

N° d'ordre : 511

50376  
1981  
102

50376

1981

102

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

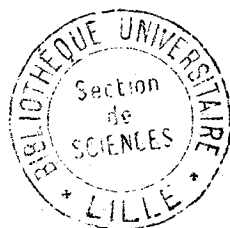
pour obtenir le grade de

**DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES**

par

Georges BOUDART

**MODALITES DE L'ATTAQUE PARASITAIRE DES CRUCIFERES  
PAR LEPTOSPHAERIA MACULANS (DESM.) CES. ET DE NOT.  
(f.c. PHOMA LINGUAM), AGENT DE LA NECROSE DU COLLET  
DETERMINISME MOLECULAIRE DU POUVOIR PATHOGENE**



Soutenue le 6 mars 1981 devant la Commission d'Examen

MM. J. CHEVAUGEON	Professeur à l'Université Paris-Sud
A. COLENO	Professeur à l'Institut National Agronomique Paris-Grignon
J. GUILLAUME	Professeur à l'Université de Lille I
L. LACOSTE	Professeur à l'Université de Lille I
A. TOUZE	Professeur à l'Université Paul Sabatier Toulouse

## AVANT - PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Cryptogamie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, sous la direction de Monsieur le Professeur L. LACOSTE. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir permis d'entrer au C.N.R.S. et pour la confiance qu'il a témoignée en me laissant traiter ce sujet en toute liberté. J'ai été particulièrement sensible aux efforts qu'il a déployés pour mettre à ma disposition les moyens nécessaires à la progression de ma recherche, ainsi qu'à ses grandes qualités humaines. Qu'il soit assuré de mon respectueux attachement.

Monsieur C. MARTIN, Directeur de Recherche à l'I.N.R.A., en acceptant la charge de parrainer mes activités de recherche au C.N.R.S., m'a apporté une aide constante et n'a jamais cessé de m'encourager dans ma tâche. Je voudrais lui exprimer ma plus vive gratitude pour les regains d'enthousiasme qu'il m'a donnés à chacun de mes passages dans son Laboratoire et pour le bénéfice que j'ai pu retirer de ses judicieux conseils.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur J. GUILLAUME pour sa présence à ce Jury ; me souvenant qu'il participait déjà à celui de mon D.E.A., je lui exprime toute ma gratitude pour l'intérêt qu'il continue à porter à mon travail.

A Monsieur le Professeur J. GHEVAUGEON, de la Faculté des Sciences d'Orsay, je tiens à dire tout l'agrément que m'ont procuré les entretiens qu'il m'a accordés et je le remercie pour les précieux conseils qu'il m'a donnés sur certains aspects de la mutagenèse. Je sais qu'il a toujours manifesté un vif intérêt pour mon travail et je suis heureux de lui témoigner ma reconnaissance.

Je sais gré à Monsieur le Professeur A. TOUZE de l'Université Paul Sabatier de Toulouse d'avoir accepté d'examiner ce travail et de m'avoir fait profiter de sa compétence en matière de physiologie du parasitisme ; je le remercie vivement de participer à ce Jury.

Monsieur le Professeur A. COLENO, titulaire de la Chaire de Pathologie Végétale à l'Institut National Agronomique, a bien voulu consacrer une partie de son temps à l'examen de ce travail et je suis sensible à l'honneur qu'il me fait en siégeant à mon Jury.

*Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette Thèse.*

*En acceptant de prendre en charge l'étude ultrastructurale, Monsieur M. ABADIE, Directeur à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, rattaché au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle, m'a apporté beaucoup et sa collaboration a été pour moi l'occasion d'apprécier ses qualités et sa grande expérience. Qu'il trouve ici le témoignage de mon estime.*

*C'est avec beaucoup de plaisir que j'exprime mes remerciements à Monsieur M. BARBIER, Maître de Recherche à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles ainsi qu'à son élève J.P. FERZOU, Attaché de Recherche au C.N.R.S., pour leur esprit de franche collaboration et pour leur extrême obligeance.*

*La préparation de ce mémoire m'a été facilitée grâce à l'aide que j'ai pu trouver auprès de mes camarades du Laboratoire ainsi qu'auprès des services de Cytogénétique et de Bryologie. Je tiens à remercier plus particulièrement pour leur contribution spontanée et dévouée Marie-Chantal FABRE, Assistante, Bertrand DEHORTER, Maître-Assistant et Pierre RENARD, Diplômé.*

*José GODIN, Maître-Assistant, a bien voulu assurer avec beaucoup de gentillesse l'illustration d'une partie de ce mémoire ; je le remercie pour la qualité des photographies en couleur.*

*Claude DEFIVES, Maître-Assistant, m'a procuré les souches d'Entérobactéries, je lui en suis reconnaissant.*

*Qu'il me soit également permis d'exprimer ma gratitude à Mesdames M. LECOCQ, M. FORTRIE et M.F. STRECK qui ont contribué à la réalisation pratique du mémoire ; leur aide m'a été précieuse.*

*J'adresse également mes remerciements au Centre National de la Recherche Scientifique et aux membres de la Commission de Biologie Végétale, grâce auxquels ces investigations ont pu être poursuivies.*

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
PREMIERE PARTIE : L'AGENT PATHOGENE ET SON HOTE	
CHAPITRE I : BIOLOGIE DE L'AGENT PATHOGENE.....	5
I. Introduction.....	.
II. Matériel et Méthodes.....	9
1) les souches employées.....	.
a) les souches monoascospores.....	.
b) isolats pluriconidiens.....	.
2) conditions d'obtention des périthèces, <i>in vitro</i> .....	.
3) milieux de culture.....	10
4) mesure de la pycniogenèse et du pouvoir pathogène.....	11
III. Résultats.....	11
1) mise en évidence d'un hétérothallisme bipolaire.....	.
2) variabilité du pouvoir pathogène.....	12
3) recherche de critères culturels pouvant être en relation avec le signe des thalles compatibles et l'agressivité de l'isolat de signe (+).....	14
a) aspect des cultures sur Carotte.....	.
b) croissance sur des milieux naturels gélosés.....	.
c) relation avec la pycniogenèse.....	17
IV. Discussion.....	18
V. Conclusion.....	19

CHAPITRE II : ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA MALADIE DE LA NECROSE DES CRUCIFERES EN CONDITIONS CONTROLEES.....	21
I. Introduction.....	.
II. Matériel et Méthodes.....	23
1) espèces végétales utilisées.....	.
2) conditions de culture.....	.
3) réalisation du complexe hôte-parasite.....	24
III. Résultats.....	25
1) incubation à 14°C.....	.
a) macules cotylédonaire.....	.
b) nécrose des hypocotyles.....	26
2) incubation à 24°C.....	28
a) macules cotylédonaire.....	.
b) nécrose des hypocotyles.....	29
3) sensibilité variétale des cotylédons de Colza.....	30
IV. Discussion.....	32
V. Conclusion.....	34
 CHAPITRE III : ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE LA RELATION HOTE-PARASITE.....	35
I. Introduction.....	.
II. Matériel et Méthodes.....	36
1) méthode de contamination.....	.
2) techniques cytologiques.....	37
a) fixation.....	.
b) confection des coupes.....	38
c) tests cytochimiques.....	.
III. Examens microscopiques.....	.
1) examen des tissus sains.....	.
a) aspect des cellules épidermiques.....	.
b) aspect des cellules du parenchyme cortical.....	39
2) visualisation du processus infectieux.....	40
a) pénétration du Champignon.....	.
b) développement du Champignon dans la plante.....	41
IV. Discussion.....	43
V. Conclusion.....	47
CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE.....	48

DEUXIEME PARTIE : LES DETERMINANTS MOLECULAIRES  
DU POUVOIR PATHOGENE

CHAPITRE I : LA SIRODESMINE PL.....	51
I. Introduction.....	.
II. Production et caractérisation de phytotoxines produites par <i>Phoma lingam</i> , en culture sur un milieu synthétique... 53	53
1) mise en évidence.....	.
a) milieu de culture.....	.
b) conditions de culture.....	54
c) traitement des filtrats de culture.....	.
d) test biologique.....	55
2) fractionnement du filtrat par chromatographie sur couche mince.....	.
a) principe.....	.
b) résultats.....	56
3) méthodes de purification des toxines.....	59
a) purification de la toxine (1).....	.
b) purification de la toxine (2).....	60
4) détermination de la structure des deux toxines.....	.
a) structure de la toxine (1).....	.
b) structure de la toxine (2).....	61
5) biosynthèse, <i>in vitro</i> , de la sirodesmine PL.....	63
a) propriétés antibactériennes.....	64
b) propriétés antifongiques.....	.
III. Rôle de la sirodesmine PL dans la maladie.....	68
1) caractérisation, <i>in vivo</i> , de la sirodesmine PL.....	.
a) méthode d'extraction.....	.
b) activité biologique de l'extrait.....	69
c) analyse chromatographique de l'extrait.....	.
2) activité biologique de la sirodesmine PL.....	72
a) sensibilité de l'hypocotyle.....	73
b) sensibilité du cotylédon.....	.
3) spécificité d'action de la sirodesmine PL.....	74
4) relation entre l'agressivité du Champignon et la pro- duction, <i>in vitro</i> , de sirodesmine PL.....	75
a) obtention des souches.....	.
b) relation entre la croissance des différentes sou- ches et la biosynthèse de sirodesmine PL, <i>in vitro</i> ..	78
c) relation entre la biosynthèse de sirodesmine PL, <i>in</i> vitro, et l'agressivité des souches.....	80
5) relation entre la sensibilité variétale du Colza et la sensibilité à la sirodesmine PL.....	82
IV. Discussion.....	83
V. Conclusion.....	85

CHAPITRE II : LES GLYCANASES DE PHOMA LINGUAM.....	87
I. Introduction.....	.
II. Caractérisation des glycanases produites, <i>in vitro</i> , en présence de parois cellulaires.....	89
1) caractérisation d'enzymes pectinolytiques.....	90
a) mise en évidence d'une polyméthylgalacturonase.....	91
b) mise en évidence d'une pectine trans-éliminase.....	92
c) essai de mise en évidence d'une pectineméthylestérase	95
2) caractérisation d'enzymes cellulolytiques.....	.
a) essai de caractérisation d'une cellulase de type C <sub>1</sub> ..	96
b) mise en évidence d'une carboxyméthylcellulase.....	.
3) caractérisation d'hémicellulases.....	97
III. Cinétique de production, <i>in vitro</i> , des différentes glycanases en présence de parois cellulaires.....	100
1) définition des unités d'activité relative.....	.
a) activité polyméthylgalacturonase et carboxyméthylcellulase.....	.
b) activité pectine trans-éliminase.....	.
c) activité xylanase et laminarinase.....	101
2) résultats.....	.
IV. Propriétés biologiques du filtrat de culture de <i>Phoma linguam</i> obtenu en présence de parois cellulaires.....	103
1) mise en évidence.....	.
2) mise au point d'un test d'activité biologique.....	104
V. Vérification de la nature inductible ou constitutive du composé phototoxique.....	105
VI. Effets d'agents dénaturants des protéines sur l'activité phytotoxique du filtrat.....	105
1) action de la chaleur.....	106
2) action d'une enzyme protéolytique.....	.
VII. Fractionnement du filtrat de culture phytotoxique sur un gel Sephadex G-100.....	107
1) principe.....	.
2) résultats.....	108
VIII. Purification du composé phytotoxique.....	109
IX. Relation entre agressivité du Champignon et biosynthèse de la polyméthylgalacturonase.....	114
X. La polyméthylgalacturonase est une enzyme extracellulaire.	115
XI. Discussion.....	117
XII. Conclusion.....	120
CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE.....	121
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	123
BIBLIOGRAPHIE.....	129

## RÉSUMÉ DE LA THÈSE

La maladie de la nécrose des collets de Crucifères due à l'Ascomycète *Leptosphaeria maculans*, plus connu depuis longtemps sous sa forme conidienne *Phoma lingam*, est très répandue et prend des proportions graves dans les cultures intensives de Chou et dans les zones où la culture du Colza est en pleine expansion. Malgré les améliorations génétiques et l'utilisation de cultivars actuellement beaucoup plus tolérants, la maladie pose toujours des problèmes. Dans la perspective de faciliter la sélection génétique par une meilleure compréhension des mécanismes biochimiques qui provoquent une réaction de tolérance chez ces cultivars, nous nous limitons dans ce travail à préciser les modalités de l'attaque parasitaire chez un hôte très sensible.

Dans une première partie consacrée à l'agent pathogène et à son hôte, nous précisons la biologie de la reproduction du Champignon à partir de souches monoascosporées et d'isolats conidiens. Nous avons cherché ensuite à établir une corrélation entre quelques caractères culturels des souches, leur agressivité et l'hétérothallisme que présente cette espèce. Cette première étude permet de montrer qu'il n'existe aucune corrélation au niveau génotypique ; par contre, nous avons pu caractériser chez *Leptosphaeria maculans* un phénotype particulièrement agressif.

L'influence du génotype de l'hôte sur l'évolution de la maladie de la nécrose des hypocotyles, en conditions contrôlées, se traduit par la manifestation d'une très grande sensibilité du Chou, bien supérieure à celle d'un cultivar très sensible de Colza. En étudiant également l'influence de la température, nous montrons que l'expression du caractère résistant chez les Colzas tolérants à la maladie ne s'effectue que si la température d'incubation est



relativement basse. Les résultats de cette étude épidémiologique nous ont conduit à choisir le Chou comme plante-hôte très sensible pour la suite de nos investigations sur les mécanismes d'attaque du parasite.

Une étude au microscope électronique à transmission a permis de comprendre le mode de pénétration du Champignon et la façon dont il envahit les tissus de l'hypocotyle. Cette étude révèle que les conidies utilisées pour la contamination pénètrent directement dans la plante par les stomates ; les filaments germinatifs qu'elles émettent ensuite se propagent uniquement par les espaces intercellulaires et colonisent les vaisseaux conducteurs. L'action du mycélium affecte principalement les parois cellulaires qui sont hydrolysées intensément mais de façon progressive ; à partir des observations effectuées, on ne peut déceler aucune action précoce d'une éventuelle toxine.

Dans la seconde partie de notre travail, nous abordons le déterminisme moléculaire du pouvoir pathogène en recherchant des substances produites par le Champignon susceptibles de provoquer des désordres physiologiques identiques à ceux provoqués par l'agent pathogène.

En culture *in vitro* et dans les hypocotyles nécrosés, on peut mettre en évidence la présence d'une substance phytotoxique dont la structure a été identifiée à la sirodesmine PL, substance de la famille des épithiodicétopipérazines. Cependant, nous sommes amené à considérer le rôle de cette molécule dans la pathogenèse comme secondaire. En effet, la sirodesmine PL n'agit pas spécifiquement sur les Crucifères ; introduite dans des hypocotyles elle ne reproduit pas le symptôme typique de la nécrose ; ensuite, il n'existe aucune corrélation entre sa production, *in vitro*, et l'agressivité du Champignon ; des cultivars de Colza se comportant très différemment à la maladie manifestent la même sensibilité à cette toxine. Par conséquent, il est probable que la sirodesmine PL participe aux processus de dégradation tissulaire mais n'en est pas la cause initiale. Ces résultats concordent avec l'absence d'observations en microscopie électronique relatives aux effets d'une toxine sur les structures cellulaires.

L'action du Champignon sur les parois cellulaires de l'hôte étant cytologiquement remarquable, nous avons orienté notre étude vers la caractérisation des glycanases fongiques produites, *in vitro*, en présence d'une préparation à base de parois cellulaires purifiées d'hypocotyles. Nous avons

ensuite montré que le filtrat de culture obtenu dans ces conditions reproduit le symptôme de la nécrose quand on l'injecte dans les hypocotyles. La mise en place d'un protocole de purification a abouti à attribuer ces effets nécrosants à une enzyme, la polyméthylgalacturonase. Ce résultat indique que dans le cas de la maladie des Crucifères due à *Leptosphaeria maculans* une protéine enzymatique à caractère phytotoxique est très certainement à l'origine de la formation de la nécrose. Des investigations plus poussées devraient le confirmer et ouvrir des perspectives susceptibles de faire progresser la sélection de cultivars de Colza plus résistants.

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

La maladie de la jambe noire des Crucifères (Black leg pour les auteurs anglo-saxons) est connue des Phytopathologistes depuis de nombreuses années et au cours des six dernières décennies on peut relever les travaux épidémiologiques de WALKER (1922), CUNNINGHAM (1927), HUGHES (1933), POUND (1947), CRUICKSHANK et PALMER (1954). Ces études ont essentiellement analysé le développement de la maladie sur les Crucifères maraîchères, en particulier sur le Chou et ses multiples variétés. L'agent pathogène, un Champignon Ascomycète, est connu actuellement sous le nom de sa forme parfaite : *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., alors que les travaux épidémiologiques cités ci-dessus ne s'intéressaient qu'au rôle de la forme imparfaite *Phoma lingam* (Tode) Desm.

Cette meilleure connaissance de l'agent pathogène est liée à la vigoureuse expansion en Europe du Nord de la culture du Colza, Crucifère intéressante par sa richesse en huile. Cette oléagineuse voit son aire de culture s'étendre chaque année. Bien installée au Canada, elle progresse notamment en Australie et en Espagne. Cette extension a souvent été accompagnée d'une densification des semis sur une même région -en France : en Champagne berrichonne ; en Hollande : dans les Polders-, et d'une rotation plus rapide de l'assolement traditionnel. Pour notre seul pays, la surface occupée par la culture de cette

Crucifère avoisinera, en 1981, 500 000 hectares alors qu'elle était légèrement inférieure à 100 000 hectares en 1964/1965. L'intensification de la culture de Colza au milieu des années 60 a provoqué dans le Centre de la France une grave épidémie caractérisée par une verse parasitaire due à la "nécrose du collet" avec corrélativement une chute importante des rendements. Le programme expérimental mis en place à cette époque et portant sur l'étude de la maladie en conditions naturelles a abouti, avec les travaux de LACOSTE, LOUVET et leurs collaborateurs en 1969-1970, à une meilleure connaissance des conditions favorables à l'apparition de la maladie.

L'enfouissement précoce des résidus de culture prescrit à la suite de ces travaux a entraîné une nette régression de l'épidémie. Malgré cela, et en dépit des constantes améliorations génétiques et des progrès techniques réalisés en pratique agronomique et en traitement, le rendement moyen progresse très lentement restant encore inférieur à 30 q/ha en 1980 pour une production nationale de 1 200 000 t. Cette évolution lente de la productivité peut s'expliquer par l'existence constante d'un taux de contaminations naturelles mais elle paraît aussi liée aux nombreuses difficultés rencontrées par les sélectionneurs qui se trouvent confrontés à la fois avec le problème de la tolérance au Champignon et celui d'une production croissante d'huile sans acide érucique.

A ce jour, seules les contaminations naturelles constituent encore le moyen d'évaluer à grande échelle la tolérance à la maladie des cultivars nouvellement sélectionnés. Sur un plan fondamental, aucun des mécanismes d'action du Champignon qui aboutissent à la formation de la nécrose ne sont actuellement connus et on mesure mieux l'intérêt que présente cette connaissance quand on sait qu'elle peut déboucher sur des applications dans le domaine agronomique, en sélection notamment. Cet aspect fondamental du parasitisme constitue l'objet du travail présenté dans ce mémoire. Dans une première partie nous définirons le modèle biologique de base qui servira à l'étude, à l'échelle moléculaire, de la relation hôte-parasite. Pour cela, nous avons cherché à reproduire la maladie en conditions artificielles chez de jeunes plantes sachant que la résistance de certains cultivars de Colza se manifeste dès le stade cotylédonaire (ALABOUVETTE, 1969 ; BRUNIN, 1970). Mais pour mieux comprendre l'ensemble des mécanismes susceptibles de limiter l'action du parasite chez les plantes tolérantes, il est nécessaire de connaître parfaitement la nature des désordres biochimiques conduisant à la nécrose chez un hôte sensible.

Les deux premiers chapitres seront donc consacrés respectivement à la recherche d'une souche pathogène très agressive puis d'une Crucifère particulièrement sensible à la maladie. Les protagonistes étant en place, nous observerons dans un troisième chapitre par une étude au microscope électronique à transmission, les perturbations que provoque le Champignon chez son hôte au niveau des structures cellulaires.

La deuxième partie du travail constituera une approche de l'étude du déterminisme moléculaire du pouvoir pathogène, en analysant tout d'abord le rôle d'une toxine produite par le Champignon ; puis, conformément aux renseignements recueillis à la suite de l'étude ultrastructurale, nous aborderons l'aspect enzymologique de l'agression parasitaire.

**PREMIERE PARTIE**  
**L'AGENT PATHOGENE ET SON HOTE**

---

## CHAPITRE I : BIOLOGIE DE L'AGENT PATHOGÈNE

### I. INTRODUCTION

Après un rappel de la position systématique du Champignon et un aperçu sur les données biologiques naturelles et culturales, nous précisons la variabilité des caractères cultureux et de l'infectivité de l'agent pathogène.

#### - Position systématique :

Le Champignon qui nous intéresse fut à l'origine inclus dans le genre *Sphaeria* et décrit sur *Brassica campestris* comme étant *Sphaeria maculans* (DESMAZIERE, 1846). En 1863, CESATI et DE NOTARIS créent le genre *Leptosphaeria* : *Sphaeria maculans* devient *Leptosphaeria maculans*. Dans les années qui suivirent, une certaine confusion devait cependant régner chez les systématiciens à propos de ce Champignon. FÜCKEL (1870) puis SACCARDO (1883) décrivent respectivement sur *Alliaria officinalis* et *Brassica napus*, *Pleospora napi* et *Leptosphaeria napi*. Plus près de nous, SMITH (1956) fait également la description d'un *Leptosphaeria napi* mais SMITH et SUTTON, en 1964, identifient finalement *Leptosphaeria napi* à *Leptosphaeria maculans*.

SACCARDO avait dans son répertoire supposé l'existence d'une relation entre *Leptosphaeria maculans* et la forme conidienne *Phoma*. Cette idée fut reprise par MÜLLER en 1953 et confirmée en 1957 successivement par MÜLLER et TOMASEVIC puis par HOLM qui précisent qu'il s'agit de *Phoma linguam*. BOEREMA et VAN KESTEREN (1964) estiment qu'il est préférable d'attribuer la forme imparfaite

du Champignon à *Plenodomus linguam*, en raison de l'existence de deux types de pycnides : les unes avec des parois grêles et un pore circulaire, les autres avec des parois épaisses et sans pore bien défini.

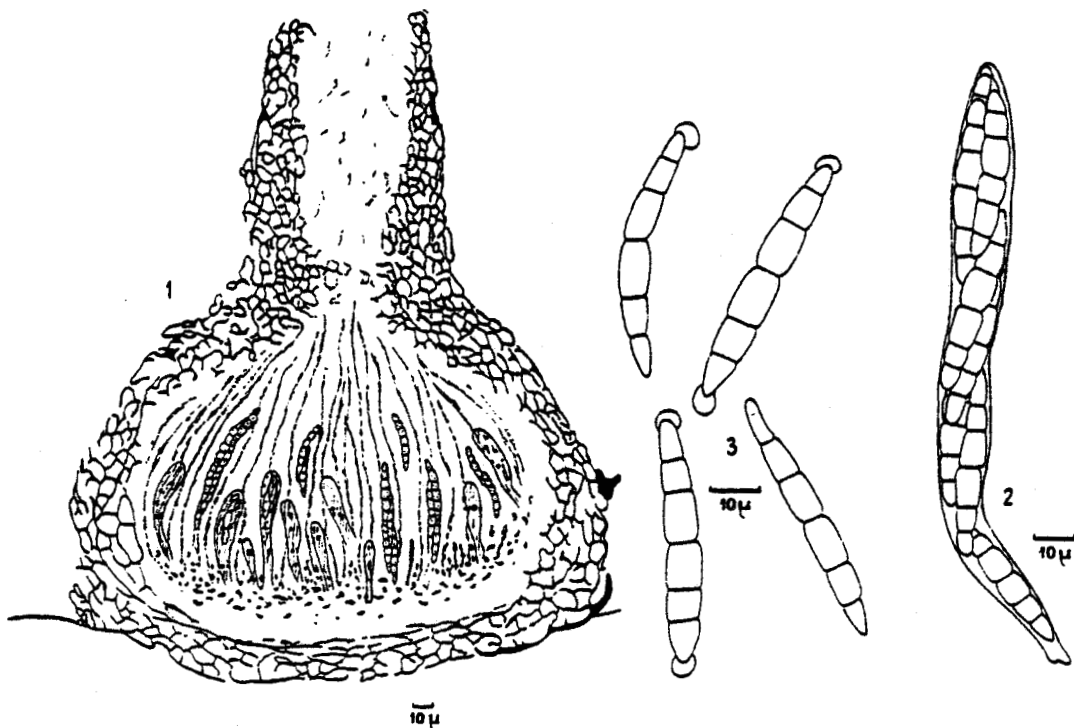
- Biologie naturelle :

Pour la description de la forme parfaite et de la forme conidienne du Champignon, nous reportons la reproduction de deux figures extraites des ouvrages de LACOSTE (1965) et de BOEREMA et VAN KESTEREN (1964).

Les périthèces du *Leptosphaeria maculans* se développent en très grand nombre sur les tiges sèches et noircies du Colza, principalement dans la région du collet. Ils ont un diamètre de 300 à 400  $\mu$  sur une hauteur de 250  $\mu$  et sont terminés par un petit col portant un ostiole circulaire. Leur formation nécessite une période de températures relativement basses, de ce fait on les observe, en fonction des régions, de Septembre à Novembre.

Figures 1 à 3 : *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.

1 - périthèce ; 2 - asque ; 3 - ascospore.





Les asques sont oblongs avec un pied court ; leur taille varie de 100 à 150  $\mu$  x 12-15  $\mu$ . Ils contiennent toujours 8 spores.

Les ascospores sont fusoides, à 6 cellules, offrant une légère constriction au niveau des septums et plus fortement au niveau du septum central. Elles ont une taille variant de 35 à 60  $\mu$  x 6  $\mu$  et sont en général jaune-brun.

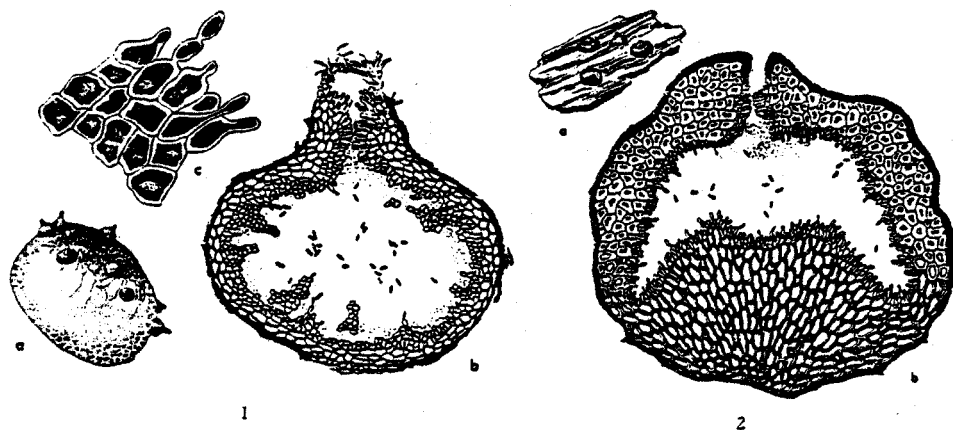
Ces ascospores sont émises en très grand nombre en fonction de la pluviométrie ; ALABOUVETTE et BRUNIN (1970) ont bien montré la relation qui s'établit entre les périodes de fortes précipitations, l'émission des ascospores et l'apparition de la maladie. Ces travaux ont été confirmés quelques années plus tard par des auteurs australiens qui aboutissent aux mêmes conclusions (Mc GEE et EMMETT, 1977 et Mc GEE, 1977).

Les pycnides se forment essentiellement sur les organes végétatifs parasités, en particulier au niveau des macules cotylédonaires et foliaires qui apparaissent sous l'action du Champignon.

Ces pycnides émettent un grand nombre de spores hyalines, unicellulaires, de 5 à 6  $\mu$  de long, dans un mucilage qui prend la forme d'un ruban, au moment de l'expulsion des spores. Leur rôle épidémiologique est nettement moins important que celui des ascospores ; ce point sera plus amplement discuté dans le chapitre suivant.

*Figures 1 et 2 : Leptosphaeria maculans (Desm.) Ces. et de Not. Formes conidiennes d'après BOEREMA et VAN KESTEREN*

- 1 - phénotype I - *Plenodomus linguam* (Tode ex. Fr.) Höhn.
  - a) sur une graine de Chou - b) section verticale -
  - c) détail de la structure des parois et origine des spores.
- 2 - phénotype II - *Plenodomus linguam* (Tode ex. Fr.) Höhn.
  - a) sur une tige morte de Chou - b) section verticale.



- Biologie culturale :

Des périthèces de *Leptosphaeria maculans* peuvent être obtenus sur différents milieux naturels à partir d'un isolement monoascal (LACOSTE, 1965) mais aucune fructification sexuée ne s'ébauche dans les mêmes conditions avec des souches monoascosporées, ce qui peut faire suspecter l'existence d'un hétérothallisme. Dans un premier temps, nous nous efforcerons de préciser les modalités de la reproduction sexuée du Champignon en cherchant à identifier des thalles compatibles par des croisements entre souches monoascosporées. Puis, nous nous consacrerons à la recherche désormais devenue classique de critères cultureux permettant de différencier d'une part les types de thalles compatibles et d'autre part les souches possédant un pouvoir pathogène élevé.

- Variabilité du Champignon :

L'examen de cet aspect nous amène à évoquer l'agressivité de l'agent pathogène. Telle que la définit VAN DER PLANK (1968), l'agressivité possède un support polygénique et exprime la capacité plus ou moins grande d'une souche à provoquer des dégâts chez la plante-hôte. Les différences d'agressivité observées pour différentes souches d'un même agent pathogène sont simplement quantitatives.

La variabilité des caractères cultureux et du pouvoir pathogène est un phénomène très répandu chez les Champignons phytopathogènes. Pour certains d'entre eux, l'agressivité est en relation très étroite avec certains critères tels que la croissance sur un milieu nutritif gélosé, c'est le cas pour *Ceratocystis ulmi* (GIBBS et BRASIER, 1973) ou encore avec la forme dressée des poils des carpophores chez *Polyporus tomentosus* (WHITNEY et BOHAYCHUK, 1976 ; WHITNEY et BOHAYCHUK, 1977). De nombreuses études ont déjà été réalisées sur la variabilité de la croissance, de la sporulation, de la pigmentation et de la pathogénicité d'isolats et de souches conidiennes de *Phoma linguam* (CUNNINGHAM, 1927 ; HUGHES, 1933 ; BUDDIN, 1934 ; POUND, 1947). Toutefois, les ascospores de *Leptosphaeria maculans* assurant essentiellement la contamination naturelle des Crucifères par voie aérienne, nous nous proposons de reprendre cette étude avec, cette fois, des souches monoascosporées ainsi qu'avec deux isolats conidiens du Champignon.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1) LES SOUCHES EMPLOYEES

#### a) les souches monoascosporees :

Les souches ont été isolées au micromanipulateur de Defontbrune selon une technique décrite par LACOSTE (1965). Les ascospores n'ont pas été choisies au hasard mais proviennent de deux asques isolés chacun à partir d'un périthèce formé sur un pied de Colza nécrosé différent. Leur libération de l'asque a nécessité l'hydrolyse de la paroi à température ambiante par une solution de suc digestif d'*Helix pomatia* (I.B.F.) à 0,5 mg par millilitre de tampon acide citrique-phosphate disodique 0,01 M de pH 5,5 ; au bout de 20 minutes, les ascospores peuvent être transférées dans les gouttes d'isolement après avoir été rincées dans de l'eau distillée stérile. Dans la mesure du possible, nous nous sommes efforcé d'isoler les spores dans l'ordre qu'elles occupent dans l'asque ; ceci n'est pas toujours chose facile, tout d'abord en raison de leur forme fusiforme et de leur chevauchement et puis, parce que souvent deux ou trois des ascospores situées au sommet de l'asque sont réunies entre elles par leur masselotte mucilagineuse. Les souches ont été ainsi numérotées de 1 à 8 pour le premier asque et de 1' à 8' pour le second, l'ascospore 8 ou 8' correspondant à celle située près du pied de l'asque. Pour le second asque, la spore 5' ayant très mal germé n'a pu être récupérée.

#### b) isolats pluriconidiens :

Deux souches ont été également isolées à partir de Choux de Milan malades (*Brassica oleracea* L., var. *sabauda* L., cultivar "De Pontoise"). Ces choux proviennent essentiellement de la région parisienne et ont été contaminés naturellement. A deux époques différentes, nous avons prélevé une pycnide sur une feuille de Chou maculée et effectué pour chacune un isolement pluriconidien au micromanipulateur.

### 2) CONDITIONS D'OBTENTION DES PERITHECES, *IN VITRO*

Sur les milieux naturels employés par LACOSTE, tiges sèches ou collets de Colza, tiges sèches de *Phragmites*, les cultures monoascales de

*Leptosphaeria maculans* sexualisent à 18°C, en présence de lumière blanche fournie par des tubes fluorescents "Blanc brillant de luxe" de 40 watts, à raison de 12 heures d'éclairement par jour. L'énergie reçue par les cultures est environ de 750  $\mu$ watts/cm<sup>2</sup>. Malheureusement, ces milieux et en particulier les tiges sèches ou les collets de Colza, ne fournissent que peu de périthèces. Par contre, d'assez nombreuses fructifications sexuées s'ébauchent sur de la paille de blé, en tubes de 25 x 200 contenant 1 g de paille pour 20 ml d'eau distillée. Les premières ébauches apparaissent vers le 21<sup>ème</sup> jour de culture et les ascospores se différencient, en général, 3 à 4 jours après ; dans chaque asque, il se forme toujours 8 ascospores de taille égale.

### 3) MILIEUX DE CULTURE

Les 17 souches définies ci-dessus sont maintenues en culture sur un demi cylindre de Carotte dans des tubes à étranglement dits de Roux, à 18°C et à la lumière blanche.

Leur vitesse de croissance est mesurée après 15 jours de culture en boîtes de Pétri, à l'obscurité et à 18°C, sur deux milieux naturels gélosés à 2 % :

- de l'eau de Pomme de terre à 50 g/l, glucosée à 1 % et enrichie en extrait de levure à 1 % (pH du milieu : 6,7) ;
- du jus Vg, non filtré à 25 % (v/v) (pH du milieu : 4,5).

Dix boîtes ont été coulées par souche ; le diamètre moyen des colonies est calculé et pour chaque milieu, les valeurs sont comparées deux à deux par la méthode de la différence des moyennes selon la loi de STUDENT-FISHER. Cette étude statistique permet d'établir un classement des souches selon que leur différence de vitesse de croissance est hautement significative (au seuil de 1 %), significative (au seuil de 5 %) ou non significative.

#### 4) MESURE DE LA PYCNOGENESE ET DU POUVOIR PATHOGENE

Dans les deux cas, les cultures sont réalisées en tubes 25 x 200 sur le milieu d'eau de Pomme de terre glucosé, enrichi en extrait de levure, à 18°C et en lumière blanche. Cinq tubes sontensemencés pour la même souche avec un fragment de mycélium prélevé sur Carotte. Après 20 jours de culture, la surface mycélienne est lavée avec 10 ml d'eau distillée à l'aide d'un mélangeur tourbillon, les conidies étant ensuite numérees avec un hématimètre.

Pour les contaminations, les volumes sont réunis et la concentration finale est amenée pour chaque souche à  $10^5$  conidies par millilitre de suspension. Le pouvoir pathogène est évalué en contaminant en microphytotrons des plantules de Chou rouge au stade cotylédonaire par pulvérisation de la suspension de pycniospores et en dénombrant les plantules nécrosées après 6 semaines d'incubation à 20°C. La raison pour laquelle nous avons choisi le Chou comme plante-hôte, à savoir sa grande sensibilité, est explicitée dans le chapitre suivant.

### III. RESULTATS

#### 1) MISE EN EVIDENCE D'UN HETEROThALLISME BIPOLAIRE

Sur la paille de blé, les cultures des 15 souches monoascosporées et des deux isolats demeurent stériles. Croisées deux à deux, les 8 ascospores du premier asque fournissent 16 combinaisons fertiles, les 7 ascospores du second n'en produisant que 12. Les périthèces sont mûrs et tous les asques renferment 8 ascospores. Ceci démontre bien l'existence d'un hétérothallisme bipolaire chez *Leptosphaeria maculans*, les deux types de thalles compatibles étant désignés par les signes (+) et (-).

Le croisement des deux isolats entre eux fournit également des périthèces mûrs, les ascospores étant en tous points semblables à celles décrites par LACOSTE pour *Leptosphaeria maculans* : elles sont fusoides, à 6 cellules, offrant une légère constriction au niveau des septums et plus fortement au septum central ; leur taille varie de 40 à 55  $\mu$  x 6  $\mu$ . A la différence des asques produits

par la confrontation de deux souches monoascosporeées compatibles, ceux obtenus par le croisement des deux isolats renferment très rarement 8 ascospores ; on en observe généralement que 6 ou 7 et il est même parfois possible de n'en trouver que deux très volumineuses. Il nous faut donc constater que les souches monoascosporeées et les deux isolats, ou seulement l'un des deux, ne sont pas totalement isogéniques.

A l'issue de cette confrontation des thalles, nous avons classé arbitrairement les souches :

- 2,6,7,8 - 1',2',4',7' et un isolat conidien comme étant de signe (+) ;
- 1,3,4,5 - 3',6',8' et le second isolat conidien comme étant du signe (-).

A l'examen du résultat, il est difficile d'avoir une idée précise sur la façon dont ségrègent les facteurs de compatibilité à la méiose. Le premier asque semble pré-réduit, le second post-réduit. Nous avons eu l'occasion, il y a quelques années, d'isoler les 8 ascospores de 4 asques ; le regroupement par asque des deux types de thalle avait donné :

- |                  |                  |
|------------------|------------------|
| a) (+) : 1,2,3,4 | b) (+) : 1,2,4,5 |
| (-) : 5,6,7,8    | (-) : 3,6,7,8    |
| c) (+) : 1,2,6,8 | d) (+) : 1,3,5,6 |
| (-) : 3,4,5,7    | (-) : 2,4,7,8    |

Un seul cas (a) fournit un exemple caractéristique d'asque dans lequel les facteurs de compatibilité ségrègent en première division de méiose ; pour (c) et (d), cette ségrégation semble avoir lieu au cours de la seconde division. Les deux modes de ségrégation paraissent donc s'opérer en ce qui concerne ces facteurs.

## 2) VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE

Nous avons regroupé dans le tableau 1 les résultats des contaminations en représentant pour chaque souche le pourcentage de plantules de Chou nécrosées.

Tableau 1 : Résultats des contaminations de plantules de Chou par des souches monoascosporees et 2 isolats conidiens de *Leptosphaeria maculans*.

Souches (signe du thalle)	i(+)	i(-)	1(-)	2(+)	3(-)	4(-)	5(-)	6(+)	7(+)	8(+)	1'(+)	2'(+)	3'(-)	4'(+)	6'(-)	7'(+)	8'(-)
Nombre de contaminées	54	55	60	54	54	53	55	49	54	56	51	57	60	50	63	66	45
Nombre de plantules nécrosées	53	35	31	21	34	31	37	28	41	40	34	39	36	25	48	49	37
Pourcentage de plantes nécrosées	98,1	63,6	51,6	38,2	62,9	58,5	67,3	57,1	75,2	71,4	66,6	68,4	60	50	76,2	74,2	82,2

i : isolat conidien.

Les pourcentages calculés indiquent clairement qu'au sein d'un asque, le pouvoir pathogène varie d'une souche monoascosporee à l'autre avec parfois une grande amplitude. Cette variabilité se rencontre également chez les isolats conidiens et on remarque tout particulièrement la forte agressivité de celui de signe (+).

Etant donné les différences de pouvoir pathogène observées pour les ascospores d'un même asque, peut-on regrouper ces souches en classes distinctes en fonction de leur agressivité ? Pour cela, nous avons appliqué la méthode du test  $\chi^2$  de PEARSON aux 8 souches monoascosporees du premier asque, puis au 7 souches du second, en calculant la valeur du  $\chi^2$  pour l'effectif global et en la comparant avec la valeur théorique donnée par la table, au seuil de 5 %, en fonction du nombre de degrés de liberté correspondant. Les résultats obtenus sont les suivants :

- premier asque : souches 1 à 8 :

$\chi^2$  calculé.....23,57  
 nombre de degrés de liberté....15  
 $\chi^2$  théorique.....25,00

- deuxième asque : souches 1' à 8' :

X <sup>2</sup> calculé.....	16,14
nombre de degrés de liberté.....	13
X <sup>2</sup> théorique.....	22,36

Les valeurs calculées étant inférieures dans les deux cas à celles de la table, on en conclut qu'il n'y a pas d'hétérogénéité entre les souches monoascosporées d'un même asque en ce qui concerne leur agressivité et que par conséquent, il n'y a pas de classes à établir.

Un tel résultat nous amène à écarter toute relation entre compatibilité et pouvoir pathogène. Par conséquent, l'étude des caractères cultureux des 17 souches se limitera à la recherche de la possibilité de différencier les thalles de signe (+) et (-) ainsi qu'à caractériser l'isolat très agressif.

### 3) RECHERCHE DE CRITERES CULTURAUX POUVANT ETRE EN RELATION AVEC LE SIGNE DES THALLES COMPATIBLES ET L'AGRESSIVITE DE L'ISOLAT DE SIGNE (+)

#### a) aspect des cultures sur Carotte :

La plupart des souches monoascosporées ainsi que l'isolat de signe (-) se présentent sous la forme d'une trame mycélienne compacte pigmentée de jaune et de vert s'assombrissant en vieillissant ; le mycélium des souches 6 (de signe +) et 6'(de signe -) est beaucoup moins pigmenté. A première vue, il n'y a pas de différences phénotypiques entre les souches compatibles. Par contre, pour l'isolat agressif de signe (+), l'aspect de la culture est très différent ; la nappe mycélienne est nettement plus rase et l'abondance des pycnides donne une teinte noirâtre à la culture dès les premiers jours du développement mycélien. La libération des conidies dans un mucilage rose provoque la formation caractéristique de nombreuses petites plages colorées.

