	1,229			2,0571	1,0286			3,246	1,623			0,003	0,0015		
Totaux	11	340,6195				592,191				222,272				0,1599			

Tableau 27: Analyse de variance (tri-dimensionnelle) sur les composantes de résistance (PI, PL, FI et DL) selon les traitements-A (Infecté-seul, Infecté+AOA, Infecté+TEPA), Nombre d'applications-B (I : 5 traitements de l'AOA et 2 traitements du TEPA; II : 8 traitements de l'AOA et 3 traitements du TEPA), génotype-C (Local et NC Ac 17090) et leurs interactions. SCE : Somme des carrés des écart à la moyenne; CM : Carré moyen; F : le 'F' de Fisher; P : Risque de 1er espèce.

Source de variation	degré de liberté	Lésions nécrosées (%)			
		SCE	CM	F	P
A (Date)	1	0,5764	0,5764	14,16	<0,005
B (Trait.)	2	0,5006	0,2503	6,15	<0,025
A x B	2	0,1705	0,0853	2,1	<0,25
Totaux	17	1,7356			

Tableau 28: Analyse de variance (bi-dimensionnelle) sur les lésions nécrosées (%) pour le génotype NC Ac 17090, selon le nombre du traitements (cf. Tab. 27) et les traitement lui même (In-seul, In+AOA et In+TEPA) et et leur interactions. (SCE, CM, F et P : cf. Tab. 27).

## 2°) ANALYSE STATISTIQUE

Ces résultats sont exposés dans les tableaux 27 et 28. Ils suggèrent :

a) un effet significatif du traitement (A) (AOA ou TEPA) uniquement sur la composante de résistance Diamètre des lésions ( $p \leq 0,05$ ); alors que l'on note simplement une tendance à un effet positif de ce même traitement (A) sur la Fréquence d'infection ( $p \leq 0,10$ ) (tableau 27).

Un effet très fort du traitement (B) ( $p \leq 0,025$ ) et du nombre d'application (A) ( $p \leq 0,005$ ) sur le Pourcentage de lésions nécrosées, alors que l'interaction (A x B) ne présente qu'une tendance positive ( $p \leq 0,25$ ) sur cette même composante (tableau 28).

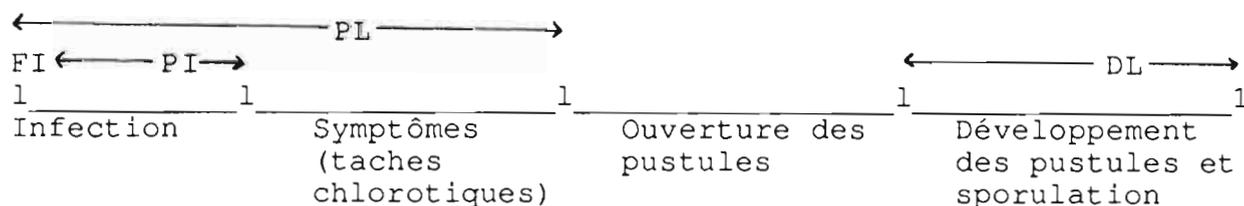
b) un effet très fort du génotype (C) sur les quatre composantes (déjà mentionné par les travaux précédents, SUBRAHMANYAM et al., 1983 a; SAVARY, 1986).

c) L'interaction génotype (C) x traitement (A) ne dégage qu'une tendance positive sur la composante Diamètre des lésions ( $p \leq 0,25$ ); confirmation en est faite par l'effet significatif du traitement (A) sur le même paramètre ( $p \leq 0,05$ ).

d) un effet non-significatif du nombre du traitement (B) sur toutes les composantes. Par contre une tendance à l'interaction entre le nombre de traitements (B) et le génotype (C) se dégage des résultats pour la composante Diamètre des lésions ( $p \leq 0,25$ ).

### 3°) INTERPRETATION DES RESULTATS DE L'ANALYSE STATISTIQUE EN TERMES BIOLOGIQUES

Les quatre composantes étudiées interviennent à 4 étapes différentes du déroulement de la pathogénèse.



Si l'on considère que les composantes de résistances les plus affectées par les traitements par l'AOA et le TEPA sont la Fréquence d'infection et le Diamètre des lésions, on s'aperçoit que les étapes "ciblées" se situent tout au début de la pathogénèse et à la fin de celle-ci.

L'effet initial porte sur le nombre de lésions qui se développent par unité de surface foliaire. Il est évident que pour une densité déterminée de spores déposées, des variations, statistiquement significatives du nombre de lésions produites indiquent une action des produits soit sur la germination des spores soit sur la capacité des spores germées à pénétrer dans les tissus de l'hôte. L'application de l'AOA tendant à augmenter

la valeur de cette composante, il faut admettre que même les génotypes sensibles produisent un (ou plusieurs) composé(s) capable(s) de s'opposer au bon déroulement de ces étapes initiales de la pathogénèse. L'AOA aurait pour effet de diminuer la production de ce(s) composé(s).

A l'inverse, le TEPA stimulerait leur biosynthèse, entraînant une réduction du nombre de lésions formées.

Une fois la pénétration effectuée, le processus pathogénique semble suivre un cours normal, ni la durée de la période d'incubation ni celle de la période de latence n'étant très sensiblement affectées par les traitements. Par contre, ceux-ci agissent, toujours en sens inverse, sur le développement des lésions et donc sur la production des spores susceptibles d'être à l'origine d'un nouveau cycle infectieux.

## **II - ESSAI DE PREMUNITION DE L'ARACHIDE CONTRE L'INFECTION PAR *P. ARACHIDIS***

Deux génotypes (Local-sensible et PI 259747-résistant) ont été retenus pour la réalisation de cet essai.

L'agent de la rouille du Maïs, *P. sorghi*, non pathogène pour l'Arachide, a été utilisé comme agent de prémunition. Cette expérience est conduite sur plante entière à raison de 4 répétitions pour chaque traitement. L'effet de la prémunition sur le comportement de l'Arachide à une infection par *P. arachidis* a été suivi sur deux types de marqueurs: moléculaire (phénols totaux) et pathogénique [composantes de résistance (Période d'incubation, Période de latence, Fréquence d'infection et Diamètre des lésions)]. Les traitements suivants ont été étudiés pour chacun des génotypes:

1. Témoin - plantes saines (Arachide)
2. Témoin - plantes saines (Maïs)
3. Infection par *P. arachidis* seul (Arachide)
4. Infection par *P. sorghi* seul (Arachide)
5. Infection par *P. sorghi* seul (Maïs): vérification de l'agressivité de la souche sur la plante-hôte normale.
6. Infection simultanée par *P. arachidis* et *P. sorghi* (Arachide)
7. Infection par *P. sorghi*, puis par *P. arachidis* 48 heures plus tard [infection différée (Arachide)].

Le dénombrement des lésions est réalisé chaque jour à partir du 8<sup>e</sup> jour après l'infection artificielle. Les phénols sont dosés sur les tissus prélevés 10 j après l'infection.

## 1. DOSAGE DES PHENOLS TOTAUX

Les deux génotypes réagissent de manière opposée aux traitements étudiés (tableau 29). En effet, chez le génotype Local, on constate systématiquement une diminution de la teneur en phénols (par rapport au témoin), tandis que chez le génotype résistant, le taux de composés phénoliques augmente pour tous les traitements, excepté chez les plantes infectées par *P. sorghi* seul.

## 2. ESTIMATION DES COMPOSANTES DE RESISTANCE

Les résultats concernant l'effet de la prémunition sur les quatre composantes de résistance (période d'incubation, période de latence, fréquence d'infection et diamètre des lésions) sont exposés dans le tableau 30.

Traitement	Teneur en phénols totaux	
	Local	PI 259747
<i>Témoin</i>	1192	1063
<i>Plantes infectées par:</i>		
<i>P. arachidis seul</i>	1061	1222
<i>P. sorghi seul</i>	719	1024
<i>P. a + P.s même temps</i>	846	1262
<i>P. s 48 h avant P. a</i>	1035	1161

Tableau 29: Comparaison de la teneur en phénols totaux ( $\mu\text{g/g.P.F}$ ) selon les traitements pour les deux génotypes (Local et PI 259747); Prélèvement pour analyse: 10 j après infection par *P. s* et/ou *P.a* (cf. tableau 30).

Génotype :	Local (sensible)				PI 259747 (résistant)			
	Composantes de résistance							
Traitement	P.I	P.L	F.I	D.L	P.I	P.L	F.I	D.L
<i>P. a seul (témoin)</i>	9	13	11,5	0,77	14,6	18,12	1,9	0,68
<i>P. a + P.s même temps</i>	8,8	12,8	11,9	0,65	15,6	22	2,3	0,69
<i>P.s 48 h avant P. a</i>	10,8	14,8	5,6	0,62	15,5	21	0,5	0,48

Tableau 30: Comparaison de composantes de résistance [PI: Période d'incubation (en jours); PL: Période de latence (en jours); F.I: Fréquence d'infection (nombre de lésions/cm<sup>2</sup>); DL: Diamètre des lésions (en mm)] selon les traitements (infecté par *P.a*: *P. arachidis*; *P.s*: *P. sorghi* ou les deux).

### 1°) GENOTYPE LOCAL ( SENSIBLE)

D'après ces résultats, l'infection simultanée de *P. sorghi* et *P. arachidis* semble n'avoir d'effet que sur le Diamètre des lésions qui diminue par rapport à la valeur enregistrée en cas d'infection par *P. arachidis* seul. L'infection différée

(infection par *P. sorghi* 48 h avant l'infection par *P. arachidis*) provoque, en revanche, une augmentation des valeurs de la Période d'incubation et de la Période de latence ainsi qu'une diminution de celles de la Fréquence d'infection et du Diamètre des lésions. L'évolution de toutes ces variables témoigne d'une augmentation de la résistance des plantes et donc d'un effet positif de la prémunition.

## 2°) GENOTYPE PI 259747 (RESISTANT)

Ce génotype réagit aux traitements 6 et 7 (infection simultanée par les deux champignons et infection différée). Pour les deux traitements, la réaction est caractérisée par une augmentation des valeurs des Période d'incubation et de latence. Par contre, les composantes Fréquence d'infection et Diamètre des lésions évoluent de manière différente suivant le traitement. L'infection simultanée ne semble pas avoir d'effet sur ces variables, alors que l'infection différée provoque une diminution très importante de leur valeur. Pour ce génotype, l'infection préalable par *P. sorghi* induit une variation des différentes composantes de résistance dans le sens d'un accroissement du niveau de la résistance de ce génotype (déjà naturellement nettement plus résistant que le génotype Local).