En conséquence, les différents thalles ne présentent aucun caractère particulier pouvant être relié à l'hétérothallisme.

#### b) croissance sur des milieux naturels gélosés :

. *croissance sur milieu d'eau de Pomme de terre* : la valeur moyenne du diamètre des colonies exprimée en mm est figurée dans le tableau 2.



Tableau 2 : Valeur moyenne de la croissance de 15 souches mono-ascosporées et de 2 isolats conidiens de *Leptosphaeria maculans* sur un milieu d'eau de Pomme de terre.

Souches (signe du thalle)	i(+)	i(-)	1(-)	2(+)	3(-)	4(-)	5(-)	6(+)	7(+)	8(+)	1'(+)	2'(+)	3'(-)	4'(+)	6'(-)	7'(+)	8'(-)
Diamètre moyen	45,6	51,1	39,2	36,1	39,3	39,1	36,4	40,4	35,0	40,9	46,0	38,5	38,8	36,8	52	47,8	50,9
Ecart-type	2,0	1,5	1,2	1,6	1,6	1,1	1,1	1,6	2,0	1,9	2,3	3,4	2,3	3,2	2,0	2,5	1,7

i : isolat conidien.

Statistiquement, les souches peuvent être regroupées :

-en deux classes pour le premier asque

[1(-),3(-),4(-),6(+),8(+)] et [2(+),5(-),7(+)]

-en trois classes pour le second

[1'(+),7'(+)] , [2'(+),3'(-),4'(+)] et [6'(-),8'(-)].

La croissance des deux isolats est significativement très différente de celles des souches monoascosporées du premier asque uniquement.

Sur ce milieu et dans nos conditions de culture, les 17 colonies présentent beaucoup de similitudes avec en particulier un mycélium d'aspect laineux, légèrement brunâtre, pigmenté de gris au centre et bordé par une frange vert-olive. Les pycnides sont en général peu nombreuses sauf pour les souches 4,2',4',6',8' ; par contre chez l'isolat agressif, elles se différencient en très grand nombre.

Aucune relation ne peut être faite entre le signe des thalles compatibles, leur vitesse de croissance et leur aspect sur ce milieu ; d'autre part, hormis une forte pycniogenèse, l'isolat agressif ne présente aucun caractère phénotypique particulier.

. croissance sur le milieu au jus  $V_8$  : Les résultats sont représentés de la même façon que pour l'essai précédent, dans le tableau 3.

Tableau 3 : Valeur moyenne de la croissance de 15 souches monosporées et de 2 isolats conidiens de *Leptosphaeria maculans* sur un milieu au jus  $V_8$ .

Souches (signe du thalle)	i(+)	i(-)	1(-)	2(+)	3(-)	4(-)	5(-)	6(+)	7(+)	8(+)	1'(+)	2'(+)	3'(-)	4'(+)	6'(-)	7'(+)	8'(-)
Diamètre moyen	44,2	34,3	40,1	36,0	40,7	25,2	25,1	27,1	38,1	28,9	34,6	37,7	33,6	37,8	39,4	32,6	37,5
Ecart-type	1,2	1,6	1,0	1,5	2,0	0,7	0,9	0,9	1,4	1,7	2,5	1,2	1,3	2,4	2,2	1,3	1,1

i : isolat conidien.

Les souches se classent de la façon suivante :

- pour le premier asque

[1(-),3(-)] - [2(+)] - [4(-),5(-)] - [6(+)] - [7(+)] - [8(+)]

- pour le deuxième asque

[1'(+),3'(-),7'(+)] - [2'(+),4'(+),6'(-),8'(-)].

Sur ce milieu, la différence entre la vitesse de croissance de l'isolat agressif et celle des 16 autres souches est hautement significative. De plus, la colonie est très différente d'aspect : le mycélium brun-foncé se développe régulièrement de façon très rase en fournissant une abondante pycnogenèse, tandis que les autres souches, y compris le deuxième isolat, se caractérisent par un mycélium duveteux, blanchâtre avec un anneau périphérique brun-orangé. La formation de secteurs a été également observée chez une souche monosporée, la souche 1' ; tout comme pour le milieu d'eau de Pomme de terre, en

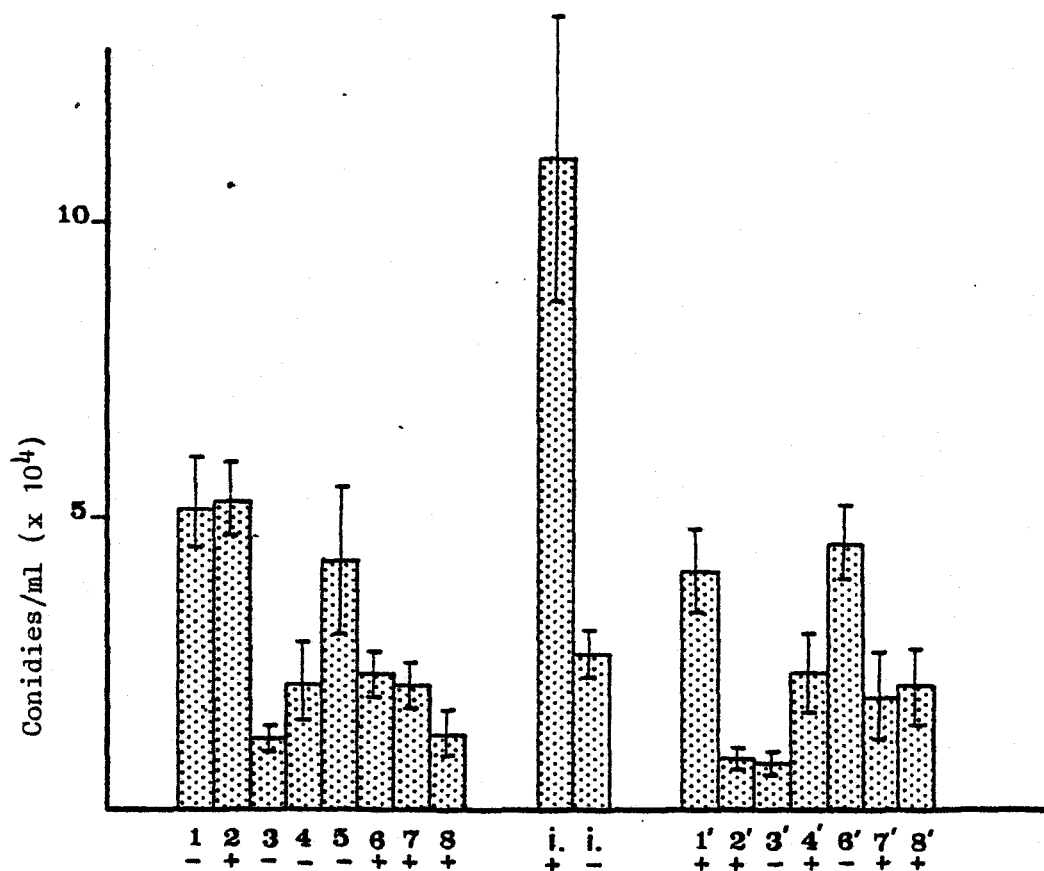
présence de jus V<sub>8</sub> on ne note aucune caractéristique particulière relative aux thalles compatibles ; par contre l'isolat agressif présente un phénotype très particulier.

c) relation avec la pycniogénèse :

Le graphique 1 illustre les différentes capacités des souches à sporuler sur le milieu d'eau de Pomme de terre ; les valeurs indiquées représentent le nombre de conidies par millilitre de suspension.

L'abondante pycniogénèse observée antérieurement pour l'isolat agressif à la lumière sur Carotte et également à l'obscurité sur eau de Pomme de terre et jus V<sub>8</sub> est confirmée dans cet essai. En ce qui concerne les autres souches, la variabilité de la sporulation est très grande et rend impossible toute relation avec l'hétérothallisme.

*Graphique 1 : Variation de la pycniogénèse pour 15 souches monosporées et 2 isolats conidiens de *Leptosphaeria maculans*.*



(+) et (-) : signes des thalles  
 i. : isolat conidien  
 I : valeur de l'écart-type.

## IV. DISCUSSION

Les résultats obtenus avec des souches monoascosporés de *Leptosphaeria maculans* concordent avec ceux des travaux de CUNNINGHAM et POUND en particulier qui ont été réalisés avec des isolats et des souches monoconidiennes de *Phoma linguam*.

Les souches monoascosporées présentent donc une grande variabilité de leur vitesse de croissance, de leur sporulation et de leur pouvoir pathogène. HUGHES constatait déjà en 1933 qu'on ne pouvait retenir le pouvoir pathogène comme critère de différenciation entre des souches de *Phoma linguam*. D'une autre manière en ayant recours à une méthode statistique, nous confirmons ce point de vue en démontrant qu'on ne peut établir de classes distinctes entre les ascospores d'un même asque de *Leptosphaeria maculans*, en se basant sur le seul critère d'agressivité. Toutefois, il semble exister chez *Leptosphaeria maculans* un type de thalle très fortement pathogénique en conditions expérimentales, possédant des caractéristiques culturelles particulières très différentes de celles de souches monoascosporées. La distinction est nette sur Carotte et sur un milieu au jus V<sub>8</sub> : on observe toujours une abondante pycniogenèse et une pigmentation brun foncé à noir de la culture. Nous avons eu l'occasion de comparer cette souche avec un isolat très agressif provenant de Choux malades cultivés dans la région du Wisconsin\* (Etats-Unis). Cet isolat présente les mêmes caractéristiques culturelles que le nôtre. Une autre souche fortement pathogène, isolée cette fois à partir de pieds de Colza nécrosés, a été récemment décrite au Canada comme présentant de très grandes analogies avec la souche "Wisconsin" (PETRIE, 1978).

Tout ceci semble donc confirmer l'existence d'un phénotype agressif chez *Leptosphaeria maculans* ; étant donné l'absence quasi totale de similitudes culturelles entre cet isolat et les souches monoascosporées et en raison de sa nature hétérothallique, nous pouvons supposer que cette souche résulte plutôt d'une mutation que d'une hétérocaryose.

\* Nous remercions vivement le Professeur P.D. MAXWELL, de l'Université de Madison (Etats-Unis), de nous avoir procuré cette souche.

Dans cette étude de la biologie du Champignon, nous avons mis en évidence l'existence d'un hétérothallisme bipolaire chez *Leptosphaeria maculans*. Malheureusement, aucun rapprochement ne peut être établi entre les deux types de thalles compatibles et certains caractères cultureux.

## V. CONCLUSION

*Leptosphaeria maculans* est un Champignon présentant une très grande variabilité de ses souches monoascosporees, excepté pour leurs caractères phénotypiques qui sont assez voisins. En outre, le Champignon est capable de produire naturellement un thalle très agressif dont le phénotype se différencie nettement de celui des souches précédentes sur certains milieux. Nous disposons donc d'une souche très agressive pour la suite de notre expérimentation. Dans l'immédiat, nous nous proposons d'étudier son influence, en conditions contrôlées, sur diverses espèces cultivées du genre *Brassica*, afin de savoir si toutes présentent la même sensibilité.

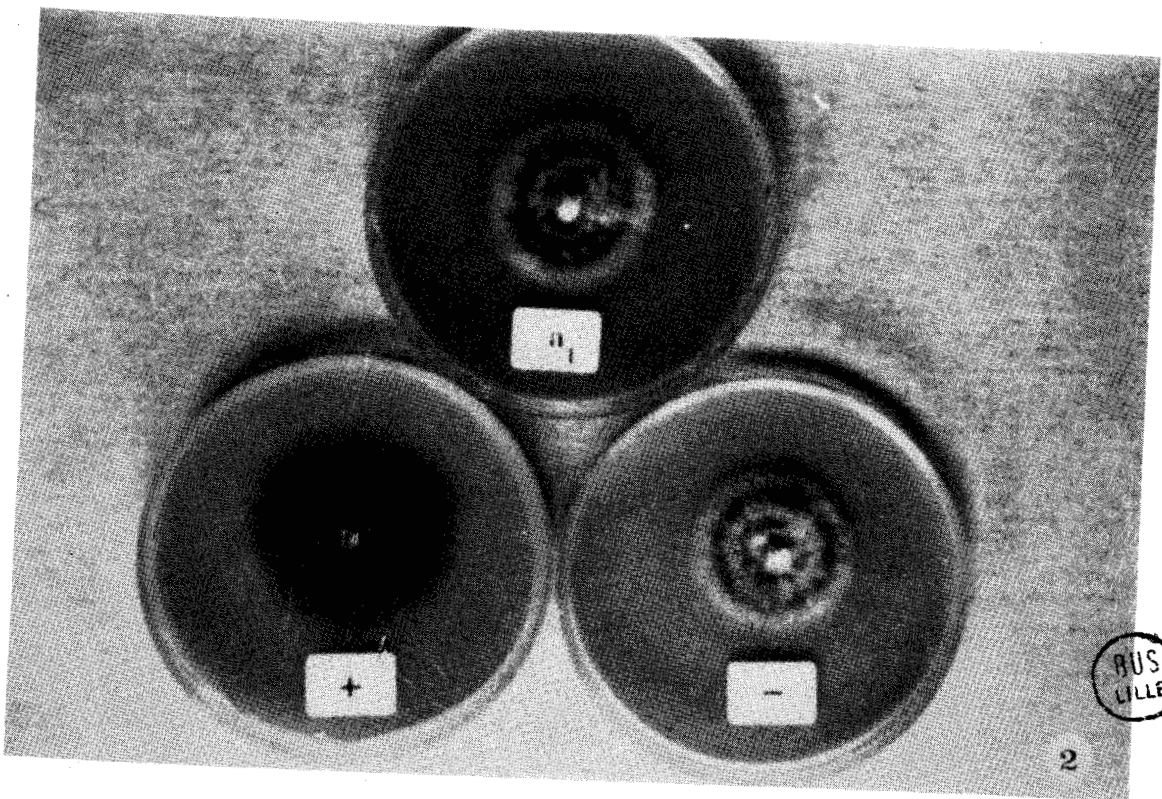
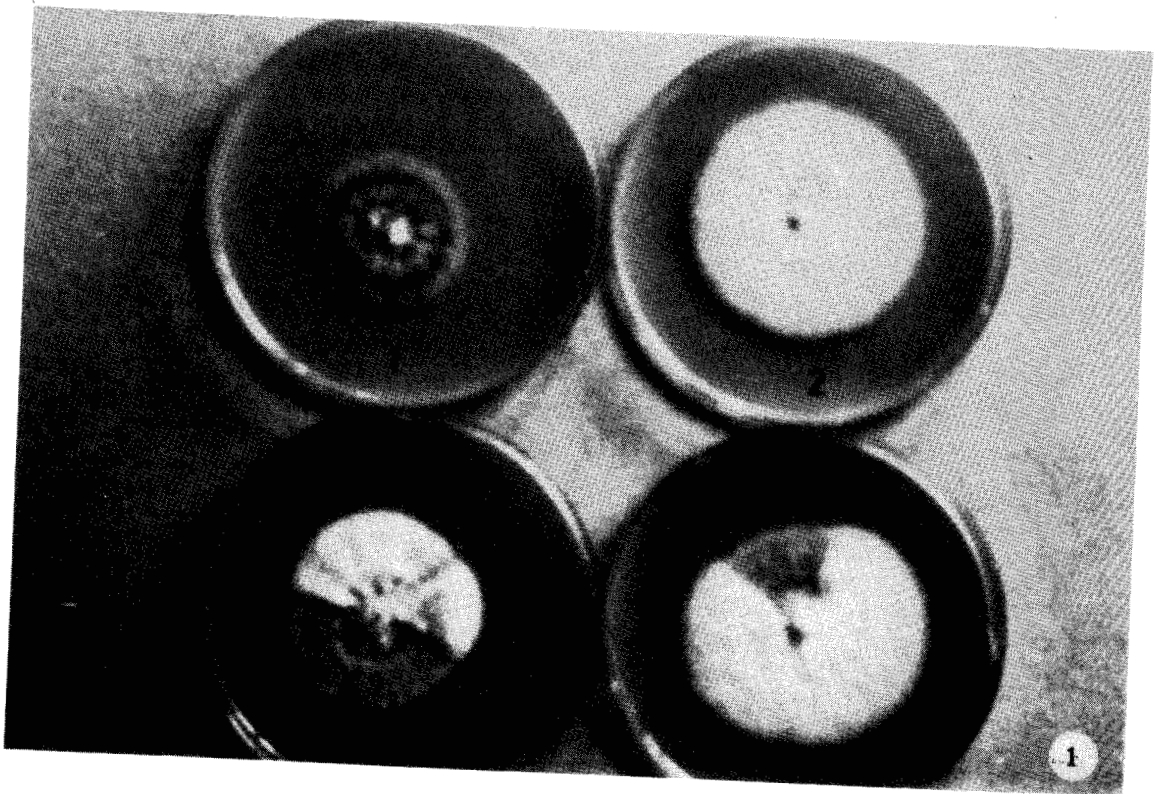
*Photo 1 :*

Aspect de la souche monoascosporee 1' sur le milieu au jus V<sub>8</sub> à 18°C et à l'obscurité. Noter la formation de secteurs et les deux phénotypes très distincts obtenus (1 et 2) (1 : phénotype caractéristique d'une souche monoascosporee).

*Photo 2 :*

Phénotypes des deux isolats conidiens de signe (+) et (-) et d'une souche monoascosporee sur un milieu au jus V<sub>8</sub>, à 18°C et à l'obscurité.

(+) : isolat agressif.



## CHAPITRE II : ETUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE LA MALADIE DE LA NÉCROSE DES CRUCIFÈRES EN CONDITIONS CONTRÔLÉES

### I. INTRODUCTION

L'objectif principal de cette étude est d'analyser, en conditions contrôlées, l'influence de deux paramètres, le génotype et la température, sur le devenir de la maladie de la nécrose des Crucifères à la suite d'une infection par des pycniospores de *Phoma lingam*.

Nous avons choisi comme plantes-hôtes, trois espèces cultivées du genre *Brassica* : deux espèces diploïdes, le Chou, *Brassica oleracea* L. ( $2n = 18$ ,  $x = 9$ ), la Navette, *Brassica campestris* L. ( $2n' = 20$ ,  $x' = 10$ ) et une espèce allotétraploïde naturelle résultant du croisement entre les deux précédentes, le Colza, *Brassica napus* ( $2n = 38$ ,  $2x + 2x' = 18 + 20$ ). Les variétés de Colza sont connues pour présenter une gamme très large de sensibilité à la maladie, aussi nous a-t-il paru particulièrement intéressant de savoir si les deux espèces parentes possèdent des gènes de résistance.

L'expression de ces gènes de résistance est-elle soumise à certaines conditions de température ? Ce second aspect de notre étude a été abordé en fixant de façon constante deux températures d'incubation,  $14^{\circ}\text{C}$  et  $24^{\circ}\text{C}$ , afin de comparer le comportement d'un cultivar très résistant de Colza d'hiver à une température voisine de celle des conditions naturelles de culture et à une température beaucoup plus élevée.



Le choix des pycniospores plutôt que des ascospores comme source d'inoculum est justifié pour deux raisons. La première est qu'il est très facile et rapide d'en obtenir d'importantes quantités en culture pure, ce qui n'est pas toujours le cas pour les ascospores, les mécanismes de la reproduction sexuée du *Leptosphaeria maculans* restant souvent difficiles à contrôler. La seconde raison est que certains aspects fondamentaux concernant le pouvoir infectieux des conidies, en conditions contrôlées, sont encore mal connus. Bien avant la mise en évidence du rôle fondamental joué par les ascospores dans le développement épidémique de la maladie, d'abord en France (LACOSTE et al., 1969 ; BRUNIN, 1970 ; BRUNIN et LACOSTE, 1970) puis à l'étranger (Mc GEE et EMMETT, 1977 ; Mc GEE, 1977), les pycniospores avaient été rendues responsables de la propagation de la maladie (WALKER, 1922) et avaient permis la reproduction de symptômes à la suite d'inoculations artificielles, réalisées malheureusement dans des conditions très mal définies (HUGHES, 1933 ; POUND, 1947 ; CRUICKSHANK et PALMER, 1954). Si le pouvoir contaminant des pycniospores ne fait plus de doute (ALABOUVETTE et al., 1974) ; WOOD et BARBETTI, 1977), par contre leur rôle dans la propagation de la maladie est fort discuté (Mac KAY, 1956 ; ALABOUVETTE, 1969). Toutefois, il semble que les pycniospores, libérées à partir des pycnides formées sur des macules cotylédonaire et foliaires consécutivement à une inoculation artificielle, soient effectivement capables d'attaquer des plantes voisines non inoculées et d'y provoquer des nécroses. Mais les effets ne se remarquent que dans un rayon de 90 cm et décroissent très rapidement au fur et à mesure que la distance séparant les plantes non inoculées du foyer d'infection augmente (BARBETTI, 1976). Par conséquent, le pouvoir de dispersion des conidies existe, mais demeure extrêmement faible comparativement à celui des ascospores (ALABOUVETTE et BRUNIN, 1970).

Etudiant le pouvoir infectieux des pycniospores et la résistance variétale en conditions naturelles et contrôlées, ALABOUVETTE ne parvient pas, dans le second cas, à classer les variétés de Colza dans leur ordre de sensibilité et conclut que la sensibilité variétale ne peut être valablement étudiée que dans des conditions normales de culture (ALABOUVETTE et al., 1974). Cette étude mérite d'être reprise et approfondie pour savoir si des infections réalisées en conditions contrôlées permettent ou non d'établir un classement de lignées de Colza d'après leur sensibilité.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1) ESPECES VEGETALES UTILISEES

Nous avons choisi pour l'expérimentation 4 variétés de Chou en prenant un cultivar de chaque, un cultivar de Navette et deux cultivars de Colza oléagineux d'hiver connus pour leur sensibilité très différente au Champignon. Ces variétés sont les suivantes :

#### - Brassica oleracea L.

- . var. *capitata* L. f. *rubra* (Chou rouge) cultivar "Tête de Nègre", graines Clause ;
- . var. *botrytis* L. (Chou Fleur) cultivar "Merveille des quatre saisons", graines Clause ;
- . var. *gemmifera* DC. (Chou de Bruxelles), cultivar "Anagoor", graines Clause ;
- . var. *sabauda* L. (Chou de Milan) cultivar "de Pontoise", graines Clause.

#### - Brassica campestris L.

. (Navette) - cultivar "Daisy" ; ce cultivar est un tétraploïde obtenu expérimentalement ;

#### - Brassica napus L.

. var. *oleifera* (DC.) Metzger, (Colza), cultivars :- "R<sub>0</sub>" très résistant, obtention des Etablissements Ringot  
 - "Expandier" très sensible, obtention des Etablissements Dippe.

### 2) CONDITIONS DE CULTURE

Toutes les graines de Chou sont au préalable désinfectées à l'eau chaude, 20 minutes à 54°C (NORTON, 1919). Les semis sont faits en pots de section carrée de 12 cm de côté, remplis de terre dite de bruyère "Fertiligène", support végétal à base de Sphaignes, de pH = 5 et renfermant 22 % de matière organique. Les pots sont placés à 14°C, en microphytotrons de 1 m<sup>3</sup> "Sapratin", équipés chacun de 2 lampes à iodure métallique "Osram" de 400 watts éclairant les cultures à raison de 12 heures de lumière par jour.

Aussitôt après leur levée, les plantules reçoivent quotidiennement une solution nutritive ; sa composition est établie de façon à obtenir un rapport entre les éléments N/P/K/Mg/S égal à 15/15/20/2/5. La valeur du rapport N/P/K est très proche de celle des engrais composés que l'on fournit aux Colzas d'hiver au début de leur croissance. La composition de la solution est complétée par un apport d'oligoéléments : fer chélaté, zinc, cuivre et bore dont les concentrations respectives sont celles indiquées dans la formule du milieu de Hoagland (HOAGLAND, et SNYDER, 1933). La solution nutritive est composée des éléments suivants :

- Macroéléments (mg)

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	1425
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$ .....	2107
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	1435
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....	610
$\text{K}_2\text{SO}_4$ .....	925

- Oligoéléments (mg)

$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ complexé avec de l'EDTA $\text{Na}_2$ ..	$50 \cdot 10^{-3}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	$550 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ .....	$50 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....	$50 \cdot 10^{-3}$
$\text{H}_2\text{O}$ q.s.p.....	1000 ml

### 3) REALISATION DU COMPLEXE HOTE-PARASITE

Les plantules sont contaminées au stade cotylédonaire, 10 jours après le semis, par pulvérisation avec une suspension de pycniospores de la souche très agressive, renfermant  $10^5$  conidies par millilitre. Cette suspension de conidies est obtenue à partir de cultures, en tubes pyrex 25 x 200, effectuées à  $18^\circ\text{C}$  en présence de 12 heures de lumière par jour sur un milieu d'eau de pomme de terre à 50 g/l, glucosé à 1 %, enrichi à 1 % en extrait de levure, et gélosé à 1,5 %. Les conidies sont recueillies au bout de 10 jours de culture par lavage du mycélium avec de l'eau distillée stérile, à l'aide d'un mélangeur tourbillon et numérées avec un hématimètre.

De l'eau distillée est pulvérisée sur les plantes témoin. Une heure avant l'inoculation, la température et l'humidité relative des enceintes sont portées respectivement à  $20^\circ\text{C}$  et à saturation ; ces conditions sont maintenues

pendant 24 heures. La température est ensuite fixée pendant toute la durée de l'expérience soit à 14°C, soit à 24°C, et l'hygrométrie ramenée à 85 %. Pour chaque cultivar, 50 plantules environ ont été contaminées et les essais ont été répétés 3 fois.

L'évolution de la maladie est suivie pendant une durée variable, dépendante de la température, correspondant dans les deux cas au temps de culture nécessaire pour obtenir des plantes au stade 9ème feuille, soit 12 semaines à 14°C et 8 semaines à 24°C. La sensibilité des différentes variétés est estimée d'après :

- l'aspect des macules cotylédonaire et le nombre de plantes présentant ce symptôme ;
- le nombre d'hypocotyles nécrosés.

### III. RESULTATS

#### 1) INCUBATION A 14°C

##### a) macules cotylédonaire :

Les premières macules apparaissent sur les cotylédons des Choux uniquement, dès le 10ème jour d'incubation, sous la forme d'une plage brunâtre, diffuse ; 2 jours plus tard, on commence à les observer sur le cultivar de Colza "Expander".

L'évolution est ensuite rapide chez les 4 variétés de Chou. Au 15ème jour d'incubation, toutes les plantules sont maculées ; les macules s'étendent progressivement à la surface du cotylédon, les tissus se dessèchent fortement et un début d'amincissement des pétioles commence à s'observer. De nombreuses pycnides se forment sur les parties flétries.

Pour les Colzas et la Navette, cette évolution est différente. Les macules formées sur les cotylédons du cultivar "Expander" ont un aspect différent de celles observées sur les Choux ; elles se présentent sous la forme d'une tache nécrotique typique, brunâtre, circulaire, accompagnée d'une chlorose des tissus périphériques, et ont un aspect translucide à la lumière. Malgré sa sensibilité, on dénombre moins de plantules maculées chez ce cultivar que chez les

variétés de Chou dans les 15 premiers jours suivant la contamination. Ce n'est qu'au bout de 27 jours d'incubation que les symptômes s'étendent à la quasi totalité des plantes. Pour le cultivar "R<sub>9</sub>" et la Navette, rares sont les cotylédons maculés sur lesquels on n'observe en général qu'une seule petite tache nécrotique, beaucoup moins large que celle formée sur les cotylédons du cultivar "Expander".

Le symptôme cotylédonaire évolue donc différemment en aspect et en intensité pour les 3 espèces considérées. Les 4 variétés de Chou se distinguent nettement des variétés de Colza et de Navette par l'apparition plus précoce et plus importante de macules présentant, en outre, un aspect différent. Toutefois, la maladie prend pratiquement les mêmes proportions chez le cultivar très sensible de Colza que chez les Choux. Quant au cultivar de Colza "R<sub>9</sub>" et à la Navette, tous deux manifestent une nette résistance qui se traduit par la formation tardive et en moins grand nombre de très petites macules.

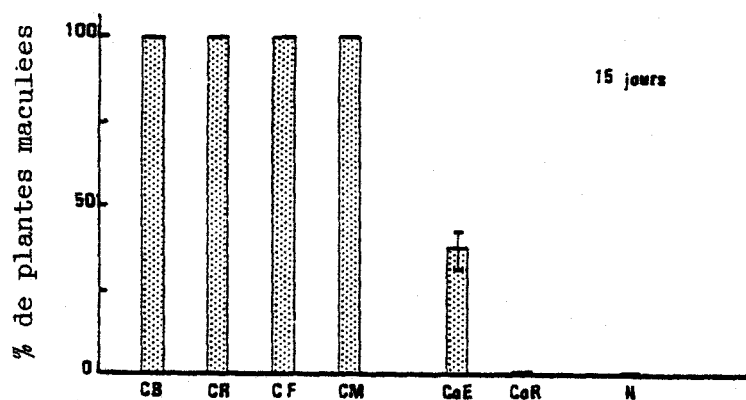
b) nécrose des hypocotyles :

L'évolution de ce symptôme chez les 3 espèces est pratiquement identique à ce qui vient d'être décrit pour la formation des macules cotylédonaires. Les nécroses apparaissent tout d'abord sur les hypocotyles des Choux, aux environs du 25ème jour d'incubation, alors que les hypocotyles du cultivar "Expander" présentent des débuts de nécrose plus tardivement et surtout dans une proportion beaucoup plus faible. Les premières nécroses ne se forment généralement pas au collet, mais plutôt dans la région supérieure de l'hypocotyle, juste sous le noeud cotylédonaire. Ceci a déjà été observé par ALABOUVETTE à la suite d'inoculations artificielles par pycniospores (ALABOUVETTE, 1969). Par contre, les nécroses plus tardives se localisent pratiquement toutes au collet. Au bout de 3 mois d'incubation, tous les Choux présentent des nécroses très profondes, de nombreux collets sont sectionnés ; la plupart des plantes flétrissent, certaines sont même totalement desséchées. Parmi les quelques plantes que le Champignon n'a pas encore gravement perturbées, on note souvent une extension de la nécrose à l'épicotyle et au pétiole de la première feuille. Parfois même, celle-ci gagne la région apicale et donne lieu à la formation d'un second bourgeon apical ; cette néoformation ne s'est toutefois produite qu'une seule fois au cours de nos différentes expérimentations. Par contre, il est très fréquent d'observer

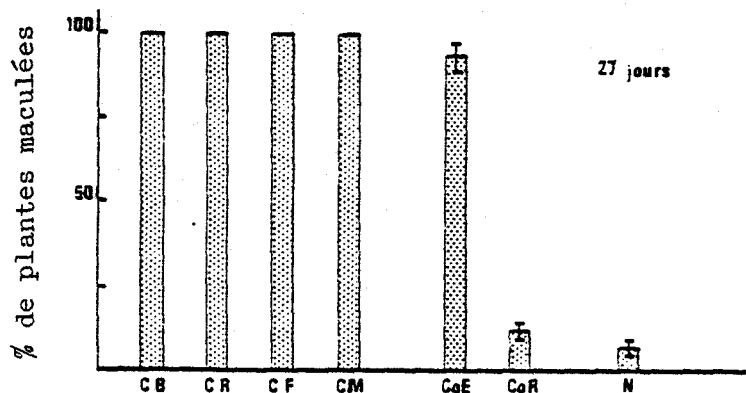
la formation de racines adventives le long de l'hypocotyle, mais également au niveau du noeud cotylédonaire. Cette rhizogenèse prend parfois un développement inattendu, puisque dans quelques cas, les racines néoformées au noeud cotylédonaire sont capables de s'allonger suffisamment et de gagner le substrat dans lequel, ensuite, elles se développent. Cette attaque s'accompagne, en plus, de graves symptômes foliaires, surtout au niveau des premières feuilles où le Champignon provoque très souvent la nécrose des tissus périphériques de la nervure centrale sur toute la longueur de la feuille. Ces effets secondaires n'ont jamais été observés pour les Colzas et la Navette pendant la durée de l'expérimentation, bien que la formation de racines sur des pivots nécrosés de Colza soit couramment observée, en champ ; quelques macules foliaires typiques sont tout au plus obtenues et ceci sans aucune relation directe avec la sensibilité variétale.

Nous avons illustré dans les graphiques 2 et 3, l'évolution de la maladie à 14°C chez les 3 espèces différentes en représentant le pourcentage de plantes porteuses de macules cotylédonaires à 2 temps d'incubation différents (graphique 2) et le pourcentage d'hypocotyles nécrosés 3 mois après la contamination (graphique 3). Les valeurs des écarts-type sont également figurées.

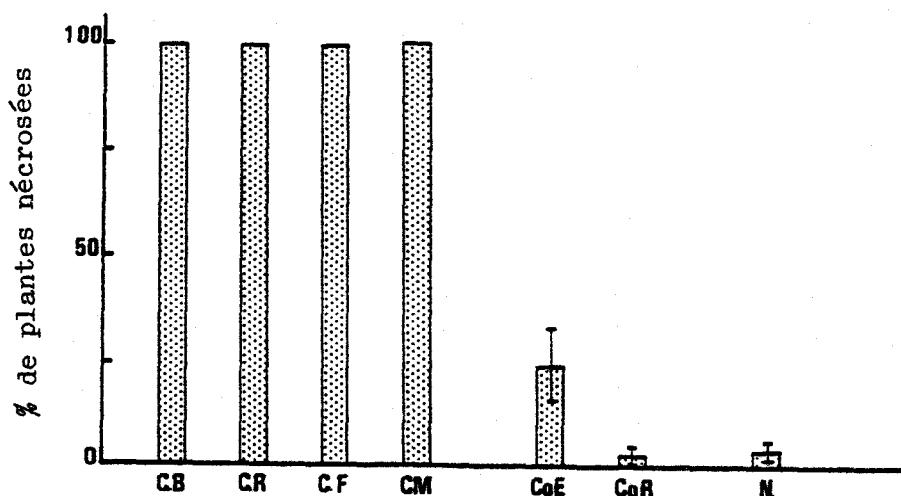
*Graphique 2 : Evolution du pourcentage de plantes porteuses de macules cotylédonaires chez 3 espèces du genre Brassica après 15 et 27 jours d'incubation à 14°C.*



CB : cultivar de Chou de Bruxelles  
 CR : cultivar de Chou rouge  
 CF : cultivar de Chou-fleur  
 CM : cultivar de Chou de Milan  
 CoE : cultivar de Colza "Expander"  
 CoR : cultivar de Colza "R<sub>9</sub>"  
 N : cultivar de Navette



Graphique 3 : Pourcentage de plantes nécrosées chez 3 espèces du genre *Brassica* après 3 mois d'incubation à 14°C. (même légende que le graphique 2).



## 2) INCUBATION A 24°C

### a) macules cotylédonaires :

A cette température, la maladie évolue de la même façon qu'à 14°C mais beaucoup plus rapidement ; les premières macules cotylédonaires apparaissent d'abord sur les Choux dès le 7ème jour d'incubation et sont généralisées à l'ensemble des plantules 4 jours plus tard tandis que les premiers cotylédons maculés ainsi que leur pétiole commencent à flétrir. La première feuille présente également des macules beaucoup plus tôt, en général à partir du 15ème jour.

Comme à 14°C, les symptômes cotylédonaires ne se développent sur la variété sensible de Colza qu'un à deux jours après leur formation sur Choux ; mais l'évolution est ici beaucoup plus rapide, toutes les plantules étant maculées au bout de 15 jours d'incubation.

Pour le cultivar résistant de Colza et la Navette, les résultats sont particulièrement intéressants. L'élévation de température provoque chez ces deux variétés à la fois un accroissement de la vitesse d'action du Champignon et une augmentation de la sensibilité des cotylédons qui se traduisent, 15 jours après la contamination, par l'obtention d'un nombre de plantes maculées beaucoup plus élevé qu'après 27 jours d'incubation à 14°C. En outre, à partir de cette date, la totalité des cotylédons contaminés présente un début de flétrissement sur toute leur périphérie et par la suite, le symptôme gagne la majeure partie de la surface de l'organe. Ce processus est une manifestation atypique de l'action du Champignon sur les cotylédons et pour cette raison, nous n'avons tenu compte que des plantules présentant des macules caractéristiques pour l'interprétation graphique des résultats.

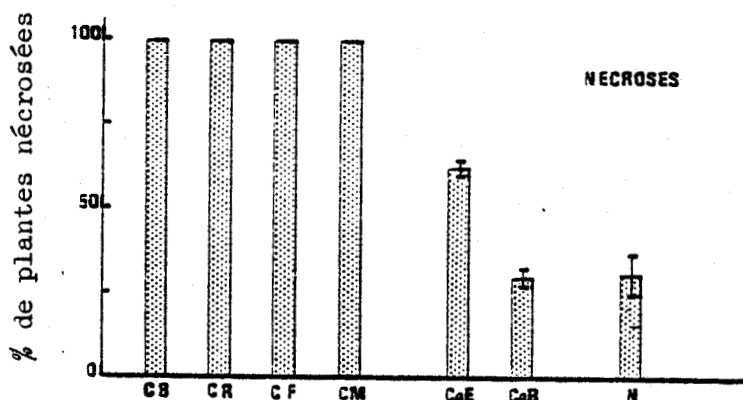
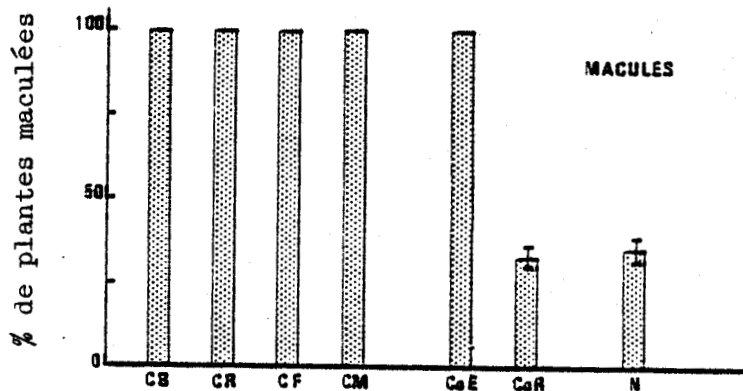
b) nécrose des hypocotyles

Comme précédemment pour les macules cotylédonaire, l'attaque du Champignon se manifeste par une nécrose plus précoce, plus rapide et plus importante des hypocotyles, les premiers symptômes pouvant être observés au bout de 15 jours sur les Choux et 3 semaines sur le cultivar de Colza "Expander". Le parasite provoque également chez les Choux les mêmes perturbations et les mêmes traumatismes qu'à 14°C ; toutefois, les pycnides se différencient plus rarement et uniquement sur des hypocotyles très fortement amincis.

Les répercussions de l'élévation de température sur la sensibilité des hypocotyles du cultivar de Colza "R<sub>0</sub>" et de la Navette sont identiques à celles observées pour les cotylédons. En effet, au même stade végétatif qu'à 14°C, les nécroses sont en moyenne 5 à 7 fois plus nombreuses, les pivots les plus atteints présentant souvent de profondes échancrures.

Les résultats de l'agression parasitaire, à 24°C, sur les cotylédons et les hypocotyles des variétés des différentes espèces sont regroupés dans les graphiques 4 et 5.

*Graphiques 4 et 5 : Pourcentage de plantes porteuses de macules cotylédonaire, 11 jours après l'inoculation (graphique 4) et de plantes nécrosées, 8 semaines après l'inoculation (graphique 5) à 24°C chez 3 espèces du genre Brassica. (même légende que le graphique 2).*





## 3) SENSIBILITE VARIETALE DES COTYLEDONS DE COLZA

Cette étude de l'influence du génotype et de la température sur l'évolution des symptômes de la maladie permet de constater qu'à basse température, on peut nettement différencier la sensibilité de cultivars de Colza non seulement par le dénombrement des nécroses au bout de 3 mois d'incubation, mais également en suivant l'évolution du symptôme cotylédonaire. Ceci est particulièrement vrai pour 2 cultivars de sensibilité très différente comme le sont "Expandar" et "R<sub>9</sub>"; en est-il tout autant pour d'autres cultivars dont les différences de comportement en champ sont moins distinctes ? Pour le savoir, nous avons contaminé dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, 8 cultivars de Colza, l'ensemble présentant une gamme très large de sensibilité à la maladie "R<sub>9</sub>", très résistant ; "R<sub>30</sub>" et "Marcus", résistants ; "Major", assez sensible ; "Primor", sensible ; "Rapol", "Expandar" et "Eurora", très sensibles. Comme témoin extrêmement sensible, nous avons choisi la variété de Chou rouge "Tête de Nègre". Les plantules porteuses de macules cotylédonaires ont été dénombrées après 25 jours d'incubation et les essais ont été répétés au moins 3 fois. Nous avons d'abord vérifié l'homogénéité des résultats pour chaque cultivar par la méthode du test  $\chi^2$  de PEARSON ; les valeurs du  $\chi^2$  calculé comparées à celles de la table au seuil de 5 % sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

*Tableau 4 : Comparaison entre les valeurs du  $\chi^2$  calculé et celles de la table, au seuil de 5 %, pour chaque cultivar.*

Variétés	$\chi^2$ calculé	$\chi^2$ de la table au seuil de 5 %	degrés de liberté
R <sub>9</sub>	8,19	19,68	11
R <sub>30</sub>	4,40	11,07	5
Marcus	3,58	11,07	5
Major	24,9	14,07	7
Primor	0,35	11,07	5
Rapol	4,05	11,07	5
Expandar	2,38	14,07	7
Eurora	1,28	11,07	5

A l'exception du cultivar "Major" que nous avons dû écarter, les valeurs du  $\chi^2$  calculé sont nettement inférieures à celles de la table, les résultats des différentes répétitions sont donc homogènes. En prenant les cultivars deux à deux, nous avons constitué 6 couples "R<sub>9</sub> et R<sub>30</sub>", "R<sub>30</sub> et Marcus", "Marcus et Primor", "Primor et Rapol", "Rapol et Expander", "Expander et Eurora", auxquels nous avons soumis le test  $\chi^2$ . Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 5.