Pour confirmer ces observations, une analyse statistique (analyse de variance bidimensionnelle) a été conduite sur les données correspondant à chacune des composantes (tableau 31). Il en ressort :

- \* un effet significatif du génotype (A) sur trois des composantes de résistance (Période d'incubation, Période de latence et Fréquence d'infection) ( $p \leq 0,001$ ) et une tendance positive sur la composante Diamètre des lésions ( $p \leq 0,10$ ).
- \* un effet non-significatif du traitement (B) sur la Période d'incubation mais significatif sur les autres composantes (Période de latence:  $p \leq 0,001$ ; Fréquence d'infection:  $p \leq 0,05$ ; Diamètre des lésions:  $p \leq 0,001$ ).

Source de variation	degré de liberté	Période d'incubation (PI)				Période de latence (PL)				Fréquence d'infection (FI)				Fréquence d'infection-Corrigé				Diamètre de lésion (DL)			
		SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P
A (Gén.)	1	195,5	195,5	82,5	<0,001	326,34	326,34	201,3	<0,001	390,91	390,91	41,9	<0,001	2,933	2,933	41,9	<0,001	0,027	0,03	4,38	<0,10
B (Trait.)	2	6,583	3,29	1,39		37,938	18,969	11,7	<0,001	78,156	39,08	4,2	<0,05	0,589	2,295	4,2	<0,05	0,139	0,07	11,4	<0,001
A x B	2	5,075	2,54	1,07		16,938	8,469	5,2	<0,025	26,094	13,05	1,4		0,198	0,099	1,4		0,029	0,02	2,41	<0,25
Variation résiduel	18	42,57	2,37			29,188	1,622			167,7	9,32			1,268	0,07			0,109	0,01		
Totaux	23	249,7				410,4				662,86				4,988				0,304			

Tableau 31: Analyse de variance sur les composantes de résistance (PI, PL, FI, FI-Corrigé et DL) selon les génotypes (A) et les trois traitements (B) (Infection par *P. arachidis* seul, *P. arachidis* et *P. sorghi* en même temps, et par *P. sorghi* 48 h avant *P. arachidis*. (SCE, CM, F et P : cf. Tab. 27).

Source de variation	degré de liberté	Période d'incubation (PI)				Période de latence (PL)				Fréquence d'infection (FI)				Diamètre de lésion (DL)			
		SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P	SCE	CM	F	P
A (Gén.)	1	132,25	132,25	45,49	<0,001	289	289	165	<0,001	216,02	216,02	36,31	<0,001	0,012	0,012	2,44	<0,25
B (Trait.)	1	3,063	3,063	1,05		6,25	6,25	3,57	<0,10	64,04	64,04	10,76	<0,01	0,061	0,061	12,16	<0,005
A x B	1	5,058	5,058	1,74	<0,25	2,25	2,25	1,28		19,824	19,824	3,33	<0,10	0,013	0,013	2,54	<0,25
Variation résiduel	12	34,88	2,907			21	1,75			71,394	5,95			0,056	0,005		
Totaux	15	175,25				318,5				371,28				0,142			

Tableau 32: Analyse de variance sur les composantes de résistance (PI, PL, FI et DL) selon les génotypes (A) et les deux traitements (B) (Infection par *P. arachidis* et *P. sorghi* en même temps, et par *P. sorghi* 48 h avant *P. arachidis*. (SCE, CM, F et P : cf. Tab. 27).

\* l'interaction A x B est significative sur Période de latence ( $p \leq 0,025$ ); au niveau du Diamètre des lésions l'effet est beaucoup moins net ( $p \leq 0,25$ ).

Cette analyse statistique, affectuée sur les données brutes, a été reprise après ajustement de la valeur de la composante de résistance Fréquence d'infection pour le traitement 3 (infection par *P. arachidis* seul). Cet ajustement semblait nécessaire dans la mesure où ce traitement avait été réalisé avec une dose d'inoculum double par rapport à celle utilisée pour les autres traitements. Seule la variable fréquence d'infection, recalculée selon la formule, FI-corrigé = FI/FI' (où FI: la valeur individuelle; FI': la valeur moyenne de 4 répétitions du traitement n°3) a été modifiée (tableau 31), elle seule étant en effet susceptible de varier avec la dose d'inoculum (SAVARY, 1987).

Il apparaît ainsi que l'effet du traitement (B) est significatif ( $p \leq 0,05$ ) pour ce paramètre (Fréquence d'infection-corrigé). Afin de confirmer ce résultat, l'analyse a également été menée sur les données concernant les motifs 6 et 7 (infection simultanée et différée par les deux champignons) pour lesquels la même dose d'inoculum (dose simple) est utilisée.

Selon cette analyse (tableau 32), l'effet du génotype est toujours significatif pour les 3 paramètres (Période d'incubation:  $p \leq 0,001$ ; Période de latence:  $p \leq 0,001$ ; Fréquence d'infection:  $p \leq 0,001$ ) alors qu'il n'existe qu'une tendance pour la paramètre Diamètre des lésions ( $p \leq 0,25$ ).

Par contre, l'effet du traitement est significatif sur la Fréquence d'infection ( $p \leq 0,01$ ) et le Diamètre des lésions ( $p \leq 0,005$ ), et une forte tendance existe pour la Période de latence ( $p \leq 0,10$ ).

Quant à l'interaction, génotype x traitement, elle tend à être significative sur la Période d'incubation ( $p \leq 0,25$ ), la Fréquence d'infection ( $p \leq 0,10$ ) et le Diamètre des lésions ( $p \leq 0,25$ ).

Cette seconde analyse statistique des résultats confirme donc nos précédentes conclusions.

En résumé, l'Arachide réagit de manière hautement significative à l'infection par un agent non pathogène. Ce traitement a pour effet d'accroître la résistance des plantes ainsi traitées, qu'elles appartiennent à un génotype sensible ou résistant. Cependant, les individus appartenant à ce dernier génotype réagissent mieux (plus rapidement et plus intensément) au traitement.

### III - DISCUSSION

Au cours des expérimentations décrites dans les chapitres I et II, nous avons tenté de vérifier l'effet de l'infection sur différents constituants chimiques des tissus hôte et d'en déduire le rôle de ces composés dans la pathogénèse. Les essais décrits dans le présent chapitre visent le même objectif tout en mettant en oeuvre la procédure inverse: modifier, par des traitements artificiels appropriés, la capacité de synthèse de certaines substances fongitoxiques par la plante ou, plus globalement, ses capacités de réaction et vérifier l'effet de ces traitements sur le déroulement de la pathogénèse.

Dans l'ensemble, ces traitements n'ont qu'un effet limité sur le taux de phénols des feuilles, alors que l'un d'eux au moins, le traitement par l'AOA, (inhibiteur notamment de la PAL), est considéré comme limitant très efficacement la biosynthèse de ces composés. Cette absence de réponse de la plante n'est pas liée à une inefficacité des traitements (produits non absorbés, dose ou fréquence d'application non adaptée...) puisque l'Arachide réagit ainsi qu'en témoigne la modification notable de certains facteurs de résistance. Il est plus vraisemblable, comme nous l'avons déjà souligné, que l'inefficacité ne soit qu'apparante dans la mesure où seule la biosynthèse de certaines substances (pas nécessairement majoritaires en regard du taux global de composés phénoliques présents dans la plante) serait

affectée par le traitement. Le "sens" de variation est celui auquel on s'attend: accroissement de la résistance après traitement par le TEPA et la prémunition, diminution dans le cas de l'application de l'AOA. Cette dernière réponse laisse supposer que des composés phénoliques sont bien impliqués dans la résistance de l'Arachide.

La littérature suggère deux modes d'action différents attribués au TEPA.

1. Une action indirecte (VO-THI-HAI *et al.*, 1979; BOMPEIX *et al.*, 1980; RAYNAL *et al.*, 1980; GUEST, 1984; KHAN *et RAVISE*, 1985) en stimulant les réactions de l'hôte.

2. Une action directe sur l'agent pathogène lui-même par inhibition de la croissance du champignon (COFFEY *et BOWER*, 1984; FENN *et COFFEY*, 1984; 1985).

Dans le cadre de nos études nous avons observé que les deux modes d'actions peuvent coexister lorsque le traitement est effectué par pulvérisation foliaire; en revanche, il est probable que seule l'action élicitrice ou stimulatrice des mécanismes de défense se manifeste (ou prédomine) en cas d'application au niveau des racines.

En ce qui concerne la prémunition, l'effet de ce phénomène est toujours variable sur la teneur en phénols totaux. Par contre, son effet sur les composantes de résistance est net. L'infection simultanée est moins efficace que l'infection différée. Cependant, les deux traitements conduisent à une augmentation de la résistance des plantes, quelles appartiennent à un génotype sensibles ou résistant, et témoignent donc d'un effet positif de la prémunition. Ceci implique que l'activité de l'agent pathogène est réduite par la prémunition. Ici encore divers mécanismes sont proposés pour expliquer l'effet de la prémunition:

Dans le cas du coton HILLOCKS (1986), estime que la prémunition induirait une occlusion vasculaire empêchant la

progression du champignon dans les vaisseaux. Chez la tomate, c'est une réaction de type hypersensible qui jouerait un rôle important dans la résistance des plantes prémunisées à l'infection par *Phytophthora infestans* (HELLER et GESSLER, 1986). Enfin, une nécrose du phloème extérieur est associée au phénomène de prémunition chez le tabac infecté par *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* (COHEN et KUC, 1981).

Le phénomène de prémunition est également observé chez les plantes atteintes de rouille [(YARWOOD, 1954, 1956; LITTLEFIELD, 1969; KOCHMAN et BROWN, 1975) cités par KUC, 1983]. D'après ces auteurs, il serait basé sur:

- l'émission de substances gazeuses produites par le non-pathogène et inhibant la germination des spores du pathogène proprement dit (YARWOOD, 1956).
- l'intervention d'une phytoalexine et un blocage mécanique (LITTLEFIELD, 1969) de la progression du parasite.
- le blocage du site de pénétration (KOCHMAN et BROWN, 1975).

Nous n'avons pas vérifié les mécanismes impliqués dans la prémunition dans le cas du couple Arachide-*P. arachidis*. Cet aspect mériterait d'être approfondi pour confirmer ou infirmer les mécanismes proposés.

Nous avons vu que les différents traitements n'avaient d'incidence que sur quelques uns des facteurs de résistance, et que la réponse d'un génotype résistant était plus vigoureuse que celle d'un génotype sensible. On était néanmoins en droit de se demander quelle importance réelle les variations enregistrées pouvaient revêtir au plan du développement d'une épiphytie.

Nous avons tenté de répondre à cette question à l'aide du modèle de simulation dynamique de la rouille de l'Arachide, mis au point au Laboratoire (SAVARY, 1986; 1987, soumis pour publication) et qui permet:

\* d'effectuer la synthèse des données épidémiologiques expérimentales

\* d'évaluer l'importance des différentes composantes de résistance (ZADOKS, 1972 a; PARLEVLIET, 1975) dans le développement des épiphyties (intensité globale cumulée).