*Tableau 5 : Comparaison entre les valeurs du  $\chi^2$  calculé et celles de la table au seuil de 5 %, pour chaque couple de cultivars.*

Variétés	$\chi^2$ calculé	$\chi^2$ de la table au seuil de 5 %	degrés de liberté
R <sub>9</sub> - R <sub>30</sub>	63,07	33,41	17
R <sub>30</sub> -Marcus	14,01	19,68	11
Marcus-Primor	50,22	19,68	11
Primor-Rapol	91,04	19,68	11
Rapol-Expander	22,68	22,36	13
Expander-Eurora	3,72	22,36	13

Pour les couples "Expander-Eurora" et "R<sub>30</sub>-Marcus" uniquement, le  $\chi^2$  calculé est inférieur à celui de la table, les cultivars ne sont donc pas différents au sein de chaque association.

Les 7 cultivars de Colza peuvent, par conséquent, être rangés dans 5 classes distinctes de sensibilité croissante : "R<sub>9</sub>" < "R<sub>30</sub>-Marcus" < "Primor" < "Rapol" < "Expander-Eurora". Cette hiérarchisation est tout à fait conforme au classement établi d'après les données agronomiques que nous avons pu recueillir.

#### IV. DISCUSSION

Il ressort de cette étude qu'il existe de très nettes différences dans le comportement à la maladie entre les variétés appartenant aux 3 espèces étudiées. Les 4 variétés de Chou manifestent, en effet, une extrême sensibilité au Champignon, caractérisée par une apparition précoce des symptômes ainsi que par une attaque particulièrement sévère, généralisée à l'ensemble des plantes, quelle que soit la température. La comparaison entre l'évolution de la maladie chez cette espèce et le cultivar très sensible de Colza "Expandier" est significative et permet de supposer que les variétés de Chou sont également dépourvues de gènes de résistance. Toutefois, le parasite se manifeste moins rapidement chez le Colza sensible. Ce retard n'est guère important en ce qui concerne la formation des macules cotylédonaires, de l'ordre de 1 à 2 jours, mais le devient nettement lorsqu'il s'agit des nécroses des hypocotyles. De plus, dans ce cas, l'attaque atteint un degré moindre, tout au moins au terme des premiers mois d'incubation et surtout à basse température. Les modifications structurales, qualitatives et quantitatives, engendrées par l'hybridation au niveau des constituants cellulaires sont vraisemblablement à l'origine du retard mis par l'agent pathogène à altérer les tissus de cet hôte, même si celui-ci est classé comme sensible. On peut également fournir une autre explication de cette disparité entre les deux espèces sensibles dans le fait d'une plus grande spécialisation de la souche agressive vis-à-vis des Choux, étant donnée qu'elle a été isolée à partir de Choux de Milan malades. Mais, quelle que soit l'explication à donner, la plus grande sensibilité des variétés de Chou nous a amené à retenir l'espèce *Brassica oleracea* plutôt que le cultivar de Colza "Expandier", pour la suite de nos investigations sur les mécanismes d'action du Champignon chez un hôte très sensible.

Cette étude a également permis de vérifier qu'en fonction de l'espèce inoculée, les pycniospores de *Phoma lingam* possèdent un pouvoir hautement infectieux ; pourtant ce pouvoir est généralement considéré comme assez nettement inférieur à celui des ascospores de *Leptosphaeria maculans* (ALABOUVETTE et al., 1974 ; WOOD et BARBETTI, 1977).

Contrairement à ce qu'avait conclu ALABOUVETTE (ALABOUVETTE, et al., 1974), il est possible d'établir un classement valable de cultivars de Colza

à la suite d'inoculations artificielles et en conditions contrôlées. La condition nécessaire et suffisante est d'opérer à une température constante relativement basse. A 14°C, après une période d'incubation courte, inférieure à 1 mois, il est possible de différencier significativement la sensibilité des cultivars en se basant uniquement sur le pourcentage de plantes porteuses de macules cotylédonaire. Nous devons mentionner que ces observations vont à l'encontre de celles d'auteurs (THURLING et VENN, 1977), qui soulignent que la sensibilité des cotylédons ne constitue pas un critère de sélection suffisamment valable. La contamination des plantules ne se traduit pas toujours par la formation de macules sur les deux cotylédons, il arrive parfois qu'un seul présente des symptômes ; ceci explique pourquoi nous avons dû tenir compte, pour le résultat final, du nombre de plantules maculées plutôt que des cotylédons.

La vitesse d'action du Champignon chez un hôte très sensible est fonction de la température d'incubation ; une élévation de température provoque inévitablement une accélération du processus infectieux concrétisée par une apparition plus précoce des symptômes. Nos observations concordent sur ce point avec celles de BARBETTI (BARBETTI, 1975). Chez un hôte résistant, en l'occurrence le cultivar de Colza "R<sub>9</sub>", l'effet d'une basse température est net : extériorisation plus tardive et moins importante des symptômes. Par contre, l'effet de l'incubation à une température élevée, 24°C, est particulièrement intéressant, car il révèle une atténuation de la résistance à la maladie. A un stade identique de leur développement végétatif, les plantes maculées puis nécrosées sont beaucoup plus nombreuses qu'à 14°C, mais leur nombre demeure toutefois inférieur à celui obtenu avec une plante sensible. Par conséquent, chez le Colza, l'expression des gènes de résistance est étroitement conditionnée par les basses températures. Le comportement de la Navette "Daisy" qui est analogue à celui de "R<sub>9</sub>" apporte la confirmation de ce résultat. Toutefois, il ne faut pas en conclure que tous les cultivars de Navette sont résistants au *Phoma lingam*, bien au contraire. Comme les Colzas, ils présentent une large gamme de sensibilité à la maladie (THURLING et VENN, 1977).

## V. CONCLUSION

Avec un isolat très agressif de *Phoma linguam*, nous avons pu différencier à 2 températures, 14°C et 24°C, la sensibilité à la maladie de variétés cultivées de Crucifères appartenant à 3 espèces du genre *Brassica* ; nous avons montré que l'agressivité du Champignon est particulièrement exacerbée quand la plante hôte est le Chou. Pour cette raison, nous avons choisi cette espèce comme hôte très sensible afin de réaliser les infections artificielles nécessaires pour entreprendre l'étude cytologique et physiologique de l'attaque parasitaire.

Dans un premier temps, nous examinerons en microscopie électronique à transmission, les modalités de la pénétration du Champignon dans la plante, sa propagation dans les tissus et les perturbations qu'il provoque au niveau cellulaire.

### CHAPITRE III : ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE LA RELATION HÔTE - PARASITE

#### I. INTRODUCTION

Actuellement, pour une maladie donnée, on ne conçoit plus l'analyse méthodique de la relation hôte - parasite sans la contribution d'études complémentaires cytologiques, physiologiques et biochimiques.

Dès la fin du siècle dernier, la cytologie classique a permis d'effectuer des descriptions précises sur les structures histologiques de plantes infectées par des rouilles. Un peu plus tard, BERNARD mettait en évidence un mécanisme de défense dans les embryons de *Phalœnopsis*, Orchidée mycorhizée par *Rhizoctonia mucoroides*, en observant l'arrêt de l'invasion mycélienne au niveau de certaines assises cellulaires par un processus de phagocytose (BERNARD, 1909). L'explication d'une partie de ce phénomène n'a été fournie que 50 années plus tard, grâce au développement de la biologie moléculaire et aux travaux de GAÜMANN en particulier qui apportent la preuve d'une réaction d'opposition des cellules d'Orchidées à la présence du Champignon ; cet auteur caractérise en effet l'accumulation de substances antifongiques -l'orchinol et l'hircinol en particulier- dans les organes colonisés par le Champignon (GAÜMAN et al., 1950 ; GAÜMANN, 1960). Cet exemple montre combien l'observation peut être précieuse pour le physiopathologiste dans la compréhension des mécanismes mis en jeu pendant la confrontation d'une plante avec un agent agresseur.

L'augmentation considérable du pouvoir séparateur du microscope électronique a permis d'apporter de nombreuses informations sur les modifications engendrées au niveau de l'ultrastructure de la cellule végétale par la présence de Champignons pathogènes facultatifs (LUKE et al., 1966 ; WHITE et al., 1973) et obligatoires (ORCIVAL, 1963 ; ORCIVAL, 1972). Pour ces derniers, on connaît particulièrement bien les mécanismes de pénétration du Champignon et les modalités de la relation très étroite qui s'établit entre les filaments mycéliens et les cellules de l'hôte au moyen des haustoriums (EHRlich et EHRlich, 1971 ; BUSHNELL, 1972 ; BRACKER et LITTLEFIELD, 1973). Les très nombreuses données concernant le parasitisme obligatoire constituent l'essentiel des travaux qui ont été réalisés dans le domaine de l'étude ultrastructurale de la relation hôte-parasite fongique. Le parasitisme facultatif a, semble-t-il, moins inspiré les cytologistes, mais il est vrai que l'incidence économique des rouilles, des mildious et des oïdiums sur les grandes cultures n'est pas étrangère à cette situation.

Une étude histologique de l'attaque du Colza par des ascospores de *Leptosphaeria maculans* a été entreprise par BRUNIN en 1970 mais n'a jamais été approfondie. Pour cette raison et en nous basant sur les résultats de notre expérimentation précédente, nous nous proposons d'examiner en microscopie électronique à transmission les étapes successives de l'attaque du Chou, choisi comme hôte très sensible, par les conidies de *Phoma lingam*, à 20°C.

## II. MATERIEL ET METHODES

### 1) METHODE DE CONTAMINATION

Dans le souci de mettre en contact le plus rapidement possible le Champignon avec les tissus de l'hypocotyle, en évitant toute blessure, nous avons mis au point un protocole de contamination particulier. Des bandelettes de parafilm de 1 cm de long et 2 mm de large sont préparées. Chaque hypocotyle destiné à être contaminé est entouré d'une bandelette ; celle-ci est maintenue en place en rabattant les 2 extrémités l'une sur l'autre et en les pinçant

à l'aide d'une pince fine, tout en prenant soin de laisser un espace entre le parafilm et l'hypocotyle. La suspension de conidies ( $10^5$  conidies par millilitre) est introduite dans cet interstice à l'aide d'une pipette Pasteur dont l'extrémité a été courbée à angle droit. L'inoculum est remplacé par de l'eau distillée dans le cas des hypocotyles témoin.

Les plantules sont contaminées au 6ème jour de leur développement, l'humidité relative du microphytotron étant portée à saturation une heure avant l'inoculation et maintenue pendant 24 heures.

Pendant les 6 premiers jours d'incubation, aucun symptôme ne s'extériorise. Les premières manifestations visibles du parasitisme s'observent au 7ème jour sous l'aspect d'un mince filet verdâtre orienté longitudinalement et correspondant à une disparition des anthocyanes ; cet effet est caractéristique de l'action du Champignon sur le Chou rouge. Le symptôme évolue ensuite progressivement ; la région dépourvue d'anthocyanes s'étend en surface et se plasmolyse de plus en plus profondément. Au 12ème jour, la nécrose est très profonde et commence à gagner les tissus situés de part et d'autre du point d'inoculation.

Afin de suivre l'évolution de la maladie, des coupes ont été effectuées dans des hypocotyles contaminés depuis 5, 8 et 12 jours. Comme nous venons de le décrire précédemment, ces stades correspondent respectivement à la phase de latence, à un début de nécrose et, enfin, à une nécrose profonde.

## 2) TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

### a) fixation :

Les échantillons sont fixés 30 minutes dans un mélange glutaraldéhyde à 5 % (v/v) - paraformaldéhyde à 3 % (p/v) dans du tampon complet cacodylate de sodium 0,1 M, pH = 7,4. Après dégazage contrôlé sous vide partiel puis poussé jusqu'à  $10^{-3}$  torr, le fixateur est régénéré par le mélange tampon cacodylate complet - diméthylsulfoxyde à 5 % (v/v). Les préparations sont laissées deux heures à température ambiante, puis lavées plusieurs fois avec le tampon complet avant d'être fixées à l'acide osmique pendant 18 heures à 4°C, à l'obscurité. La post-fixation terminée, les échantillons sont rapidement lavés



d'abord avec le tampon puis à l'eau distillée, déshydratés par passages dans des bains d'alcool éthylique de concentration croissante suivis par un double lavage à l'oxyde de propylène avant d'être imprégnés par la résine de Spurr (SPURR, 1969) et polymérisés 48 heures à 70°C.

b) confection des coupes :

Les coupes sont réalisées à l'ultra-microtome LKB "Ultratome 3" à l'aide de couteaux de verre et contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb selon REYNOLDS (REYNOLDS, 1963). Les observations sont faites à 75 KV sur un microscope électronique à transmission Hitachi HU 11 A.

c) tests cytochimiques :

Eventuellement, des tests cytochimiques ont été réalisés :

- test PAT Ag de THIERY pour les polysaccharides neutres (THIERY, 1967) ;
- test PTA Cobalt acide pour les polysaccharides acides.

### III. EXAMENS MICROSCOPIQUES

En premier lieu, nous aborderons l'examen des tissus d'un hypocotyle non contaminé. Ensuite, nous décrirons les étapes successives de l'infection.

#### 1) EXAMEN DES TISSUS SAINS

a) aspect des cellules épidermiques :

L'assise épidermique est constituée de grandes cellules en voie de dégénérescence, très fortement vacuolisées, dans lesquelles on observe un reste de cytoplasme plaqué contre la paroi, où sont encore visibles des fragments de réticulum endoplasmique et des vésicules de taille très variable (Pl. I, Fig. 1 et 2). Le plasmalemma et le tonoplaste restent bien individualisés. Entre ces cellules qui possèdent une architecture normale, s'intercalent des vestiges d'autres cellules totalement dégénérées, fortement comprimées,

caractérisées par une matrice parfaitement délimitée par l'enveloppe plasmique et riches en systèmes lamellaires désorganisés (Pl. I , Fig. 1). On note également la présence d'espaces intercellulaires remplis d'une matière opaque et riches en débris (Pl. I , Fig. 2 ). La paroi des cellules est particulièrement épaisse et nettement stratifiée. L'épiderme, délimité à l'extérieur par une fine cuticule très dense aux électrons, présente de nombreux replis qui lui donnent parfois une forme crennelée.

Du fait de leur dégénérescence avancée et de la rigidité de leurs parois, les cellules épidermiques jouent, avant tout, un rôle de soutien mécanique.

Les cellules stomatiques observées paraissent fonctionnelles ; on y reconnaît, en effet, les structures classiques des cellules végétales avec, en particulier, des mitochondries, de l'ergatoplasme, des chloroplastes volumineux aux structures lamellaires organisées en granum et élaborant des grains d'amidon, ainsi que de nombreux plastoglobules (Pl. I , Fig. 3 ).

Le système d'obturation du stomate se réalise à partir de deux zones d'extension de la cuticule.

b) aspect des cellules du parenchyme cortical :

La région la plus externe du parenchyme cortical que constituent les cellules sous épidermiques se compose de nombreuses cellules également en voie de dégénérescence, certaines étant fortement comprimées (Pl. II , Fig. 1 ). Le cytoplasme, très opacifié, s'y présente à l'état coagulé ; les vacuoles renferment de nombreux débris ainsi que de grandes vésicules généralement sphériques et libres.

Dans les couches plus profondes, le parenchyme prend un aspect hétérogène. On y trouve de très jeunes cellules comprenant un noyau volumineux bien différencié, des dictyosomes parfois hypertrophiés élaborant de nombreuses vésicules, de l'ergastoplasme, des ribosomes, de jeunes plastes et de nombreuses mitochondries (Pl. II, Fig. 2 ). Dans d'autres cellules plus différenciées, de nombreuses plastes élaborent de gros grains d'amidon (Pl. II, Fig. 4 ). On remarque parfois la présence de plasmalemmasomes (MARCHANT et ROBARDS, 1968) (Pl. II, Fig. 3 ). Ces jeunes cellules côtoient d'autres cellules réduites à l'état de grandes vacuoles ne renfermant plus que quelques débris cytoplasmiques.

Dans ce parenchyme, de très larges espaces intercellulaires se différencient, chargés d'un matériel légèrement opaque aux électrons. Les structures pariétales y sont épaissies ; d'autre part, au niveau des accolements cellulaires, l'épaisseur et la densité électronique de la lamelle moyenne sont assez remarquables (Pl. III, Fig. 2 et 3). On y observe un réseau de fibrilles orientées longitudinalement dans le sens de la paroi (Pl. III, Fig. 3). Parfois, les cellules sont dissociées, favorisant la présence d'espaces intercellulaires très importants (Pl. III, Fig. 1).

## 2) VISUALISATION DU PROCESSUS INFECTIEUX

### a) pénétration du Champignon :

Il est pratiquement impossible, 5 jours après la contamination, d'observer une section d'hyphe développée à la surface de la plante. Au contraire, les conidies, dispersées dans un mucilage, sont toujours dans un état quiescent (Pl. IV, Fig. 1). Leurs structures internes ne paraissent cependant pas altérées : la paroi, relativement mince, présente une certaine transparence aux électrons, le noyau est volumineux, les ribosomes nombreux et les réserves importantes (Pl. IV, Fig. 2). Certaines conidies sont binucléées.

Aucune trace d'une éventuelle action lytique exercée par diffusion au niveau de la paroi des cellules épidermiques n'est décelable ; la paroi, sous-jacente au point d'inoculation, conserve son apparence stratifiée normale (Pl. IV, Fig. 1).

Ces observations conduisent à une première constatation : dans le cas d'une contamination expérimentale par pycniospores, le Champignon ne pénètre pas au moyen de ses filaments germinatifs par perforation de la paroi de l'hôte ou par les stomates, contrairement à ce qui semble être le cas lors d'inoculation expérimentale par ascospores (BRUNIN, 1970). On observe, au contraire, que les conidies pénètrent directement dans la plante par les ouvertures naturelles que constituent les stomates (Pl. IV, Fig. 3). Elles semblent, en outre, pouvoir gagner facilement la chambre sous-stomatique et envahir les méats (Pl. VI, Fig. 1). A ce stade, l'observation, plusieurs fois renouvelée, de conidies à l'intérieur de cellules épidermiques dégénérées, présente un caractère insolite qui sera discuté ultérieurement (Pl. V, Fig. 1).

b) développement du Champignon dans la plante :

. à partir du cinquième jour d'incubation : De par leur relative richesse, les espaces intercellulaires vont fournir des conditions favorables à la germination *in situ* des conidies et favoriser la croissance de jeunes hyphes, les méats assurant une oxygénation suffisante pour le Champignon. Ce dernier aspect est très important dans le cas du *Phoma linguam* car on sait qu'*in vitro*, l'obtention d'une très bonne croissance du Champignon en milieu statique est étroitement conditionnée par l'importance de l'oxygénation du mycélium. Ce n'est qu'à partir du 5ème jour que les observations se précisent, en particulier en ce qui concerne la présence et la progression des hyphes. On constate que le Champignon prend rapidement de l'extension dans les parenchymes corticaux, en colonisant abondamment les espaces intercellulaires (Pl. VI, Fig. 2 et Pl. VII, Fig. 1) dans lesquels peuvent s'insinuer plusieurs filaments à la fois (Pl. VI, Fig. 3). Cette extension exerce visiblement une pression mécanique sur les parois qui apparaissent de plus en plus distendues. Un manchon mucilagineux entoure les hyphes en se renforçant au niveau des accolements des hyphes entre elles, mais aussi au niveau des points de contact de ces dernières avec la paroi des cellules de l'hôte (Pl. VI, Fig. 3 et Pl. VII, Fig. 1).

A ce stade de l'infection, le Champignon est également capable de se propager dans les couches de la paroi de l'épiderme situées juste sous la cuticule (Pl. VIII, Fig. 1). Dans ce cas, on peut observer au voisinage immédiat de l'hyphe, une atténuation de l'aspect stratifié de la paroi sans que l'opacité générale aux électrons soit diminuée pour autant. Le Champignon paraît donc capable de sécréter, très tôt, des enzymes susceptibles d'altérer l'agencement des polysaccharides pariétaux. Cette localisation sous-cuticulaire précoce de l'hyphe ne semble pas le résultat du hasard mais, au contraire, la manifestation d'un chimiotropisme intéressant. Une étude fine de cette région nous a permis d'en connaître mieux l'hétérogénéité chimique. A cet effet, des coupes ont été traitées 20 minutes à 70°C par de l'EDTA à 0,5 %, puis par le DMSO à 10 % et enfin par la potasse, afin de révéler l'existence de régions éventuellement riches en composés pecto-hémicellulosiques. Les coupes témoin non traitées par la potasse montrent une disposition caractéristique des fibres celluloses en faisceaux du type "contreplaqué" dans les parties moyennes et profondes et un aspect beaucoup plus lamelliforme de la région sous-cuticulaire (Pl. IX, Fig. 2). Après traitement, au contraire, il apparaît que l'organisation caractéristique des

fibres est détruite ; d'autre part, la région sous-cuticulaire se révèle particulièrement sensible à l'extraction, celle-ci se traduisant par une transparence aux électrons accrue par rapport à l'ensemble du reste de la paroi (Pl. IX, Fig. 3). Ainsi, une concentration importante de composés pecto-hémicellulosiques dans la région sous-cuticulaire peut-elle expliquer la migration préférentielle de l'hyphe à cet endroit, dans la mesure où (comme nous le montrerons ultérieurement, dans la deuxième partie, chapitre 2), le Champignon possède en effet des enzymes nécessaires à la dégradation de ce type de substrat.

Dans les espaces intercellulaires, un traitement particulier par l'EDTA suivi d'une oxydation par l'eau oxygénée et d'un contraste au plomb alcalin permet de souligner finement, d'autre part, les structures au niveau des zones de contact étroites entre le filament et la paroi (Pl. VIII, Fig. 2). Il permet de constater, qu'à ce stade, il n'existe pas encore d'action directe du Champignon sur les parois. Il met également en évidence la présence d'un espace entre les deux structures qui pourrait bien correspondre à la gaine mucilageuse normalement présente autour du Champignon et qui serait extraite au cours du traitement. Enfin, dans les cellules normales adjacentes aux filaments, le cytoplasme ne présente pas d'altération immédiate ; il semble même contenir un taux plus élevé d'ergastoplasme ; ce dernier, en se disposant parallèlement au plasmalemme, présente une orientation caractéristique (Pl. VIII, Fig. 3).

. *au huitième jour d'incubation (début de formation de la nécrose)*: Le Champignon continue à migrer dans les tissus par les espaces intercellulaires en assurant toujours un contact étroit avec la paroi et commence à envahir les cellules de la région externe du parenchyme cortical. Sa progression est relativement rapide, car, à ce stade, on peut le caractériser dans le cylindre central, à l'intérieur des vaisseaux conducteurs du xylème (Pl. X, Fig. 1). Son action au niveau des parois se précise : dans les régions de contact, on observe la formation de nombreuses poches de lyse, diffuses, s'élargissant en profondeur (Pl. X, Fig. 2). Parallèlement, l'activité métabolique du mycélium s'intensifie : des coupes longitudinales montrent de l'ergatoplasme abondant, de grandes mitochondries riches en crêtes, de nombreux ribosomes et, le long du plasmalemme, beaucoup de structures lamellaires indifférenciées ou organisées en plasmalemmasomes.

Dans les cellules envahies par le Champignon, le cytoplasme est coagulé, les particules osmiophyles sont nombreuses et les parois présentent un début de vésiculation (Pl. X, Fig. 3). Cependant, toutes les fibres de cellulose ne sont pas totalement attaquées, ainsi la structure pariétale garde-t-elle encore, en certaines régions, un aspect fibrillaire stratifié.

. au 12<sup>ème</sup> jour d'incubation (nécrose profonde) : Cette ultime étape de l'invasion des tissus se traduit par l'envahissement massif des cellules, conséquence directe d'une altération très profonde des structures pariétales (Pl. XII, Fig. 2). Les parois ne présentent plus aucune organisation et sont largement vésiculisées sur toute leur longueur. Toutefois, quelques débris de fibres non digérées s'observent encore au voisinage immédiat de l'hyphe, orientés parallèlement à la paroi fongique (Pl. XI, Fig. 1 et 2). Ces résidus correspondent certainement à des portions de fibres cellulosiques qui n'ont pu être hydrolysées. On sait que le Champignon ne produit pas, *in vitro*, de cellulase de type C<sub>1</sub>, ni certaines hémicellulases et, de ce fait, est tout à fait incapable d'attaquer en particulier les formes cristallines de cellulose (Chapitre 5).

Si le mycélium manifeste encore à ce stade une grande activité et présente de nombreuses structures lamellaires le long de sa paroi (Pl. XII, Fig. 4), un chondriome important, des microbodies et des ribosomes, il apparaît, le plus souvent, que le cytoplasme des hyphes tend à s'opacifier et à se vacuoliser abondamment tandis qu'à l'extérieur, des conglomerats de débris cytoplasmiques coagulés s'accrochent à la paroi fongique.

#### IV. DISCUSSION

Contrairement à ce qu'avait observé BRUNIN avec des ascospores de *Leptosphaeria maculans* (BRUNIN, 1970), les pycniospores de *Phoma linguam* ne semblent pas émettre de filaments germinatifs à la surface de la plante, mais pénètrent directement en se logeant à l'intérieur des stomates et des espaces sous-stomatiques. A notre connaissance, ce cas n'a pas encore été décrit.

Les stomates constituent effectivement une voie de pénétration pour des filaments mycéliens ; ceci a déjà fait l'objet de nombreuses observations en microscopie photonique (POLE EVANS, 1907 ; TISDALE, 1920 ; BYWATER, 1959 ; RIGGLE et DUNLEAVY, 1974) et en microscopie électronique (LITTLEFIELD et BRACKER, 1972 ; DELON, 1975 ; WYNN, 1976 ; PARES et GREENWOOD, 1977). Toutefois, le mode de pénétration le plus fréquemment observé est celui où le filament germinatif pénètre directement par perforation de la cuticule et de la paroi de l'épiderme, soit aussitôt après la germination de la spore (BRACKER, 1968 ; LESEMANN et FUCHS, 1970 ; HANCHEY et WHEELER, 1971 ; HELD, 1972 ; DAY et SCOTT, 1973 ; PAUS et RAA, 1973 ; Mc KEEN, 1974), soit après avoir formé un appressorium (ISHIDA et AKAI, 1968 ; SKIPP et DEVERALL, 1972 ; POLITIS et WHEELER, 1973 ; KNOX-DAVIS, 1974 ; RIGGLE et DUNLEAVY, 1974 ; LANDES et HOFFMANN, 1979).

Toutefois, il ne faut pas exclure la possibilité pour *Phoma linguam* d'avoir recours à ce second mode de pénétration. *In vitro*, les pycniospores sont capables de germer mais beaucoup plus lentement que les ascospores et des températures voisines de 20°C sont plus favorables. De plus, les conidies germent d'autant mieux qu'elles sont moins nombreuses ; il est fort probable que le mucilage libéré avec elles joue un rôle déterminant comme facteur de régulation de la germination. La concentration en conidies utilisée pour nos inoculations étant élevée, il n'est pas surprenant de ne trouver aucune trace d'hyphes à la surface des hypocotyles, si ce n'est quelques élongations cellulaires témoin d'un début de germination, 5 jours après le dépôt. Par conséquent, le mode de pénétration observé doit probablement tenir compte de la particularité que représente cette forte densité d'inoculum, à laquelle il faut également associer le fait que la faible taille des conidies favorise, à son tour, la pénétration dans les stomates.

Quant à l'observation des spores dans un méat, elle tend à prouver l'existence de larges espaces intercellulaires vraisemblablement en communication directe avec la chambre sous-stomatique. Par un processus d'entraînement mettant en oeuvre des phénomènes de microcondensation et de compression mécanique, les conidies sont donc capables d'être véhiculées passivement plus en profondeur dans les tissus. Par contre, il est beaucoup plus délicat d'expliquer la présence tout à fait inattendue de conidies à l'intérieur.

des cellules épidermiques. Bien que l'éventualité d'une blessure au moment de l'inoculation puisse expliquer peut être ce phénomène, l'observation de nombreuses coupes n'a jamais révélé d'altération à ces endroits ; le problème de la présence des conidies dans ces cellules reste encore à élucider.

Dans la phase initiale de l'infection, le Champignon migre dans les tissus en empruntant uniquement les voies de passage que constituent les espaces intercellulaires. Ce processus d'envahissement a également été décrit, entre autres, pour *Fusarium solani* (CHRISTOU et SNYDER, 1962), *Ceratocystis ulmi* (CHAMBERLAIN et OUELETTE, 1977 ; OUELETTE, 1978), *Taphrina deformans* (SCHNEIDER et DARGENT, 1977). Pour de très nombreux Champignons phytopathogènes, l'invasion des organes aériens de la plante commence par la migration des filaments entre les cellules épidermiques. Certains parasites facultatifs sont capables d'hydrolyser activement la paroi et de pénétrer très tôt dans les cellules (BUSH et WALKER, 1958 ; ANDERSON et WALKER, 1962 ; DARGENT et TOUZE, 1974 ; LANDES et HOFFMANN, 1979). D'autres produisent à distance des substances toxiques, altérant fortement les cellules situées bien au-delà des filaments mycéliens (DELON, 1975 ; DELON et MANGENOT, 1975). Il ne semble pas que ce soit le cas pour *Phoma linguam*. En effet, 5 jours après l'inoculation, les cellules du parenchyme cortical sont intactes. Toutefois, en ce qui concerne la région sous-épidermique, il est difficile d'apprécier une éventuelle action à distance du Champignon en raison de l'état naturellement dégénérescent de ce type de cellule.

Dans les cellules au contact avec de jeunes hyphes, nous n'avons pas remarqué d'altération immédiate et significative, en particulier au niveau des plastes et des mitochondries. Toutefois, compte tenu des connaissances actuelles sur les effets de certaines toxines sur les structures cellulaires (STROBEL et al., 1972), l'hypothèse de l'action précoce d'une toxine diffusible peut présenter, dans le cas du *Phoma*, un caractère tout à fait aléatoire.

On constate que les effets induits par la présence du parasite sont identiques à ceux décrits dans la littérature : augmentation de l'ergastoplasme qui s'oriente à la périphérie du cytoplasme parallèlement au plasmalemme (DELON et al., 1973 ; SYROP, 1975 ; LAZAROVITS et HIGGINS, 1976 ; LANDES et HOFFMANN, 1979), vacuolisation du cytoplasme.



Dans les espaces intercellulaires, les filaments mycéliens assurent un contact permanent entre eux mais également avec la paroi végétale par l'intermédiaire d'une substance d'origine fongique, de structure vraisemblablement mucilagineuse. Des observations similaires ont été faites pour d'autres parasites facultatifs (LABORDA et MAXWELL, 1976 ; LAZAROVITS et HIGGINS, 1976) ainsi que pour quelques parasites obligatoires tels qu'*Erysiphe graminis* (BRACKER, 1968 ; Mc KEEN et BHATTACHARYA, 1970 ; RIJKENBERG et TRUTER, 1973) et *Melampsora lini* (LITTLEFIELD et BRACKER, 1972). Cette substance est également observée lors de la formation du tube germinatif chez *Botrytis spp* (HAWKER et HENDY, 1963 ; RICHMOND et PRING, 1971), *Fusarium culmorum* (MARCHANT, 1966), *Alternaria brassicicola* (CAMPBELL, 1970), *Stemphylium carbonus* et *Stemphylium sarcinaeforme* (MURRAY et MAXWELL, 1974 ; MURRAY et MAXWELL, 1976).

Pendant qu'il prend de l'extension dans le cortex par les espaces intercellulaires pour gagner le cylindre central, le Champignon va provoquer très progressivement la lyse de plus en plus intense des parois en contact avec ses filaments. Au tout premier temps de la confrontation, aucun signe d'altération évidente n'apparaît. Puis il se forme rapidement des poches de lyse diffuses et profondes qui rappellent les cavités décrites dans les parois secondaires des cellules du chêne parasité par *Ceratocystis fagacearum* (SACHS et al., 1970) ; ces poches vont s'étendre à l'ensemble de la paroi, fusionner pour donner un stade final de lyse caractérisé par une perte totale de la structure fibrillaire originelle. A la place des parois, on ne trouve plus que de très nombreuses vésicules, vraisemblablement des résidus de fibres que le Champignon n'est pas parvenu à hydrolyser.

Pendant qu'il lyse la paroi, le mycélium manifeste une activité métabolique intense caractérisée, entre autres, par la présence de nombreux lomasomes et plasmalemmasomes. Ces structures lamellaires sont généralement associées à une active synthèse de la paroi (BRACKER, 1967 ; MARCHANT et ROBARDS, 1968) et sont susceptibles de renfermer des enzymes hydrolytiques actives (GROVE et BRACKER, 1970 ; MARCHANT et MOORE, 1973). Parallèlement, la paroi du Champignon laisse apparaître deux régions d'opacité différente : une région interne relativement transparente aux électrons et une région externe plus opaque.

Sur des sections d'hyphes en phase de synthèse active, on remarque la différenciation centrifuge d'un matériel granuleux très dense aux électrons, semblable à un glycocalyx, qui vient se fixer au niveau de la zone de contact avec la paroi végétale (Pl. VII, Fig. 2). Cette différenciation est la matérialisation de l'intense activité de transfert du matériel constitutif de la paroi de l'hyphe en extension.

Comme nous l'avons souligné précédemment, la progression du Champignon est relativement rapide puisqu'on le trouve à l'intérieur des éléments conducteurs du xylème à un stade où la nécrose s'ébauche à peine. Cette observation montre bien que le mycélium est capable de se propager rapidement dans l'appareil végétatif et reproducteur de la plante, en particulier par les vaisseaux du bois, ce qui explique qu'en contaminant les hypocotyles, il est possible d'obtenir des macules cotylédonaires, toujours localisées en bordure de vaisseaux, avant l'apparition des premières nécroses. On comprend également pourquoi, dans le cas de contamination des cotylédons, des macules foliaires peuvent ainsi se former plusieurs mois après l'inoculation dans des conditions excluant toute nouvelle pénétration du Champignon.

## V. CONCLUSION

Introduites passivement à l'intérieur des hypocotyles, les conidies de *Phoma linguam* germent dans les espaces intercellulaires du cortex externe ; les filaments colonisent rapidement le parenchyme cortical et le cylindre central, permettant la propagation du Champignon dans d'autres organes de la plante, tandis qu'apparaissent les premiers signes d'une lyse intense des parois cellulaires en contact avec le mycélium. La dégradation des structures pariétales se traduit par la disparition progressive de leur organisation fibrillaire et aboutit à la formation de nombreuses vésicules sphériques renfermant des débris de fibres. Une étude cytochimique fine démontre que la présence du mycélium dans la région sous cuticulaire de la paroi de l'épiderme est la manifestation d'un chimiotropisme précis, mettant en évidence les aptitudes du mycélium à dégrader de façon préférentielle les régions pariétales riches en composés pecto-hémicellulosiques.

## CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

A l'issue de cette première partie consacrée à l'agent pathogène et à son hôte, nous avons caractérisé l'existence d'un phénotype agressif chez *Leptosphaeria maculans* ainsi que des différences spécifiques de sensibilité au Champignon pour le genre *Brassica*. Ceci nous a permis de choisir judicieusement un hôte très sensible, le Chou. Par l'étude ultrastructurale, après contamination artificielle, nous avons recueilli de précieux renseignements à la fois sur le mode d'envahissement des hypocotyles par les hyphes mycéliens et également sur la nature des mécanismes d'action du parasite au niveau des structures cellulaires. Une lyse intense des parois végétales étant observée, la démarche logique à donner à la suite de notre travail est la recherche des systèmes enzymatiques fongiques responsables de la dégradation des polysaccharides pariétaux. Toutefois, avant d'aborder cet aspect enzymologique du parasitisme, nous consacrons un chapitre à l'étude du rôle joué dans la pathogenèse par une toxine, la sirodesmine PL, qui est produite par *Phoma linguam*.

## LISTE ALPHABÉTIQUE DES ABRÉVIATIONS

amidon	a	nucléole	n
cavité de lyse	cly	paroi	p
cellule stomatique	cst	paroi de l'épiderme	ep
conidie	co	paroi fongique	pf
cuticule	cu	paroi lysée	ply
cytoplasme coagulé	cyc	plasmalemme	pl
dictyosome	d	plasmalemmasome	plm
épaississement de lignine	L	plasmodesme	pld
ergastoplasme	e	plaste	P
espace intercellulaire	ei	plastoglobule	plg
fibres résiduelles	fir	réserves	rs
filament germinatif	fg	septum	s
filament mycélien	fm	stomate	st
granum	g	synapse	sy
lamelle moyenne	lm	système lamellaire désorganisé	sld
matériel granuleux	mg	système lamellaire fongique	slf
matrice	ma	tonoplaste	t
méat	mt	vacuole	V
membrane plastidale	mp	vaisseau conducteur	va
mitochondrie	m	vésicule	ve
mucilage	mu	vésicule de lyse	vly
noyau	N		

## PLANCHE I

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.*

Fig. 1 - Aspect des cellules épidermiques d'hypocotyles de Chou. On remarque l'importance des vacuoles (V), la stratification de la paroi (ep), la cuticule (c) et une cellule en voie de dégénérescence dont le contenu cytoplasmique encore nettement délimité par le plasmalemme renferme des systèmes lamellaires désorganisés (sld). G x 6 750.

Fig. 2 - Détail d'un espace intercellulaire délimité par la paroi (ep) de deux cellules épidermiques. Le méat est rempli d'une substance matricielle (ma) opaque aux électrons, contenant de nombreux débris. Dans le cytoplasme des cellules épidermiques, on observe de l'ergastoplasme (e) ainsi que de nombreuses vésicules (ve). G x 11 900.

Fig. 3 - Coupe transversale d'un stomate (st). Les cellules stomatiques (c st) sont fonctionnelles, avec des mitochondries (m) et des plastes (P) renfermant des systèmes lamellaires organisés en granums (g), des plastoglobules (plg) et élaborant de l'amidon (a). G x 16 100.

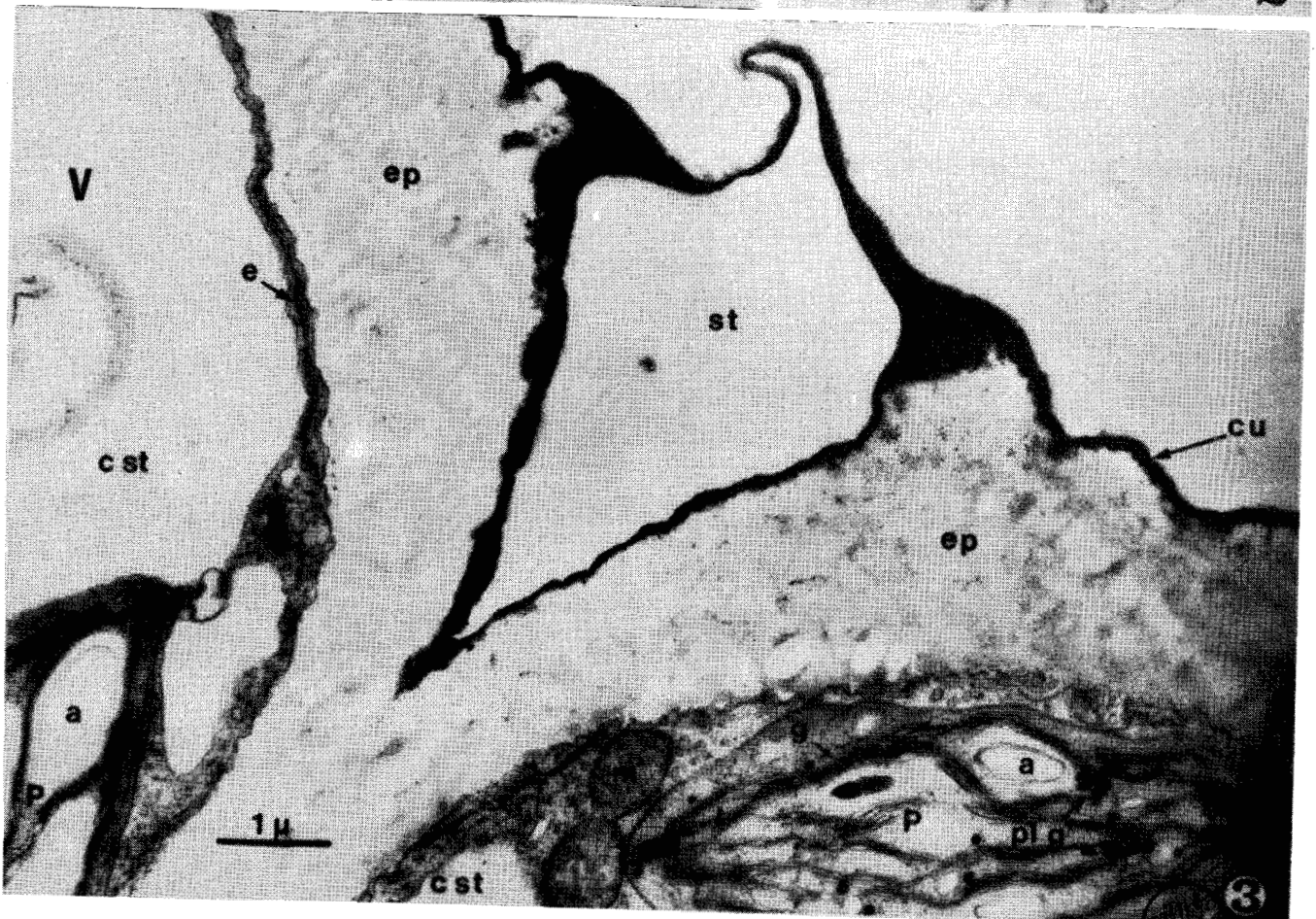
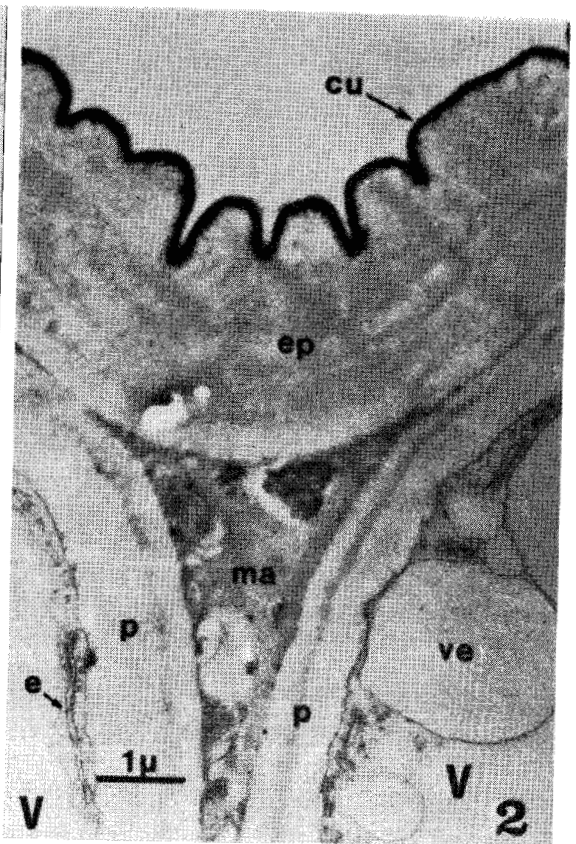
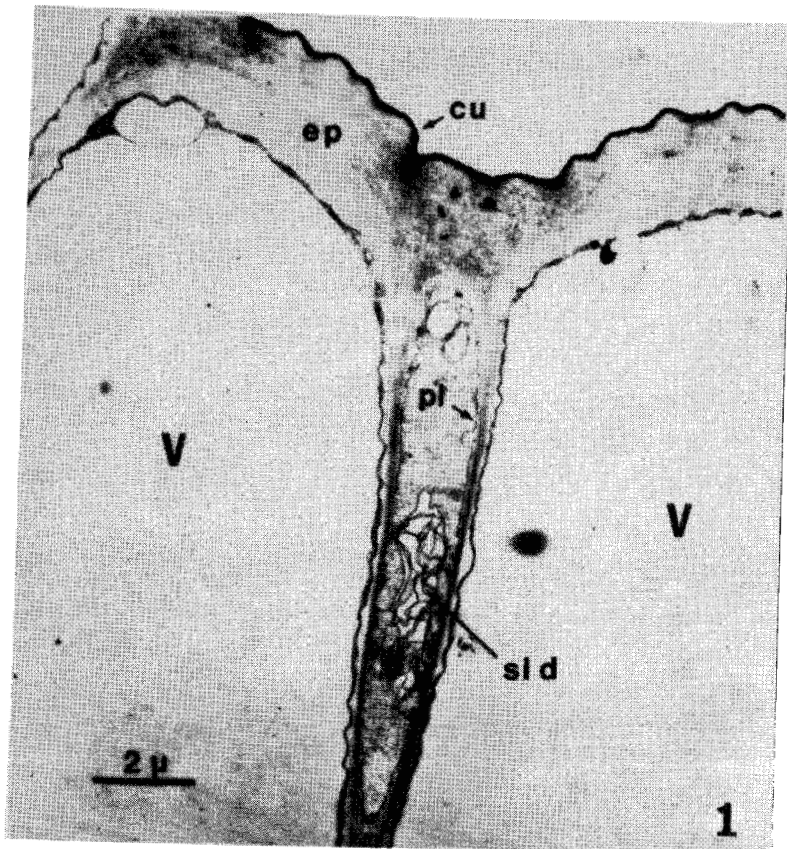
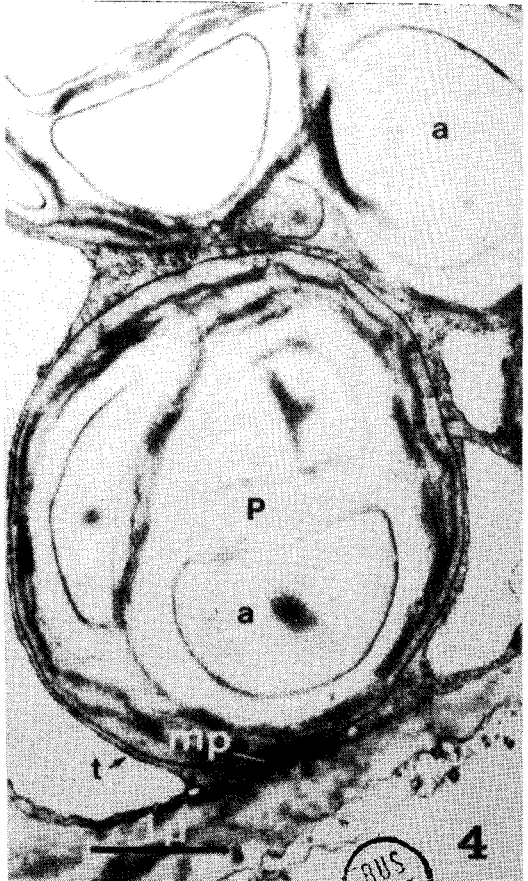
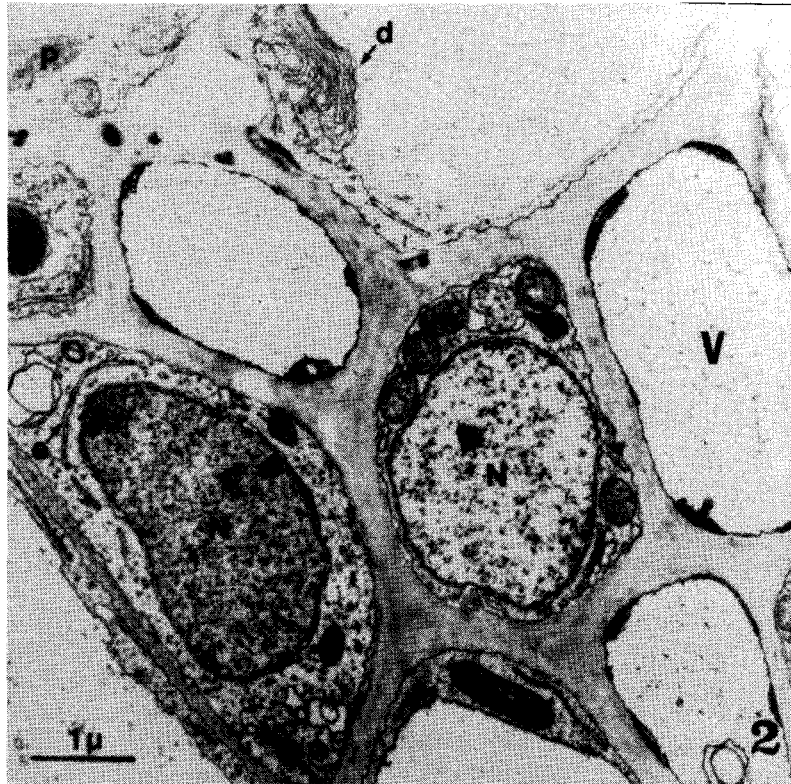
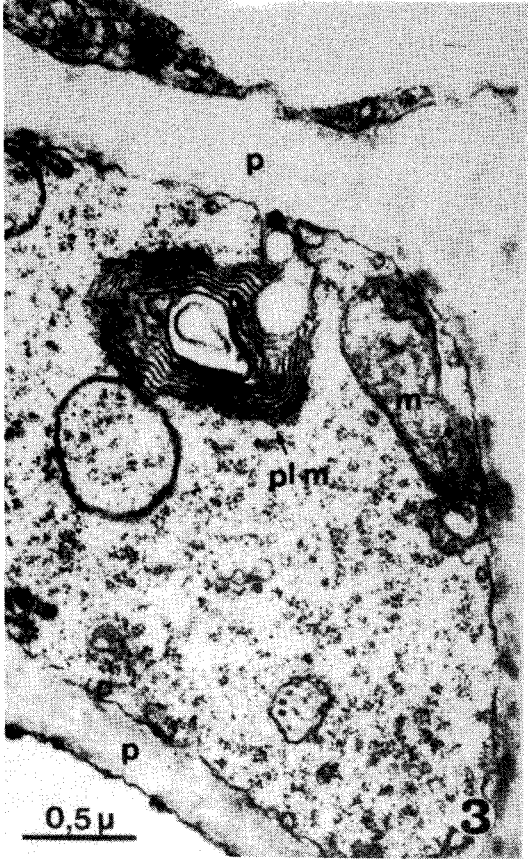
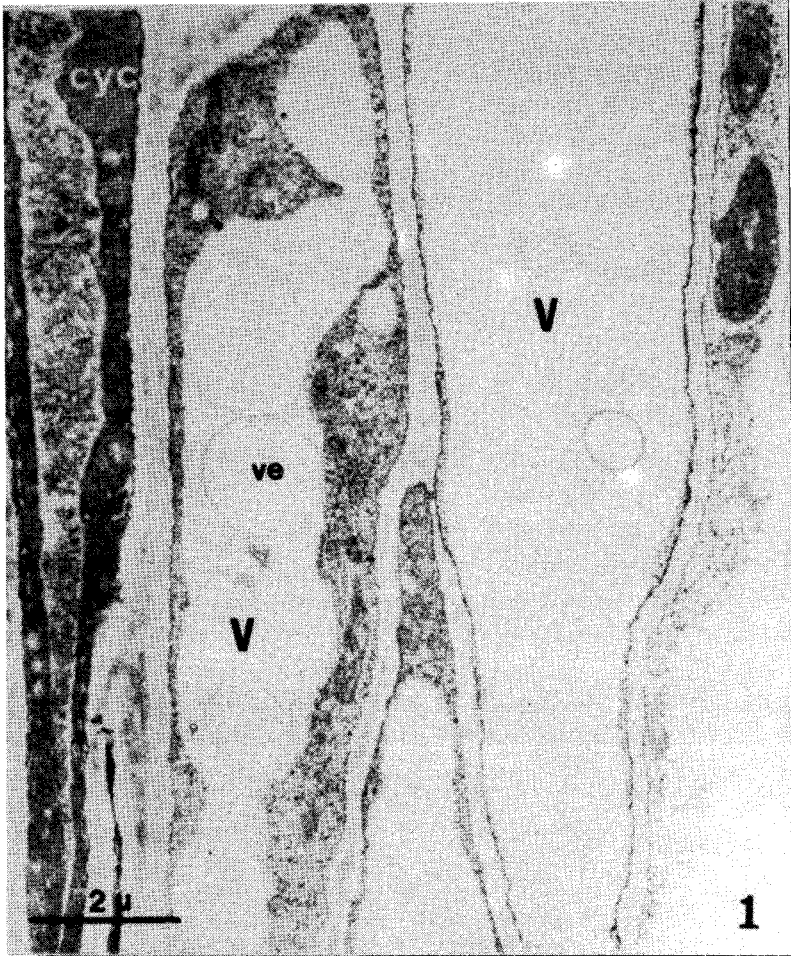


PLANCHE II

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.*

- Fig. 1 - Les cellules corticales sous-épidermiques sont dans un état naturel de dégénérescence. Le cytoplasme est coagulé (cy c) et les vacuoles (V) renferment de nombreuses vésicules (ve). G x 10 400.
- Fig. 2 - Aspect hétérogène du tissu cortical situé plus en profondeur : association de cellules dégénérées fortement vacuolisées et de très jeunes cellules possédant un noyau volumineux (N), des mitochondries (m), des plastes (P) et des dictyosomes (d) émettant de nombreuses vésicules. G x 14 000.
- Fig. 3 - Détail d'une cellule corticale montrant un plasmalemmosome (plm). G x 31 000.
- Fig. 4 - Activité amylofère des plastes (P) : synthèse de gros grains d'amidon (a) provoquant la concentration des systèmes lamellaires à la périphérie du stroma. La membrane plastidale (mp) et le tonoplaste (t) restent toujours bien individualisés. G x 18 000.



BUS  
LILLE



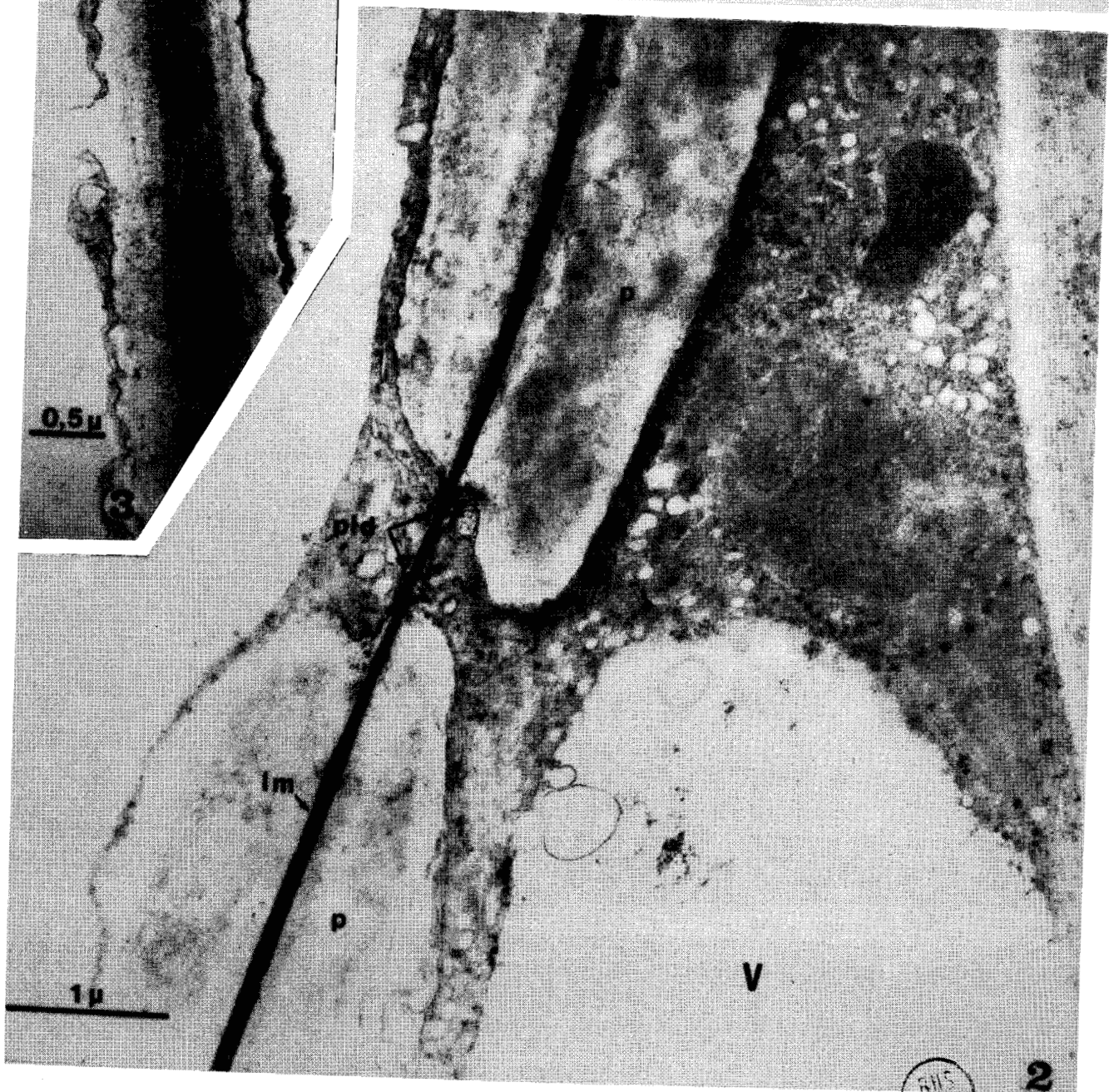
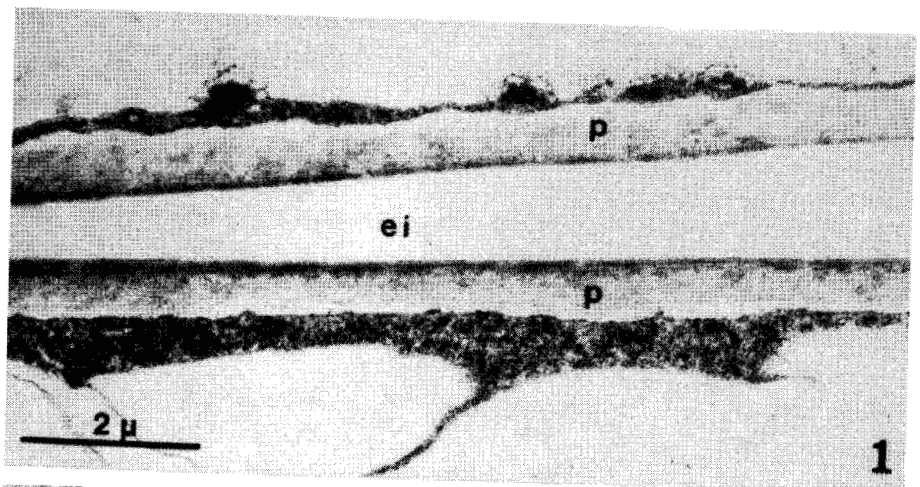
PLANCHE III

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.*

Fig. 1 - Observation d'espaces intercellulaires (ei) entre les cellules corticales. G x 24 200.

Fig. 2 - Au niveau des discontinuités de la paroi on remarque la présence de plasmodesmes (pld). G x 26 000.

Fig. 3 - La lamelle moyenne (lm) dont la structure est fibrillaire présente parfois une épaisseur remarquable. G x 24 200.



BIS  
LILLE

PLANCHE IV

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.*

Fig. 1 - Les conidies (co) du Champignon dispersées dans un mucilage (mu) sont dans un état quiescent ; les réserves (rs) occupent un volume important. La paroi de l'épiderme (ep) présente un aspect nettement stratifié. G x 10 850.

Fig. 2 - La paroi des conidies (p) est mince et relativement transparente aux électrons. Une conidie émet un filament germinatif (fg). G x 16 200.

Fig. 3 - Conidie pénétrant à l'intérieur d'un stomate. G x 8 700.

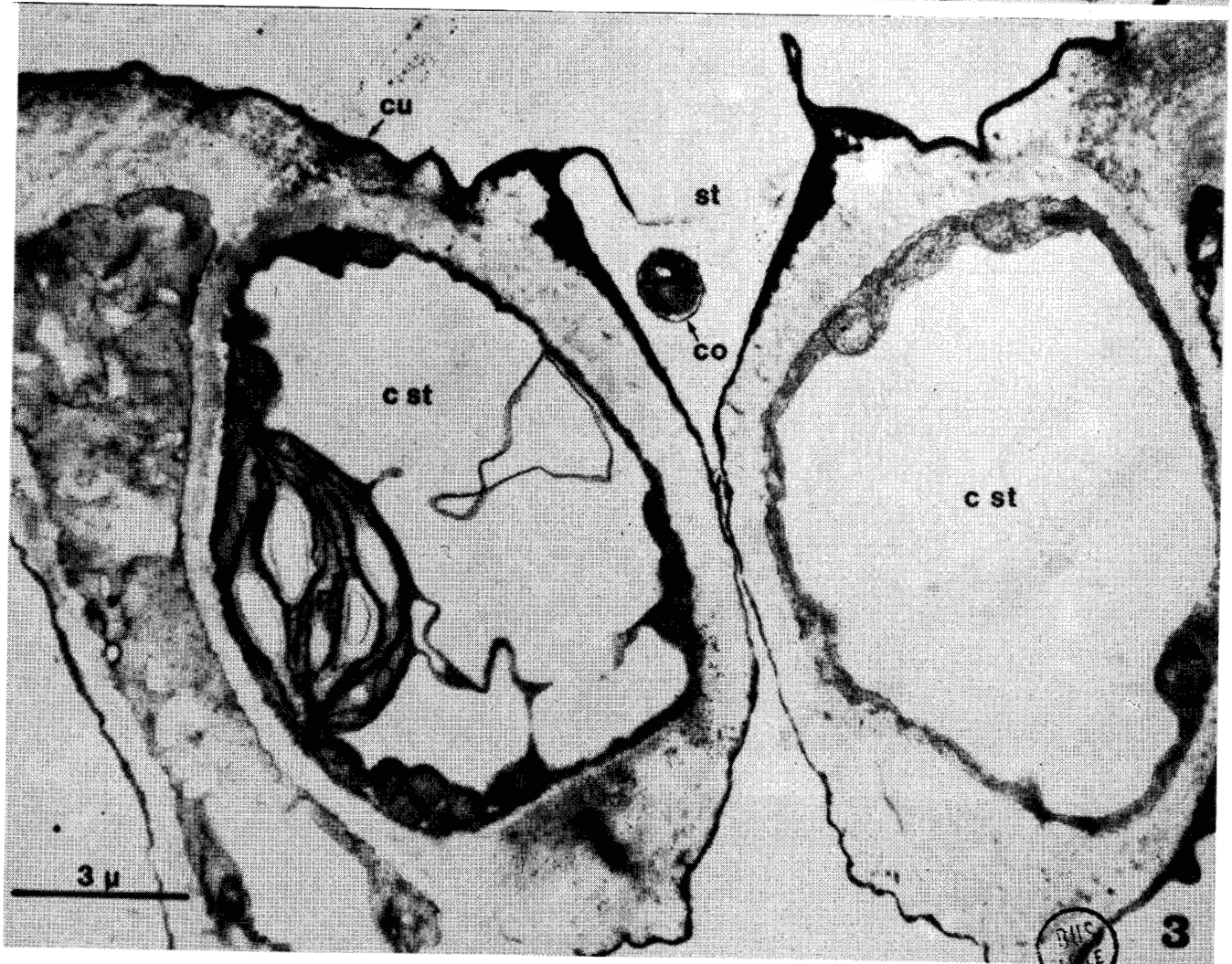
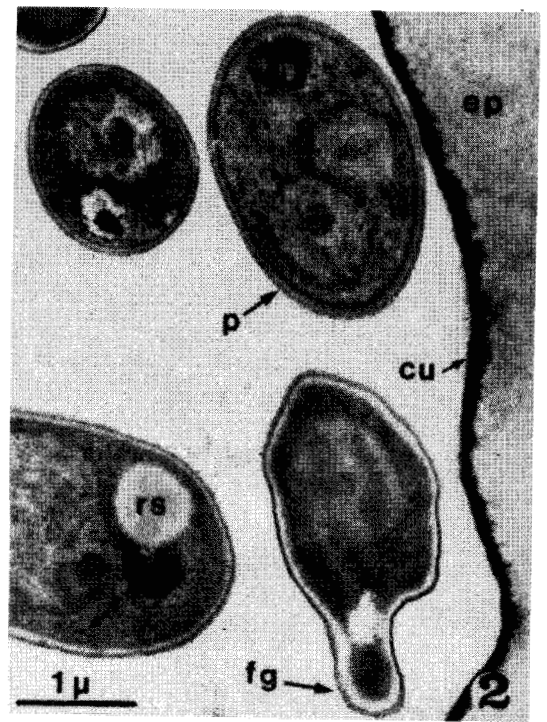
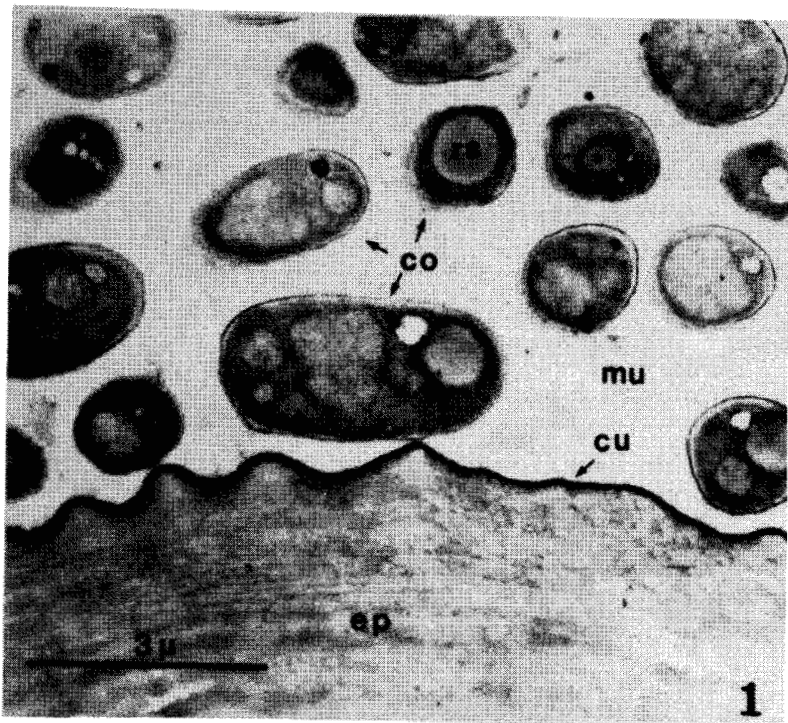
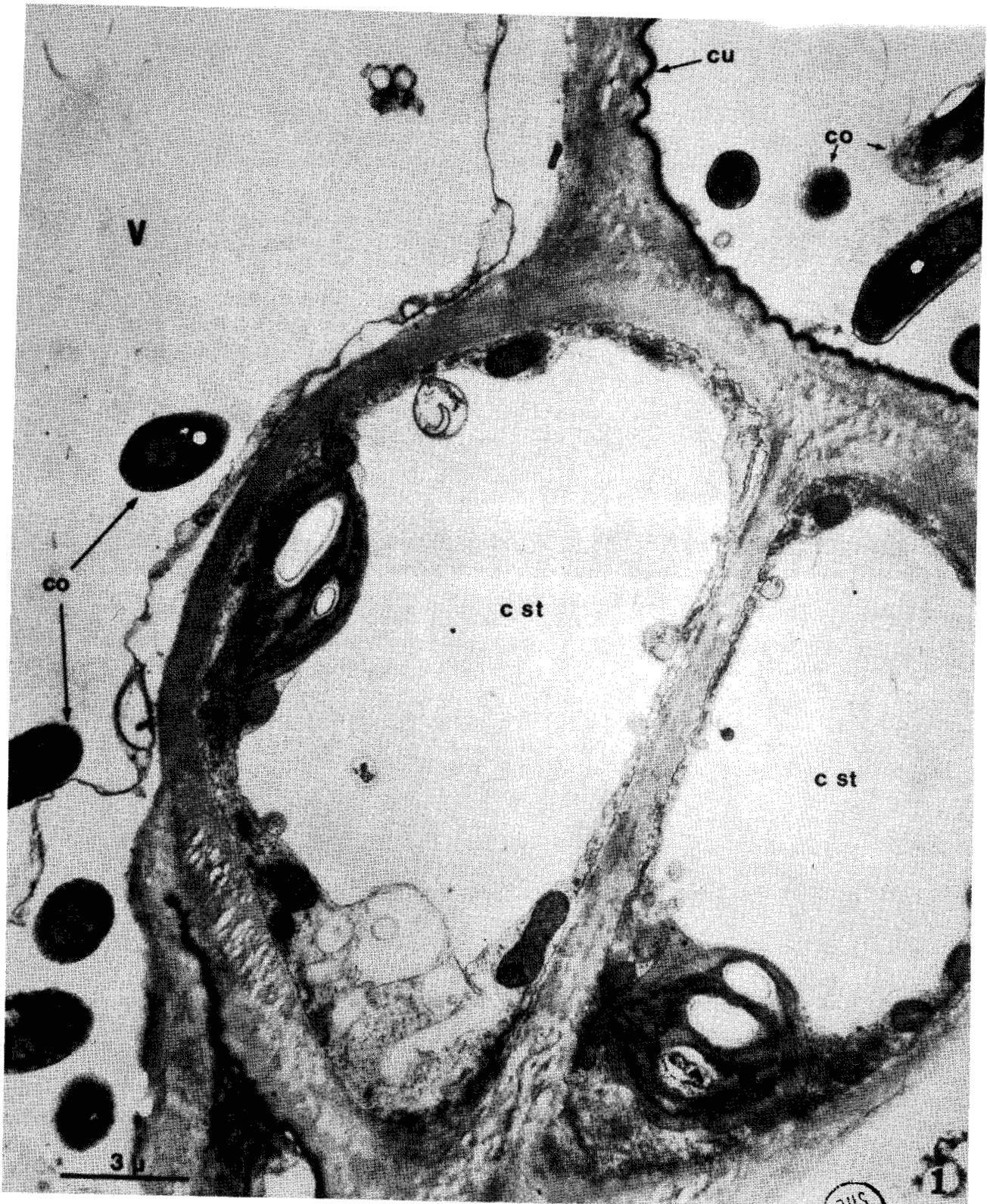


PLANCHE V

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.*

Fig. 1 - Observation de conidies (co) à l'intérieur des cellules épidermiques voisines des cellules stomatiques (c st). G x 7 800.



BIS  
LILLE

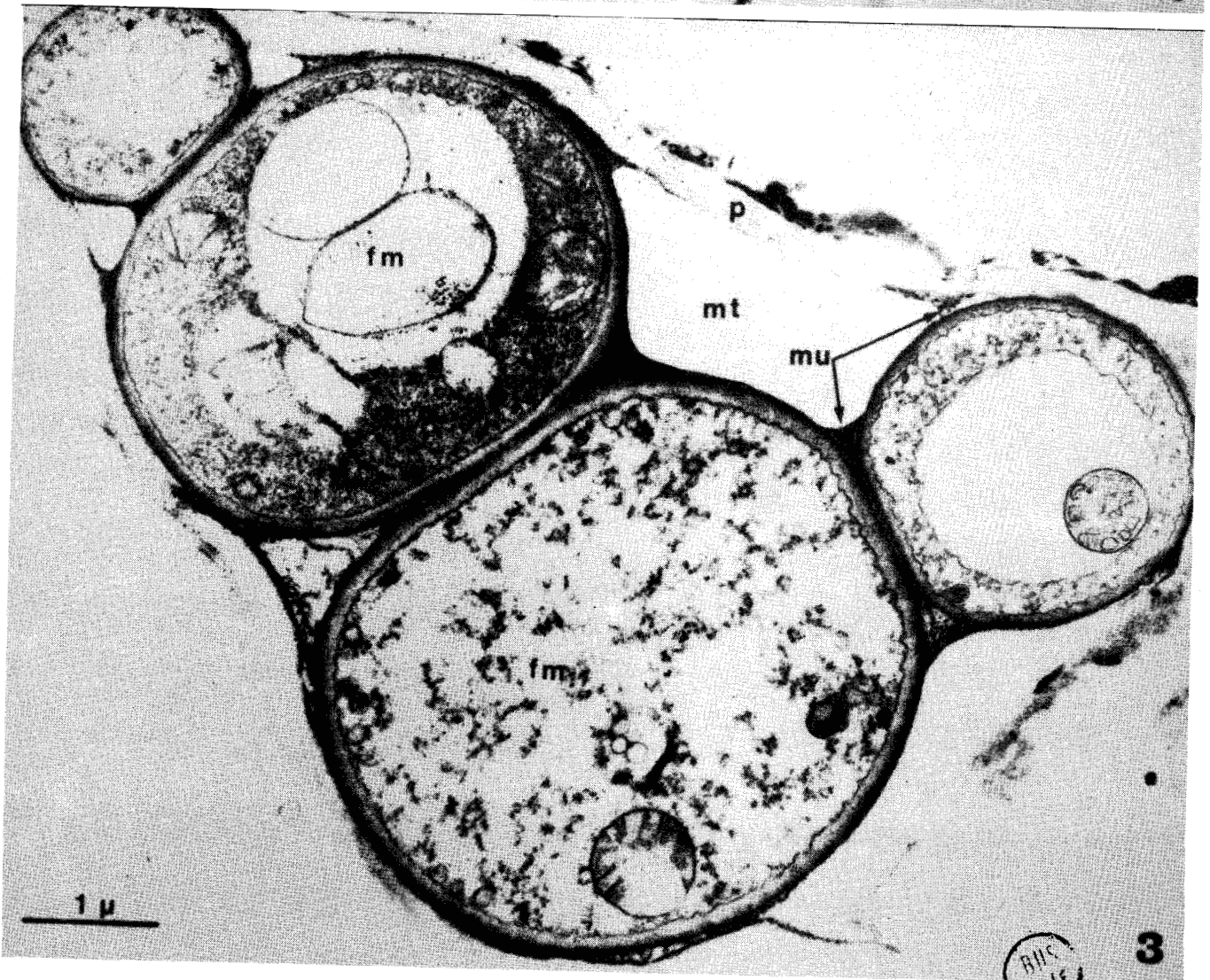
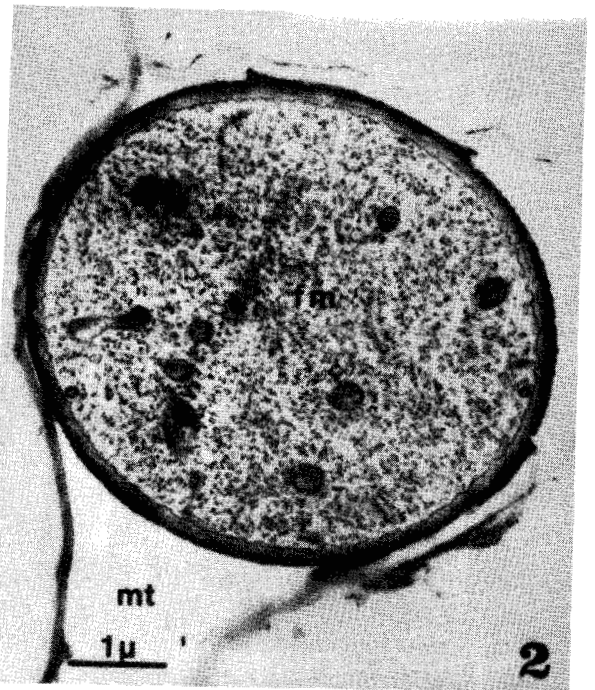
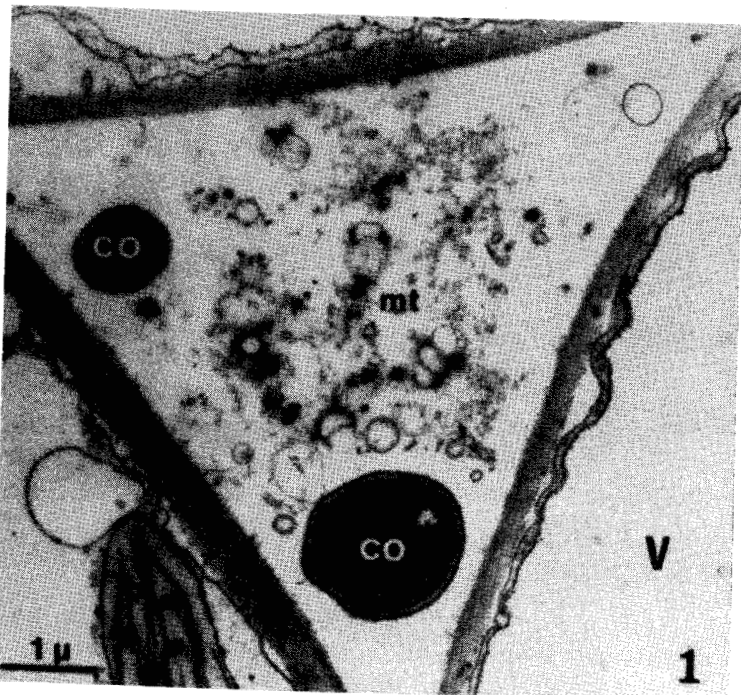
## PLANCHE VI

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.*

Fig. 1 - Présence de conidies (co) à l'intérieur d'un méat (mt). G x 13 500.

Fig. 2 - Section d'un filament mycélien (fm) dans un méat (mt). Remarquer la pression mécanique exercée par le filament sur la paroi de l'hôte. G x 12 750.

Fig. 3 - Plusieurs filaments mycéliens (fm) peuvent s'insinuer dans les méats (mt). Un manchon mucilagineux (mu) entoure les hyphes en se renforçant au niveau des accolements des hyphes entre elles et au contact de ces dernières avec les parois des cellules de l'hôte. G x 20 300.



RHS  
LILLE

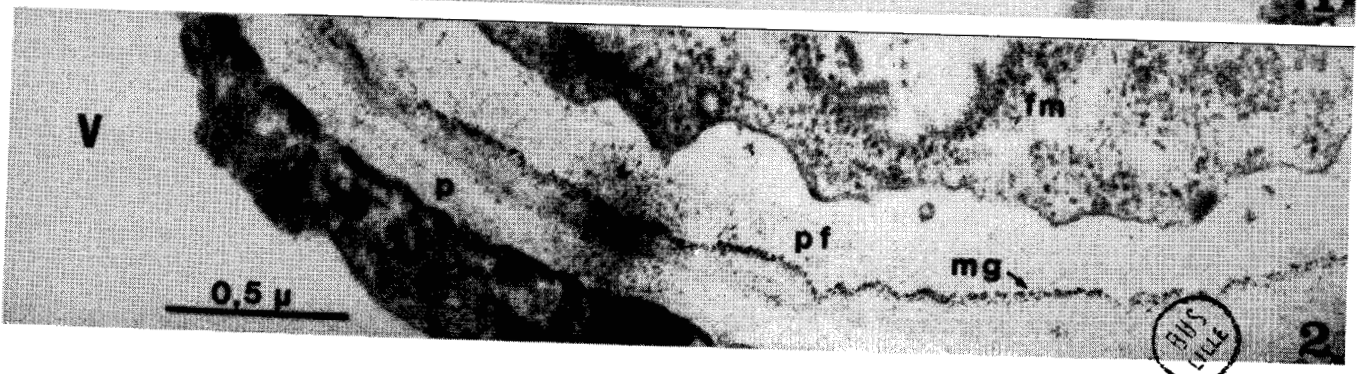
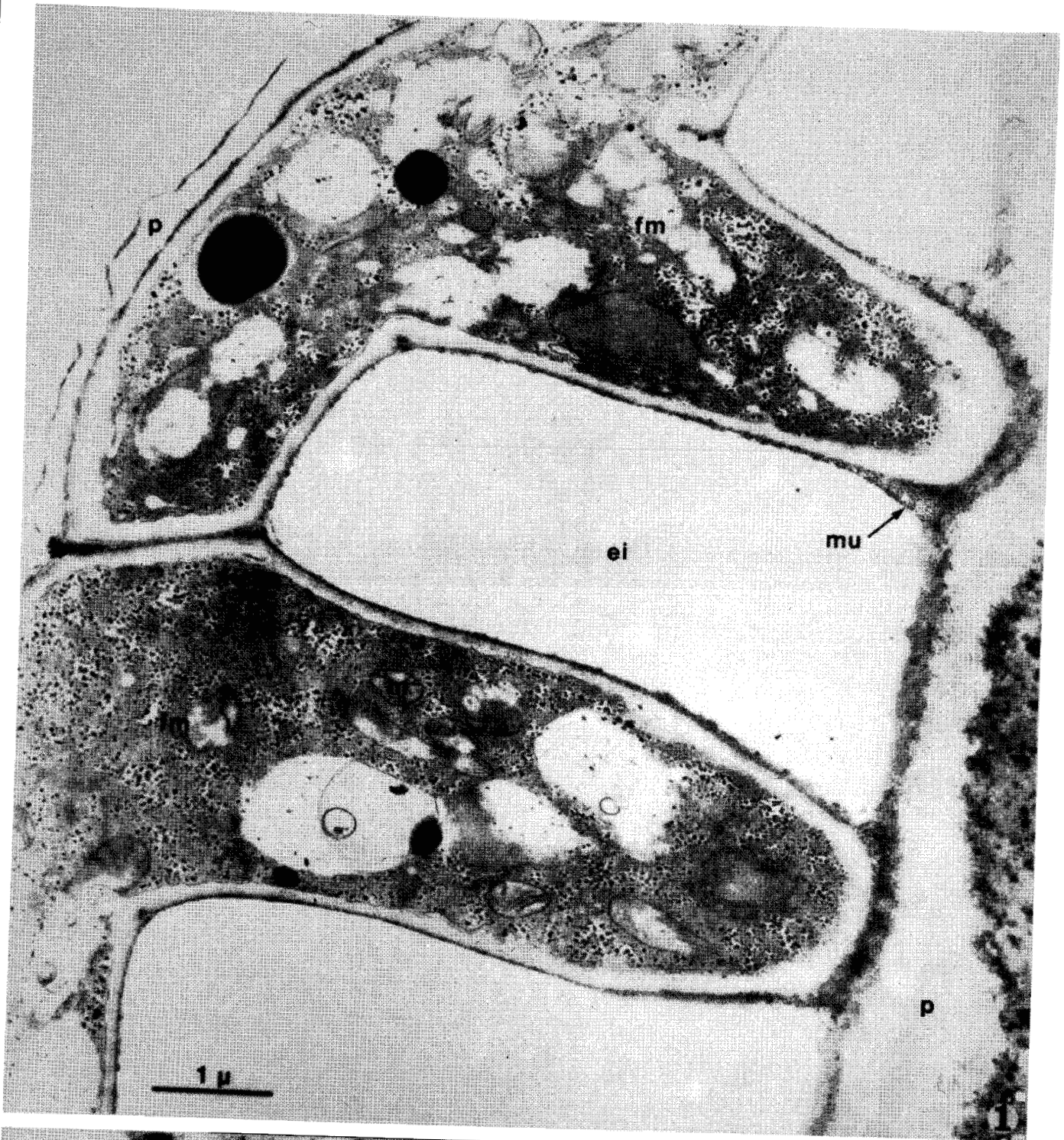


## PLANCHE VII

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Test de THIERY : fig. 1. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb : fig. 2.*

Fig. 1 - Coupe longitudinale d'un filament mycélien (fm) migrant entre deux cellules. Accolé à la paroi (p) de l'une, ce filament émet des évaginations en doigt de gant venant s'appuyer fortement sur la paroi opposée (p). Les épaisissements de la gaine de mucilage (mu) au niveau de la zone de contact sont nettement visibles. G x 21 000.