VCLAT	VCIEFF	VCSPOP	Niveau de l'épidémie (% X jours)
1,33	0,75	0,75	0,815
		1	1,184
	1	0,75	1,182
		1	1,878
1	0,75	0,75	4,076
		1	6,602
	1	0,75	6,567
		1	9,192

Tableau 33: Résultat-type de l'application du modèle prenant en compte trois composantes de résistance (VCLAT: Période de Latence, VCIEFF: Efficacité des Infections, et VCSPOP: Intensité de la sporulation. Pour chacune des composantes deux niveaux ont été testés respectivement: 1 et 1,33 pour la période de latence, 1 et 0,75 pour les autres composantes. Pour la Période de latence la valeur  $x=1$  caractérise un génotype sensible (Local), les valeurs  $x>1$  (augmentation de la période de latence) caractérisent une augmentation de la résistance. L'inverse est vrai pour les deux autres composantes.

Le tableau 33 présente un résultat-type de l'application du modèle prenant en compte trois composantes de résistance: Efficacité des infections, Période de latence et Intensité de la sporulation. Pour chacune de ces composantes deux niveaux ont été testés respectivement: 1 et 1,33 pour la Période de latence, 1 et

0,75 pour les autres composantes, afin de déterminer l'effet d'une variation quantitative des composantes sur l'ampleur de l'épidémie. Pour la Période de latence la valeur  $x=1$  caractérise un génotype sensible (Local), les valeurs de  $x>1$  (augmentation du temps de latence) caractérisent une augmentation de la résistance. L'inverse est vrai pour les deux autres composantes. Le niveau de l'épidémie est exprimée en "Pourcentage X Jours".

Les résultats de la simulation proposée (tableau 33) montrent très clairement l'existence d'une hiérarchie dans l'importance des composantes de résistance en regard de leur effet sur les épidémies. Ainsi, un accroissement de 33% de la seule composante Période de latence induit une diminution de l'intensité cumulée de l'épidémie par un facteur 5; une diminution de 25% de la composante Efficacité des infections en provoque une réduction de 30 à 35% ...

Sur ces bases nous avons tenté d'interpréter en termes épidémiologiques les données expérimentales rassemblées dans le tableau 25. Les composantes de résistance évaluées dans le cadre de la présente étude (Période d'incubation, Période de latence, Fréquence d'infection et Diamètre des lésions) ne correspondant pas parfaitement avec celles prises en compte pour la construction du modèle de simulation, nous avons effectué les correspondances suivantes:

- \* Fréquence d'infection <--> Efficacité des infections
- \* Diamètre des lésions <--> Intensité de sporulation

Enfin, le modèle de simulation ne permettant pas de simuler un accroissement du niveau de sensibilité du génotype Local considéré comme représentatif d'un état de sensibilité maximal, nous avons arbitrairement considéré le motif "plante infectée et traitée par l'AOA" (cf. tableau 25) comme représentant cette situation pour le génotype considéré. Il en découle, par exemple, que le génotype Local infecté doit être considéré comme manifestant un niveau de résistance supérieur à celui de cette même variété ayant subie un traitement par l'AOA. Les valeurs des composantes de résistance correspondant à ce motif ont été notées

= 1 (à l'exception de la Période de latence de NC Ac 17090 notée 1,33) et les différentes autres valeurs ont été recalculées en conséquence. Le tableau 34 rassemble les données transformées de manière à les rendre interprétables par référence à celles du tableau 33.

Traitement	Prélèvement (A / B)	Local			NC Ac 17090		
		LP	IE	SP	LP	IE	SP
Inoculé + AOA	A	0,97	0,98	0,93	0,89	0,91	1,23
	B	1	1	1	1	1	1
Inoculé seul		0,94	<b>0,7</b>	0,85	0,9	<b>0,6</b>	1,14
Inoculé + TEPA	A	0,91	<b>0,81</b>	<b>0,69</b>	0,88	<b>0,38</b>	<b>0,76</b>
	B	0,89	<b>0,59</b>	<b>0,75</b>	0,88	<b>0,7</b>	<b>0,76</b>

Tableau 34: Données transformées à partir du tableau 25 pour permettre une correspondance avec les données du tableau 33. Les valeurs indiquées en caractères gras sont les seules dont l'écart (par rapport à 1) est considéré comme significatif. Prélèvements A: Arrêt traitement 5j, B: Arrêt traitement 10j, après infection artificielle.

L'interprétation tient également compte des restrictions suivantes que nous nous sommes imposées:

a) Les variations inférieures à 20% sont considérées comme non-significatives (variances élevées)

b) Les variations significatives, quelles que soit leur amplitude réelle, sont limitées à 25%.

Sur ces bases les résultats de la simulation indiquent clairement que l'AOA et le TEPA n'affectent significativement que les composantes Efficacité des infections et Intensité de la sporulation. Au plan quantitatif et par référence aux données de la simulation (tableau 33), l'intensité cumulée des épidémies a pu être évaluée pour les différentes situations testées et l'effet des différents traitements en a été déduit (tableau 35).

Génotype	Traitement	% intensité de l'épidémie	Variation (%) par rapport In + AOA	Variation (%) par rapport In (seul)
Local	In + AOA	9,19	-	(+) 40
	In (seul)	6,57	(-) 29	-
	In + TEPA	4,08	(-) 56	(-) 38
NC Ac 17090	In + AOA	1,88	-	(+) 59
	In (seul)	1,18	(-) 37	-
	In + TEPA	0,81	(-) 57	(-) 31

Tableau 35: Intensité cumulée de l'épidémie pour les différents traitements testés et variation par rapport aux traitements indiqués.

Ainsi, par rapport au traitement par l'AOA, l'absence de traitement et le traitement par le TEPA auraient théoriquement pour effet de réduire l'intensité cumulée des épidémies de 37% et 57% chez le génotype résistant (NC Ac 17090); de 29 et 56% chez le génotype sensible. Si l'on examine l'effet de l'AOA et du TEPA par rapport à la plante non-traitée (manière plus conformiste d'interpréter les résultats), il apparaît que le traitement par l'AOA induirait un accroissement de l'intensité de l'épidémie de 59% chez NC Ac 17090 et de 40% chez le génotype sensible; tandis que le traitement par le TEPA conduirait à une réduction de cette intensité de 31% et 38% environ respectivement chez NC Ac 17090 et Local. Ces estimations ne sont qu'indicatives; néanmoins, dans

la mesure où le modèle de simulation dynamique repose, pour la détermination des composantes de résistance et leur quantification, à la fois sur des données d'enquêtes et des données d'expérimentation, on peut estimer que cette hiérarchisation des effets est fiable.

D'une manière générale, une réduction de 30 à 50% de l'intensité cumulée d'une épidémie n'est pas négligeable pour un agriculteur, bien qu'il puisse espérer des résultats plus satisfaisants. Cependant, au-delà de ces données quantitatives illustrant l'effet potentiel de variations des composantes de résistance sur l'intensité d'une épidémie, ce sont les informations quant à la stratégie à adopter pour la réduire qui présentent le plus d'intérêt. Ainsi, l'accroissement de la Période de latence conduit à une réduction considérable de l'épidémie; la mise en oeuvre de techniques tendant à induire un tel accroissement semble donc *a priori* la plus "rentable". Néanmoins, une stratégie visant à agir simultanément sur les trois composantes les plus importantes donnerait également satisfaction. En effet, des variations, même modestes, du niveau de chacune d'entre elles entraînerait une réduction très appréciable de l'épidémie tout en évitant le risque inhérent à l'utilisation de résistances mono- ou oligogéniques (encore que chaque "composante de résistance" soit très vraisemblablement sous le contrôle d'un nombre élevé de gènes et qu'il puisse exister des corrélations entre certaines des composantes).

Dans le cadre de notre étude nous avons vu que la modulation des réactions de défense de l'Arachide est non seulement possible, mais encore qu'elle produit un effet sensible. Encore conviendrait-il, pour en augmenter l'efficacité, de mieux cibler cette intervention externe. En ce sens les recherches dans le but d'acquérir une connaissance plus approfondie des conditions d'élicitation et de stimulation de la biosynthèse des phytoalexines par la plante et des modalités d'action de ces substances en tant que facteurs de résistance devraient être poursuivies.

## CONCLUSION GENERALE

L'Arachide est une légumineuse d'importance capitale dans l'alimentation de très nombreuses populations des régions tropicales et constitue, pour certains pays, un facteur économique majeur. Cette plante est soumise à des pressions parasitaires dramatiques. Parmi les agents pathogènes, *Puccinia arachidis*, responsable de la rouille de l'Arachide, est sans doute le plus répandu et vraisemblablement le plus dommageable. D'où l'intérêt que suscite l'étude de cette maladie tant au niveau des pathologistes et des sélectionneurs qu'à celui des Services de Protection de cultures et ceci dans la plupart des pays des zones arachidières.

Des techniques de lutte existent; l'on connaît, notamment, des produits fongicides efficaces. Leur mise en oeuvre se heurte néanmoins à des difficultés liées soit aux habitudes de culture ancestrales des populations, soit surtout, à la rentabilité des traitements. Dans ce contexte la solution d'avenir semble reposer sur l'utilisation de variétés sélectionnées pour la résistance ou la tolérance à la rouille. Là encore des difficultés existent: choix des variétés (des sources de résistance) pour éviter une trop forte pression de sélection sur le parasite; éviter que la sélection variétale ne conduise à un accroissement de la sensibilité à d'autres maladies importantes (Cercosporioses, maladies d'origine virale)...

Pour le pathologiste et le sélectionneur il est donc fondamental de bien connaître les événements accompagnant la pathogénèse, en particulier ceux témoignant d'une réaction de la plante à l'agression parasitaire.

Chez les plantes les réactions de défense sont très variées; elles consistent, notamment, en l'édification de barrières mécaniques et de barrières chimiques. Dans le cas de l'Arachide quelques réactions ont déjà été décrites par le passé. Ces

connaissances résultent cependant davantage d'investigations ponctuelles ou sectorielles que d'une étude générale. C'est pourquoi nous avons, dans un premier temps, abordé des recherches sur une base relativement large afin de tenter d'acquérir une vue globale des phénomènes tout en sachant que ce type d'analyse ne saurait être exhaustif.

Les observations histo- et cytochimiques de tissus infectés, qu'ils soient prélevés sur des génotypes sensibles ou sur des génotypes résistants, ne permettent pas de mettre en évidence un renforcement net des parois cellulaires en réaction à l'attaque parasitaire. Dans quelques cas, néanmoins, de la callose semble s'accumuler. Par rapport à des tissus sains le taux de lignine et de subérine ne varie pas ou peu. Ces observations devront cependant être complétées par des dosages chimiques et/ou enzymatiques de ces polymères, ainsi que par une analyse de leur composition monomérique.

Des variations au niveau des pools protéiques et phénoliques ont été enregistrées, toutefois sans que l'on puisse les relier directement au niveau de résistance des différents génotypes étudiés. Cette absence de corrélation pourrait résulter du fait que l'approche réalisée est trop globale.