Fig. 2 - Différenciation par le filament mycélien (fm) d'un matériel granuleux (mg) opaque aux électrons, allant se fixer au niveau de la zone de contact entre les parois fongique (pf) et végétale (p). G x 12 000.



BUS  
LIFE

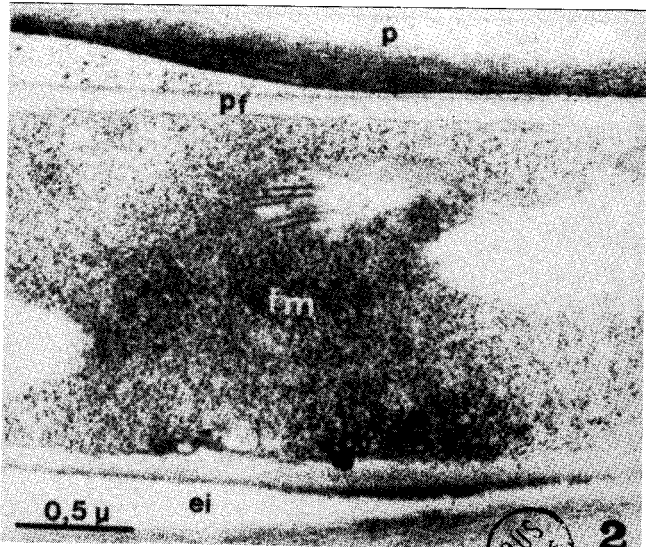
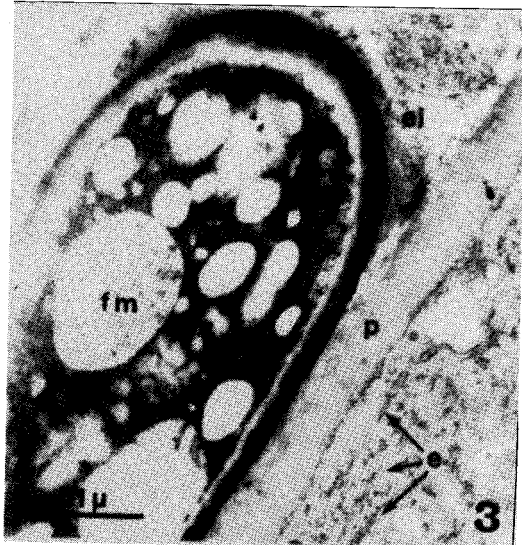
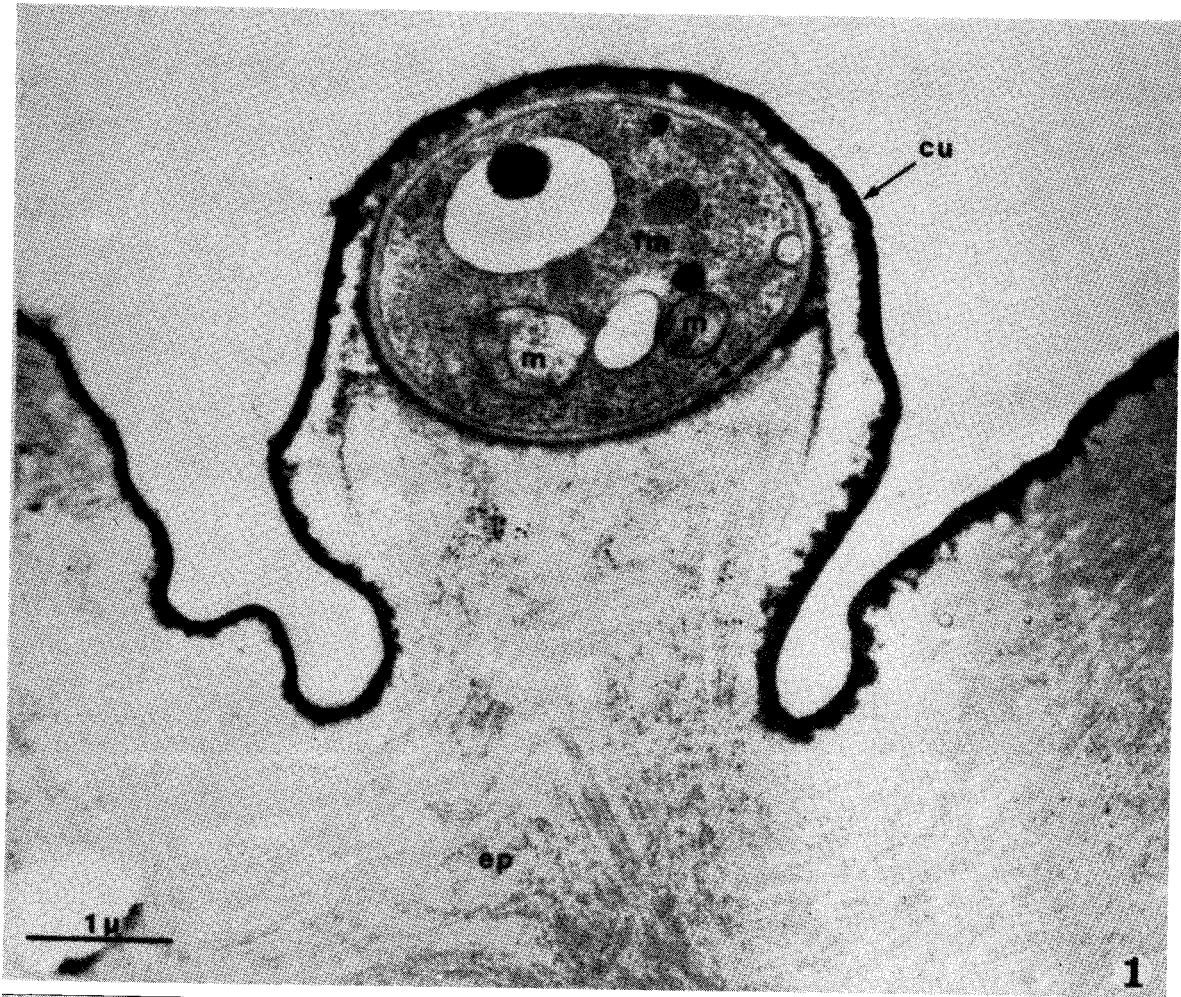
PLANCHE VIII

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb : fig. 2, traitement par le PTA Cobalt acide.*

Fig. 1 - Localisation sous-cuticulaire d'un filament mycélien (fm) migrant dans la paroi de l'épiderme (ep). Au voisinage immédiat de ce filament, la stratification de la paroi disparaît. G x 22 500.

Fig. 2 - A un stade précoce de l'attaque parasitaire, on n'observe aucune action du filament mycélien (fm) sur la paroi (p) des cellules de l'hôte. G x 36 900.

Fig. 3 - Disposition caractéristique de l'ergastoplasme (e) de la cellule végétale provoquée par la présence du filament mycélien (fm). G x 18 000.



BUS  
VILLE

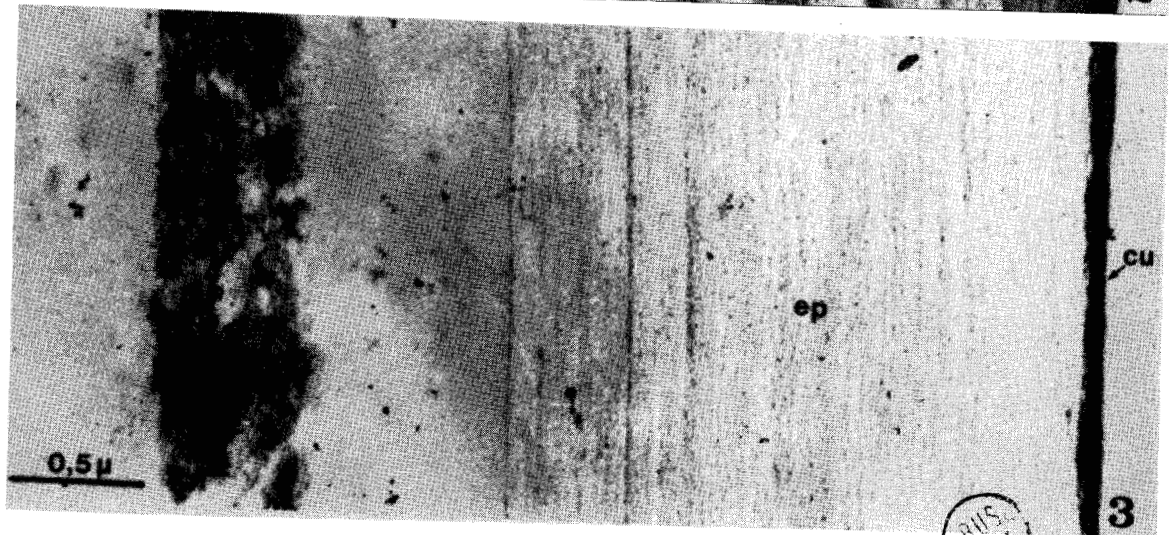
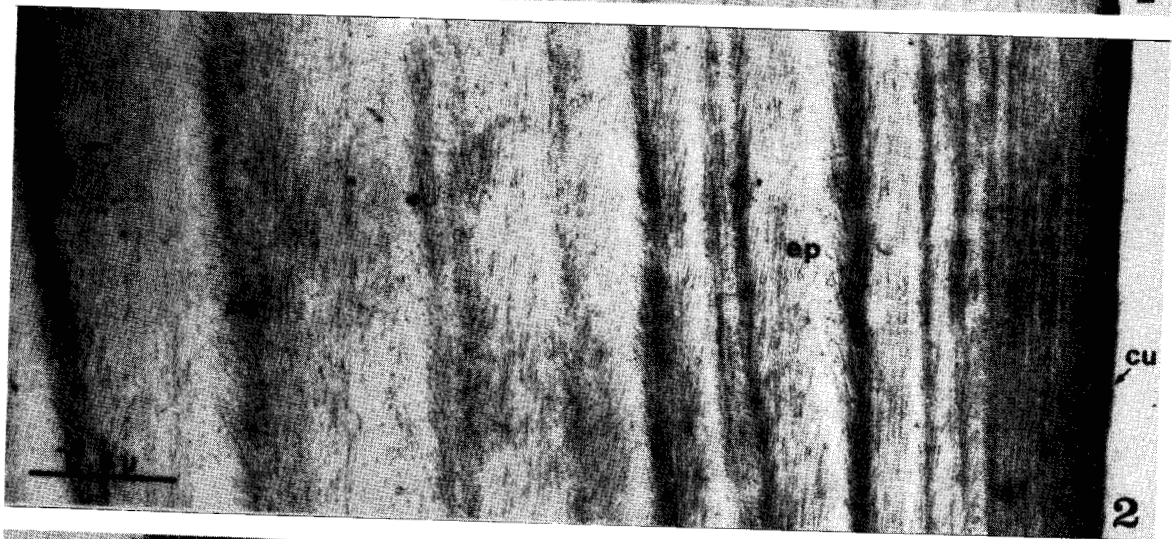
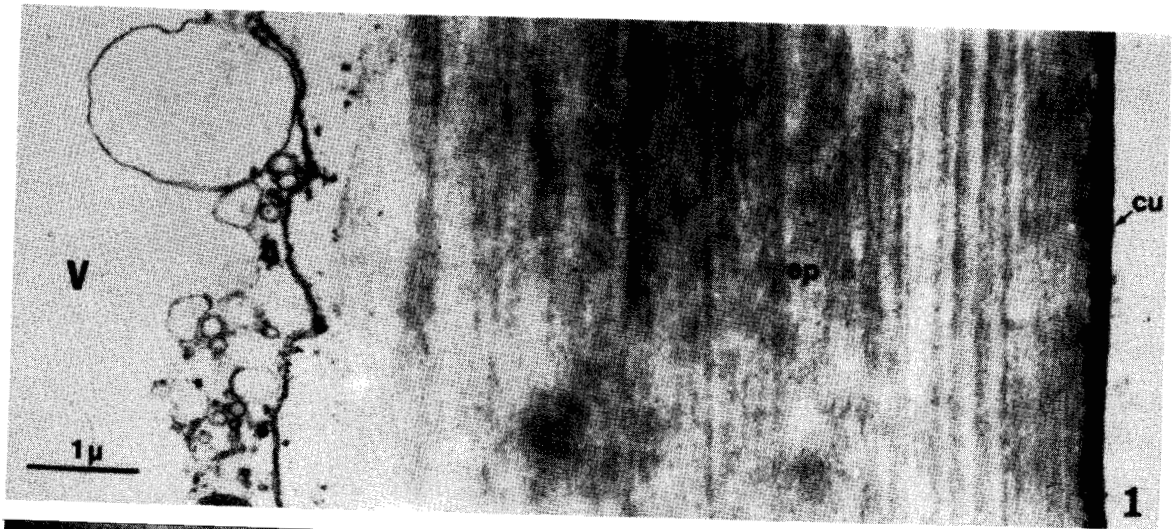
## PLANCHE IX

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.*

Fig. 1 - Aspect de la paroi de l'épiderme sur une coupe non traitée. G x 17 400.

Fig. 2 - Aspect caractéristique des fibres de cellulose en faisceaux dans les parties moyennes et profondes de la paroi de l'épiderme ; dans la région sous-cuticulaire, l'apparence est plus lamelliforme. Cette disposition structurale de la paroi est révélée, après préfixation, par désincrustation à l'EDTA (sel disodique en solution), suivie par adjonction de DMSO (Diméthylsulfoxyde) dans le fixateur principal. Les coupes sont contrastées normalement. G x 38 500.

Fig. 3 - Mise en évidence de la richesse en composés pecto-hémicellulosiques de la région sous-cuticulaire de la paroi de l'épiderme. La paroi désincrustée au préalable par l'EDTA est fixée normalement. L'hydrolyse potassique des composés pecto-cellulosiques est réalisée par flottation des coupes sur un gradient de solution alcaline, suivi d'une imprégnation par les contrastants habituels. G x 42 000.



BIS  
1111

PLANCHE X

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.*

Fig. 1 - Présence d'un filament mycélien à l'intérieur d'un vaisseau conducteur du xylème (va). Noter les épaisissements de lignine (L) ainsi qu'un plasmalemmosome. G x 40 000.

Fig. 2 - Formation de cavités de lyse (cly) dans la paroi végétale. Le filament mycélien dont on observe un septum (s), manifeste une grande activité métabolique ; on remarque une abondance de ribosomes (r), des mitochondries, et de nombreux systèmes lamellaires (slf) le long du plasmalemme.

Fig. 3 - Filament mycélien à l'intérieur d'une cellule : le cytoplasme est coagulé (cy c) ; dans la paroi déjà fortement lysée on observe par endroits des résidus de fibres (fir).

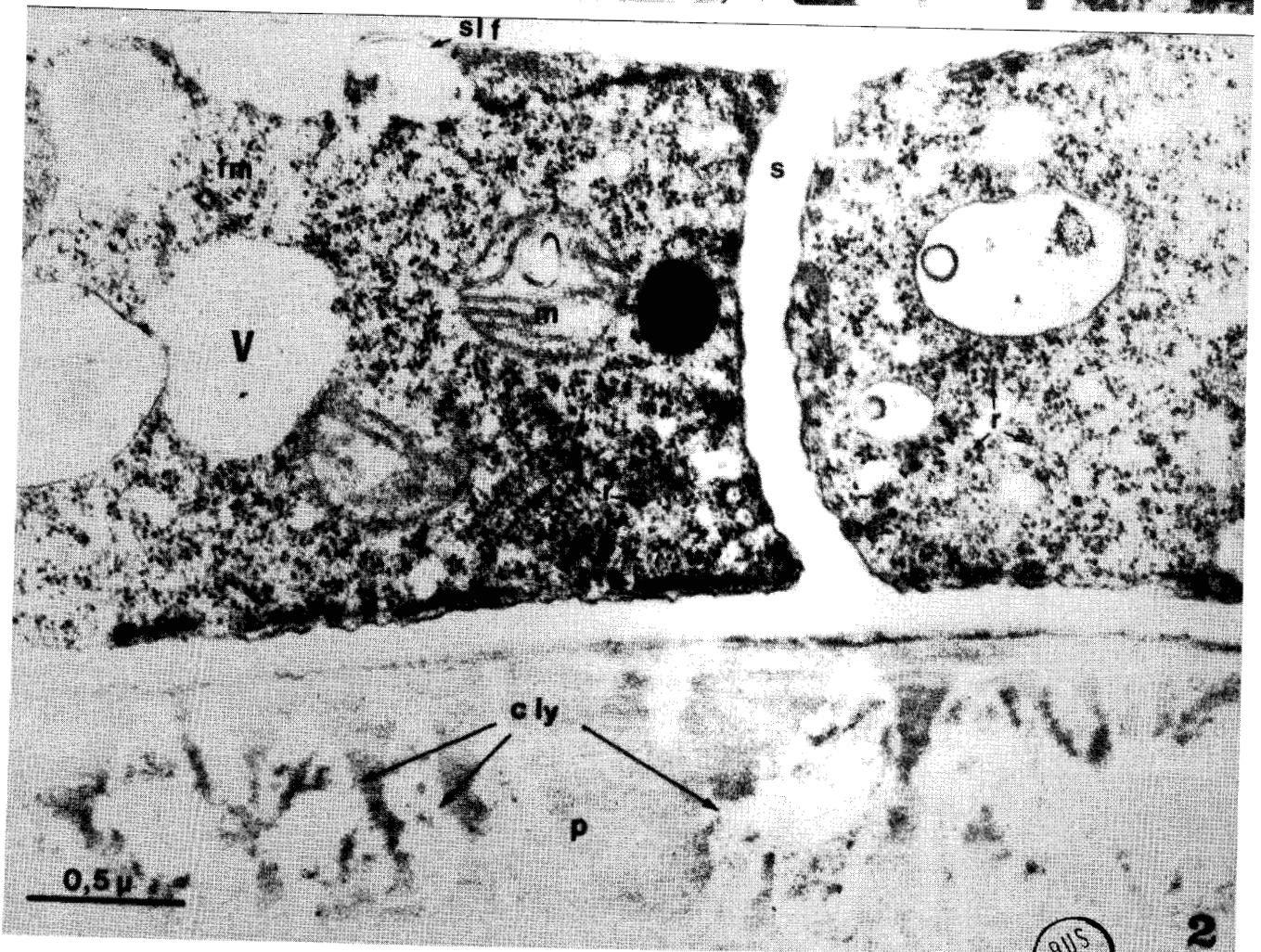
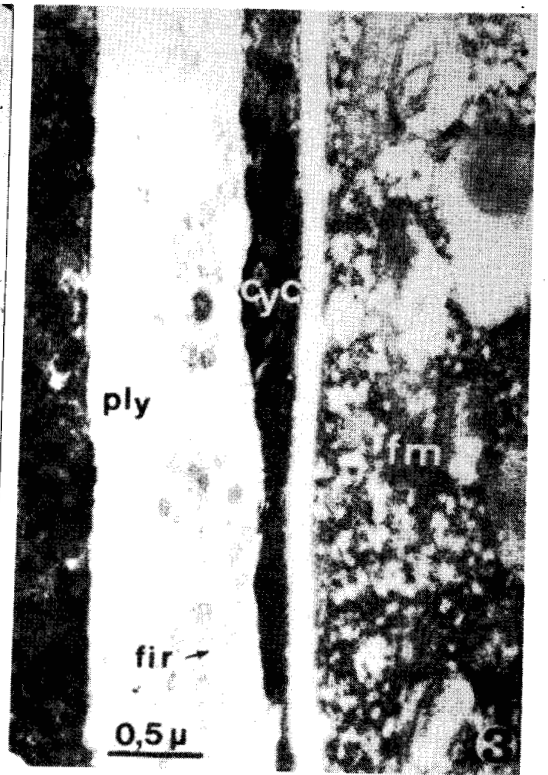
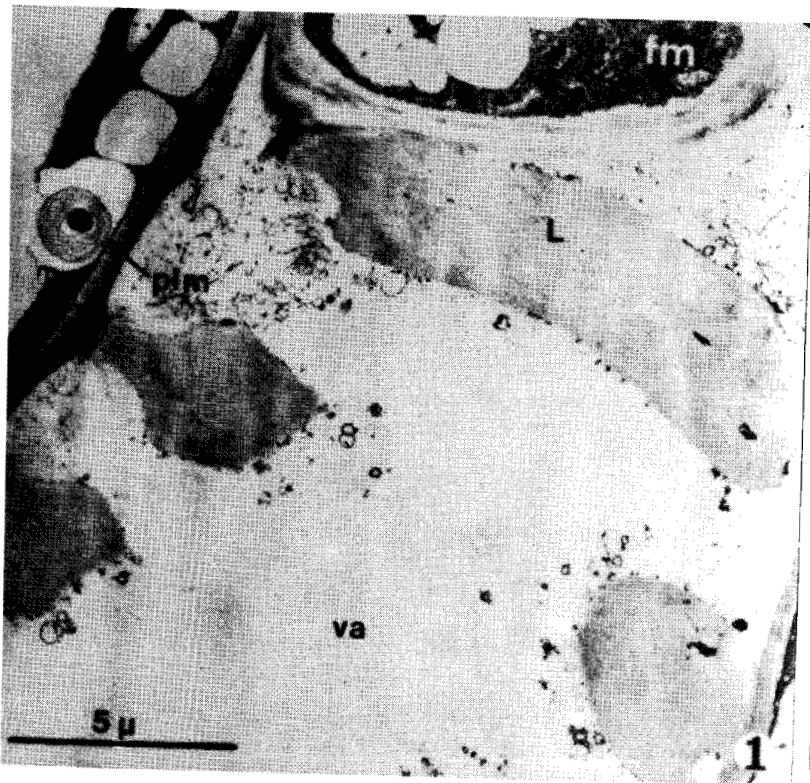




PLANCHE XI

*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle - citrate de plomb.*

Fig. 1 - A un stade avancé de l'attaque parasitaire, les fibres résiduelles (fir) de la paroi lysée (ply) viennent s'accoler à la paroi fongique (pf). Dans le filament, on observe un noyau (N) avec un nucléole (n), des mitochondries (m) et d'abondants ribosomes. G x 40 300.

Fig. 2 - Autre coupe montrant en plus des nappes d'ergostoplasme (e) dans le filament mycélien. G x 55 100.

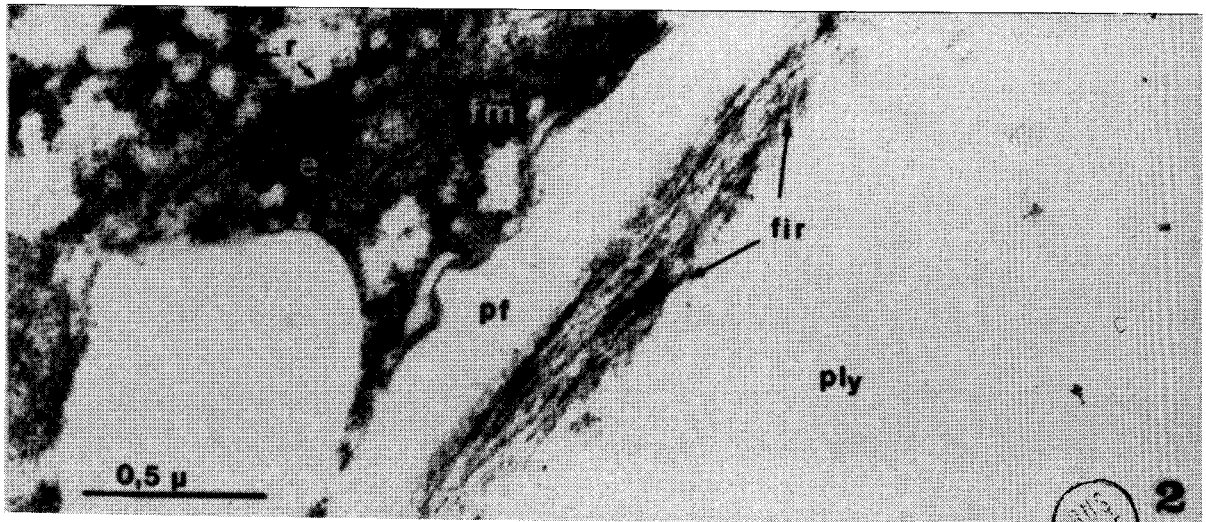
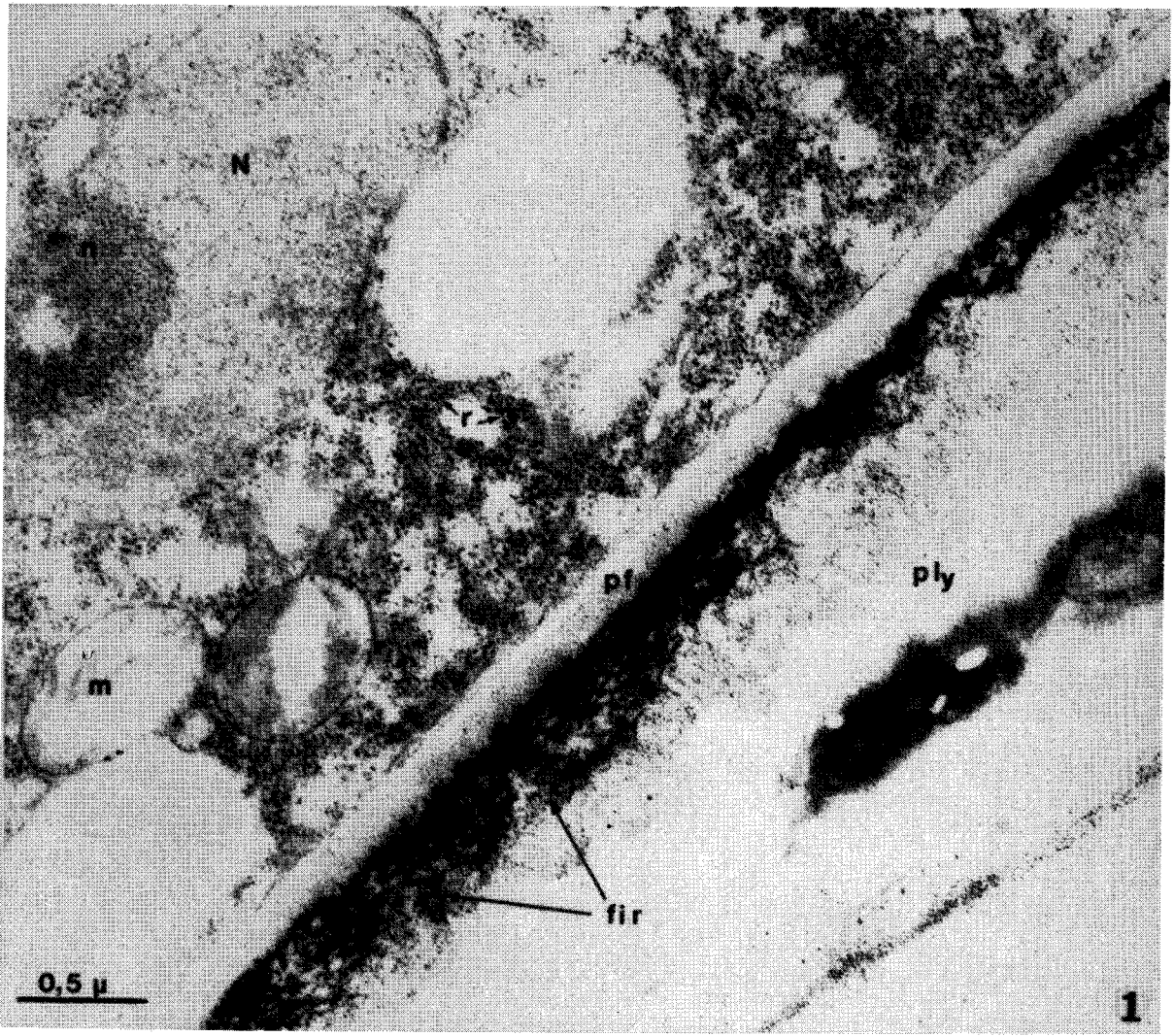


PLANCHE XII

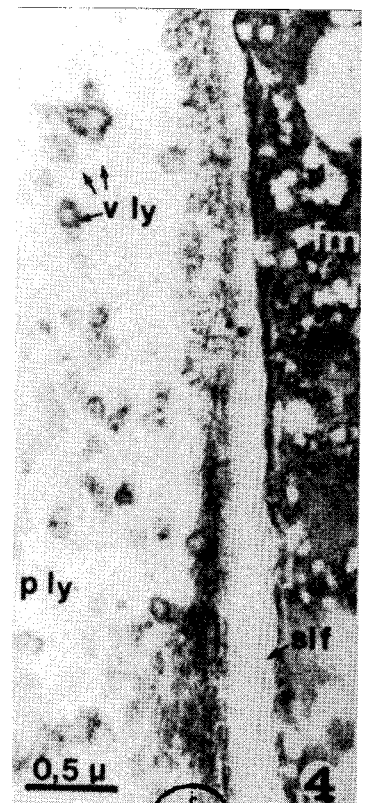
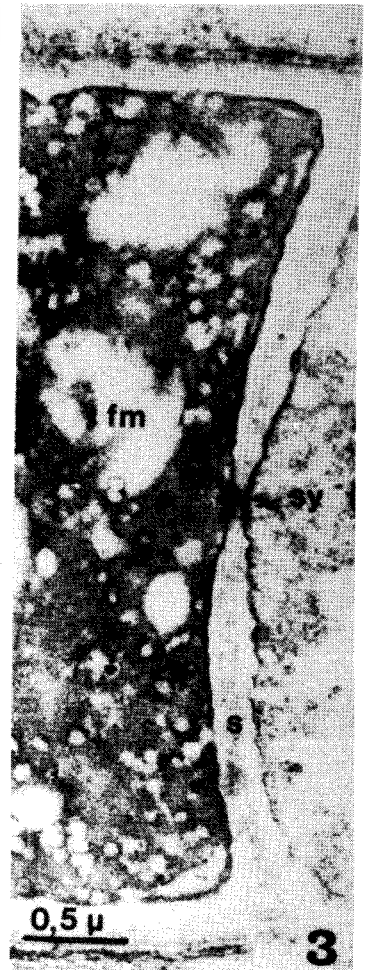
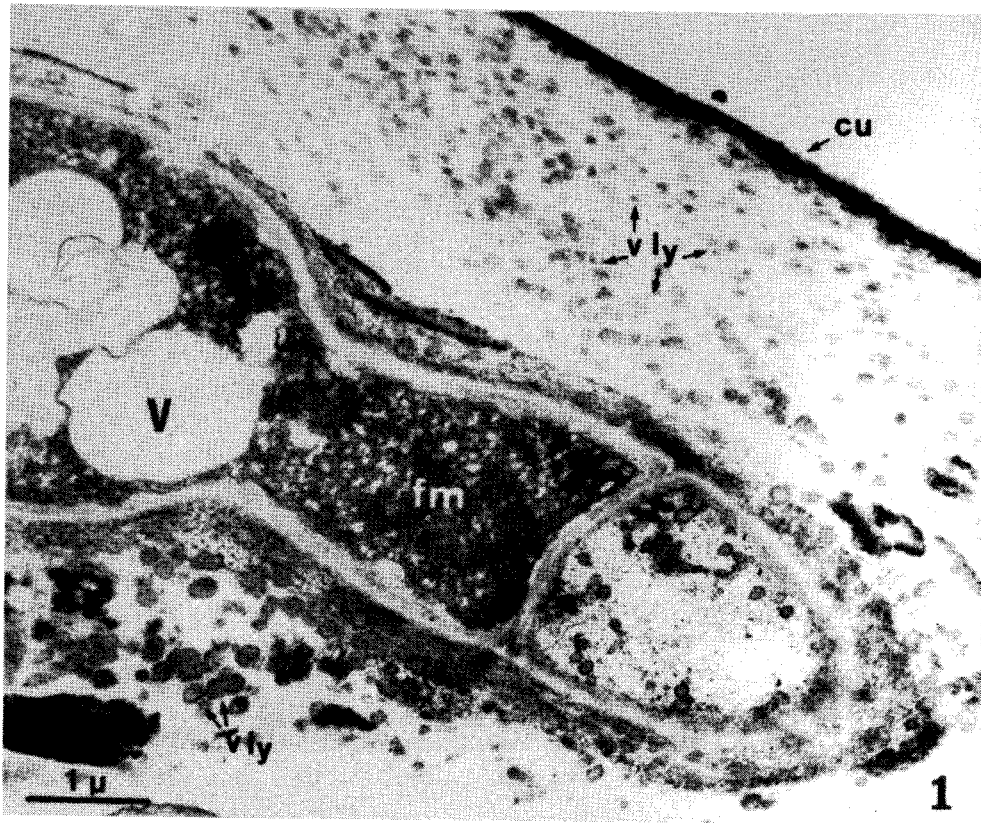
*Fixation : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.*

Fig. 1 - Dans les tissus nécrosés, la paroi de l'épiderme présente de nombreuses vésicules de lyse (vly). G x 17 000.

Fig. 2 - Importante colonisation mycélienne provoquant la disparition de la structure tissulaire de l'hôte. G x 11 550.

Fig. 3 - Détail d'un septum (s) montrant une synapse (sy). G x 28 000.

Fig. 4 - Détail d'une région de contact : on observe le long du plasmalemme des systèmes lamellaires fongiques (slf) indifférenciés ; la paroi de l'hôte fortement lysée (ply) présente de nombreuses vésicules de lyse (vly). G x 24 500.



**DEUXIEME PARTIE**  
**LES DETERMINANTS MOLECULAIRES**  
**DU POUVOIR PATHOGENE**

---

## CHAPITRE I : LA SIRODESMINE PL

### I. INTRODUCTION

En matière de Pathologie humaine, le terme de toxine sert à désigner des substances à caractère antigénique. En Phytopathologie, il est pris dans un sens beaucoup plus large.

La Physiopathologie a commencé à prendre son essor à la fin du siècle dernier avec, en particulier, les travaux de DE BARY qui, en 1886, réussissait à provoquer la pourriture de tissus de carotte mis en contact avec un extrait stérile de carotte pourrie. Mais, ce n'est qu'à partir du milieu de ce siècle, que la notion de "toxine" fut introduite en Phytopathologie pour désigner certaines substances impliquées dans des maladies cryptogamiques ; encore fallait-il définir précisément ce que l'on entendait par "toxine". Très vite, au fil des investigations, on se rendit compte de la complexité du problème.

Dans un article de synthèse publié en 1954, GAÜMANN affirmait : "Micro-organisms are pathogenic only if they are toxigenic : in other words, the agents responsible for diseases can damage their hosts only if they form toxins -microbial poisons- that penetrate into the host tissue". Ce raisonnement présente un caractère restrictif et même ambigu en raison de la signification trop vague attribuée au terme de toxine, qui englobe implicitement toute substance produite par l'agent pathogène pouvant nuire à la plante, y compris des enzymes.

Un an auparavant, DIMOND et WAGGONER proposaient une première distinction entre "toxine" et "vivotoxine", définissant cette dernière comme "a substance produced in the infected host by the pathogen and/or its host, which functions in the production of disease, but is not itself the initial inciting agent of disease" (DIMOND et WAGGONER, 1953). Ces auteurs postulaient également que pour caractériser une vivotoxine comme telle, il fallait :

- 1) l'isoler des plantes malades uniquement ;
- 2) la caractériser physico-chimiquement ;
- 3) lui faire reproduire en partie ou en totalité les symptômes induits par le parasite.

On voit immédiatement les limites de cette proposition, notamment à propos des substances dont la structure moléculaire est très instable, ou qui sont produites en quantités trop faibles pour être décelées.

Les propriétés biologiques particulières de la victorine, composé phytotoxique produit par *Helminthosporium victoriae*, furent à l'origine de la constitution d'une nouvelle classe de toxines, les "pathotoxines" (WHEELER et LUKE, 1963), encore qualifiées, pour reprendre la terminologie anglo-saxonne, de "host-specific toxins" (PRINGLE et SCHEFFER, 1964). Ces toxines manifestent une grande spécificité d'action sur l'espèce végétale que parasite l'agent pathogène. En outre, elles reproduisent la totalité des symptômes et n'exercent leurs effets toxiques que sur les variétés sensibles de l'hôte, pour une certaine gamme de concentrations. Leur production est en relation très étroite avec l'agressivité de l'agent pathogène. Ces propriétés ont été d'ailleurs mises à profit en Agronomie pour l'établissement de programmes de sélection de lignées tolérantes de Canne à sucre (BYTHER et STEINER, 1972). D'autres composés phytotoxiques produits par des microorganismes mais n'étant pas impliqués dans la pathogenèse ont été regroupés sous l'appellation de phytotoxines (LUKE et GRACEN, 1972) ; quant aux composés d'origine fongique qui sont toxiques pour les vertébrés, ils sont désignés par le terme de mycotoxines.

Les enzymes participant à la dégradation des constituants cellulaires ne sont pas considérées comme des toxines, même si leurs effets cytotoxiques les y apparentent pourtant (MOUNT et al., 1970 ; BASHAM et BATEMAN, 1975).

Cette classification est tout à fait arbitraire, car certaines substances possèdent un large spectre d'activité. En effet, certaines mycotoxines telles que la sporidesmine (WRIGHT, 1968), la rubratoxine B (REISS, 1971, la

citrinine (WHITE et TRUELOVE, 1972), la moniliformine (COLE et al., 1973) sont douées de propriétés phytotoxiques ; les aflatoxines (EL KHADEM, 1968) et la patuline (ELLIS et Mc CALLA, 1973) semblent même contribuer aux mécanismes d'envahissement de la plante par le Champignon.

A l'inverse, des phytotoxines sont capables de produire des effets toxiques chez les animaux (SINDEN et al., 1969 ; STEELE et MIROCHA, 1971).

Dans ce chapitre, nous avons cherché à caractériser la production de substances phytotoxiques par *Phoma linguam* et à préciser leurs propriétés biologiques ainsi que leur rôle dans la maladie.

Cette recherche est d'autant plus intéressante que des substances phytotoxiques ont déjà été isolées des filtrats de culture d'autres espèces appartenant au genre *Phoma*. Nous les avons rassemblées dans le tableau ci-dessous en faisant figurer également l'espèce productrice.

Tableau 6 : Liste des composés phytotoxiques isolés des filtrats de cultures de quelques espèces du genre *Phoma*.

Espèces fongiques	Substances phytotoxiques
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> et var. <i>nonoxydabilis</i>	Phomine ou cytochalasine B (BOUSQUET et BARBIER, 1972)
<i>Phoma exigua</i> var. <i>nonoxydabilis</i>	Phomenone (BOUSQUET, 1973 ; RICHE et al., 1974)
<i>Phoma tracheiphila</i>	Glycoprotéine (NACHMIAS et al., 1977)
<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>	Pigments anthraquinoniques (SAUVET, 1979).

## II. PRODUCTION ET CARACTERISATION DE PHYTOXINES PRODUITES PAR *PHOMA LINGUAM*, EN CULTURE SUR UN MILIEU SYNTHETIQUE

Dans une première étape, nous caractérisons la production de substances phytotoxiques à partir de cultures réalisées sur un milieu synthétique. Une méthode de purification du produit, son identification ainsi que ses propriétés antibiotiques sont ensuite décrites.

### 1) MISE EN EVIDENCE

#### a) milieu de culture :

La composition du milieu choisi pour la culture du Champignon est la suivante :



- le milieu minéral est celui proposé par MORQUER, dilué au quart, soit par litre de milieu :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 400 mg ;  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  : 200 mg ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 125 mg ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  complexé avec de l'EDTA  $\text{Na}_2$  : 10 mg ;  $\text{MnSO}_4$  : 10 mg ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 10 mg ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  : 5 mg

- l'azote est fourni, à raison de 50 mg/l, sous forme d'un mélange de deux acides aminés, la L-Asparagine  $\text{H}_2\text{O}$  : 135 mg et l'acide L- $\gamma$ -aminobutyrique : 185 mg ;

- le glucose, à la concentration de 20 g/l a été choisi comme source de glucide

- enfin, la composition du milieu est complétée par l'addition de deux vitamines la thiamine : 100  $\mu\text{g}$  et la biotine : 10  $\mu\text{g}$ .

Le pH du milieu initialement égal à 4,8 est amené à 5,5 par addition d'une solution de soude décinormale.

b) conditions de culture :

Les cultures sont réalisées en fioles de Roux de un litre, à raison de 100 ml de milieu par fiole. Le fond des fioles est tapissé de baguettes de verre de 6 mm de diamètre afin de permettre l'aération nécessaire à une bonne croissance du Champignon. Le milieu estensemencé avec une suspension de conidies de façon à obtenir une concentration finale de  $5 \times 10^3$  conidies par fiole. Les fioles de Roux ainsiensemencées sont ensuite placées à 22°C, à l'obscurité continue, pendant 4 semaines.

c) traitement des filtrats de culture :

Au bout de 4 semaines, les cultures sont filtrées sur de la gaze et centrifugées 20 minutes à 4 000 t/mn. Une partie du filtrat est conservée au réfrigérateur, le reste est extrait 3 fois par du chloroforme. L'extrait chloroformique est séché en le plaçant quelques heures au congélateur, puis en le filtrant à froid sur du papier filtre. L'extrait est ensuite évaporé à sec, à 30°C, sous vide, dans un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris par du méthanol fraîchement distillé. Le filtrat extrait au chloroforme est conservé au réfrigérateur après avoir toutefois éliminé les traces du solvant par passage d'une durée de quelques minutes, à 30°C, sous vide, dans un évaporateur rotatif.

Le filtrat brut, l'extrait méthanolique et le filtrat résiduel sont testés biologiquement.

d) test biologique :

L'activité biologique est mise en évidence, à 20°C, par trempage de plantules de Chou âgées de 3 semaines, dont l'hypocotyle a été sectionné au niveau du collet. Chaque plantule est placée dans un tube à hémolyse renfermant soit :

- 5 ml de filtrat brut ;
- 5 ml de filtrat résiduel ;
- 4,9 ml d'eau distillée + 0,1 ml d'extrait méthanolique ;
- 4,9 ml d'eau distillée + 0,1 ml de méthanol ;
- 5 ml de milieu de culture non ensemencé.