Cette hypothèse est confortée par les résultats d'analyses en CLHP d'extraits de tissus qui révèlent des modifications importantes, qualitatives et quantitatives, de fractions caractéristiques (désignées par  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , correspondant à des éluions, sur colonne de silice, par des systèmes de solvants de polarité croissante). En effet, la comparaison entre les diagrammes d'éluion d'extraits de feuilles de génotypes sensibles et de génotypes résistants (sains et parasités) indique que certaines des variations enregistrées pourraient être corrélées d'une part avec le niveau de résistance de la plante, d'autre part avec une réaction à l'attaque parasitaire. Ces différentes fractions sont elles-mêmes complexes. Le nombre et l'intensité des "pics" qui les composent sont variables et certains d'entre eux semblent liés aux capacités de réponse de l'hôte.

Sans doute conviendrait-il d'affiner davantage encore les techniques analytiques et d'effectuer des investigations au niveau moléculaire. Une telle démarche conduirait vraisemblablement à l'obtention de résultats plus aisément interprétables.

Une approche similaire a été réalisée pour l'étude des peroxydases en relation avec les caractéristiques génotypiques des plantes et leur réaction à l'infection. La séparation en électrophorèse a révélé des modifications au niveau des spectres isoenzymatiques suivant les différents motifs expérimentaux (tissus sains - tissus parasités, génotypes sensibles - génotypes résistants). Ces modifications, quantitatives et qualitatives, semblent cependant mineures par rapport à celles enregistrées pour d'autres couples hôte-parasite.

Parmi les réactions des plantes à l'agression parasitaire, l'élaboration de certaines substances, les phytoalexines, toxiques pour l'agent pathogène, est considérée comme un événement important dans la pathogénèse. Nous avons donc accordé une attention particulière à cet aspect des relations hôte-parasite.

Les extraits de tissus parasités présentent une activité fongitoxique variable suivant le génotype et le temps d'infection. Une telle activité est également décelée, fréquemment, dans les tissus sains. Cette observation soulève un problème de "terminologie" étant donné que le terme "phytoalexine" devrait être réservé à la dénomination générique des substances élicitées suite à l'attaque parasitaire. La présence de substances fongitoxiques dans des tissus sains implique que ces composés sont préformés ou bien que les plantes-témoin ne sont pas réellement saines. Cette dernière hypothèse n'est pas purement académique dans la mesure où nous avons montré qu'un stress, l'abscission des feuilles, provoque l'accumulation de tels composés dans les tissus, ceci en l'absence d'infection. Ce résultat a, par ailleurs, pour corolaire l'obligation de s'adresser à du matériel végétal infecté "sur pied" si l'on veut étudier le seul effet du parasite sur les événements accompagnant la pathogénèse.

Le fait que la durée de mise en survie accentue la production de phytoalexines sans pour autant modifier les composantes de résistance dans le sens d'une plus grande résistance des feuilles (on enregistre, au contraire, une augmentation de leur sensibilité) soulève une autre question importante: dans le cas de l'Arachide les phytoalexines jouent-elles réellement un rôle dans la pathogénèse? La réponse n'est pas immédiate: le seuil d'efficacité de ces composés peut ne pas être atteint; le stress dû au détachement peut entraîner des perturbations métaboliques tendant à un accroissement de la sensibilité de la feuille, accroissement non compensé par l'augmentation de la production de produits fongitoxiques... Néanmoins, l'observation selon laquelle les extraits de feuilles de variétés hautement résistantes ou immunes présentent une fongitoxicité très supérieure à celle des autres génotypes semble indiquer qu'il existe bien une corrélation positive entre production de phytoalexines et résistance. Notons enfin qu'une augmentation de la toxicité, même modeste mais précoce, est plus efficace pour contenir l'évolution de l'infection qu'une stimulation importante mais tardive.

Ces investigations, menées à un niveau très global présentaient l'inconvénient majeur de masquer, potentiellement, des variations individuelles de la production de chaque composé toxique (à supposer que le niveau global de la toxicité résulte de l'action conjuguée, éventuellement synergique, de deux ou plusieurs substances). Il s'avérait donc indispensable de poursuivre cette étude dans deux directions complémentaires: identification des substances fongitoxiques et cinétique de la production de chacune d'entre elles (en relation, notamment avec le niveau de résistance des génotypes et le déroulement de la pathogénèse).

Nous n'avons abordé que le premier aspect de ce travail en tentant d'isoler les différentes phytoalexines élaborées par l'Arachide. Une étude préliminaire consistant en une analyse des extraits de tissus foliaires par chromatographie en couche mince sur plaque de silice (CCM) avait en effet mis en évidence l'existence d'au moins six composés toxiques envers *Cladosporium cladosporioides*, champignon communément utilisé pour effectuer le test biologique. La mise en oeuvre de techniques préparatives pour

la purification de telles substances (colonne "atmosphérique" de silice, séparation par CLHP sur support de silice ou de silice greffée en C<sub>18</sub>) a conduit à l'isolement, avec un degré de pureté suffisant, d'une quinzaine de molécules. La structure d'une dizaine d'entre elles a pu être déterminée par des spécialistes de la chimie structurale. Quelques unes de ces molécules ont été identifiées pour la première fois chez l'Arachide (linoléate de méthyle, dérivés diéniques d'acides gras hydroxylés, nonylphénols, alkyl bis phenyl éthers...) d'autres correspondent à des substances identifiées préalablement par d'autres chercheurs (médicarpine, hydroxystilbènes). Parmi ces substances certaines ne présentent pas de toxicité, d'autres, au contraire, inhibent non seulement le développement du *Cladosporium cladosporioides* mais également celui de *Puccinia arachidis*: germination des spores et croissance du tube germinatif. Il en est ainsi pour le linoléate de méthyle et l'hydroxy-13 octadécadien-9,11 oate de méthyle dont la toxicité est très élevée. La toxicité d'autres substances a été éprouvée sur *Phytophthora*; vue les caractéristiques générales des phytoalexines, elle devrait également s'exercer à l'encontre de *P. arachidis*. Les tests devront néanmoins être poursuivis pour l'ensemble des composés identifiés.

Au-delà de l'intérêt intrinsèque d'identifier des molécules synthétisées par l'Arachide, ces résultats sont très précieux dans le cadre de l'étude des interactions Arachide-*P. arachidis*. Ils permettront en effet de suivre la production de chacune des substances au cours de la pathogénèse et en fonction du niveau de résistance des génotypes. Cette démarche devrait apporter une réponse claire quant à leur intervention effective parmi les mécanismes de résistance de la plante.

Une manière de vérifier cette participation consiste à modifier la biosynthèse des substances supposées actives et d'en observer l'effet sur le déroulement de l'infection. La première étape a été de rechercher l'effet de deux composés chimiques, l'acide  $\alpha$ -aminoxy acétique (AOA) et le tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium (TEPA), et celui de la prémuniton (à l'aide de

*Puccinia sorghi*, parasite du maïs mais non de l'Arachide) sur les composantes de résistance de différentes variétés d'Arachide. Bien que l'action de l'AOA sur le métabolisme des plantes soit complexe, ce produit est principalement connu pour inhiber compétitivement la PAL, enzyme-clef de la chaîne de biosynthèse de nombreux composés phénoliques dérivant de la série cinnamique. Le TEPA est un produit fongicide possédant, en outre, la propriété de stimuler les mécanismes de défense des plantes. Enfin la prémunition conduit également à la stimulation de ces mécanismes.

De façon très générale, la réponse de l'arachide à ces traitements est conforme à la théorie: diminution de la résistance des feuilles traitées par l'AOA (d'où une très forte présomption en faveur de l'intervention de certains types de composés phénoliques dans les mécanismes de résistance), augmentation de la résistance de celles traitées par le TEPA et par *P. sorghi*. Ces résultats sont importants car ils démontrent clairement, s'il le fallait encore, l'aptitude de l'Arachide à répondre positivement à des stimuli. Dans les cas expérimentés, les réponses se traduisent essentiellement par la modification de deux des composantes de résistance: Fréquence d'infection et Diamètre des lésions. Bien que les modifications paraissent *a priori* modestes, la simulation de leur effet sur l'intensité cumulée des épidémies (à l'aide du modèle de simulation dynamique des épiphyties de rouille de l'Arachide mis au point au laboratoire par S.SAVARY) montre que leur amplitude est suffisante pour, théoriquement, accroître (traitement par l'AOA) ou diminuer (traitement par le TEPA) cette intensité de 30 à 50% environ.

En nous cantonnant strictement dans le cadre de nos recherches, la possibilité, ainsi démontrée, de moduler artificiellement le niveau de résistance de l'Arachide laisse augurer favorablement de la possibilité d'identifier des composés - dérivés phénoliques, phytoalexines, polymères divers - dont la biosynthèse est modulée en parallèle; ces composés seraient donc potentiellement impliqués dans la pathogénèse.

Ce type d'investigation devrait en conséquence être poursuivi; il pourrait conduire à l'élaboration de techniques visant à stimuler les mécanismes de défense de l'Arachide contre l'un de ses principaux adversaires, *Puccinia arachidis*, ou même plus généralement contre l'ensemble de ses parasites. Enfin, des phytoalexines pourraient servir de marqueurs à prendre en compte au niveau des opérations de tri variétal.



## RESUME

*Puccinia arachidis* Speg., agent de la rouille de l'Arachide (*Arachis hypogaea* L.) est un parasite foliaire majeur, sévissant dans de nombreuses régions arachidières du monde. Les recherches que nous avons menées sur les réactions de la plante à l'agression parasitaire révèlent qu'à l'échelle cellulaire les mécanismes de résistance ne semblent pas reposer sur un renforcement des parois (lignification par exemple).

Au plan biochimique on ne note qu'une faible stimulation de l'activité peroxydasique lors de l'infection; par ailleurs les variations quantitatives en protéines et en composés phénoliques sont réduites et ne paraissent pas corrélées aux niveaux de résistance des différents génotypes cultivés. Le pool phénolique de ces derniers est cependant très inférieur à celui des espèces sauvages hautement résistantes ou immunes.

L'Arachide synthétise une dizaine de composés fongitoxiques. Parmi ceux-ci figurent des acides gras insaturés, leurs dérivés oxygénés, un composé de structure alyphatique, des nonyl phénols, des alkyl bis phényl éthers, des hydroxystilbènes et des ptérocarpanes (médicarpine). La structure chimique de la plupart d'entre eux a été déterminée.

Ces substances semblent être préformées chez les génotypes résistants, leur biosynthèse est cependant stimulée par l'infection. Une telle stimulation se manifeste également chez les génotypes sensibles; elle est plus tardive et d'amplitude plus réduite que chez les génotypes résistants. L'abscission des feuilles, ainsi que leur mise en survie provoque l'accumulation de produits fongitoxiques sans pour autant conduire à un accroissement du niveau de résistance de ce matériel végétal, suggérant l'intervention de plusieurs types de facteurs dans la résistance à *P. arachidis*.

Enfin les réactions de défense de l'Arachide peuvent être modulées par l'application de substances chimiques ou par une inoculation préalable par un agent non pathogène (prémunition). De tels traitements se répercutent au niveau des composantes de résistance. Leur utilisation pourrait contribuer à élucider les mécanismes physiologiques et biochimiques impliqués.

Mots clés: Réaction de defense, Phytoalexines, Mécanismes de la résistance, Prémunition, TEPA, AOA, *Puccinia arachidis* Speg., *Arachis hypogaea* L.

## SUMMARY

*Puccinia arachidis* Speg., causal agent of rust disease of groundnut (*Arachis hypogaea* L.), is a major foliar pathogen in most of the groundnut producing areas in the world. Studies have been made of groundnut-rust interactions and their modulation by means of chemical or biological agents.

The results obtained indicate that at the cellular level the mechanisms of resistance do not involve cell-wall reinforcement, while at molecular level, infection stimulates peroxidase activity only to modest levels. Quantitative differences observed among various genotypes (cultivated) in their protein and total phenolic contents do not seem to correlate with their resistance levels; however their total phenolic content was far less than that of the wild species (highly resistant or immune).

Groundnut plants produce at least ten antifungal compounds in response to infection; these include unsaturated fatty acids, their oxygenated derivatives, an aliphatic compound, nonyl phenols, alkyl bis phenyl ethers, hydroxystilbenes and pterocarpan (medicarpin). The chemical structure of most of these compounds has been determined. These compounds seem to be preformed in resistant genotypes and their biosynthesis is stimulated by infection. Such a stimulatory response does exist in susceptible genotypes, but is of smaller amplitude and is usually delayed. Leaf detachment and its survival away from the plant favour accumulation of antifungal compounds. Nevertheless, such a response does not seem to contribute towards an increase in resistance levels, suggesting the involvement of other factors in the resistance mechanisms against *P. arachidis*.

It was found that the defence reactions of the groundnut plant could be modulated either by the application of chemical compounds (Fosetyl-Al and AOA) or by cross-protection techniques. Such treatments showed an effect on some components of resistance leading to significant reductions in build-up of epidemics. The investigation of such modulations would contribute to the elucidation of physiological and biochemical mechanisms involved in host resistance.

Additional key words: Defence reactions, Phytoalexins, Resistance mechanisms, Fosetyl-Al, AOA, Cross-protection, *Puccinia arachidis* Speg., *Arachis hypogaea* L.,

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGUAMAH, G.E., P. LANGCAKE, D.P. LEWORTHY, J.A. PAGE, R.J. PRYCE, and R.N. STRANGE, 1981. Two novel stilbene phytoalexins from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* 20 (6) : 1381-1383.
- ALLEN, P.J. 1942. Changes in the metabolism of wheat leaves induced by infection with powdery mildew. *Amer. J. Bot.* 29 : 425-435.
- ARTHUR, J.C. 1934. Manual of the Rusts in the United States and Canada. **Purdue Res. Foundation, La Fayette, Indiana, 438 pp.**
- ASADA, Y. 1978. Lignin induction in plant storage tissues with infection or injury. A pamphlet for the 3rd Int. Congress of Plant Pathology, München.
- BAILEY, J.A. and J.W. MANSFIELD (Eds.). 1982. Phytoalexins **Blackie, London, 334 pp.**
- BARRETT, R.E. and J.H. McLAUGHLIN. 1964. Electrophoretic and chromatographic analysis of protein extracts of wheat seedlings. *J. Agr. Food. Chem.* 2 : 1026-1029.
- BATEMAN, D. F. 1964. An induced mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in *Rhizoctonia* - induced hypocotyls of bean. *Phytopathology* 54 : 438-445.
- BOMPEIX, G. et J.F. BOUSQUET. 1974. Les composés phénoliques dans la résistance des pommes à l'infection par les *Pezicula malicorticis* et *P. alba*. *Fruits*, 29 : 693-696.
- BOMPEIX, G., A. RAVISE, G. RAYNAL, F. FETTOUCHE, et M.C. DURAND. 1980. Modalités de l'obtention des nécroses bloquantes sur feuilles détachées de tomate par l'action du Tris-0-Ethyl phosphonate d'aluminium (phoséthyl d'aluminium), hypothèses sur son mode d'action *in vivo*. *Ann. Phytopathol.* 12 (4) : 337-351.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapide and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 : 248-254.
- BRAUNER, A., H. BUDZIKIEWICZ and W. BOLAND, 1982: Studies in chemical ionisation mass spectrometry. V - Localization of homoconjugated triene and tetraene units in aliphatic compounds. *Org. Mass Spectrom.* 17, 161-164.
- BUSHUK, W., and C.W. WRIGLEY. 1971. Effects of rust infection on Marquis wheat grain proteins. *Phytochemistry* 10 : 2975-2978.
- CHATTOPADHYAY, S.B., and A.K. BERA . 1980. Phenols and polyphenol oxidase activity in rice leaves infected with *Helminthosporium oryzae*. *Phytopath. Z.* 98 : 59-63.
- CHERRY, J.P., Y.M. RUTH and R.L. ORY. 1974. Proteins and enzymes from seeds of *Arachis hypogaea* L. IX. Electrophoretically detected changes in 15 peanut cultivars grown in different areas after inoculation with *Aspergillus parasiticus*. *Physiological Plant Pathology* 4 : 425-434.
- CHESTER, K.S. 1946. The cereal rusts. **Chronica Botanica Co., WALTHAM, Mass., U.S.A., 269 pp.**
- COFFEY, M.D., and L.A. BOWER 1984. *In vitro* variability among isolates of eight *Phytophthora* species in response to posporous acid. *Phytopathology* 74: 738-742.

- COFFEY, M. D., and D.S.M. CASSIDY 1984. Peroxidase activity and induced lignification in rusted flax interactions varying in their degree of incompatibility. *Canadian Journal of Botany* 62 : 134-141.
- COHEN, Y., and J. KUC. 1981. Evaluation of systemic resistance to blue mold induced in tobacco leaves by prior stem inoculation with *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. *Phytopathology* 71: 783-787.
- COHEN, Y., S. PEER, O. BALASS, and M.D. COFFEY, 1987. A fluorescent technique for studying growth of *Peronospora tabacina* on leaf surfaces. *Phytopathology* 77 : 201-204.
- COOK, M. 1980 a. Host parasite relations in uredial infections of peanut by *Puccinia arachidis*. *Phytopathology* 70 : 822-826.
- COOK, M. 1980 b. Peanut leaf wettability and susceptibility to infection by *Puccinia arachidis*. *Phytopathology* 70 : 826-830.
- CRUICKSHANK, I.A.M. and D.R. PERRIN. 1963. Phytoalexins from the Leguminosae. Phaseollin from *Phaseolus vulgaris* L. *Life Sci.*: 680-682.
- DAGNELIE, P. 1975. Théorie et méthodes statistiques Vol. 2. Les Presses Agronomiques de Gembloux, A.S.B.L. Avenue de la faculté, 22 - 5800 Gembloux (Belgique).
- DALY, J.M. 1976. Specific interactions involving hormonal and other changes in : Specificity in Plant Diseases : R.K.S. WOOD and A. GRANITE (Eds.). Plenum Press, New York, 151-167.
- DALY, J.M., A.A. BELL and L.R. KRUPKA. 1961. Respiratory changes during development of rust diseases. *Phytopathology* 51 : 461-471.
- DARGENT, R., et A. TOUZE. 1974. Etude cinétique, en microscopie électronique, des interactions entre *Colletotrichum lagenarium* et les cellules foliaires de *Cucumis melo*. *Can. J. Bot.* 52 (6) : 1319-1323.
- DAWSON, R.M.C. *et al.*, 1969. Data for Biochemical Research. Oxford Press 560 pp.
- DUFFAULT, J.M. 1987. Synthèse de phytoalexines et analogues structuraux du palmier à huile. DEA de Chimie Organique, Université de Paris Sud, Centre d'Orsay.
- EINHORN, J. J.M. DUFFAULT, H. VIRELIZIER and J.C. TABET. 1987 a. Gas phase ion-molecular reactions of unsaturated hydroxy-fatty acid derivatives and analogs. 5<sup>th</sup> European Symposium on Organic Chemistry, Jerusalem, 30 Aug. - 2 Sept. 1987.
- EINHORN, J. J.M. DUFFAULT, H. VIRELIZIER and J.C. TABET. 1987 b. Réactions des éthers de vinyle sur les dérivés oxygénés d'acides gras polyinsaturés. 6<sup>e</sup> Congrès de Spectrométrie de Masse, Strasbourg, 15-17 Sept. 1987.
- EKBOTE, A.U. and C.D. MAYEE. 1984. Biochemical changes due to rust in resistant and susceptible Groundnuts I. Changes in oxidative enzymes. *Ind. J. Plant Pathol.* 2 (1) : 21-26.
- F.A.O. 1978. *Production Year Book* 32 : 124.
- FARKAS, G.L. and Z. KIRALY. 1958. Enzymological aspects of plant disease. I. Oxidative enzymes. *Phytopath. Z.* 31 : 251-272.
- FEHRMANN, H and A.E. DIMOND. 1967. Peroxidase activity and *Phytophthora* resistance in different organs of the potato plant. *Phytopathology* 57 : 69-72.