Pour chaque condition, nous avons étudié le comportement de 5 plantules. Le test est effectué en microphytotron, dans des conditions de lumière identiques à celles requises pour la culture des Choux. En effet, dans certains cas, des modifications apportées dans la qualité de la lumière provoquent des variations de l'effet biologique de certaines toxines (RUFFNER, 1971).

En ce qui concerne le lot témoin milieu de culture non ensemencé, il est indispensable de le renouveler toutes les 12 heures afin de limiter les pollutions bactériennes.

L'activité biologique du filtrat brut et de l'extrait méthanolique se traduit après 48 heures de trempage par une diminution de la turgescence des pétioles et par un début de flétrissement des feuilles ; le flétrissement total de toutes les plantules est atteint au bout de 96 heures. Aucun effet phytotoxique ne se manifeste en ce qui concerne le filtrat résiduel extrait au chloroforme et les deux témoins eau distillée/méthanol et milieu de culture non ensemencé. Les filtrats de culture de *Phoma linguam* renferment donc une ou plusieurs substances phytotoxiques solubles dans le chloroforme.

## 2) FRACTIONNEMENT DU FILTRAT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

a) principe :

L'extrait méthanolique correspondant à l'extraction d'un filtrat de culture provenant de 1 litre de milieu est soumis à une chromatographie préparative sur couche mince de gel de silice Merck, type G de 0,5 mm d'épaisseur, développée dans de l'acétate d'éthyle sur une distance de 10 cm.

L'extrait est déposé sous forme d'une bande étroite sur toute la longueur de la plaque, à 2 cm de part et d'autre de chaque bord. Avant le développement, la plaque est soumise à une saturation par les vapeurs de solvant, pendant une heure, à température ambiante. Après séchage, une partie du chromatogramme est divisée en 10 bandes de 1 cm de large ; chacune de ces bandes est récupérée par grattage de la plaque avec une spatule et éluee par 2,5 ml de méthanol. Les fractions ainsi récupérées sont numérotées de 1 à 10, la première fraction correspondant à la zone de dépôt de l'éluat.

Après centrifugation, les 10 fractions sont diluées 10 fois avec du méthanol pour être testées biologiquement. Le test biologique consiste à nouveau à faire tremper des plantules sectionnées au niveau du collet, dans des tubes à hémolyse contenant 4,9 ml d'eau distillée et 0,1 ml d'éluat méthanolique. Dans le lot témoin, l'éluat est remplacé par du méthanol. Au bout de 72 heures de trempage, il est possible d'évaluer la phytotoxicité de certaines fractions, d'une part en mesurant simplement la longueur des segments d'hypocotyles plasmolysés, d'autre part en observant les effets sur les cotylédons et la première feuille. L'autre partie du chromatogramme est révélée par pulvérisation d'une solution d'acide sulfurique à 50 %, suivie d'un chauffage à 110°C pendant quelques minutes.

b) résultats :

Les résultats exprimés dans le graphique 6 mettent en évidence une très nette activité phytotoxique des fractions 8 et 9 ; l'effet toxique étant plus important dans la fraction 9. Cette activité se traduit non seulement par un important amincissement des hypocotyles mais également par un très sévère flétrissement des cotylédons, des pétioles et de la première feuille. Si l'on prolonge la durée du test, on remarque une légère phytotoxicité de la fraction 1, se manifestant par l'amincissement des hypocotyles sur 4 à 5 mm mais sans flétrissement des cotylédons.


Sur l'autre partie du chromatogramme, la révélation à l'acide sulfurique à 50 % met en évidence la migration de 4 composés dont les Rf sont respectivement de 0,13 - 0,66 - 0,75 et 0,82. Ces composés apparaissent colorés en jaune et si le temps de chauffage est augmenté, cette coloration vire au brun-orangé pour les composés de Rf 0,75 et 0,82.

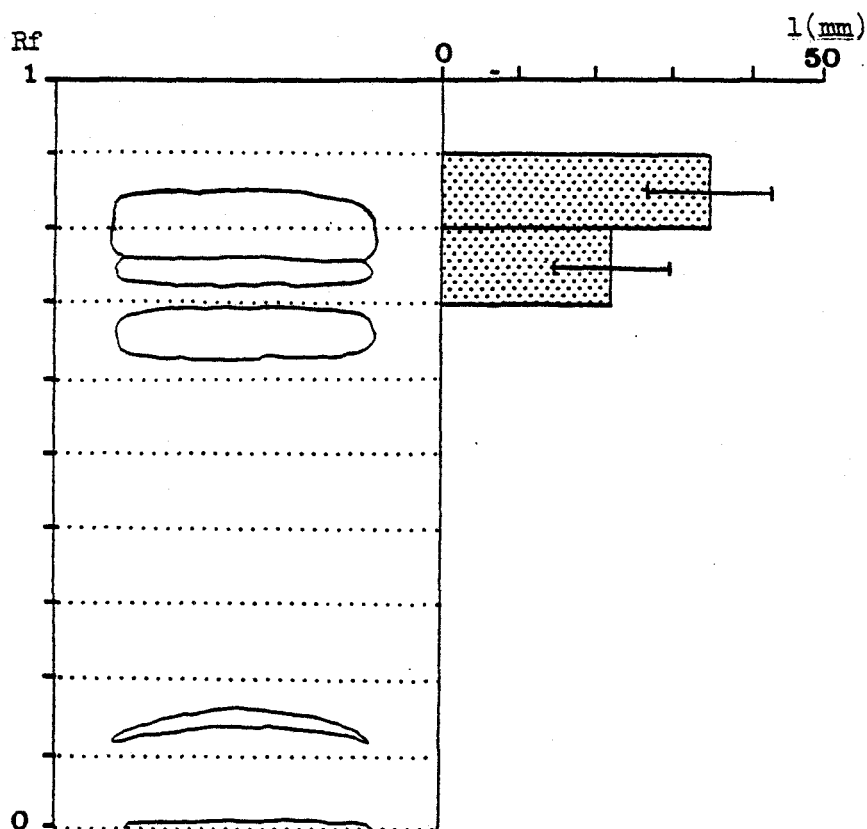
*Graphique 6 : Mise en évidence de fractions phytotoxiques après chromatographie d'un extrait chloroformique de filtrats de culture de Phoma linguam sur gel de silice dans l'acétate d'éthyle.*

l (mm) : longueur, en mm, des segments d'hypocotyles amincis

distance du front de solvant : 10 cm

fractionnement du chromatogramme en 10 parties égales

 : phytotoxicité




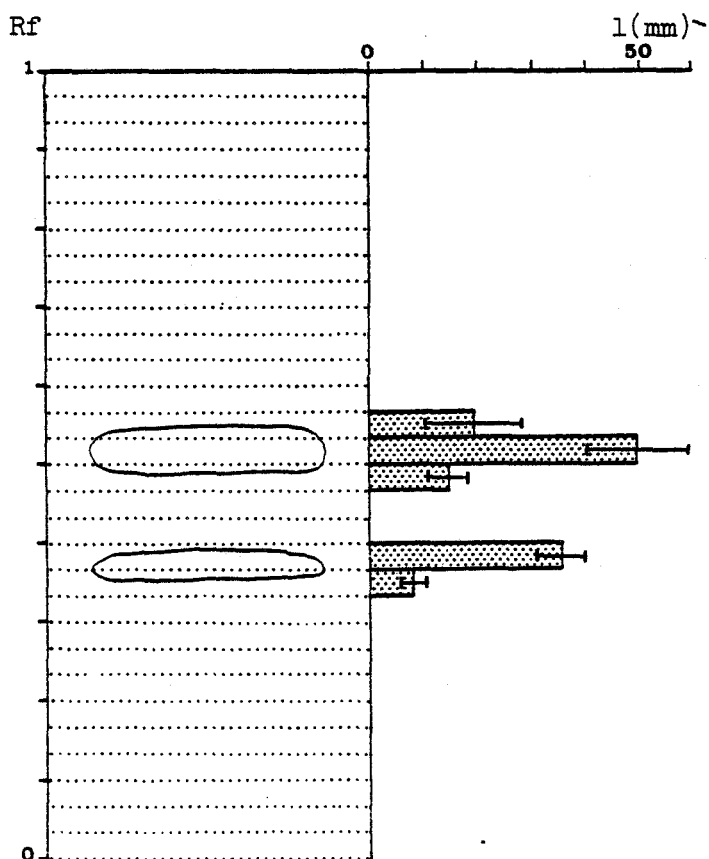
En établissant la comparaison entre l'activité biologique des fractions et la révélation du chromatogramme à l'acide sulfurique, on peut attribuer la phytotoxicité de la fraction 9 au composé de  $R_f = 0,82$ . En raison du découpage arbitraire du chromatogramme, ce composé se trouve également réparti, en moins grande quantité cependant, dans la fraction 8. Cette fraction renferme également un autre composé légèrement plus polaire, de  $R_f = 0,75$ . Afin de connaître les effets biologiques réels de ce second composé, nous avons répété l'expérience en effectuant une double chromatographie préparative sur gel de silice G. La première chromatographie est développée avec l'acétate d'éthyle sur 10 cm. La région du chromatogramme correspondant aux fractions 8 et 9 est élue au méthanol et l'éluat est rechromatographié avec un mélange acétate d'éthyle-chloroforme (1/1, v/v) sur 15 cm.

Une partie du chromatogramme est divisée en bandes de 5 mm de large cette fois, chacune de ces bandes étant éluée au méthanol. La mesure de l'activité biologique des différentes fractions s'effectue dans des conditions analogues à celles décrites dans la première expérience. L'autre partie du chromatogramme est révélée à l'acide sulfurique. Les résultats concernant l'activité phytotoxique des fractions sont regroupés dans le graphique 7. La chromatographie dans le mélange acétate d'éthyle-chloroforme permet une séparation de l'activité phytotoxique en deux régions distinctes du chromatogramme, correspondant aux fractions 11, 12 et 15, 16, 17 avec une activité maximale pour les fractions 12 et 16.

Deux composés de Rf 0,38 et 0,52 sont révélés par l'acide sulfurique à 50 %. Les produits élués dans les fractions 12 et 16 sont à nouveau chromatographiés dans l'acétate d'éthyle et révélés à l'acide sulfurique ; on peut ainsi vérifier qu'ils correspondent respectivement aux composés de Rf = 0,75 et 0,82.

*Graphique 7 : Séparation de deux composés phytotoxiques après chromatographie des fractions 8 et 9 sur gel de silice dans le mélange acétate d'éthyle/chloroforme.*

l (mm) : longueur, en mm, des segments d'hypocotyles amincis -  : phytotoxicité  
distance du front de solvant : 15 cm  
fractionnement du chromatogramme en 30 parties égales.



Pour plus de commodité, les composés migrant avec un Rf de 0,52 et 0,38 dans le mélange acétate d'éthyle/chloroforme ont été respectivement désignés comme étant les toxines (1) et (2). En conclusion, on peut attribuer à deux composés la phytotoxicité des filtrats de culture de *Phoma linguam*. Ces filtrats renferment également une ou peut-être plusieurs autres substances phytotoxiques, solubles dans le chloroforme, plus polaires car ne migrant pas dans l'acétate d'éthyle ; toutefois, en raison de leur faible activité biologique, on peut considérer l'effet de cette ou ces substances comme négligeable. Par conséquent, nous avons recherché une méthode de purification pour chacun des deux composés toxiques en vue d'élucider leur structure chimique.

### 3) METHODES DE PURIFICATION DES TOXINES

#### a) purification de la toxine (1) :

Une méthode très simple et très rapide nous a permis d'obtenir ce composé à l'état pur en quantités importantes.

La première étape de purification consiste en une extraction au chloroforme des filtrats de culture obtenus dans des conditions analogues à celles décrites précédemment. Après séchage à froid et évaporation à sec sous vide de l'extrait, le résidu est repris par un volume minimum de méthanol. Il suffit ensuite de laisser cet extrait 48 heures au congélateur pour provoquer la formation d'un abondant précipité de couleur jaune-pâle. Le précipité est récupéré par filtration à froid et rincé par du méthanol froid. Par ce procédé, nous avons pu obtenir environ 700 mg de précipité à partir de 30 litres de milieu de culture. La pureté du produit obtenu est contrôlée par chromatographie sur feuilles de gel de silice Schleicher-Schüll F1500 prêtes à l'emploi, de 0,25 mm d'épaisseur, dans des solvants de polarité différente : acétate d'éthyle, chloroforme-méthanol (98/2, v/v), acétate d'éthyle-chloroforme (1/1, v/v) et chloroforme. La distance de migration des solvants est de 10 cm et les chromatogrammes sont révélés à l'acide sulfurique à 50 %. On ne détecte, à chaque fois, qu'une seule tache. Pour ces différents systèmes solvants, la valeur du Rf du précipité et celle de la toxine (1) sont identiques. Ces valeurs sont reportées dans le tableau 7.

b) purification de la toxine (2) :

La toxine est purifiée par chromatographie préparative sur couche mince de gel de silice G dans l'acétate d'éthyle puis dans le mélange acétate d'éthyle/chloroforme (1/1, v/v). Les valeurs du R<sub>f</sub> de cette toxine après chromatographie sur gel de silice Schleicher-Schüll F1500 dans les différents solvants précédents, sont également reportées dans le tableau 7 et comparées à celles de la toxine (1) et de la substance précipitable au méthanol.

Tableau 7 : Comparaison entre les valeurs du R<sub>f</sub> de la toxine (1) de la substance précipitable au méthanol et de la toxine (2) après chromatographie dans différents solvants.

Solvants	Chloroforme	Chloroforme/ méthanol	acétate d'éthyle	acétate d'éthyle/ chloroforme
Toxine (1)	0,00	0,36	0,77	0,38
Précipité	0,00	0,36	0,77	0,38
Toxine (2)	0,00	0,16	0,67	0,25

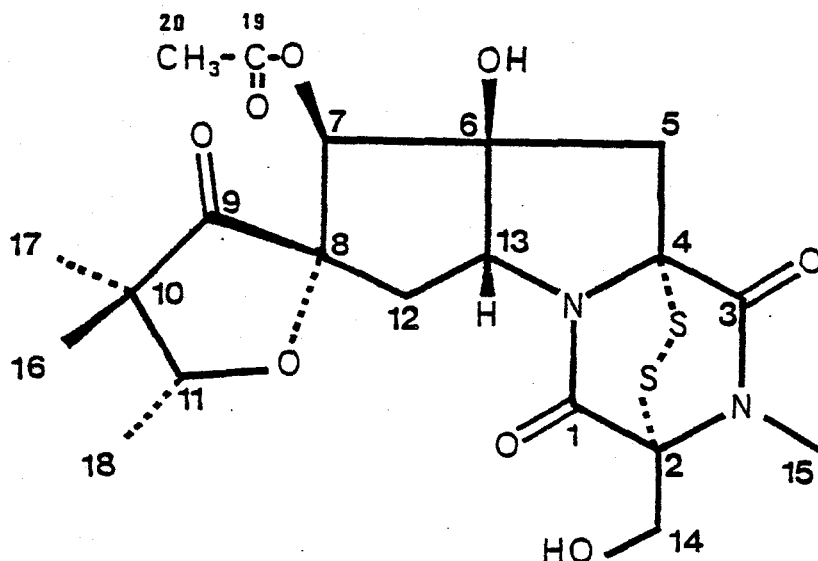
## 4) DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES DEUX TOXINES

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-Sur-Yvette en collaboration avec le laboratoire de M. BARBIER.

a) structure de la toxine (1) :

La détermination de la structure de cette toxine a abouti à l'identification (FEREZOU et al., 1977) d'une substance de formule brute  $C_{20}H_{26}N_2O_8S_2$  du groupe des épithio-3,6 dioxo-2,5 pipérazines (TAYLOR, 1971) et a été apparentée à la sirodesmine G (CURTIS et al., 1977). La sirodesmine G fait partie d'un ensemble de 4 métabolites, les sirodesmines A,B,C,G isolées et identifiées par CURTIS des filtrats de culture d'un agent de dégradation saprophytique du bois, *Sirodesmium diversum* Cooke. La toxine (1) produite par *Phoma linguam* possède des constantes physiques et des propriétés spectrales comparables à celles de la sirodesmine G, cependant la stéréochimie complète n'ayant pas été établie, le nom de sirodesmine PL a été attribué à cette toxine.

La formule plane de la molécule ainsi que ses principales caractéristiques physico-chimiques, sont représentées ci-dessous.



Formule plane de la sirodesmine PL (d'après FERZOU)

Caractéristiques physico-chimiques :

- masse moléculaire = 486
- température de fusion = 182-184°C
- absorption dans l'ultraviolet, dans le méthanol : 208 mm avec épaulement à 228 mm
- coefficient d'extinction moléculaire : -à 208 mm :  $9,9 \cdot 10^3$   
-à 228 mm :  $4,8 \cdot 10^3$
- $\alpha_D^{20} = -224^\circ$

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication parue au "Nouveau Journal de Chimie" (FERZOU et al., 1977).

b) structure de la toxine (2) :

La toxine (2) possède une formule brute, des constantes physiques et des propriétés spectrales identiques à celles de la toxine (1) ; en effet, les spectres dans l'ultraviolet dans le méthanol et infra-rouge sont semblables ; il en est de même pour la valeur de l' $\alpha_D^{20}$  ainsi que pour les spectres de masse par ionisation chimique et de résonance magnétique nucléaire dans le chloroforme. Malgré ces similitudes, on ne peut déduire que les toxines (1) et (2) possèdent une structure chimique absolument identique puisqu'elles se comportent différemment en chromatographie sur couche mince. Selon FERZOU (communication verbale), la toxine (2) serait une forme réduite, réversible, de la sirodesmine PL, résultant de la réduction spontanée du pont



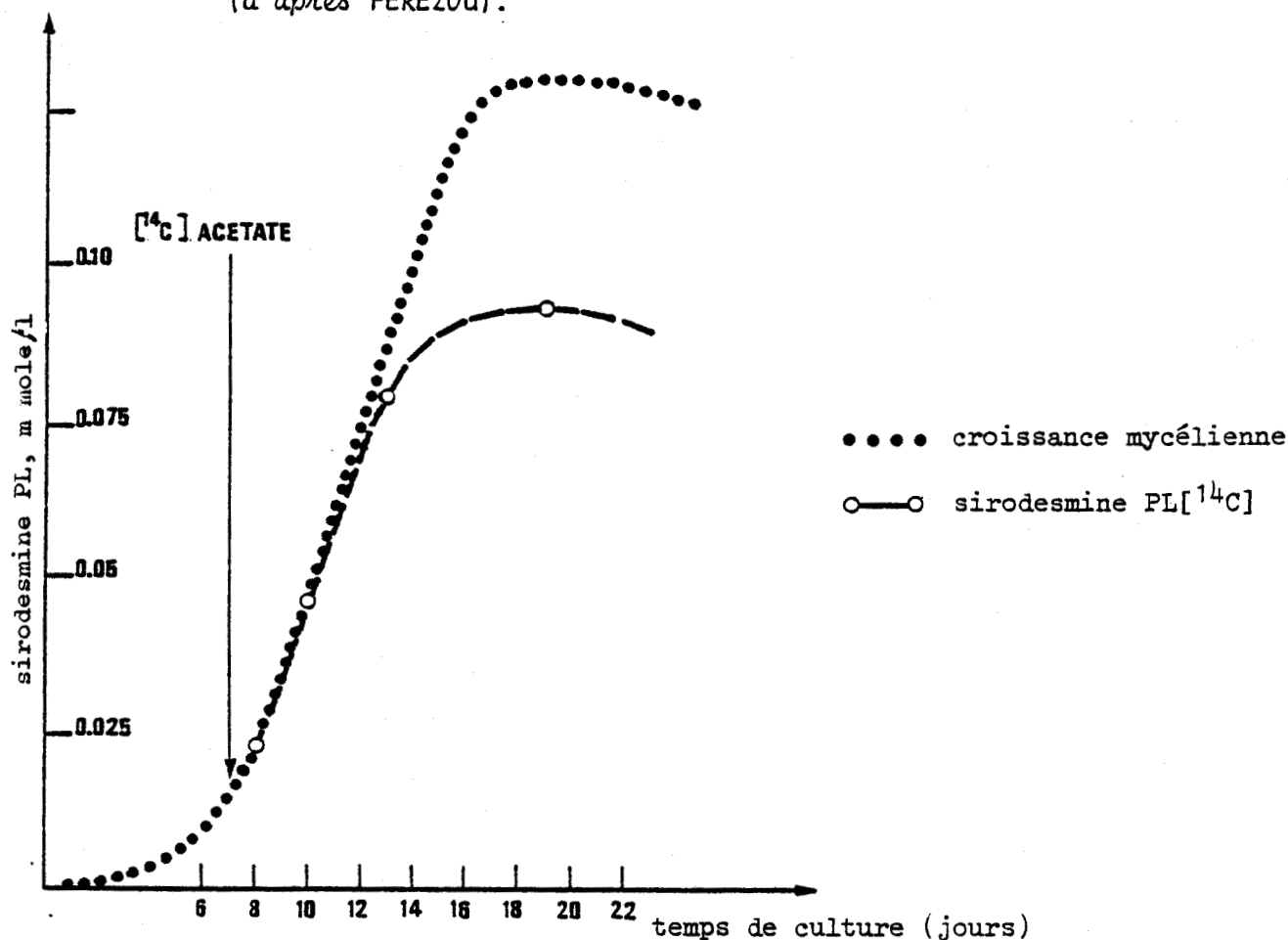
disulfure de la molécule. Nous avons personnellement constaté l'instabilité de la sirodesmine PL durant sa conservation, surtout en solution, même à basse température ; dans le mélange obtenu, nous avons pu caractériser un produit possédant les mêmes caractéristiques chromatographiques que la toxine (2). Ceci tend à prouver que le passage de l'une à l'autre des formes de la molécule s'effectue spontanément, mais, semble-t-il irréversiblement car, après un mois de conservation au congélateur des solutions des deux toxines pures, on ne remarque pas de transformation de la toxine (2) en toxine (1), alors que l'inverse se produit.

#### 5) BIOSYNTHESE, *IN VITRO*, DE LA SIRODESMINE PL

Selon des données extraites du travail de FERZOU (FERZOU et al., 1980), l'évolution de la biosynthèse de sirodesmine PL, *in vitro*, est représentée dans le graphique 8 en comparaison avec la croissance du Champignon. La courbe de croissance est établie au moyen de la méthode des poids de matière sèche. Pour le dosage de la sirodesmine PL, on fournit au Champignon une solution de précurseur radioactif sous forme d'acétate [ $^{14}\text{C}$ ], au 7ème jour de croissance. La toxine est extraite au chloroforme et à l'acétate d'éthyle, suivie d'une purification par chromatographie sur couche mince avec le mélange chloroforme/acétate d'éthyle (1/1, v/v), puis sur Séphadex LH20 éluée par le mélange chloroforme/acétate d'éthyle (3/2, v/v). Le graphique 8 montre que la biosynthèse de toxine évolue de la même manière que la croissance du Champignon, avec une production optimale allant du 16ème au 18ème jour de culture.

Une partie des mécanismes de biosynthèse de la sirodesmine PL a pu être élucidée grâce à l'identification d'un composé intermédiaire, la phomamide (FERZOU et al., 1979) ainsi que par l'utilisation de précurseurs radioactifs. Le premier produit formé est un cyclodipeptide, la cyclo-L-tyrosyl-L-sérine, transformée en phomamide, ou cyclo-O-( $\gamma$  diméthylallyl)-L-tyrosyl-L-sérine. La phomamide fournit ensuite la sirodesmine PL, après condensation avec un résidu mévalonyl et modification du complexe.

Graphique 8 : Biosynthèse de la sirodesmine PL en fonction de la croissance mycélienne de *Phoma linguam*, en culture *in vitro* (d'après FERZOU).



#### 6) PROPRIETES ANTIBIOTIQUES DE LA SIRODESMINE PL

Quelques phytotoxines sont douées d'activité antibiotique et avant le développement des techniques physico-chimiques plus fines de dosage, cette propriété a été utilisée dans le cas de l'acide fusarique (KALYANASUNDARAM, 1955) et de l'acide alternarique (BRIAN et al., 1951) pour évaluer les quantités de ces toxines produites, *in vitro* et *in vivo*.

Parmi les substances de la famille des épithiodicétopipérazines, certaines manifestent une activité antifongique et antibactérienne remarquable (WAKSMAN et BUGIE, 1944 ; BREWER et al., 1966 ; BREWER et al., 1972). En général, les bactéries donnant une coloration Gram-positive et *Bacillus subtilis* en particulier, se montrent plus sensibles à ces composés. L'activité antibactérienne est, du reste, étroitement associée à la présence du groupement disulfure (BREWER et al., 1966).

a) Propriétés antibactériennes :

Nous avons cherché à déterminer d'abord la sensibilité à la sirodesmine PL de 5 souches bactériennes, dont 3 Gram-positives : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus fecalis* et 2 Gram-négatives : *Escherichia coli* et *Salmonella typhi-murium*.

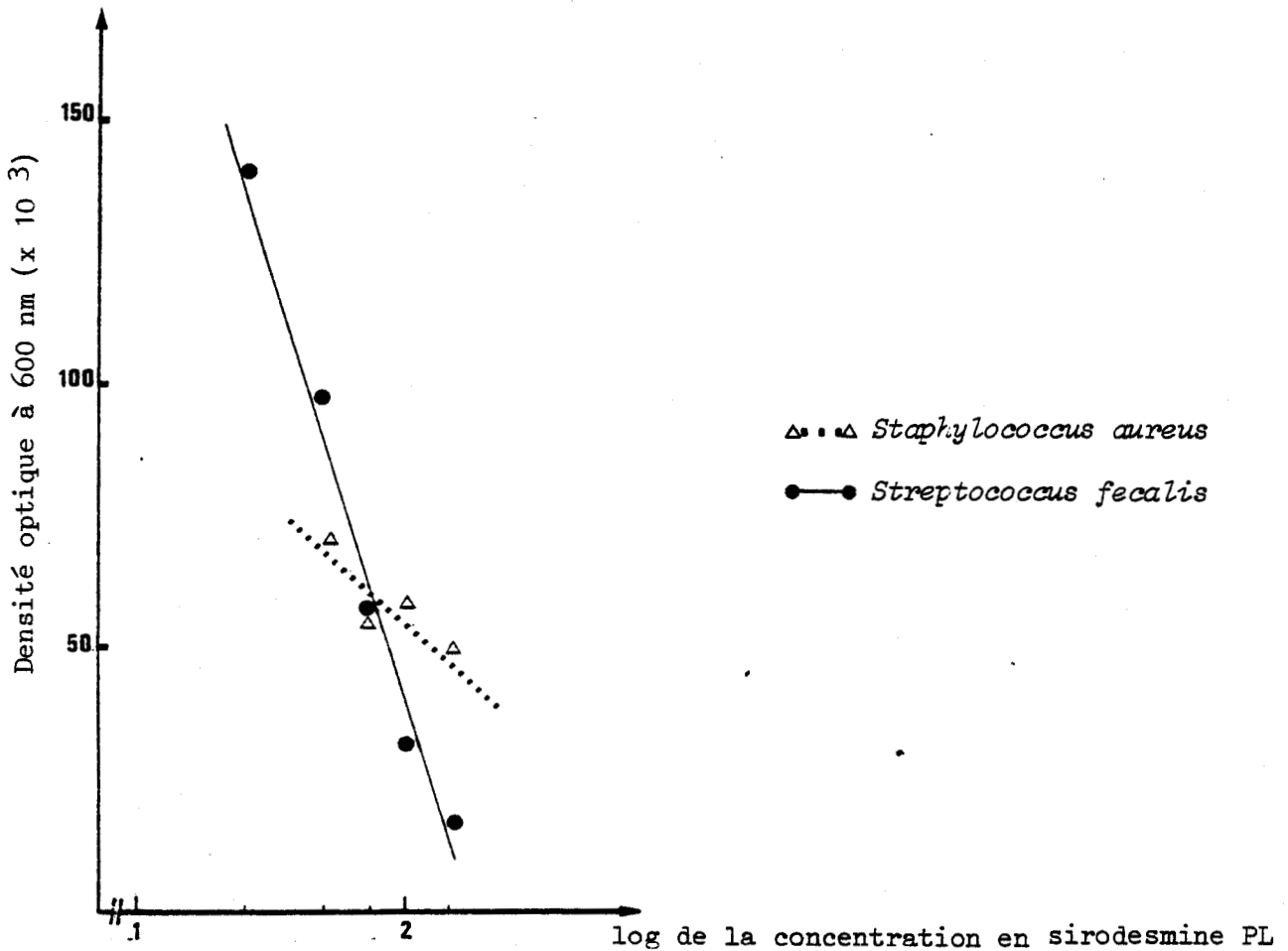
L'influence de la toxine sur la multiplication bactérienne a été testée de la façon suivante : 100 µl de solution méthanolique de sirodesmine PL renfermant 150, 100, 75, 50, 25, 10 et 5 µg de produit par millilitre sont introduits dans des tubes de 16 x 160 mm contenant 5 ml de milieu de *Luria* stérile. Dans les tubes témoin, le méthanol seul est ajouté ; à cette concentration, il n'exerce aucun effet sur les cultures. Les milieux sont ensuite ensemencés avec 0,2 ml d'une suspension bactérienne. Après 18 heures d'incubation à 37°C, la croissance bactérienne est mesurée au spectrophotomètre, à 600 nm, sauf pour *Bacillus subtilis*. Ce germe forme en effet dans les cultures témoin une colonie localisée juste sous la surface du milieu ; pour cette raison, nous nous sommes contenté d'observer uniquement le développement ou non de cette colonie pour les différentes concentrations de toxine.

Aucun effet inhibiteur de la sirodesmine PL à 150 µg/ml n'est observé pour les 2 souches Gram-négatives. En revanche, pour les 3 autres souches, le résultat est différent. *Bacillus subtilis* se montre particulièrement sensible car pour une concentration de 10 µg par millilitre, aucune colonie ne se développe dans la partie supérieure du milieu. Pour le staphylocoque et le streptocoque, l'inhibition est moins marquée et dans les deux cas, la représentation graphique de la densité optique de la culture en fonction du logarithme de la concentration en sirodesmine PL fournit une droite (graphique 9).

b) propriétés antifongiques :

Par la méthode des antibiogrammes, nous avons recherché s'il existait, parmi 9 espèces fongiques cultivées au laboratoire, une souche particulièrement sensible à la sirodesmine PL. Parmi ces 9 espèces, figurent divers Champignons phytopathogènes ou saprophytes : *Phoma linguam*, *Botrytis cinerea*, *Trichotecium roseum*, *Phoma betae*, *Phoma exigua* var. *foveata*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium expansum* et *Aspergillus nidulans*. Toutes ces souches ont été cultivées en tubes 25 x 200 sur le milieu d'eau de pomme de terre enrichi, sous un éclairage de 12 heures de lumière blanche par jour, à 18°C pour *Phoma linguam*, *Phoma betae*, *Phoma exigua* var. *foveata* et à 22°C pour les autres.

Graphique 9 : Influence de la sirodesmine PL sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus fecalis*.



Des pastilles de papier Whatman de 13 mm de diamètre placées dans des béchers stérilisés, sont imbibées soit par 100 µl d'une solution méthanolique de toxine pure de concentration variable, soit par 100 µl de méthanol pour le témoin. Le solvant est éliminé en plaçant les béchers dans un dessiccateur et en y faisant le vide pendant 15 minutes. L'air est ensuite réintroduit très progressivement. Les pastilles sont déposées dans des boîtes de Pétri sur un milieu gélosé d'eau de pomme de terre enrichi sur lequel 0,1 ml d'une suspension de spores des différents Champignons ont été préalablement étalés. Les boîtes sont mises en incubation à 22°C, à l'obscurité, pendant 72 heures.

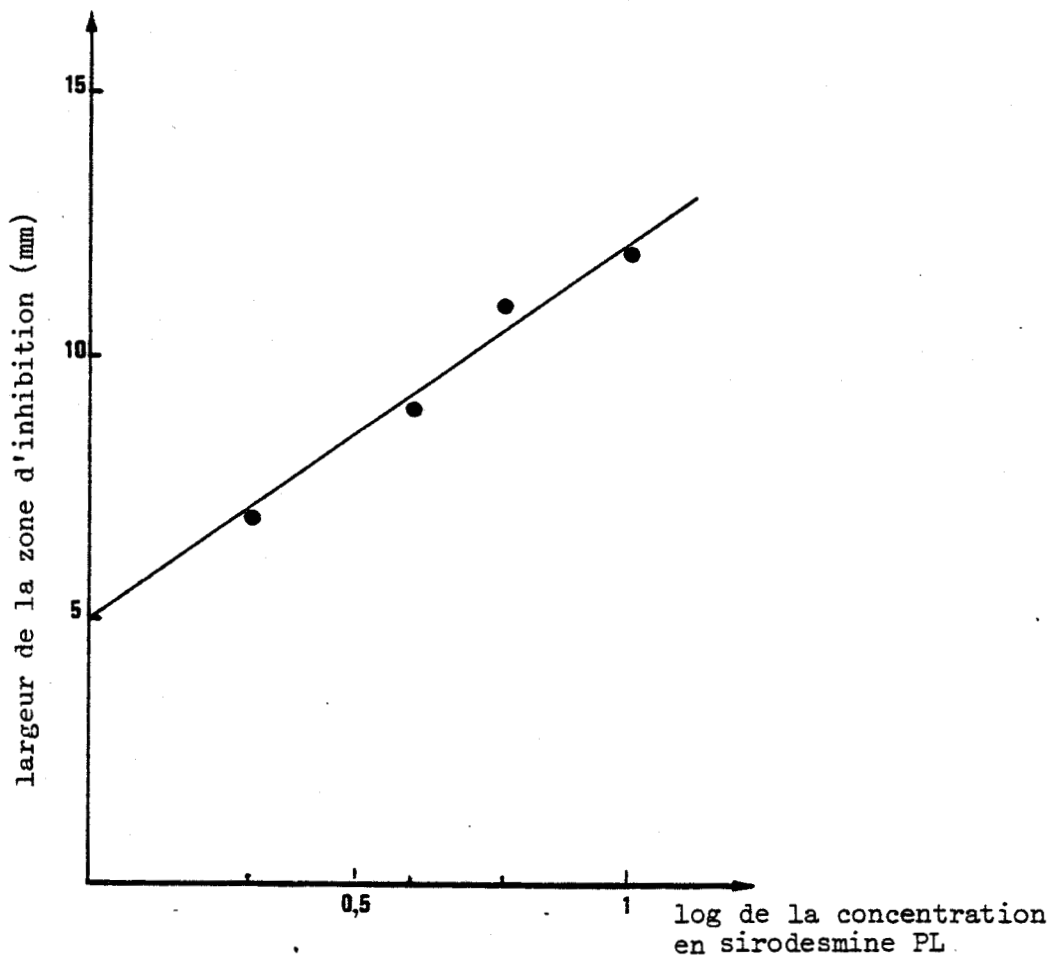
La sirodesmine PL pure exerce sur toutes les souches testées, à l'exception de *Phoma linguam*, une toxicité dont les effets se manifestent différemment selon les espèces et dont l'amplitude est fonction de la concentration employée. L'effet toxique se traduit par une zone d'inhibition de la croissance du mycélium, apparaissant plus claire par transparence. Le tableau 8 regroupe les valeurs de la largeur des zones d'inhibition exprimées en mm, pour chaque espèce, en fonction des concentrations en sirodesmine PL, données en milligrammes par millilitre.

Tableau 8 : Mesure de l'activité antifongique de la sirodesmine PL par la méthode des antibiogrammes.

Souches	Concentrations en toxine (mg/ml)							
	0	0,1	0,5	1	2	4	6	10
<i>Aspergillus nidulans</i>	0	0	0	0	0	0	2	4
<i>Aspergillus oryzae</i> (souche 1135)	0	0	0	0	0	2	3	5
<i>Botrytis cinerea</i>	0	0	0	0	0	0	2	6
<i>Penicillium expansum</i>	0	0	0	5	7	9	11	12
<i>Phoma betae</i>	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>Phoma exigua</i> var. <i>foveata</i>	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Phoma linguam</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trichotecium roseum</i>	0	0	0	0	0	0	3	5

Une seule espèce, *Penicillium expansum*, se révèle nettement plus sensible à la sirodesmine PL que les autres. Comme précédemment pour le staphylocoque et le streptocoque, l'inhibition est une fonction linéaire du logarithme de la concentration en toxine (graphique 10). Malgré tout, le seuil de toxicité reste relativement élevé puisque pour des concentrations inférieures à 1 mg/ml, la sirodesmine PL n'exerce plus aucun effet toxique, les filaments mycéliens se développant même abondamment, sur les pastilles de papier.

Graphique 10 : Influence de la sirodesmine PL sur la croissance mycélienne de *Penicillium expansum*.



La toxicité est donc moins élevée que pour les bactéries, il faut peut être en trouver l'explication dans le choix même de la méthode utilisée. Le fait que la sirodesmine PL soit insoluble dans l'eau doit restreindre fortement sa diffusion dans un milieu aqueux gélosé, surtout lorsque les concentrations de produit sont faibles ; pourtant, dans ce cas, le mycélium colonise rapidement la pastille de papier ; par conséquent, on ne peut rendre uniquement responsable la diffusion insuffisante de la toxine.

Après avoir décrit les étapes successives ayant mené à l'identification de la sirodesmine PL et mis en évidence ses propriétés antibiotiques, nous allons maintenant chercher à savoir si cette molécule a une incidence sur les mécanismes d'agression du Champignon envers les Crucifères.

### III. ROLE DE LA SIRODESMINE PL DANS LA MALADIE

Le fait de caractériser, *in vitro*, la production de métabolites phytotoxiques par un agent phytopathogène, n'implique pas, à priori, que de telles substances jouent un rôle déterminant dans les mécanismes d'action du parasite au sein de la plante-hôte. En effet, les conditions rencontrées par l'agent pathogène, *in vivo*, peuvent être suffisamment différentes pour que certaines molécules ne soient pas synthétisées ou soient rapidement dégradées (SANWAL, 1956 ; GAÜMANN, 1957). La responsabilité d'une toxine dans la manifestation d'une maladie donnée ne peut être établie qu'en fonction d'un certain nombre de critères (RUDOLPH, 1976). Parmi les principaux figurent :

- la caractérisation de la toxine dans les plantes parasitées uniquement, ceci constitue la condition *sine qua non* (DIMOND et WAGGONER, 1953) ;
- la mesure de l'activité biologique de la toxine, afin de comparer les effets produits chez la plante aux symptômes induits par le parasite ;
- la relation entre l'agressivité de différentes souches du parasite et leur aptitude à produire, *in vitro*, la toxine ;
- la sensibilité à la toxine de cultivars de l'hôte manifestant un comportement très différent à la maladie.

Notre démonstration, dans le cas de la sirodesmine PL, a consisté à aborder l'examen de ces différents critères.

#### 1) CARACTERISATION, *IN VIVO*, DE LA SIRODESMINE PL

A partir d'extraits d'hypocotyles nécrosés, nous avons cherché à mettre en évidence la biosynthèse de sirodesmine PL, *in vivo*, au moyen de deux méthodes : l'une indirecte consistant à tester l'activité biologique de l'extrait, l'autre directe par analyse chromatographique sur couche mince de gel de silice et en phase liquide haute pression.

##### a) méthode d'extraction :

En raison de la très faible polarité de la molécule, nous avons choisi d'effectuer l'extraction du matériel végétal en l'absence d'eau. Les hypocotyles nécrosés ont donc été au préalable lyophilisés. Deux grammes

d'hypocotyles nécrosés sont broyés dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette poudre est mise ensuite en suspension dans un mélange chloroforme-méthanol (9/1, v/v). L'extraction se déroule à température ambiante pendant 30 minutes, sous agitation magnétique. Le mélange est ensuite filtré sur papier filtre, le papier étant rincé par 20 ml du solvant. L'extrait est évaporé à sec, sous vide, et le résidu lavé à l'éther de pétrole 40°-65°C, afin d'éliminer les pigments chlorophylliens. Après élimination de la solution étherée, le résidu est repris par un volume minimum de chloroforme, évaporé à sec et à nouveau lavé à l'éther de pétrole. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une solution étherée incolore. Le résidu est alors repris par 1 ml de chloroforme, introduit dans un tube à hémolyse et évaporé à sec sous un courant d'azote.

b) activité biologique de l'extrait :

Le résidu sec est repris par 50 µl de méthanol et 0,4 µl sont injectés dans des hypocotyles de Chou. Dix plantes sont ainsi éprouvées. Un premier lot témoin ne reçoit que du méthanol ; dans un second, un extrait d'hypocotyles sains obtenu de la façon décrite ci-dessus, est testé. Après 48 heures, on observe une dépression de la région de l'hypocotyle éprouvée par l'extrait de tissus nécrosés. Comme le montre la photo 3, l'effet toxique est légèrement plus faible que celui obtenu consécutivement à l'injection de 1 µg de sirodesmine PL pure. Dans les deux lots témoin, aucun effet phytotoxique n'est observé.

c) analyse chromatographique de l'extrait :

. *chromatographie sur couche mince de gel de silice* : 5 µl d'extrait d'hypocotyles nécrosés et sains ainsi que 5 µg de sirodesmine PL sont chromatographiés sur gel de silice Schleicler-Schüll F1500 LS 254, imprégné d'indicateur de fluorescence, dans l'acétate d'éthyle. La toxine est révélée soit :

- par examen à la lumière ultra-violette, à 254 nm ; la sirodesmine PL apparaît sous forme d'une tache sombre contrastant avec le fond fluorescent du chromatogramme ;

- par pulvérisation d'une solution aqueuse à 1 % de nitrate d'argent ; quelques secondes après, la sirodesmine PL se révèle par une tache de couleur brune ;



- par pulvérisation d'un mélange constitué de 0,2 g d'iode, 2,5 g d'iodure de potassium et 0,2 g d'azide de sodium pour 100 ml d'eau distillée. Certains composés de la famille des épidthiodioxopipérazines possèdent la propriété de catalyser la décomposition de l'azide de sodium en présence du mélange iodo-ioduré (BREWER et TAYLOR, 1967). Dans le cas présent, la réaction qui est très sensible, mais malheureusement très fugace, se traduit par une coloration d'un bleu très pâle.