- FENN, M.E., and M.D. COFFEY. 1984. Studies on the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology* 74: 606-611.
- FENN, M.E., and M.D. COFFEY. 1985. Further evidence for the direct mode of action of fosetyl-al and phosphorous acid. *Phytopathology* 75 : 1064-1068.
- FRIEND, J. 1981. Plant Phenolics, Lignification and Plant Disease. *Prog. Phytochem.* 2 : 197-261.
- GEIGER, J.P. 1985. Aspects physiologiques et biochimiques des interactions hôte-parasite dans le cas d'*Hevea brasiliensis* et de deux parasites racinaires: *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius*. Thèse de Docteur ès Sciences, Université Louis Pasteur de Strasbourg. 207 pp.
- GEIGER, J.P., M. NICOLE, D. NANDRIS and B. RIO. 1985. The aggression of *Hevea brasiliensis* by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius* : some biochemical events. *Eur. J. For. Path.* 15 : 316-319.
- GEIGER, J.P., M. NICOLE, D. NANDRIS and B. RIO. 1986. Root rot diseases of *Hevea brasiliensis* . I. Physiological and biochemical aspects of host aggression. *Eur. J. For. Path.* 16 : 22-37.
- GIBBONS, R.W. 1980. Groundnut Improvement Research Technology for the Semi-Arid Tropics. Pages 27-37. In : *Proc. Int. Symp. Devt. and Transfer of Technology for Rainfed Agriculture and the SAT Farmer, 28 August - 1 Sept. 1979. Intl. Crops Res. Inst. for the Semi-Arid Tropics Patancheru, A.P. 502 324, India.*
- GILLIER, P. et P. SILVESTRE. 1969. L'arachide. G.-P. Maisonneuve & Larose, Paris, 292 pp.
- GLAZENER, J.A. 1982. Accumulation of phenolic compounds in cells and formation of lignin-like polymers in cell walls of young tomato fruits after inoculation with *Botsytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* 20 : 11-25.
- GUEST, D.I. 1984. Modification of defense responses in tobacco and capsicum following treatment with Fosetyl-Al [(Aluminium tris (O-ethyl phosphonate)]. *Physiological Plant Pathology* 25: 125-124.
- GUPTA, P.P., S.K. GUPTA, C.D. KAUSHIK and T.P. YADAVA. 1985. Biochemical changes in leaf surface washings of groundnut due to tikka disease *Cercosporidium personatum* . *Indian Phytopath.* 38 : 339-340.
- GRZELINSKA, A. 1970. Peroxidase isoenzyme in *Fusarium* infected tomato plants. *Phytopath. Z.* 69 : 212-222.
- HALL, J.L. 1978. Electron microscopy and cytochemistry of plant cells. Ed. by Hall, J.L. Biochemical Press, Amsterdam.
- HAMMERSCHMIDT, R., E.M. NUCKLES, and J. KUC 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology* 20 : 73-82.
- HEATH, M.C. 1971. Haustorial Sheath Formation in Cowpea Leaves Immune to Rust Infection. *Phytopathology* 61 : 383-388.
- HEATH, M.C. 1972. Ultrastructure of host reactions to cowpea rust. *Phytopathology* 62: 27-38.
- HEATH, M.C. 1981. Resistance of plants to rust infection. *Phytopathology* 71 : 971-974.

- HEATH, M.C. and M.A. STUMPF. 1986. Ultrastructural observations of penetration sites of the cowpea rust fungus in untreated and silicon-depleted French bean cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 29 : 27-39.
- HEITFUSS, R. 1980. General review of active defense mechanisms in plants against pathogens. In : *Active defense mechanisms in plants*. R.K.S. WOOD (Ed.,) Plenum Press, London, 381 pp.
- HELLER, W.E., and C. GESSLER. 1986. Induced systemic resistance in tomato plants against *Phytophthora infestans*. *J. Phytopathology* 116 : 323-328.
- HIGGINS, B.B. 1951. Origin and early history of the peanut. In : "The Peanut, the unpredictable Legume". A symposium, Washington. The NAT. FERT. ASSOC. : 18-28.
- HIJWEGEN, T. 1973. Autonomous and induced pterocarpanoid formation in the Leguminosae. *Phytochemistry* 12 : 375-380.
- HILLOCKS, R.J. 1986. Cross-protection between strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* and its effect on vascular resistance mechanisms. *J. Phytopathology* 117: 216-225.
- HILU, H.M. 1965. Host-pathogen relationships of *Puccinia sorghi* in nearly isogenic resistant and susceptible seedling Corn. *Phytopathology* 55 : 563-569.
- HINMAN, R.L. and J. LANG. 1965. Peroxydase catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochemistry*, 4 : 144-158.
- HISLOP, E.C. and M.A. STAHMANN. 1971. Peroxidase and ethylene production by barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological Plant Pathology* 1 : 297-312.
- INGHAM, J.L. 1976. 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnut (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry* 15 : 1791-1793.
- INGHAM, J.L. and DEWICK, P.M. 1978. G-Demethyl vignafuran as a phytoalexin of *Tetragonolobus maritimus*. *Phytochemistry* 17 : 535-538.
- INGHAM, J.L. 1982. Phytoalexins from the Leguminosae. In : *Phytoalexins*. J.A. BAILEY and J.W. MANSFIELD (Eds.). Blackie, Glasgow and London : 21- 80.
- I.R.H.O./DAO. 1984. Priorités en matière de cultures vivrières et alimentaires. L'arachide. *Rapport Nov. 1984*, 16 pp.
- I.R.H.O./CIRAD. 1986. Intérêt de l'arachide. *Rapport Nov. 1986*, 4 pp.
- JACKSON, C.R. and D.K. BELL. 1969. Diseases of Peanut (Groundnut) Caused by Fungi. Univ. of Georgia. College of Agriculture, Experiment Station, *Research Bulletin* 56, 137 pp.
- JOHNSON, L.B., B.L. BRANNAMAN, AND F.P. JR. ZSCHEILE, 1966. Protein and enzyme changes in barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Phytopathology* 56 : 1405-1410.
- JOHNSON, L.B., B.L. BRANNAMAN and F.P. JR. ZSCHEILE, 1968. Protein changes in wheat leaves following infection with *Puccinia recondita*. *Phytopathology* 58 : 578-583.
- JOHNSON, L.B. and B.A. CUNNINGHAM, 1972. Peroxidase activity in healthy and rust infected wheat leaves. *Phytochemistry*, 11 : 547-551.

- JOHNSON, M. and T. THEANDER. 1974. Changes in sapwood of roots of Norway spruce, attacked by *Fomes annosus*. Part I. *Physiol. Plant.*, **30** : 218-225.
- KEEN, N.T. 1979. The possible association of phytoalexins with resistance expression in flax to *Melampsora lini*. *Physiological Plant Pathology* **14**: 265-280.
- KEEN, N.T. 1986. Phytoalexins and their involvement in plant disease resistance. *Iowa State Journal of Research* **60** (4) : 477-499.
- KEEN, N.T., and J.L. INGHAM, 1976. New stilbene phytoalexins from American cultivars of *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* **15**: 1794-1795.
- KEEN, N.T., J.J. SIMS, D.C. ERWIN, E. RICE and J.E. PATRIDGE. 1971. 6- $\alpha$  hydroxyphaseollin, an antifungal chemical induced in soybean hypocotyls by *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology* **61** : 1084-1089.
- KESSEMAN, H. and W. BARZ, 1986. Elicitation and suppression of phytoalexin and isoflavone accumulation in cotyledons of *Cicer arietinum* L. as caused by wounding and by polymeric components from the fungus *Ascochyta rabei*. *J. Phytopathology* **117** : 321-335.
- KHAN, A.J and A. RAVISE 1985. Stimulation of defence reactions in Citrus by Fosetyl-Al and fungal elicitors against *Phytophthora* sp. *Communication au colloque commémoratif centenaire de la bouillie bordelaise, du 5.9.1985 au 7.9.1985, Bordeaux, France.*
- KOCHMAN, J., and J. BROWN, 1975. Studies on the mechanism of cross-protection in cereal rusts. *Physiological Plant Pathology* **6**: 19-27.
- KOSUGE, T. 1969. The role of phenolics in host response to infection. *Ann. Rev. Phytopathology* : 195-222.
- KOUNOH, H., and H. ISHIZAKI. 1976. Accumulation of chemical elements around the penetration sites of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* on barley leaf epidermis (III): micromanipulation and X-ray analysis of silicon. *Physiological Plant Pathology* **8** : 91-96.
- KUC, J. 1983. Induced systemic resistance in plants to diseases caused by fungi and bacteria. In : *The Dynamics of Host Defence*. J.A. Bailey and B.J. Deverall (Eds.) Academic Press, Australia : 191-221.
- KUC, J and J.S. RUSH 1985. Phytoalexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **236**(2): 455-472.
- KUROSAKI, F., M. AMIN, and A. NISHI. 1986. Induction of phytoalexin production and accumulation of phenolic compounds in cultured carrot cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **28**: 359-370.
- LEATH, K.T. and J.B. ROWELL. 1966. Histological study of the resistance of *Zea mays* to *Puccinia graminis*. *Phytopathology* **56** : 1305-1309.
- LEATH, K.T. and J.B. ROWELL. 1969. Thickening of corn mesophyll cell walls in response to invasion by *Puccinia graminis*. *Phytopathology* **59** : 1654-1656.
- LEATH, K.T and J.B. ROWELL, 1970. Nutritional factors in the resistance of *Zea mays* to *Puccinia graminis*. *Phytopathology* **60**: 1097-1100.
- LE GRAND, M., B. FRITIG, and L. HIRTH. 1976. Enzymes of the phenyl propanoid pathway and the necrotic reaction of hypersensitive tobacco to tobacco mosaic virus. *Phytochemistry*, **15** (9): 1353-1360.

- LITTLEFIELD, L.J. 1969. Flax rust resistance induced by prior inoculation with an avirulent race of *Melampsora lini*. *Phytopathology* 59: 1323-1328.
- LUFT, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Bioph. Biochem. Cytol.* 9: 409-414.
- MACKO, V., W. WOODBURY, and M.A. STAHMANN. 1968. The effect of peroxidase on the germination and growth of Mycelium of *P. graminis* f.sp. *tritici*. *Phytopathology* 58: 1250-1254.
- MANSFIELD, J.W. 1982. The role of phytoalexins in disease resistance. In: *Phytoalexins* J.A. BAILEY and J.W. MANSFIELD (Eds.), Blackie, London: 253-288.
- MASSALA, R., M. LEGRAND, and B. FRITIG. 1980. Effect of  $\alpha$ -aminoxyacetate, a competitive inhibitor of phenylalanine ammonialyase, on the hypersensitive resistance of tobacco mosaic virus. *Physiological Plant Pathology* 16 : 213-226.
- MAYAMA, S., Y. MATSUURA, H. IIDA and T. TANI. 1982. The role of avenalumin in the resistance of oat to crown rust, *Puccinia coronata* f.sp. *avenae*. *Physiological Plant Pathology* 20 : 189-199.
- MAYEE, C.D. 1982. Groundnut rust: a review. *Indian Botanical Reporter* 1 (2) : 75-83.
- MAYEE, C.D., and A.U. EKBOTE. 1983. Life cycle and Microepidemiology of *Puccinia arachidis* Speg. : Rust of groundnut in Maharashtra. *Indian J. Plant Pathol.* 1(1) : 62-67.
- MAYEE, C.D. and BAHETI, K.G. 1983. Influence of tridormoph of epidemic development of rust and yield of groundnut. *Trop. Plant Sci. Res.* 1(4): 319-324.
- MCDONALD, D., and A.M. EMECHEBE, 1978. Occurrence of and preliminary survey of peanut rust in Nigeria. *Pl. Dis. Rep.* 62 : 5-8.
- MCDONALD, D. 1984. The ICRISAT Groundnut Program. *Proceedings of the Regional Groundnut workshop for Southern Africa, 26-29 March 1984, Lilongwe, Malawi. ICRISAT (International Crops Research Institute for the semi-arid Tropics). Patancheru, A.P., 502 324, India.*
- MCLEAN, R.J. 1979. Histological studies of resistance to soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. *Aust. J. Agric. Res.* 30 : 77-84.
- MINISTERE DE L'AGRICULTURE DE LA COTE D'IVOIRE. 1975. *Recensement National de l'Agriculture. t.2 : 258 pp.*
- MOLTALBINI, P., and B.B. BUCHANAN. 1974. Effect of rust infection on photophosphorylation by isolated chloroplasts. *Physiological Plant Pathology* 4 : 191-196.
- NARAYANASWAMY, P., and A. MAHADEVAN, 1983 a. Phytoalexin production by groundnut. *International Journal of Tropical Plant Diseases* 1(2) : 163-170.
- NARAYANASWAMY, P., and A. MAHADEVAN. 1983 b. Isolation of phytoalexins from germinating seeds of groundnut (*A. hypogaea*). *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 18 (1/3): 33-36.
- NICKS, R.E. 1986. Failure of haustorial development as a factor in slow growth and development of *Puccinia hordei* in partially resistant barley seedlings. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 28 : 309-322.