L'examen du chromatogramme des extraits d'hypocotyles révèle l'existence d'un composé présent dans les tissus nécrosés uniquement, en faible quantité, migrant de façon identique à celle du témoin sirodesmine PL. La caractérisation de ce composé est plus aisée à 254 nm qu'après pulvérisation de nitrate d'argent. En effet, dans le premier cas, 3 autres composés seulement sont détectés. La révélation au nitrate d'argent, bien qu'étant plus spécifique que celle à l'acide sulfurique dilué, met en évidence de nombreux composés et manque de sensibilité pour de faibles quantités de toxine. Par contre, seule la troisième méthode fournit une révélation très spécifique et très sensible.

On note également la présence dans l'extrait d'hypocotyles nécrosés d'un composé plus polaire migrant avec un Rf inférieur à 0,1 ; en effet, une importante tache brune ou blanche selon le révélateur employé, est caractérisée dans la région voisine de la zone du dépôt ; l'origine de ce composé sera discutée ultérieurement.

L'extrait de tissus nécrosés a été ensuite chromatographié avec un témoin sirodesmine PL dans 2 autres solvants : les mélanges acétate d'éthyle-chloroforme (1/1, v/v) et chloroforme-méthanol (98/2, v/v). Les valeurs du Rf du composé supposé être la sirodesmine PL ainsi que celles du témoin toxine pure sont regroupées dans le tableau 9 .

*Tableau 9 : Comparaison, dans 3 solvants différents, entre la valeur du Rf de la sirodesmine PL et celle de la substance révélée à 254 nm, au nitrate d'argent et au réactif iodo-ioduré/azide de sodium, à partir d'un extrait d'hypocotyles nécrosés.*

Solvants	Extrait d'hypocotyles nécrosés de Chou	Sirodesmine PL
acétate d'éthyle/chloroforme	0,38	0,39
chloroforme/méthanol	0,42	0,42
acétate d'éthyle	0,74	0,74

La toxicité de l'extrait d'hypocotyles nécrosés ainsi que la caractérisation en chromatographie sur couche mince d'une substance réductrice migrant de façon analogue à la sirodesmine PL sont deux arguments qui permettent de supposer, qu'effectivement, la sirodesmine PL est biosynthétisée, *in vivo*. Toutefois, nous avons tenté d'apporter d'autres preuves au moyen d'autres techniques chromatographiques plus fines et nous avons recherché tout particulièrement une méthode pouvant également quantifier la production de la toxine. La chromatographie en phase gazeuse n'est pas applicable à la sirodesmine PL ; en effet, et en raison de la labilité de la molécule due en grande partie à la présence des 2 atomes de soufre, 5 pics sont recueillis à l'enregistrement. Ceci nous a amené à utiliser la chromatographie en phase liquide haute pression.

. *chromatographie en phase liquide haute pression*<sup>ii</sup>: la sirodesmine PL est chromatographiée sur une colonne de gel de silice pédiculaire de type Corasil (Waters) ; les différents paramètres fixés sont les suivants :

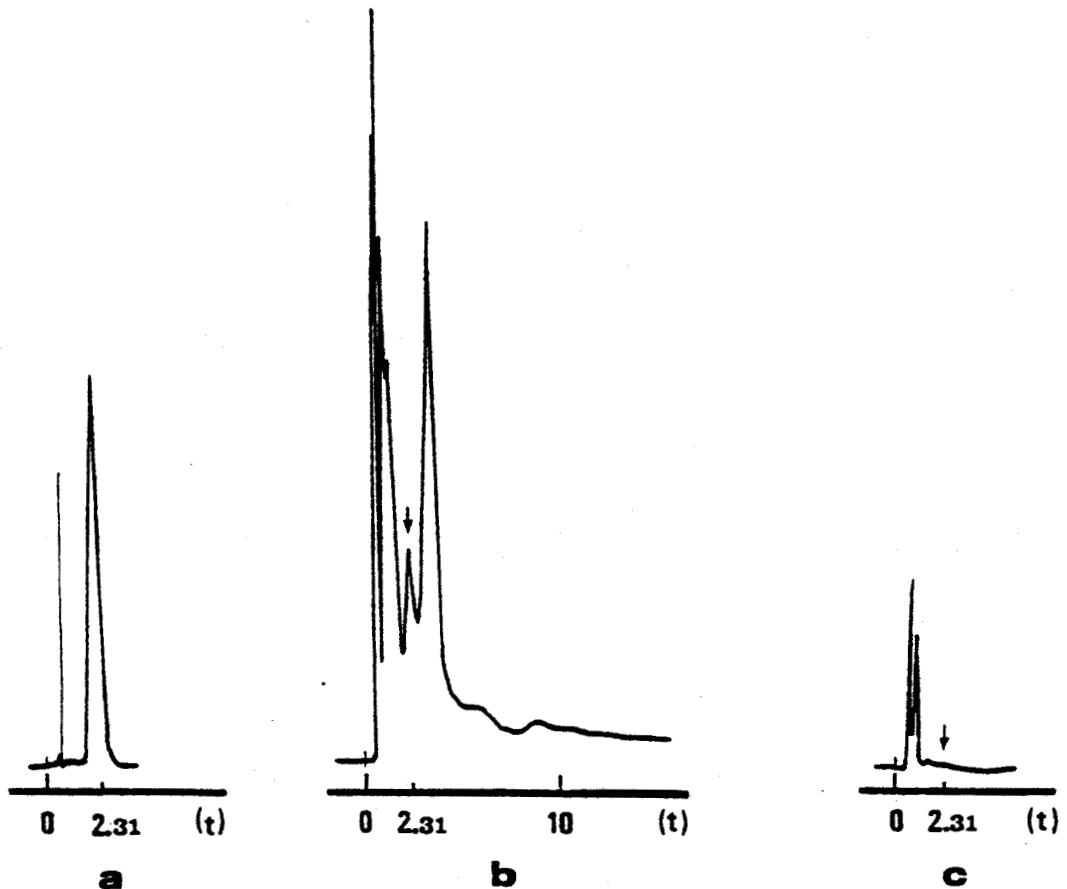
- vitesse de débit : 2 ml/minute
- vitesse d'enregistrement : 15 cm/heure
- sensibilité : 0,01
- détecteur en ultra-violet, à 254 nm.

Dix micro-litres d'une solution chloroformique de sirodesmine PL renfermant 20 µg de produit sont injectés et élués par un mélange chloroforme/hexane (9/1, v/v). Un pic unique est enregistré au bout de 2 mn 31 sec ; 20 µl de solution chloroformique d'extrait correspondant à 180 mg de poids sec d'hypocotyles sains et nécrosés sont injectés séparément et élués par le même mélange solvant. Les éluotogrammes obtenus sont représentés dans le graphique 11 .

Pour l'extrait d'hypocotyles sains, deux pics sont obtenus avec un temps d'éluion respectif de 35 secondes et 59 secondes. Par contre, l'extrait d'hypocotyles nécrosés renferme de nombreux composés absorbant dans l'ultra-violet, ceci se traduisant par plusieurs pics enregistrés pendant la première minute d'éluion, mais surtout par la caractérisation d'un composé élué 2 minutes 31 secondes après l'injection. Cette technique permet donc de confirmer la présence de sirodesmine PL dans les tissus nécrosés par le Champignon et d'évaluer les quantités recueillies. Par rapport à une gamme étalon de sirodesmine PL établie dans les conditions de l'expérimentation, on peut estimer à environ

<sup>ii</sup>Réalisée au laboratoire de Physiopathologie de Monsieur C. MARTIN.

Graphique 11 : Chromatographie en phase liquide haute pression sur gel de silice de :



- a : 30  $\mu\text{g}$  de sirodesmine PL  
 b : extrait d'hypocotyles nécrosés  
 c : extrait d'hypocotyles sains  
 (t) : temps d'élution en minute.

92  $\mu\text{g}$  la quantité de sirodesmine PL extraite à partir de 1 g de poids sec de tissu nécrosé, soit entre 1,2  $\mu\text{g}$  et 1,9  $\mu\text{g}$  par hypocotyle.



## 2) ACTIVITE BIOLOGIQUE DE LA SIRODESMINE PL

Le symptôme le plus important consécutif à l'attaque du *Phoma lingam* étant la nécrose des hypocotyles, nous avons choisi de comparer, à 20°C,

les effets de la sirodesmine PL à ceux du Champignon, en injectant la toxine dans des hypocotyles de plantules âgées de 3 semaines. En effet, dans le cas de plantules contaminées par les cotylédons, les nécroses commencent à se former en général après 20 jours d'incubation. La sirodesmine PL est injectée sous forme de solution méthanolique à l'aide d'une micro-seringue "Hamilton" pour chromatographie en phase gazeuse, à raison de 0,4 µl par hypocotyle ; des hypocotyles de plantes témoin ne reçoivent que du méthanol. Différentes concentrations de toxine, allant de 10 µg à 0,1 µg, ont été injectées. Le procédé par injection est pratiqué assez couramment et a déjà été réalisé sur racines (BASSETT et al., 1969), sur tiges (KERN et NAEF-ROTH, 1971) et également sur feuilles (NACHMIAS et al., 1977).

a) sensibilité de l'hypocotyle :

L'injection de 10 µg de toxine provoque au bout de 48 heures un important amincissement de l'hypocotyle de part et d'autre du point d'injection, sur 1 cm environ ; en outre, la région amincie est dépourvue d'anthocyanes. Pour de plus faibles concentrations allant de 5 µg à 1 µg, la réaction se traduit par une dépression plus ou moins profonde des tissus situés à la périphérie du point d'injection, accompagnée d'une perturbation du métabolisme anthocyanique semblable à celle observée précédemment. Pour des concentrations comprises entre 0,6 µg et 1 µg, on peut remarquer un très léger effet mais pas chez toutes les plantes éprouvées, contrairement à ce que l'on obtient pour des doses supérieures ou égales à 1 µg. Des concentrations inférieures à 0,6 µg ne provoquent aucune perturbation physiologique apparente, tout comme le méthanol dans le lot témoin. La photo 4 montre les effets de 10 µg et de 1 µg de sirodesmine PL ainsi que ceux du méthanol sur des hypocotyles de Chou.

Dans les conditions de l'expérimentation, la dose minimale de sirodesmine PL pouvant engendrer chez toutes les plantes des perturbations physiologiques, a été fixée à 1 µg.

b) sensibilité du cotylédon :

Généralement, dix jours après la pulvérisation d'une suspension de conidies sur les cotylédons de plantules âgées de 8 jours, toutes les plantes présentent des macules cotylédonaires nettement formées. Les cotylédons

de plantules de 18 jours ont été sectionnés à la base du pétiole, au niveau du noeud cotylédonaire et l'extrémité du pétiole est mise à tremper, à 20°C, dans un tube à hémolyse renfermant 5 ml de solution active comprenant 100 µl de solution méthanolique de toxine ou de méthanol seul. Les concentrations suivantes de toxine ont été testées : 10-5-2-1-0,5 et 0,1 µg par millilitre. Pour 10 µg/ml et 5 µg/ml de toxine, les effets ne se manifestent qu'après 96 heures de trempage : les pétioles s'amincissent et les cotylédons se dessèchent progressivement ; ceci s'accompagne en outre, d'une disparition de la chlorophylle ce qui a pour effet de donner aux cotylédons une coloration rougeâtre. Pour de plus faibles concentrations, 2-1-0,5 et 0,1 µg/ml, on n'observe aucun trouble physiologique de cette nature. Toutefois, au bout d'une semaine, des racines se différencient à la base du pétiole puis se développent nettement dans le milieu. Le même phénomène se produit pour les cotylédons témoin.

### 3) SPECIFICITE D'ACTION DE LA SIRODESMINE PL

A l'exception des "pathotoxines" qui manifestent une spécificité d'action très étroite vis-à-vis de la plante hôte, les autres phytotoxines sont capables de provoquer des symptômes chez des plantes appartenant à des familles très diverses.

Pour déterminer la spécificité d'action de la sirodesmine PL, nous avons eu recours au test de trempage appliqué à des plantules de Tomate ayant été cultivées à 24°C. Cette espèce végétale a été choisie en raison de sa sensibilité à un grand nombre de toxines.

Des plantules au stade 2 feuilles ont été sectionnées au niveau du collet et mises à tremper, à 20°C, dans des solutions actives renfermant 200, 100, 50 et 10 µg de toxine par millilitre. Dans tous les cas, la sirodesmine PL provoque un flétrissement des plantules d'autant plus rapide et d'autant plus sévère que la concentration en toxine est élevée. Dans le tableau 10 nous avons indiqué les temps nécessaires pour obtenir le flétrissement complet des plantules en fonction des concentrations de sirodesmine PL.

Tableau 10 : Relation entre le temps de flétrissement de plantules de Tomate et la concentration en sirodesmine PL.

Concentration en toxine ( $\mu\text{g/ml}$ )	200	100	50	10
temps de flétrissement (heure)	24	36	72	192

La Tomate est manifestement sensible à la sirodesmine PL, même pour de faibles concentrations ; mais, dans ce cas, la réponse est plus longue à obtenir.

#### 4) RELATION ENTRE L'AGRESSIVITE DU CHAMPIGNON ET LA PRODUCTION, *IN VITRO*, DE SIRODESMINE PL

Cette étude aboutit parfois à des résultats controversés, dus essentiellement aux souches employées. En effet, des modifications apportées dans la composition du milieu de culture peuvent entraîner des variations non corrélatives de la production de toxine chez des isolats d'origine et d'agressivité différentes (SANWAL, 1956 ; LUDWIG, 1957 ; EGLI, 1969 ; DE VAY et al., 1968 ; OTTA et ENGLISH, 1971). L'utilisation de mutants issus d'une seule souche et présentant une grande variabilité de leur agressivité permet de donner une interprétation valable à une telle étude (PATIL et al., 1974 ; RUDOLPH, 1976).

##### a) obtention des souches :

Six souches ont été retenues pour notre expérimentation :

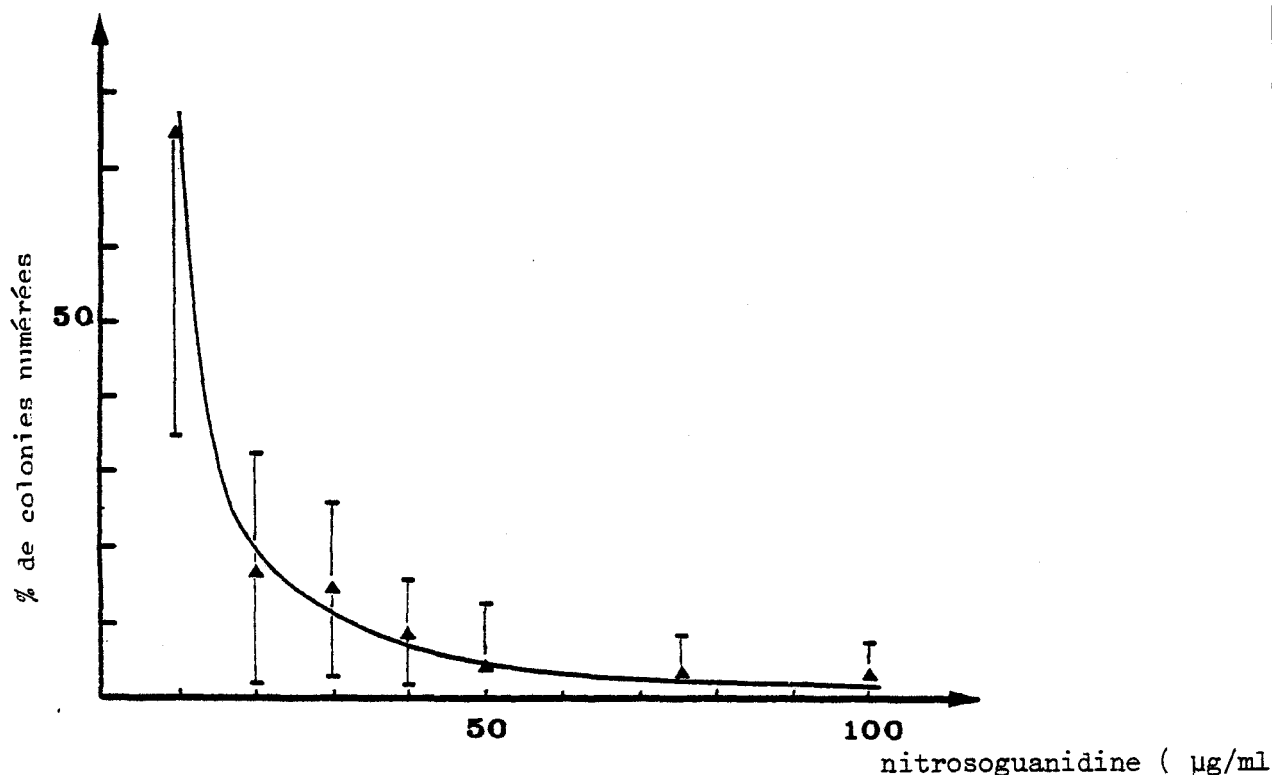
- l'isolat très agressif, hétérothallique, de signe (+) avec lequel nous avons réalisé notre étude épidémiologique ;
- l'isolat conidien hétérothallique de signe (-) ;
- une souche issue de l'isolat agressif ayant muté spontanément au laboratoire. En effet, cette souche présente des différences phénotypiques en culture pure avec la première, notamment à 18°C, sur milieu gélosé d'eau de Pomme de terre glucosé à 1 %. Alors que l'isolat agressif produit un mycélium ras et de très nombreuses pycnides de petite taille donnant un aspect noirâtre à la culture, le mutant se caractérise par un mycélium dressé, les pycnides sont beaucoup moins nombreuses, plus globuleuses et se répartissent très fréquemment en zones concentriques. Cette souche manifeste une agressivité très atténuée ;

- trois mutants obtenus par l'action d'un agent mutagène, la N-méthyl-N'nitro-N-Nitrosoguanidine sur l'isolat très agressif. Nous avons eu recours à la mutagenèse dans le but de sélectionner des souches produisant moins de toxine que la souche sauvage.

. *obtention des mutants* : à 1 ml d'une suspension de conidies de la souche très agressive renfermant  $10^3$  conidies, on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse d'agent mutagène de concentration variable. Le mélange est mis en incubation 1 heure à  $26^{\circ}\text{C}$ , à l'obscurité, sous agitation rotative, puis centrifugé. Le surnageant est éliminé et le culot de conidies lavé par 1 ml d'eau distillée stérile. La suspension est à nouveau centrifugée, le surnageant éliminé et le culot repris à 1 ml d'eau distillée ; 0,1 ml sont étalés en boîte de Pétri, sur le milieu d'eau de Pomme de terre glucosé enrichi en extrait de levure.

Les boîtes sont incubées à l'obscurité à  $22^{\circ}\text{C}$  pendant 72 heures et les colonies survivantes numérees. La courbe de survie des colonies obtenues en fonction de différentes concentrations en agent mutagène est représentée dans le graphique 12 . A l'issue de cette étude préliminaire, nous avons fixé à  $35 \mu\text{g/ml}$  la concentration en agent mutagène à utiliser pour la suite de notre expérimentation, ce qui correspond à un taux de survie d'environ 7 %.

*Graphique 12 : Evolution du taux de survie des conidies de *Phoma lingam* en fonction de différentes concentrations de nitrosoguanidine.*



. *choix du critère de sélection* : l'utilisation de la mutagenèse pose inévitablement le problème du recours à une méthode simple et rapide de sélection des mutants, en vue d'en récupérer le plus grand nombre possible. En ce qui concerne notre problème -l'obtention de souches produisant moins de toxine- la méthode la plus simple consiste à caractériser directement l'activité toxique des filtrats de culture des souches recherchées.

Les cultures des mutants sont réalisées à l'obscurité dans des conditions de milieu et de température identiques à celles définies pour l'obtention de la toxine.

La méthode utilisée pour la ségrégation des souches consiste à utiliser les propriétés phytotoxiques des filtrats de culture du Champignon, en ayant recours à un test de trempage de plantules de Tomates de 10 jours (stade cotylédonaire). Celles-ci se montrent en effet plus sensibles que des plantules de Chou du même âge. La température a été fixée à 18°C dans le seul but de limiter la pollution des filtrats pour une durée du test excédant 72 heures. Dans ces conditions, un filtrat de culture de 4 semaines de la souche agressive provoque une diminution de la turgescence des pétioles et des cotylédons de Tomate au bout de 6 heures de trempage ; 12 heures après, toutes les plantules sont flétries, les hypocotyles commençant à s'amincir. Nous avons donc sélectionné tous les mutants dont les filtrats de culture, après 96 heures de trempage, ne provoquaient ni le flétrissement des cotylédons, ni la plasmolyse des hypocotyles. Sur 476 souches testées, 5 ont présenté les caractéristiques requises et ont été désignées par le numéro d'ordre de leur isolement ; il s'agit des mutants 61-143-204-304 et 465.

Ces mutants sont maintenus en culture sur le milieu gélosé d'eau de pomme de terre, glucosé et enrichi en extrait de levure, à 18°C, sous un éclairage de 12 heures de lumière blanche par jour. L'aspect des mutants 143 et 304 se rapproche de celui de l'isolat agressif : un mycélium ras, de nombreuses petites pycnides donnant un aspect noirâtre à la culture. Le mutant 465 présente un aspect voisin de celui du mutant naturel moins agressif. Les mutants 61 et 204 se distinguent très nettement des trois autres. Le mutant 61 fournit un mycélium blanc se développant de façon exhubérante non seulement sur le milieu mais également sur les parties du tube n'étant pas en contact avec le milieu. Le mutant 204 fournit un mycélium blanc, d'aspect cotonneux ; malgré de nombreux essais de milieux naturels et synthétiques et de températures,



nous ne sommes jamais parvenu à faire sporuler ces deux mutants. Ne pouvant ainsi déterminer leur agressivité, ils n'ont pas été retenus pour notre expérimentation.

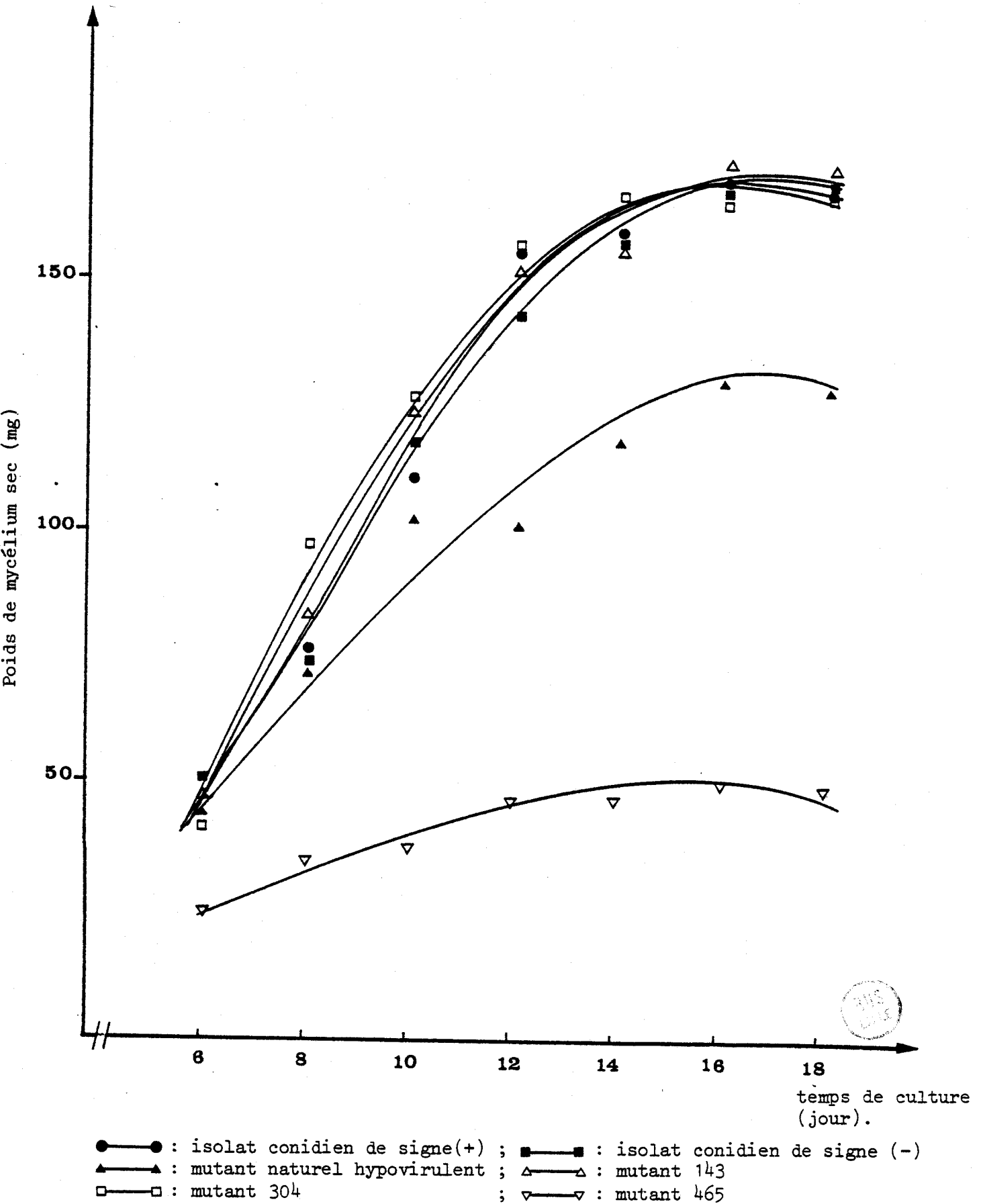
b) relation entre la croissance des différentes souches et la biosynthèse de sirodesmine PL, *in vitro* :

. *croissance des souches* : la croissance des souches retenues pour cette étude est mesurée par la méthode des poids secs. Les cultures sont réalisées en fioles de Roux dont le fond est recouvert de baguettes de verre, sur le milieu synthétique utilisé pour la production de toxine, à l'obscurité continue, à 22°C. Des fragments de mycélium prélevés à partir d'une culture sur milieu gélosé ont servi à l'ensemencement. Les mesures ont été effectuées à partir du 6ème jour de culture jusqu'au 18ème jour, l'optimum de croissance de l'isolat agressif se situant au 16ème jour. Les différentes courbes de croissance sont rassemblées dans le graphique 13. Ce graphique fait apparaître :

- une similitude de la croissance des deux isolats entre eux ainsi qu'avec celle des mutants 143 et 304 ;
- une croissance plus faible pour le mutant naturel spontané ;
- une très faible aptitude du mutant 465 à assimiler les éléments du milieu ; ceci se traduit par l'obtention, à l'optimum de croissance, de 3 fois moins de mycélium qu'avec la souche agressive.

. *dosage de la sirodesmine PL* : compte tenu de la similitude entre la croissance du Champignon et l'évolution de la biosynthèse de la sirodesmine PL, *in vitro*, sur milieu synthétique (FEREZOU et al., 1980), nous avons dosé les quantités de toxine contenues dans des filtrats de culture de 16 jours et comparé les valeurs obtenues avec le poids sec mycélien recueilli pour ce temps de culture. Pour chaque souche, le filtrat de culture de 5 fioles a été extrait au chloroforme, après avoir été filtré sur de la gaze. Après séchage à froid, le solvant est éliminé sous vide, à 30°C, et le résidu sec repris par 2 ml de méthanol ; 50 µl d'extrait ainsi que 5 µg de sirodesmine PL sont chromatographiés sur gel de silice dans l'acétate d'éthyle. La toxine est localisée en lumière ultra-violette et éluée, pour chaque extrait, par 10 ml de méthanol. Après centrifugation, les éluats sont dosés à 230 nm et les quantités de sirodesmine PL calculées par rapport à une courbe étalon du produit pur ; parallèlement, 50 µl d'extrait sont chromatographiés dans le même solvant et révélés au nitrate d'argent afin de comparer la production de toxine par les

Graphique 13 : Croissance comparée sur milieu synthétique des deux isolats conidiens et des mutants naturel et induits.



souches d'après l'intensité de la coloration des taches correspondant à la sirodesmine PL.

Les quantités de toxine produites ainsi que la croissance des différentes souches, exprimées respectivement en  $\mu\text{mole/litre}$  de milieu de culture et en mg de poids sec de mycélium, sont regroupées dans le tableau 11.

*Tableau 11 : Comparaison entre la production de sirodesmine PL et la croissance de différentes souches, au 16<sup>ème</sup> jour de culture sur milieu synthétique, à 22°C, à l'obscurité continue.*

	Souches					
	i.(+)	i.(-)	hypovirulent	143	304	465
Toxine ( $\mu\text{mole/l}$ )	69,95	111,11	167,69	62,75	13,37	8,23
Poids sec de mycélium sec (mg)	172	171	135	173	170	58

i.(+): isolat hétérothallique de signe (+), très agressif

i.(-): isolat hétérothallique de signe opposé, moins agressif ;

hypovirulent : mutant naturel d'agressivité atténuée

143,304,465 : mutants induits.

A partir des valeurs indiquées dans ce tableau, on ne peut dégager aucune corrélation entre la croissance des différentes souches et leur aptitude à biosynthétiser la sirodesmine PL. En effet, pour les isolats et les deux mutants 143, 304 qui ont une croissance équivalente, la biosynthèse de toxine est très variable. Il en est de même pour le mutant naturel d'agressivité atténuée, dont la production de toxine est beaucoup plus importante que celle des souches précédentes, mais dont la croissance est plus faible. On remarque, toutefois, pour le mutant 465, qu'à un faible poids mycélien correspond une très faible quantité de toxine.

c) relation entre la biosynthèse de sirodesmine PL, *in vitro*, et l'agressivité des souches :

Le pouvoir pathogène des souches est déterminé par le pourcentage de plantules de Chou rouge nécrosées obtenu, à 20°C, après contamination par pulvérisation d'une suspension de conidies sur les cotylédons de

plantules de 8 jours. Les conidies des différentes souches sont obtenues de la même manière que pour celles de l'isolat agressif. Les potentialités de biosynthèse de toxine des souches, exprimées comme précédemment en  $\mu$ mole de toxine produite par litre de milieu de culture, sont comparées au pouvoir pathogène dans le tableau 12. Nous avons également établi dans ce tableau le rapport entre la quantité de toxine (T) produite par l'isolat agressif de signe (+) et la quantité (T') produite par l'isolat de signe (-) et les mutants hypovirulent, 143, 304 et 465.

*Tableau 12 : Comparaison entre la biosynthèse, in vitro, de sirodesmine PL et le pouvoir pathogène exprimé en pourcentage de nécroses d'hypocotyles de Chou, des isolats de signe (+) et (-) et des mutants naturel (hypovirulent) et induits (143, 304, 465).*

	Souches					
	i.(+)	i.(-)	hypovirulente	143	304	465
Toxine ( $\mu$ mole /l)	69,95	111,11	167,69	62,75	13,37	8,23
T'/T	1	1,6	2,4	0,89	0,48	0,12
Pourcentage de nécroses	96	62,5	16	90	84,5	51

T' : quantité de toxine produite par l'isolat de signe (-) [i.(-)] et par les mutants hypovirulent, 143, 304 et 465.

T : quantité de toxine produite par l'isolat agressif de signe (+) [i.(+)]

Pour les mutants 143, 304 et 465, la diminution du pouvoir pathogène est associée à une moindre production de toxine, mais sans aucune proportionalité. Le mutant 465, malgré une très faible croissance sur milieu synthétique, est néanmoins capable de provoquer la mort de la moitié des plantes contaminées. Chez l'isolat de signe (-) et surtout chez le mutant naturel peu agressif, l'atténuation du pouvoir pathogène est associée à une plus grande aptitude à synthétiser la sirodesmine PL. Par conséquent, aucune corrélation ne se dégage entre l'agressivité des souches et leur capacité à produire la sirodesmine PL.

5) RELATION ENTRE LA SENSIBILITE VARIETALE DU COLZA ET LA SENSIBILITE A LA SIRODESMINE PL

Dix plantules de deux cultivars de Colza manifestant pour l'un, le cultivar "Expandier", une très grande sensibilité au Champignon et pour l'autre, le cultivar "R<sub>9</sub>", une grande tolérance, ont été éprouvées par injection de la toxine. Des solutions renfermant 10, 5, 2, 1 et 0,5 µg de sirodesmine PL pour 0,4 µl ont été injectées dans des plantules de 3 semaines cultivées à 14°C et laissées ensuite à cette température. Comme le montre la photo 5, les effets de la toxine sont rigoureusement analogues chez les deux cultivars ; 48 heures après l'injection de 10 µg, on observe un important amincissement des hypocotyles sur 1 cm de long environ. Au bout du même temps et avec des doses de 1, 2, 5 µg, les tissus de la région éprouvée se creusent de façon d'autant plus importante que la concentration en toxine est élevée. Les régions perturbées prennent une teinte grisâtre et se délimitent par un liséré brun (photo 6). Aucune diminution de la turgescence des parenchymes n'est visible avec 0,5 µg de toxine.

Comme on peut le remarquer, ces observations sont identiques à celles faites consécutivement à l'injection de sirodesmine PL, à 20°C, dans des hypocotyles de Chou. La vitesse d'action de la toxine est indépendante de la température à laquelle se déroule le test, puisqu'aussi bien à 20°C qu'à 14°C, 48 heures sont nécessaires pour la formation des symptômes. En outre, chez les deux cultivars de Colza, la sensibilité à la sirodesmine PL n'est pas corrélative de la sensibilité au Champignon, les mêmes quantités de toxine induisant les mêmes effets. Par conséquent, dans l'hypothèse où la sirodesmine PL serait impliquée dans les mécanismes d'attaque du *Phoma lingam*, on ne peut attribuer la différence de comportement à la maladie à une différence de sensibilité à la toxine.

Ceci implique également qu'il n'existe pas de gène de résistance à la sirodesmine PL chez des Colzas résistants au Champignon.

#### IV. DISCUSSION

Les substances du groupe des épidthiodioxopipérazines constituent une importante classe de métabolites fongiques parmi lesquels figurent la gliotoxine (BRUCE et al., 1944 ; WILKINSON et SPILSBURY, 1965), les sporidesmines A et B (RONALDSON et al., 1963), les aranotines (NEUSS et al., 1968 ; MILLER et al., 1968), les chaetocines (HAUSER et al., 1970 ; HAUSER et al., 1972), la chaetomine (SAFE et TAYLOR, 1972), les hyalodendrines (STRUNZ et al., 1973), les mélanicidines (ARGOUDELIS et REUSSER, 1971 ; ARGOUDELIS, 1972), les verticillines (MINATO et al., 1971) et l'épicorazine A (BAUTE et al., 1976).

A ce groupe, nous pouvons rattacher la toxine produite par *Phoma linguam*, dont la structure est apparentée à une sirodesmine (CURTIS et al., 1977) et plus particulièrement à la sirodesmine G. Il nous faut signaler qu'en plus de la sirodesmine PL, BOUSQUET a isolé des filtrats de culture d'une souche de *Phoma linguam*, mais au cours d'une seule série d'expériences, la forme triol correspondant à la désacétyl sirodesmine PL (BOUSQUET et al., 1977).

Outre leurs propriétés antibiotiques, certains de ces métabolites soufrés se caractérisent par une forte activité toxique pour les cultures de tissus animaux (DONE et al., 1961 ; RONALDSON et al., 1963 ; TROWN, 1968 ; BREWER et al., 1972) et inhibent la synthèse virale, en particulier celle des virus à RNA (MILLER et al., 1968 ; CURTIS et al., 1977). La sirodesmine PL présente également un large spectre d'activité toxique sur les Champignons et les bactéries, les animaux (BOUSQUET et al., 1977) et au même titre que la sporidesmine (WRIGHT, 1968), provoque d'importantes perturbations chez les végétaux (BOUSQUET et al., 1977 ; BOUDART, 1978).

La sirodesmine PL joue-t-elle un rôle déterminant dans la colonisation par *Phoma linguam* des tissus de l'hôte très sensible qu'est le Chou ?.

Les Crucifères sont connues pour être riches en métabolites soufrés particuliers, les glucosinolates (dont les principaux sont la gluconapine, la progoitrine, la glucobrassicinapine et la sinigrine) et également en acides aminés soufrés, leurs précurseurs. La présence de deux atomes

de soufre dans la molécule de sirodesmine PL et la richesse en soufre des Crucifères constituent un argument favorable à l'attribution à la toxine d'un rôle important dans l'évolution de la maladie, puisque le Champignon trouve tous les éléments de base nécessaires à la synthèse de cette molécule. De plus, la biosynthèse des composés soufrés est particulièrement active chez les plantes jeunes (JOSEFSSON, 1967). Le rôle des facteurs trophiques présents dans la plante-hôte est important car, pour certains agents phytopathogènes, la biosynthèse de phytotoxine n'a pu être caractérisée que dans les plantes contaminées. C'est le cas non seulement pour des parasites obligatoires tels qu'*Erysiphe graminis* (MILLERD et SCOTT, 1955) et *Puccinia graminis* (SILVERMAN, 1960) mais aussi pour des parasites facultatifs tel qu'*Erwinia amylovora* (GOODMAN et al., 1974).

La biosynthèse de sirodesmine PL, *in vivo*, est effective. Nous avons pu caractériser dans des tissus nécrosés, c'est-à-dire au stade ultime de la maladie, la présence d'un composé possédant en couche mince sur gel de silice les mêmes caractéristiques que la sirodesmine PL. Nous avons également constaté la présence d'une substance réductrice, plus polaire que la sirodesmine PL. Les trop faibles quantités de ce produit n'ont permis ni d'en déterminer la structure ni d'en connaître les propriétés biologiques. De ce fait, son origine demeure hypothétique ; il pourrait s'agir du précurseur de la toxine, en l'occurrence la phomamide (FEREZOU et al., 1980), qui possède des caractéristiques chromatographiques voisines ; mais nous pensons qu'il s'agit plutôt d'un produit de dégradation, comme cela a déjà été observé pour la gliotoxine B (BREWER et TAYLOR, 1967). En effet, lors d'expériences destinées à connaître les effets de la toxine sur des cultures de tissus animaux, on a pu mettre en évidence la formation de composés réducteurs plus polaires (FEREZOU, communication verbale). Les mécanismes de dégradation de la sirodesmine PL sont, à ce jour, totalement inconnus.

La chromatographie en phase liquide haute pression nous a permis de confirmer la biosynthèse, *in vivo*, de toxine. Cette technique fine a également été appliquée à la détection des toxines de *Rhizoctonia solani* dans les plantes contaminées par le Champignon (BHUSHAN et al., 1980). Elle présente, en outre, l'avantage de pouvoir quantifier cette synthèse. En faisant abstraction de la substance réductrice polaire dont l'activité biologique n'a pu

être déterminée, nous avons calculé que la quantité de toxine produite est comprise entre 1,2 µg et 1,9 µg par hypocotyle. Compte tenu de la sensibilité des hypocotyles à la sirodesmine PL, il est très vraisemblable que la toxine contribue aux mécanismes de dégradation tissulaire engendrés par le Champignon. Toutefois, il est fort improbable qu'elle en soit à l'origine. En effet, lorsqu'elle est injectée dans la plante, cette molécule ne reproduit pas le symptôme typique de la nécrose ; son action localisée se limite uniquement à provoquer un déséquilibre osmotique des tissus éprouvés, accompagné d'une perturbation du métabolisme anthocyanique chez le Chou rouge. Sur la photo 7 nous avons comparé les effets de la toxine à ceux du Champignon.

Trois autres arguments nous laissent penser que le rôle joué par la sirodesmine PL est effectivement secondaire ; ce sont :

- la non-spécificité d'action de ce produit envers les Crucifères. Toutefois, il faut remarquer que très peu de toxines présentent une grande spécificité d'hôte ;
- l'absence de corrélation entre les potentialités de biosynthèse de toxine et l'agressivité du Champignon. Pour l'acide alternarique, un résultat semblable a été obtenu (BRIAN et al., 1952), tandis que pour d'autres toxines, une relation étroite existe effectivement (HUSAIN et KELMAN, 1958 ; WARD et al., 1961 ; HOITINK et al., 1966 ; JOHNSON, 1969 ; SCHLOSSER, 1971 ; KERN, 1972 ; DORN, 1974 ; PATIL et al., 1974) ;
- l'absence de relation entre la sensibilité variétale des Colzas et la sensibilité à la toxine. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où une corrélation très étroite entre la sensibilité à un Champignon et à une toxine est la principale caractéristique des toxines spécifiques d'hôte. Cependant, une telle corrélation a été décrite pour des toxines non spécifiques, en particulier celles de *Verticillium albo-atrum* (KEEN et al., 1972), et de *Fusarium monliforme* (SCOTT et FUTRELL, 1970).

## V. CONCLUSION

L'agent de la nécrose des hypocotyles de Crucifères, *Leptosphaeria maculans* forme imparfaite *Phoma linguam*, synthétise, *in vitro* et *in vivo*, une substance douée d'activités antibiotique, antivirale et phytotoxique, la sirodesmine PL. L'ensemble des résultats acquis contribue à caractériser la



sirodesmine PL comme une vivotoxine selon les critères définis par DIMOND et WAGGONER et également comme une mycotoxine. En effet cette toxine, non spécifique des Crucifères, est produite uniquement dans les plantes contaminées, et a pu être caractérisée par différentes méthodes chromatographiques. Introduite à l'état pur dans la plante, elle reproduit partiellement les symptômes de la maladie. Les quantités produites, *in vitro*, par différentes souches n'étant pas corrélatives de leur agressivité, on ne peut attribuer à la sirodesmine PL qu'un rôle secondaire dans les mécanismes d'attaque du Champignon. Ceci est d'autant plus vrai que des Colzas résistants à la maladie ne renferment pas de gène de résistance à cette toxine.