- NICKS, R.E. 1983. Histology of the relation between minor and major genes for resistance of barley to leaf rust. **Phytopathology** **73** : 55-59.
- NICOLE, M. 1984. Approches Biologiques et Ultrastructurales des modalités du parasitisme de *Rigidoporus lignosus* et *Phellinus noxius* sur *Hevea brasiliensis*. Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université Paul Sabatier de Toulouse. 177 pp.
- O'BRIEN, R.G. 1977. Observations on the development of groundnut rust in Australia. **PANS** **23**: 297-299.
- OHGUCHI, T. and Y. ASADA. 1975. Dehydrogenation polymerization products of p-hydroxycinnamyl alcohols by isoperoxydases obtained from downy mildew infected root of japanese radish (*Raphanus sativus*). **Physiological Plant Pathology** **5** : 183-192.
- OHGUCHI, T., Y. YAMASHITA, and Y. ASADA. 1974. Isoperoxydase of japanese radish root infected by downy mildew fungus. **Ann. Phytopathol. Soc. Japan**, **40** (5) : 419-426.
- PARLEVLIET, J.E. 1975. Partial resistance of barley to leafrust, *Puccinia hordei*. I. Effect of cultivar and development stage on latent period. **Euphytica** **24** : 21-27.
- PATIL, M.B., P.V. WANI, and G.D. PATIL. 1979. Evaluation of fungicides for the control of groundnut leaf rust (*Puccinia arachidis* Speg.). **Pesticides** **13** (3) : 24-25.
- PAXTON, J.D. 1981. Phytoalexins - A working redefinition. **Phytopath. Z.** **101** : 106-109.
- PERRIN, D.R., and W. BOTTOMLEY. 1962. Studies on phytoalexins. V. The structure of pisalin from *Pisum sativum* L. **J. Amer. Chem. Soc.**, **84** : 1919-1922.
- PRESON, N. W., K. CHAMBERLAIN, and R.A. SKIPP. 1975. A 2-Arylbenzofuran phytoalexin from cowpea (*Vigna unguiculata*). **Phytochemistry** **14**: 1843.
- RAMAGOPAL, G., and P. SREENIVASULU. 1983. Effect of rust infection on lipid composition in leaves of groundnut. **Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae** **18** (4) : 255-260.
- RAVISE, A., et B. TRIQUE. 1972. Réactions phénoliques et production de phytoalexines chez des plantules de *Lycopersicum* Mill. infectées par des souches de *Phytophthora* de Bary. **C.R. Acad. Sc. Paris**, t. **274** : 1505-1508.
- RAVISE, A., G. BOMPEIX, F. FETTOUCHE et M.C. DURAND. 1981. Stimulation des réactions de défense de la tomate aux *Phytophthora* sp. par le tris-O-éthyle phosphanate d'aluminium. **Communication au congrès international de protection de cultures tropicales, Lyon.**
- RAVISE, A. 1987. Etudes des facteurs de résistance aux maladies cryptogamiques chez des plantes cultivées en régions chaudes. **Rapport intérimaire MRT**, 55pp.
- RAYNAL, G., A. RAVISE, et G. BOMPEIX 1980. 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. **Ann. Phytopathol.**, **12**(3): 163-175.
- REDDY, M.N. 1984. Changes in phenolic acids in groundnut leaves infected with rust. **Phytopath. Z.** **110** : 78-81.
- RETIG, N. 1974. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase associated with natural and induced resistance of tomato to *Fusarium* wilt. **Physiological Plant Pathology** **4** : 145-150.
- REUVENI, R., and G.C. BOTHMA 1985. The relationship between peroxidase activity and resistance to *Shaerotheca fulginea* in melons. **Phytopath. Z.** **114** : 260-267.

- REUVENI, R., and J.F. FERREIRA 1985. The relationship between peroxidase activity and resistance of tomatoes (*Lycopersicum esculentum*) to *Verticillium dahliae*. *Phytopath. Z.* 112 : 193-197.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 7: 208-212.
- RIDE, J.P. 1980. The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. *Physiological Plant Pathology* 16 : 187-196.
- ROHRINGER, R., W.K. KIM, D.J. SAMBORSKI and N.K. HOWES 1977. Calcofluor: an optical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology* 67: 808-810.
- RUDOLPH, K., and M.A. STAHMANN. 1964. Some investigations on proteins of bean leaves infected by *Pseudomonas phaseolicola*. *Z. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 71 : 107-112.
- SAVARY, S. 1984. Répartition, intensité et incidence sur le rendement de la rouille et des cercosporioses de l'arachide en Côte d'Ivoire. *Rapport ORSTOM*, 17 pp.
- SAVARY, S. 1985 a. Comparaison de différentes techniques d'infection de folioles d'arachide par *Puccinia arachidis* Speg. *Agronomie* 5: 325-332.
- SAVARY, S. 1985 b. Effect de la temperature sur quelques étapes du cycle parasitaire de *Puccinia arachidis* Speg. *Agronomie* 5: 479-485.
- SAVARY, S. 1986. Etudes épidémiologiques sur la rouille de l'arachide en Côte d'Ivoire. *Thèse de Docteur en Agronomie, Univ. Agronomique de Wageningen, Pays-Bas*, 154 pp.
- SAVARY, S. 1987 a. Enquête sur les maladies fongiques de l'arachide (*A. hypogaea* L.) en Côte d'Ivoire. I. Méthodes d'enquête et étude descriptives: les conditions culturales et les principales maladies. *Neth. J. Plant Path.* (Sous Presse).
- SAVARY, S. 1987 b. Enquête sur les maladies fongiques de l'arachide (*A. hypogaea* L.) en Côte d'Ivoire. II. Epidémiologie de la rouille de l'arachide (*Puccinia arachidis* Speg.). *Neth. J. Plant Path.* 93 : 15-24.
- SAVARY, S. 1987 c. Decrease by plant development and leaf age of susceptibility of groundnut to rust (*Puccinia arachidis* ) in a susceptible cultivar. *Neth. J. Plant Path.* 93 : 25-31.
- SCHLÖSSER, E.W. 1980. Preformed internal chemical defenses. In: *Plant disease: Advanced Treatise*. J.G. HORSFALL and E.W. COWLING (Eds.), Academic Press, New York, 5 : 161-177.
- SCHÖNBECK, F., and E.W. SCHLÖSSER. 1976. Preformed substances as potential protectants. In : *Physiological Plant Pathology*. R. HEITEFUSS and P.H. WILLIAMS (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, 4 : 653-678.
- SECOND, G., et P. TROUSLOT. 1980. Electrophorèse d'enzymes de riz (*Oriza* spp.). *Travaux et Documentation de L'ORSTOM*; N° 120, 93 pp.
- SEEVERS, P.M., J.M. DALY and F.F. CATEDRAL. 1971. The role of peroxydase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physiology* 48 : 353-360.
- SHAW, M. 1963. The physiology of host-parasite relations in rusts. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1 : 259-294.
- SHAW, M., and N. COLOTELO. 1961. The physiology of host-parasite relations. VII. The effect of stem rust on the nitrogen and amino acids in wheat leaves. *Can. J. Bot.* 39 : 1351-1372.

- SHERWOOD, R.T., and C.P. VANCE. 1976. Histochemistry of papillae formed in reed canarygrass leaves in response to non-infecting pathogenic fungi. *Phytopathology* 66 : 503-510.
- SHIPTON, W.A. and J.F. BROWN. 1962. A whole leaf clearing and staining technique to demonstrate host pathogen relationships of wheat stem rust. *Phytopathology* 52 : 1313.
- SIDDARAMAIAH, A.L., N. VASUKI, T.D. BARAMA GOUDAR, S. LINGARAJU, and R.K. HEGDE. 1979. Biochemical changes in rust infected leaves of groundnut. *Indian Phytopathology* 32: 640-642.
- SMITH, I.M. 1971. The induction of antifungal inhibitors in pods of tropical legumes. *Physiological Plant Pathology* 1 : 85-94.
- SMITH, D.H., and R.H. LITTRELL. 1980. Management of peanut foliar diseases with fungicides. *Plant Disease* 64: 356-361.
- SMITHIES, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal adults. *Biochem. J.* 61 : 629-641.
- SPEGAZZINI. 1884. *Annal. Soc. Argentine* 17: 69-96 et 119-134.
- STAPLES, R.C. and M.A. STAHMANN. 1964. Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. *Phytopathology*, 54 : 760-764.
- STÖESSEL, P. and D. MAGNOLATO. 1983. Phytoalexins in *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max* induced by chemical treatment, microbial contamination and fungal infections. *Experientia* 39: 153-154.
- STRANGE, R.N., J.L. INGHAM, D.L. COLE, M.E. CAVILL, C. EDWARDS, C.J. COOKSEY and P.J. GARATT. 1985. Isolation of the phytoalexin, Medicarpin from leaflets of *Arachis hypogaea* and related species of the tribe Aeschynomeneae. *Z. Nuturforsch.* 40 c : 313-316.
- STROBEL, G.A., and E.L. SHARP. 1965. Proteins of wheat associated with infection type of *Puccinia striiformis*. *Phytopathology* 55 : 413-414.
- SUBBA RAO, P.V. 1986. Etudes biochimiques des réactions de défense de l'Arachide contre la rouille, *Puccinia arachidis* Speg. Rapport de stage, ORSTOM, Sept. 1986, 23 pp.
- SUBBA RAO, P.V., J.P. GEIGER, J. EINHORN, C. MALOSSE, B. RIO, M. NICOLE, S. SAVARY, and A. RAVISE. 1987 a. Isolation of Methyl Linolenate, a new antifungal compound from *Arachis hypogaea* L. leaves infected with *Puccinia arachidis* Speg. *Oléagineux (Accepté pour publication)*.
- SUBBA RAO, P.V., J.P. GEIGER, J. EINHORN, B. RIO, S. SAVARY, M. NICOLE and A. RAVISE. 1987 b. Groundnut Phytoalexins and host resistance to *Puccinia arachidis* Speg. *Communication au 1<sup>er</sup> Congrès de la Société Française de Phytopathologie, 19-20, Rennes, France.*
- SUBRAHMANYAM, P., G. RAMAGOPAL, N. MALAKONDAIAH, and M.N. REDDY. 1976. Physiological changes in rust (*Puccinia arachidis*) infected groundnut (*A. hypogaea*) leaves. *Phytopathologische Zeitschrift* 40: 107-113.
- SUBRAHMANYAM, P., C.S.K. VIJAYAKUMAR and A.S. RAO. 1978. *Curr. Sci.* 47, (9): 302-304.
- SUBRAHMANYAM, P., and D. McDONALD. 1982. Groundnut rust. Its survival and carry-over in India. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* 91 : 93-100.
- SUBRAHMANYAM, P., and D. McDONALD. 1983. Rust Disease of Groundnut. *ICRISAT Information Bulletin No. 13. Intl. Crops. Res. Inst. for the Semi-Arid Tropics, Patancheru P.O. Andhra Pradesh 502 324, India.*

- SUBRAHMANYAM, P., D. McDONALD, R.W. GIBBONS, and P.V. SUBBA RAO, 1983 a. Components of resistance to *Puccinia arachidis* in Peanuts. *Phytopathology* **73** : 253-256.
- SUBRAHMANYAM, P., and D. McDONALD, and P.V. SUBBA RAO. 1983 b. Influence of host genotype on uredospore production and germinability of *Puccinia arachidis*. *Phytopathology* **73** : 726-729.
- SUBRAHMANYAM, P., J.P. MOSS, and V.R. RAO. 1983 c. Resistance to Peanut Rust in wild *Arachis* species. *Plant Disease* **67** : 209-212.
- SUBRAHMANYAM, P., L.J. REDDY, R.W. GIBBONS, and D. McDONALD. 1985. Peanut Rust. A major threat to Peanut Production in the Semi-Arid Tropics. *Plant Disease* **69** : 813-819.
- TANI, T., M. YOSHIKAWA and N. NAITO. 1973. Effect of rust infection of oat leaves on cytoplasmic and chloroplast ribosomal ribonucleic acids. *Phytopathology* **63** : 491- 494.
- TAQUET, B. 1985. Les mécanismes physiologiques de la réaction de défense du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) contre la fusariose vasculaire. Application à la recherche de nouveaux moyens de lutte. Thèse de Doctorat de 3ème Cycle. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- THOMPSON, S.S., and D.H. SMITH. 1971. Distribution and significance of peanut rust in Georgia in 1971. *Plant Dis. Rep.* **56** : 290-293.
- TOUZE, A. AND M.T. ESQUERRE-TUGAYE. 1982. Defense mechanisms of plants against varietal non-specific pathogens. In : Active defense mechanisms in plants. WOOD, R.K.S. (Ed.). NATO Advanced Study Institute Series. Series A : Life Science : 103-117.
- TULI, V. and A.S. MOYED. 1967. Inhibitory oxydation products of indole-3- acetic acid : 3-hydroxymethyloxindole and 3-methyleneoxindole as plant metabolites. *Plant. Physiol.* **42** : 425-430.
- URITANI, I. 1971. Protein changes in diseased plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* **9** : 211-234.
- VANCE, C.P., J.O. ANDERSON, and R.T. SHERWOOD. 1976. Soluble and cell wall peroxidases in reed canary-grass in relation to disease resistance and localized lignin formation. *Plant Physiol.* **57** : 920-922.
- VANCE, C.P., T.K. KIRK, and R.T. SHERWOOD. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* **18** : 259-288.
- VAN SUMERE, C.F., C. VAN SUMERE-DE PRETER and G.A. LEDINGHAM. Cell wall-splitting enzymes of *Puccinia graminis* var. *tritici* . *Can. J. Microbiol.* **3** : 761-770.
- VEGETTI, G., G.G. CONTI and P. PESCI. 1975. Changes in phenylalanine ammonia-lyase, peroxydase and polyphenoloxidase during development of local necrotic lesions in Pinto bean leaves infected with Alfa Mosaic Virus. *Phytopath. Z.* **84** : 153-171.
- VERNENGGHI, A. 1985. Les phytoalexines de la tomate. Thèse de Doctorat de 3ème Cycle. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- VERNENGGHI, A., J. EINHORN, G. KUNESCH, C. MALOSSE, F. RAMIANDRASOA & A. RAVISE, 1985. Propriétés inhibitrices *in vitro* de dérivés oxygénés d'acides gras polyinsaturés élaborés chez le *Lycopersicum esculentum* Mill. en réaction à l'infection par le *Phytophthora parasitica* Dast. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 301 série III n° 16 : 743-748.
- VERNENGGHI, A., J. EINHORN, G. KUNESCH, C. MALOSSE, F. RAMIANDRASOA et A. RAVISE, 1986. Phytoalexines et réactions de défense de la tomate aux infections par *Phytophthora parasitica* et *Verticillium albo-atrum*. *Can. J. Bot.* **64** : 973-982.

- VERNENGI, A., B. TAQUET, J.L. RENARD et A. RAVISE. 1987. Détection chez le palmier à huile de dérivés oxygénés d'acides gras polyéniques toxiques pour le *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis*; variation de leur accumulation selon les croisements et les modalités de traitements. *Oléagineux* 42(1) : 1-10.
- VO-THI-HAI, G. BOMPEIX, et A. RAVISE. 1979. Rôle du tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium dans la stimulation de réactions de défense des tissus de tomate contre le *Phytophthora capsici*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 288 : 1171-1174.
- WELLS, J.C. 1962. Peanut rust in North-Carolina. *Plant Dis. Rep.* 46 : 65 (Abstr.).
- WINGFIELD, M.J. and F.H.J. RIJKENBERG. 1981. A preliminary ultrastructural study of the uredial stage of *Puccinia arachidis*. *Phytophylactica*, 13 : 53-55.
- WYNN, W.K. JR. 1963. Photosynthetic phosphorylation by chloroplasts isolated from rust-infected oats. *Phytopathology* 53 : 1376-1377.
- YARWOOD, C. 1954. Mechanism of acquired immunity to a plant rust. *National Acad. Sci. Proc.* 40 : 374-377.
- YARWOOD, C. 1956. Cross Protection with two Rust Fungi. *Phytopathology* 46 : 540-544.
- ZADOKS, J.C. 1972 a. Modern concepts of disease resistance in cereals. In : The way ahead of Plant Breeding. *Proceedings of 6th Congress. Europica, Cambridge, 1971.* Lupton F.A.G.H., Jenkins, G. & Johnson, R. (Eds.), Cambridge : 89-98.
- ZADOKS, J.C. 1972 b. Methodology of Epidemiological Research. *Annual Review of Phytopathology* 10 : 253-276.
- ZAMBETTAKIS, C., P. SANKARA, A. METIVIER. 1985. *Darluca filum*, *Tuberculina costaricana* et *Verticillium lecanii* hyperparasites de *Puccinia arachidis*, considérés comme éléments d'une lutte intégrée. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France* 101 (2): 165-181.

## RESUME

*Puccinia arachidis* Speg., agent de la rouille de l'Arachide (*Arachis hypogaea* L.) est un parasite foliaire majeur, sévissant dans de nombreuses régions arachidières du monde. Les recherches que nous avons menées sur les réactions de la plante à l'agression parasitaire révèlent qu'à l'échelle cellulaire les mécanismes de résistance ne semblent pas reposer sur un renforcement des parois (lignification par exemple).

Au plan biochimique on ne note qu'une faible stimulation de l'activité peroxydasique lors de l'infection; par ailleurs les variations quantitatives en protéines et en composés phénoliques sont réduites et ne paraissent pas corrélées aux niveaux de résistance des différents génotypes cultivés. Le pool phénolique de ces derniers est cependant très inférieur à celui des espèces sauvages hautement résistantes ou immunes.

L'Arachide synthétise une dizaine de composés fongitoxiques. Parmi ceux-ci figurent des acides gras insaturés, leurs dérivés oxygénés, un composé de structure alyphatique, des nonyl phénols, des alkyl bis phényl éthers, des hydroxystilbènes et des pterocarpanes (médicarpine). La structure chimique de la plupart d'entre eux a été déterminée.

Ces substances semblent être préformées chez les génotypes résistants, leur biosynthèse est cependant stimulée par l'infection. Une telle stimulation se manifeste également chez les génotypes sensibles; elle est plus tardive et d'amplitude plus réduite que chez les génotypes résistants. L'abscission des feuilles, ainsi que leur mise en survie provoque l'accumulation de produits fongitoxiques sans pour autant conduire à un accroissement du niveau de résistance de ce matériel végétal, suggérant l'intervention de plusieurs types de facteurs dans la résistance à *P. arachidis*.

Enfin les réactions de défense de l'Arachide peuvent être modulées par l'application de substances chimiques ou par une inoculation préalable par un agent non pathogène (prémunition). De tels traitements se répercutent au niveau des composantes de résistance. Leur utilisation pourrait contribuer à élucider les mécanismes physiologiques et biochimiques impliqués.

Mots clefs: Réaction de défense, Phytoalexines, Mécanismes de résistance, *Puccinia arachidis* Speg., *Arachis hypogaea* L.

## SUMMARY

*Puccinia arachidis* Speg., causal agent of rust disease of groundnut (*Arachis hypogaea* L.), is a major foliar pathogen in most of the groundnut producing areas in the world. Studies have been made of groundnut-rust interactions and their modulation by means of chemical or biological agents.

The results obtained indicate that at the cellular level the mechanisms of resistance do not involve cell-wall reinforcement, while at molecular level, infection stimulates peroxidase activity only to modest levels. Quantitative differences observed among various genotypes (cultivated) in their protein and total phenolic contents do not seem to correlate with their resistance levels; however their total phenolic content was far less than that of the wild species (highly resistant or immune).

Groundnut plants produce at least ten antifungal compounds in response to infection; these include unsaturated fatty acids, their oxygenated derivatives, an aliphatic compound, nonyl phenols, alkyl bis phenyl ethers, hydroxystilbenes and pterocarpanes (medicarpin). The chemical structure of most of these compounds has been determined. These compounds seem to be preformed in resistant genotypes and their biosynthesis is stimulated by infection. Such a stimulatory response does exist in susceptible genotypes, but is of smaller amplitude and is usually delayed. Leaf detachment and its survival away from the plant favour accumulation of antifungal compounds. Nevertheless, such a response does not seem to contribute towards a increase in resistance levels, suggesting the involvement of other factors in the resistance mechanisms against *P. arachidis*.

It was found that the defence reactions of the groundnut plant could be modulated either by the application of chemical compounds (Fosetyl-Al) or by cross-protection techniques. Such treatments showed an effect on some components of resistance leading to significant reductions in build-up of epidemics. The investigation of such modulations would contribute to the elucidation of physiological and biochemical mechanisms involved in host resistance.

Additional key words: Defence reactions, Phytoalexins, Resistance mechanisms, Fosetyl-Al, Cross protection, *Puccinia arachidis* Speg., *Arachis hypogaea* L.