Tout ceci nous conduit à rechercher l'existence d'une autre forme d'action du Champignon, plus en rapport avec les événements qui se déroulent dans les premiers temps de l'attaque parasitaire.

*Photo 3 :*

Mise en évidence des propriétés phytotoxiques d'un extrait organique d'hypocotyles nécrosés (2 et 3) ; (1) hypocotyle témoin.

*Photo 4 :*

Effet de l'injection de méthanol (1), de 1 µg (2) et 10 µg (3) de sirodesmine PL pure dans des hypocotyles de Chou rouge, à 20°C.

*Photo 5 :*

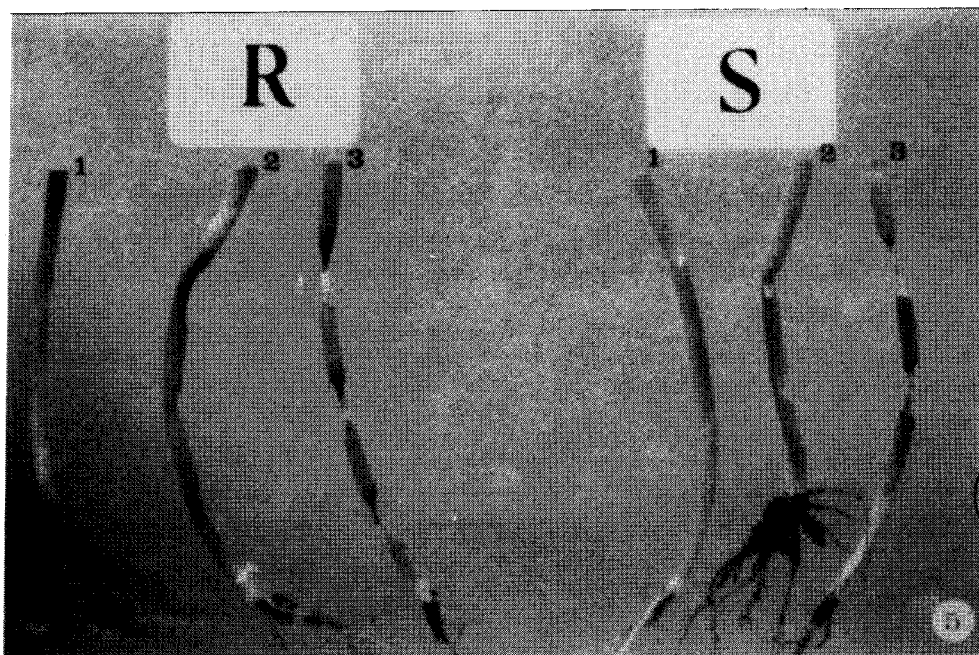
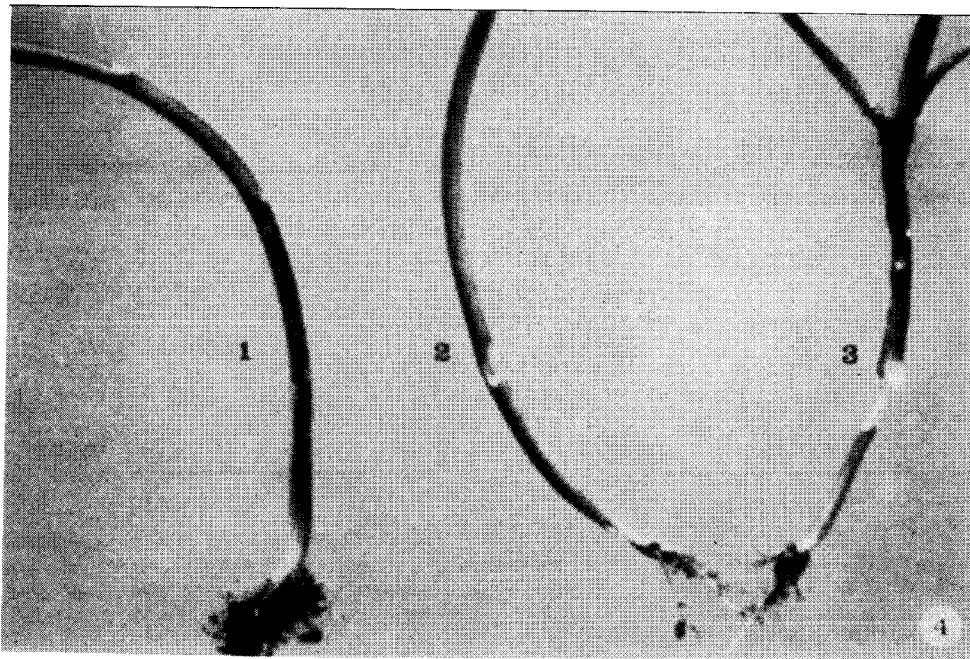
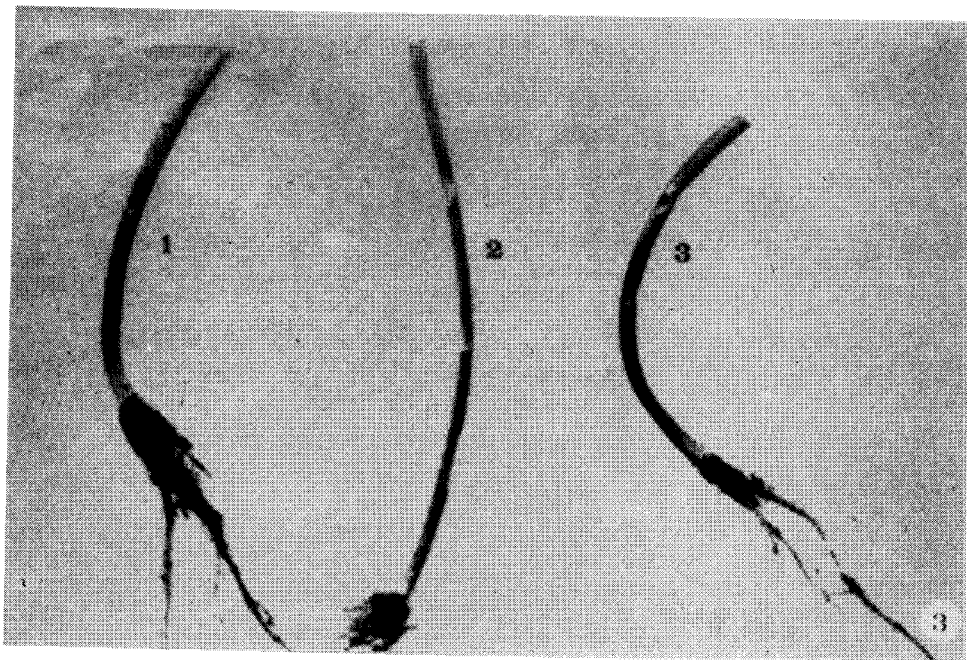
Comparaison, à 14°C, entre la sensibilité à la sirodesmine PL d'hypocotyles des cultivars "R<sub>9</sub>", très résistant à la maladie (R) et "Expander", très sensible (S).

R<sub>1</sub>-S<sub>1</sub> : hypocotyles témoin

R<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> : effet de l'injection de 1 µg de toxine

R<sub>3</sub>-S<sub>3</sub> : effet de l'injection de 10 µg de toxine

Les injections ont été pratiquées dans plusieurs régions des hypocotyles.

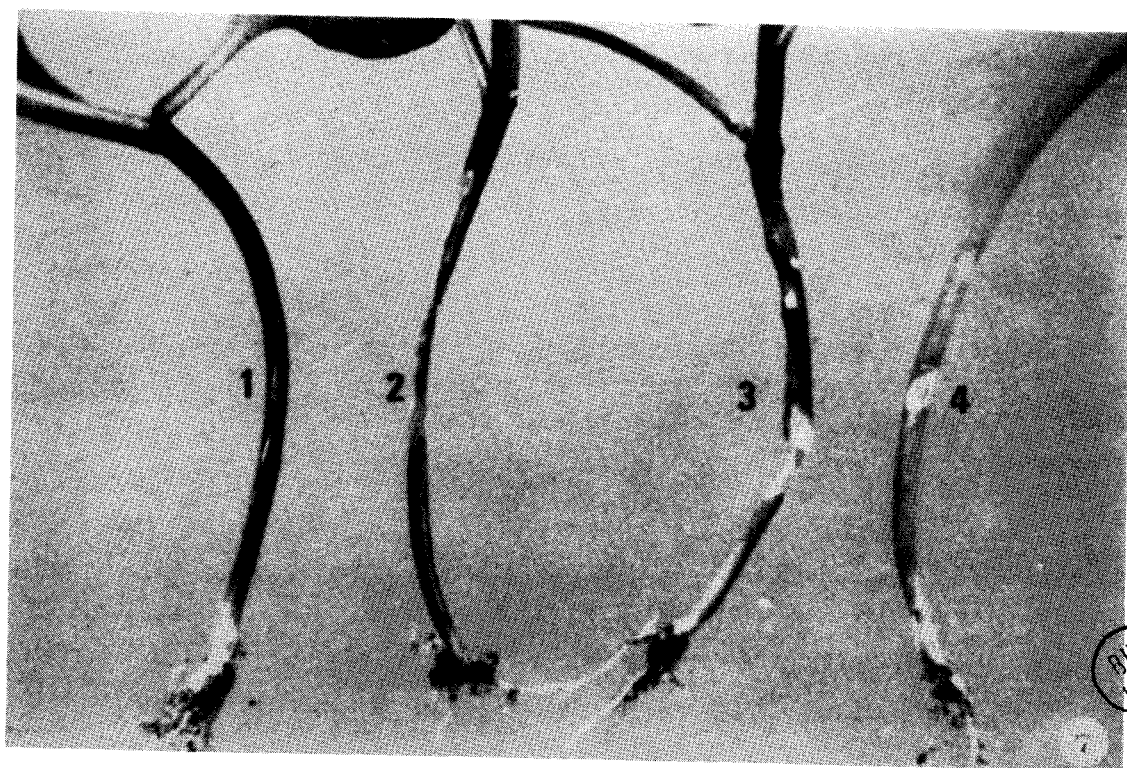
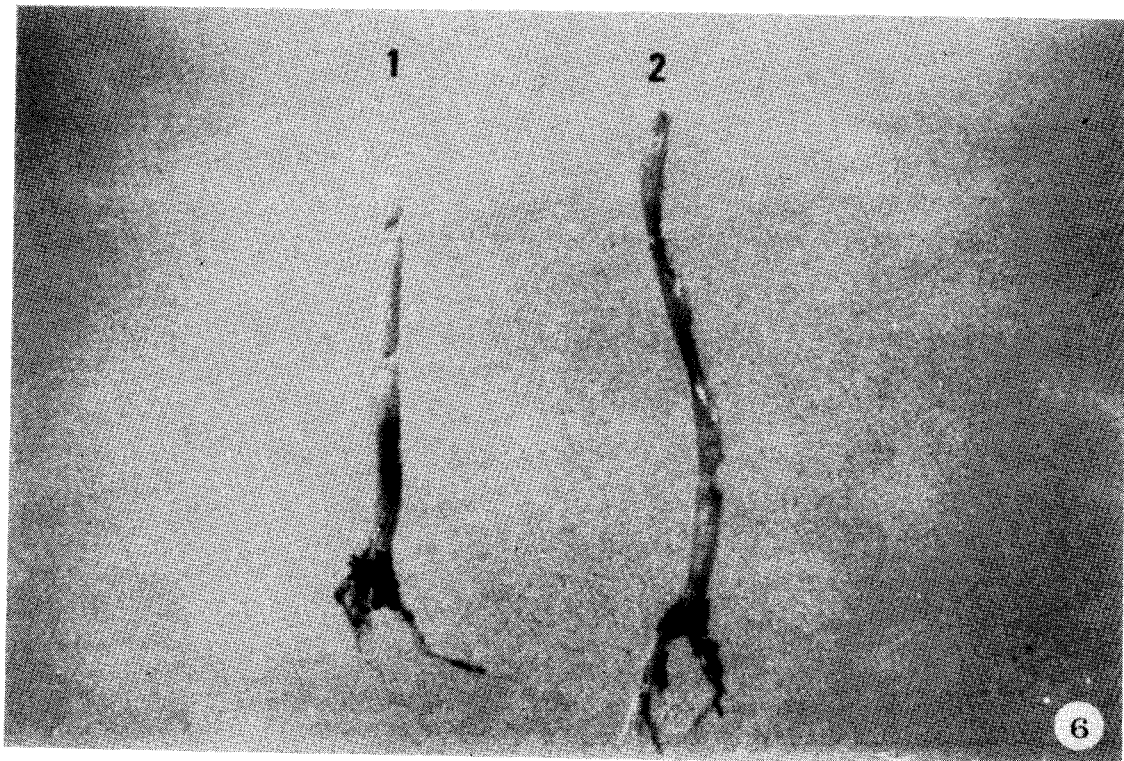


*Photo 6 :*

Effet, à 14°C, de l'injection de 1 µg (1) et 5 µg (2) de sirodesmine PL sur des hypocotyles du cultivar très sensible de Colza "Expander".

*Photo 7 :*

Comparaison entre les effets du Champignon (1 et 2) et ceux de la sirodesmine PL [10 µg (3) et 1 µg (4)] sur des hypocotyles de Chou rouge.



## CHAPITRE II : LES GLYCANASES DE PHOMA LINGUAM

### I. INTRODUCTION

Les raisons qui nous ont amené à aborder cette étude enzymologique découlent directement des observations effectuées en microscopie électronique sur le mode d'envahissement des tissus de l'hôte par le Champignon. Compte tenu du rôle secondaire joué par la sirodesmine PL, la nécrose des hypocotyles de Chou est très vraisemblablement la résultante d'une action progressive du mycélium sur les parois cellulaires de la plante. Notre premier objectif a consisté à caractériser les glycanases sécrétées par le Champignon dans des conditions de culture voisines de celles qu'il rencontre, *in situ*. Puis, nous avons orienté notre étude vers les propriétés biologiques des filtrats de culture, ce qui nous a permis de déceler leur phytotoxicité et d'obtenir la reproduction du symptôme de la nécrose. Nous avons alors entrepris la purification du (ou des) composé(s) phytotoxique(s) en cause, et nous avons recherché si ce composé ne pouvait pas être identifié à l'une des enzymes caractérisées auparavant.

Une caractéristique des agents phytopathogènes autres que les virus est leur capacité de produire un certain nombre d'enzymes capables de dégrader les polysaccharides complexes constituant les parois cellulaires végétales

(BATEMAN et MILLAR, 1966 ; WOOD, 1967 ; ALBERSHEIM et al., 1969 ; WOOD, 1973) et même pour certains d'entre eux, la capacité à dégrader les constituants membranaires du plasmalemme, (PORTER, 1966 ; TSENG et BATEMAN, 1968 ; TSENG et MOUNT, 1974). La production et l'activité de ces enzymes dépendent beaucoup des conditions d'environnement rencontrées par le parasite: de la nature du substrat, du pH et des produits du catabolisme. La répression de la biosynthèse des polysides-hydrolases par les sucres réducteurs est un phénomène courant (KEEN et HORTON, 1966 ; PATIL et DIMOND, 1968 ; BIEHN et DIMOND, 1971 ; SPALDING et al., 1973 ; GOODENOUGH et KEMPTON, 1974 ; COOPER et WOOD, 1975). Ce phénomène de répression peut même avoir une incidence sur le devenir de la maladie (HORSFALL et DIMOND, 1957 ; HORTON et KEEN, 1966 ; KEEN et HORTON, 1966 ; PATIL et DIMOND, 1968 ; ZUCKER et HANKIN, 1971 ; BUGBEE, 1973).

Par conséquent, comme pour les phytotoxines, le fait qu'un agent pathogène produise de telles enzymes dans des conditions artificielles de culture ou dans les plantes malades ne constitue pas une véritable preuve, suffisante pour leur attribuer un rôle pathogénique (HANCOCK, 1967). A cette fin, il est indispensable d'apprécier à sa juste valeur l'efficacité de ces biocatalyseurs, ne serait-ce qu'en les confrontant, *in vitro*, avec un substrat tout à fait approprié, en l'occurrence une préparation de parois cellulaires de la plante-hôte sensible (BATEMAN et al., 1969 ; ENGLISH et al., 1972, BATEMAN et al., 1973 ; BACKER et al., 1977 ; DOUX-GAYAT et al., 1978). Il est également essentiel de mettre en évidence, par des méthodes cytologiques et biochimiques, les altérations subies par les parois cellulaires dans les plantes infectées (HANCOCK, 1967 ; LUMSDEN, 1969 ; BATEMAN, 1970 ; AURIOL, 1973).

Depuis longtemps, les enzymes pectolytiques font l'objet de très nombreuses investigations en raison même de la place importante qu'occupent les substances pectiques dans la composition de la lamelle moyenne et de la paroi primaire, au sein de la structure tissulaire. Ces enzymes sont largement répandues chez les microorganismes phytopathogènes. Dans la littérature, les articles concernant soit leur production *in vitro*, soit leur rôle dans la maladie ou encore leurs propriétés physico-chimiques lorsqu'elles sont purifiées, abondent. Si pour certaines maladies il ne fait pas de doute que les enzymes pectolytiques contribuent pour une grande part au déroulement du processus infectieux (WOOD, 1960 ; HANCOCK et al., 1964 ; HANCOCK et MILLAR, 1966 ; BATEMAN et

MILLAR, 1966 ; MULLEN et BATEMAN, 1971 ; CHAN et SACKSTON, 1972 ; FERRARIS et al., 1974), dans d'autres cas, ce rôle est plutôt sujet à controverse. La meilleure illustration en est fournie par les études réalisées sur la verticilliose du Coton, où seule la sélection de mutants agressifs plus ou moins producteurs d'enzymes a permis d'apporter des éléments de réponse valables à une suite de contradictions (PUHALLA et HOWELL, 1975 ; HOWELL, 1976). Des travaux récents sur des polygalacturonases ont conduit les auteurs à leur attribuer un rôle dans les mécanismes de reconnaissance de l'hôte (CERVONE et al., 1978 ; FANELLI et al., 1978). En effet, ces enzymes existent sous de multiples formes que l'on peut séparer par la technique d'électrofocalisation (FIELDING et BYRDE, 1969 ; BATEMAN, 1972 ; PRESSEY et AVANTS, 1973 ; CERVONE et al., 1977 ; ARINZE et SMITH, 1979) ; certaines isoenzymes sont parfois caractéristiques de la spécialisation étroite du microorganisme, c'est le cas pour *Rhizoctonia solani* (SCALA et al., 1980).

## II. CARACTERISATION DES GLYCANASES PRODUITES, *IN VITRO*, EN PRESENCE DE PAROIS CELLULAIRES

Les éléments entrant dans la composition du milieu de culture sont ceux utilisés pour le milieu destiné à la production de sirodesmine PL, à l'exception de la source de glucides. Le glucose, utilisé précédemment, est remplacé par une préparation de parois cellulaires purifiées d'hypocotyles de Chou, à raison de 5 g par litre de milieu ; nous avons choisi cette source alimentaire particulière dans le but de placer le Champignon dans des conditions se rapprochant le plus de celles qu'il rencontre dans la plante. En effet, nous avons montré précédemment (première partie, chapitre 3) que la colonisation de l'hôte se faisait pendant les premiers temps de l'infection uniquement par voie intercellulaire. Pour souligner l'importance de cet aspect, nous citerons l'exemple du *Ceratocystis ulmi*, agent responsable de la maladie des Ormes, qui produit 200 fois plus de polygalacturonase et de cellulase lorsqu'on ajoute au milieu de culture une préparation à base de pectine d'Orme (BIEHN et DIMOND, 1970) ou plus simplement de la sciure de bois d'Orme (BILODEAU, 1973).

Les parois sont préparées selon le protocole de NEVINS (NEVINS et al., 1968). Les hypocotyles de plantules de Chou de 15 jours, cultivées à 20°C, sont récupérés et broyés dans un tampon phosphate mono-bipotassique 0,1 M à pH 7,0, à l'aide d'un broyeur de type "Ultra-turrax" (1 litre de tampon pour 100 g de poids frais d'hypocotyles). Le mélange est ensuite mis en agitation pendant une heure, à basse température. Après 20 minutes de centrifugation à



4000 t/mn, le surnageant est éliminé et le culot lavé deux fois par le tampon puis une fois par de l'eau distillée, avant de subir un nouveau broyage, pendant 5 minutes, dans le mélange chloroforme/méthanol (1/1, v/v). La préparation est laissée 30 minutes dans le solvant, à 4°C, puis filtrée sur verre fritté. Un lavage à l'acétone constitue la dernière étape du protocole de purification. La préparation est séchée à 30°C sous un courant d'air ; ainsi traitée, elle représente environ 1,7 % du poids frais d'hypocotyles.

Les cultures sont réalisées, à 20°C et à l'obscurité, dans des fioles de Roux renfermant chacune 0,5 g de préparation de parois pour 100 ml de milieu. L'emploi de baguettes de verre n'est pas indispensable, car la préparation suffit à fournir un bon support pour l'aération des filaments mycéliens. Au 6ème jour, les cultures sont récupérées, filtrées sur verre fritté, centrifugées pour éliminer les conidies et le surnageant est dialysé contre 100 volumes d'eau distillée froide pendant 16 heures. Les enzymes contenues dans le filtrat dialysé sont caractérisées, à 30°C, à l'aide de substrats appropriés en solution ou en solution-suspension dans différents tampons de molarité 0,2 M de pH variable. Du dialysat bouilli 3 minutes à 100°C est utilisé pour les essais témoin.

Pour chaque enzyme, nous avons déterminé le pH optimum d'activité et pour certaines, l'influence de la concentration en enzyme et en substrat. Pour la connaissance de la valeur optimale du pH, différents tampons ont été employés selon la gamme de pH à utiliser ; ainsi, pour des valeurs allant de 3,5 à 5,0, de 5,5 à 7,0, de 7,5 à 9,0 et de 9,5 à 10,5 l'activité a été évaluée respectivement dans un tampon acétate de sodium, acide citrique-phosphate de sodium bisodique, Tris-HCl et glyco-colle-soude.

#### 1) CARACTERISATION D'ENZYMES PECTINOLYTIQUES

Selon une classification proposée par BATEMAN et MILLAR (BATEMAN et MILLAR, 1966), les enzymes pectolytiques peuvent être classées :

- en hydrolases et en trans-éliminases selon que le mode de coupure s'effectue par hydrolyse ou trans-élimination ;
- en polyméthylgalacturonases ou polygalacturonases et en pectine trans-éliminases ou pectate trans-éliminases d'après la spécificité pour le substrat : en l'occurrence des pectines méthylées ou des acides pectiques faiblement méthylés ;

- en exoenzymes et endoenzymes, selon que l'enzyme attaque les chaînes pectiques par récurrence (forme exo) ou par clivage en petits chaînons (forme endo).

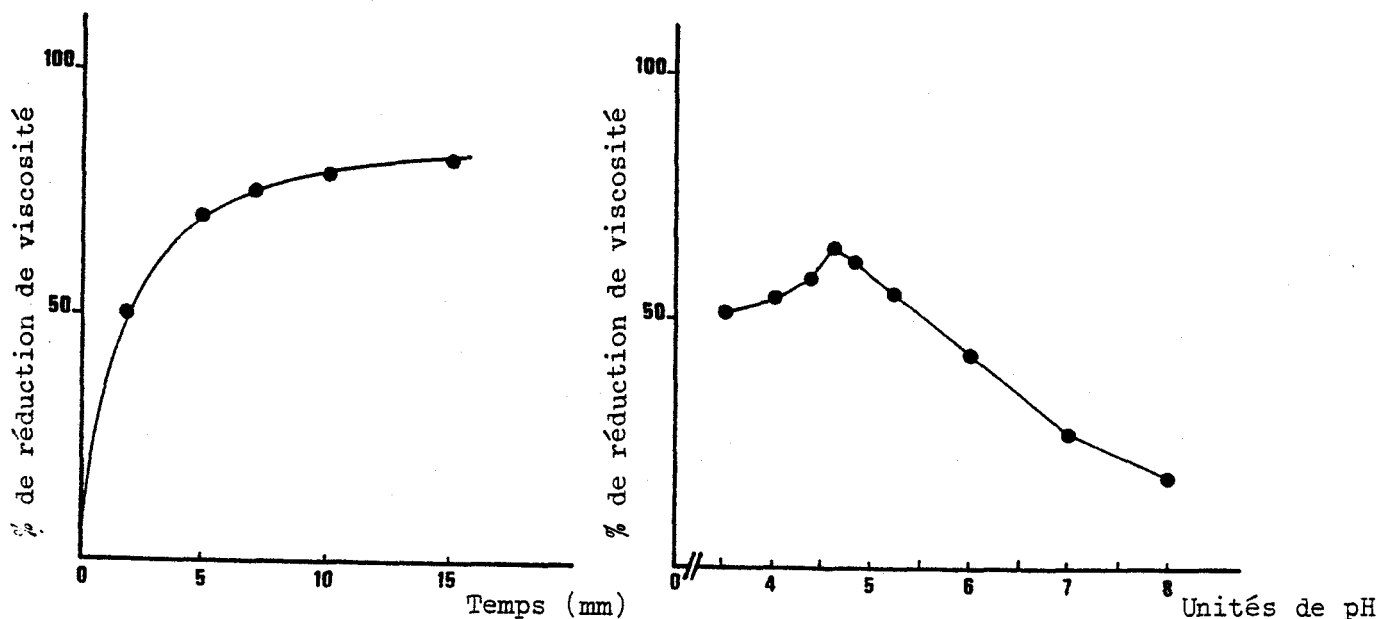
a) mise en évidence d'une polyméthylgalacturonase :

La propriété qu'a cette enzyme de diminuer la viscosité d'une solution de pectine de citron a été mise à profit pour sa caractérisation ; 5 ml de solution de pectine de citron (SIGMA) à 1 % dans un tampon acétate de sodium 0,2 M de pH 5,0 sont mélangés dans un viscosimètre à 5 ml de dialysat. Une goutte de toluène est ajoutée comme agent bactériostatique. Des mesures successives de temps d'écoulement sont effectuées et le résultat final est exprimé en pourcentage de réduction de viscosité, calculé d'après la formule suivante :  $\frac{T_0 - T_t}{T_0 - T_A} \times 100$  dans laquelle  $T_0$ ,  $T_t$  et  $T_A$  représentent respectivement le temps d'écoulement :

- du mélange témoin dans lequel l'enzyme est inactivée ( $T_0$ ) ;
- du mélange réactionnel au temps  $t$  ( $T_t$ ) ;
- du tampon acétate ( $T_A$ ).

La représentation graphique de l'activité se trouve dans le graphique 14 où nous avons également reporté l'influence du pH. L'enzyme présente une activité maximale à pH 4,6 dans le tampon acétate.

*Graphique 14 : Mise en évidence de l'activité polyméthylgalacturonase et influence du pH sur la vitesse de réaction.*



La forme endo de l'enzyme se distingue aisément de la forme exo par la mesure du pouvoir réducteur apparu dans le mélange réactionnel lorsque la viscosité de la solution est réduite de 50 %. En effet, à ce stade de l'hydrolyse, l'endoenzyme ne libère que 0,5 % à 3 % de groupements réducteurs (NAGEL et VAUGH, 1961) contre 20 % à 25 % pour l'exoenzyme (Mc MILLAN et al., 1964).

Lorsque la diminution de viscosité du mélange atteint 50 %, la réaction enzymatique est arrêtée par 2,5 volumes d'éthanol à 95° ; le gel qui se forme est éliminé par centrifugation, la solution alcoolique est évaporée à sec et le résidu est repris par 10 ml d'eau distillée. Le pouvoir réducteur de la solution aqueuse est mesuré par la méthode colorimétrique à l'arsénomolybdate d'ammonium de NELSON (NELSON, 1944) modifiée par SOMOGYI (SOMOGYI, 1952) et évalué par rapport à une courbe étalon d'acide  $\alpha$ -D monogalacturonique. Le nombre de groupements réducteurs libérés calculé représente 1,6 % du substrat, l'enzyme est donc une endopolyméthylgalacturonase.

b) mise en évidence d'une pectine trans-éliminase :

Cette enzyme possède la propriété de couper les liaisons  $\alpha$ -1,4 en provoquant la formation d'une double liaison entre les carbones 4 et 5 des résidus galacturoniques, par suite d'une déshydratation intramoléculaire. Le produit formé étant insaturé, on peut le doser soit en lumière ultraviolette à 230 nm (ALBERSHEIM et al., 1960), soit par une méthode colorimétrique appropriée (WEISSBACH et HURWITZ, 1959). Le principe est le suivant : le composé insaturé s'isomérisé en acide 4 déoxy-5 céto-uronique (PREISS et ASHWELL, 1963) ; l'oxydation périodique de ce produit fournit un composé caractéristique, le  $\beta$ -formyl pyruvate qui réagit avec l'acide thiobarbiturique pour former après chauffage, un chromophore rouge absorbant à 548 nm.

Les deux méthodes ont été employées pour caractériser l'enzyme après différents temps d'incubation. Les résultats sont exprimés soit en densité optique lorsque la mesure est effectuée à 230 nm, soit en nanomoles de  $\beta$ -formyl-pyruvate formées par millilitre sachant que 10 nmoles de ce composé donne une densité optique de 0,290 à 548 nm (PREISS et ASHWELL, 1963).

La réaction enzymatique se déroule en présence ou non d'ions calcium qui manifestent, en général, un net effet activateur ; une solution de pectine de citron à 1 % dans un tampon Tris/HCl 0,2 M pH 8,5 constitue le substrat. Le milieu réactionnel comprend :

- 0,25 ml de solution enzymatique
- 0,25 ml de substrat
- 0,5 ml Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5

ou

- 0,25 ml de solution enzymatique
- 0,25 ml de substrat
- 0,40 ml Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5
- 0,1 ml de CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 0,01 M

L'influence du pH sur la réaction enzymatique a été évaluée à 230 nm, en présence d'ions calcium, après un temps de réaction de 30 minutes.

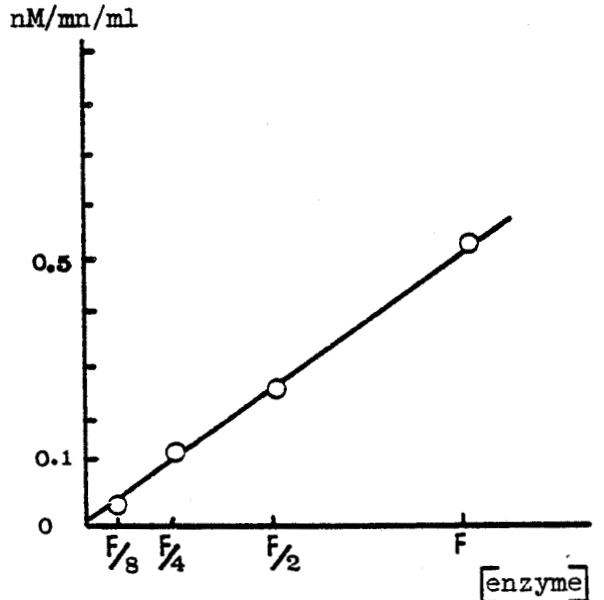
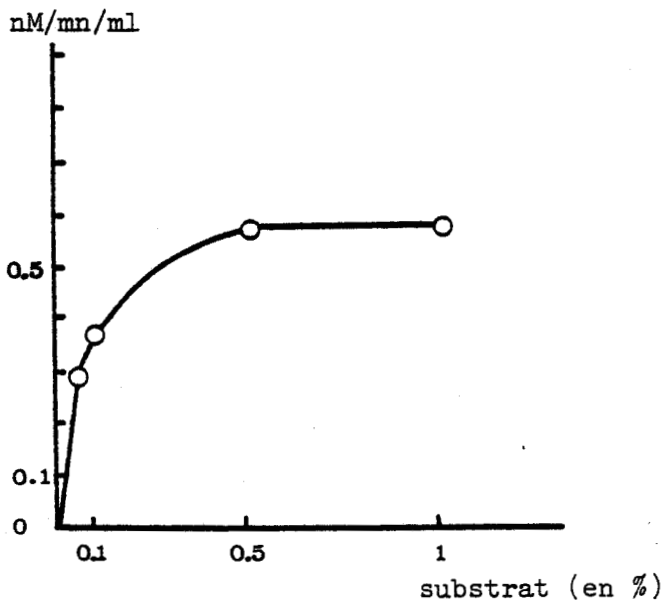
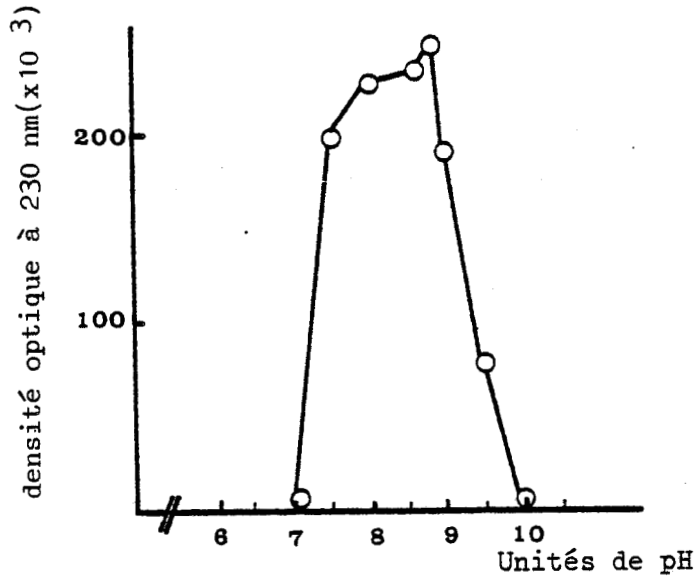
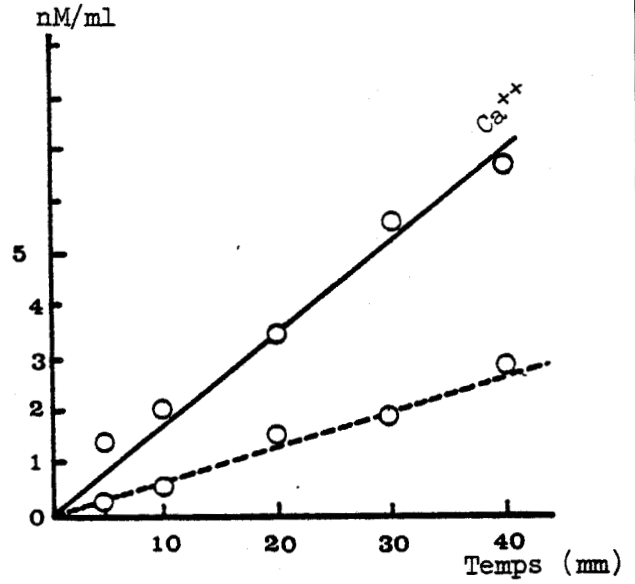
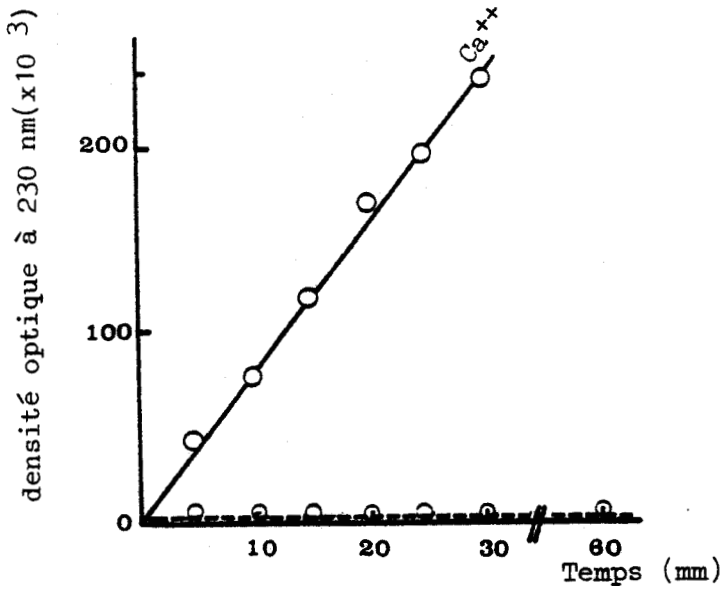
Les résultats reportés dans le graphique 15 montrent une réponse différente selon la méthode utilisée. Mesurée à 230 nm, l'activité de l'enzyme paraît étroitement dépendante de la présence d'ions-calcium, alors qu'à 548 nm, on peut la mettre en évidence sans effecteur ; on ne peut trouver d'explication que dans une plus grande sensibilité de la seconde méthode. Comme dans la majorité des cas, la vitesse de réaction est nettement accrue sous l'influence des ions calcium et présente une valeur maximale dans un tampon Tris/HCl à pH 8,8 ; pour des valeurs inférieures à 7,5 l'enzyme n'agit pas.

L'influence de la concentration en substrat et en enzyme a été également analysée, cette fois en l'absence de calcium et par la méthode de WEISSBACH et HURWITZ. Dans le premier cas, on fait agir le filtrat sur diverses concentrations de pectine de citron en solution dans du tampon Tris/HCl 0,2 M pH 8,8, pendant 1 heure à 30°C. La réaction est indépendante de la concentration en substrat pour des valeurs supérieures à 0,5 %.

Dans le second cas, la concentration du substrat est de 0,5 %, les différentes concentrations en enzyme étant obtenues par dilution du filtrat ; le temps de réaction reste le même. Il y a saturation de l'enzyme pour chaque concentration (graphique 15 ).

Par un mode de révélation basé sur le même principe que la méthode de dosage de WEISSBACH et HURWITZ, on peut caractériser spécifiquement le produit de la réaction en chromatographie (WARREN, 1960). Pour cela, on précipite le substrat par 2,5 volumes d'éthanol à 95°, on centrifuge et on évapore à sec la solution alcoolique. Le résidu est repris par 100 µl d'eau distillée ; 10 µl sont chromatographiés sur du papier Whatman n° 1 dans le mélange solvant méthanol/acide formique/eau (8:13/7, v/v/v). Après séchage, on pulvérise successivement sur le chromatogramme :

Graphique 15 : Influence de différents facteurs sur la vitesse de la réaction catalysée par la pectine trans-éliminase.



- une solution aqueuse de periodate de sodium 0,02 M (on laisse agir 15 minutes) ;
- un mélange éthylène-glycol/acétone/acide sulfurique concentré (50/50/0,3, v/v/v) (on laisse agir 10 minutes) ;
- une solution aqueuse à 6 % d'acide thiobarbiturique.

Un chauffage à 100°C d'une durée de 5 minutes fait apparaître une tache rouge ayant un Rf de 0,76. On n'obtient aucune révélation avec un témoin acide  $\alpha$ -D-monogalacturonique.

Cette méthode chromatographique permet de confirmer l'existence d'une pectine trans-éliminase dans le filtrat de culture.

c) essai de mise en évidence d'une pectinéméthylestérase :

Cette enzyme catalysant la libération de méthanol à partir des esters méthyliques des chaînes pectiques, on dose par titrimétrie les fonctions carboxyliques apparues. La méthode que nous avons employée est inspirée de celle de KERTESZ (KERTESZ, 1955). A 5 ml de dialysat, on ajoute 5ml d'une solution de pectine de citron (méthylée à 70 %) renfermant du chlorure de sodium 0,1 M et dont le pH a été amené à 5,0 et à 7,0 par addition de soude. Toutes les 30 minutes, pendant 4 heures, le pH du mélange est mesuré au pH mètre et ramené à sa valeur initiale avec de la soude 0,02 M.

Les valeurs des essais sont toujours restées égales à celles des témoins renfermant de la solution enzymatique bouillie, par conséquent le filtrat ne contient pas de pectinéméthylestérase.

## 2) CARACTERISATION D'ENZYMES CELLULOLYTIQUES

Quelques Champignons, notamment *Trichoderma viride*, *Myrothecium verrucaria*, *Botryodiplodia theobromae*, dégradent les fibres de cellulose grâce à un complexe enzymatique comprenant deux sortes de cellulases, les cellulases de type C<sub>1</sub> et C<sub>x</sub> (REESE, 1956). Les premières scindent les fibres de cellulose en fibres de petite taille. Les secondes transforment les fibrilles en produits solubles et finalement en glucose (HALLIWELL, 1966 ; SELBY et MAITLAND, 1967 ; UMEZURIKE, 1970 ; HALLIWELL et MOHAMED, 1971). Récemment, une carboxyméthyl trans-éliminase a été pour la première fois caractérisée (ARUN NEHEMLAH, 1978).

a) essai de caractérisation d'une cellulase de type C<sub>1</sub> :

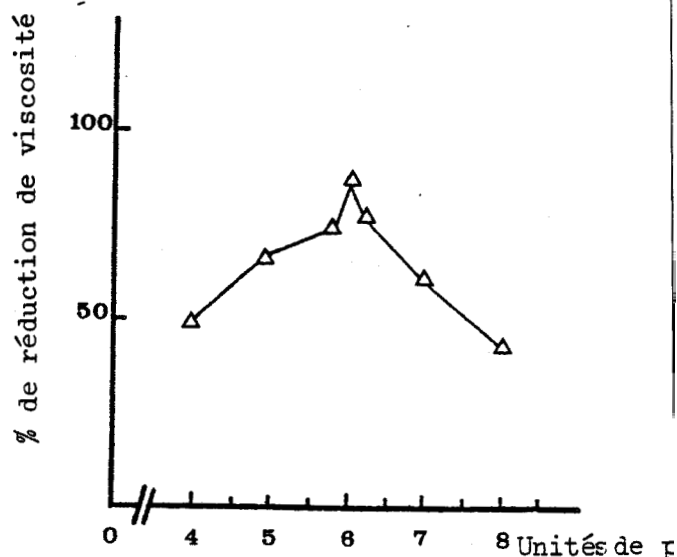
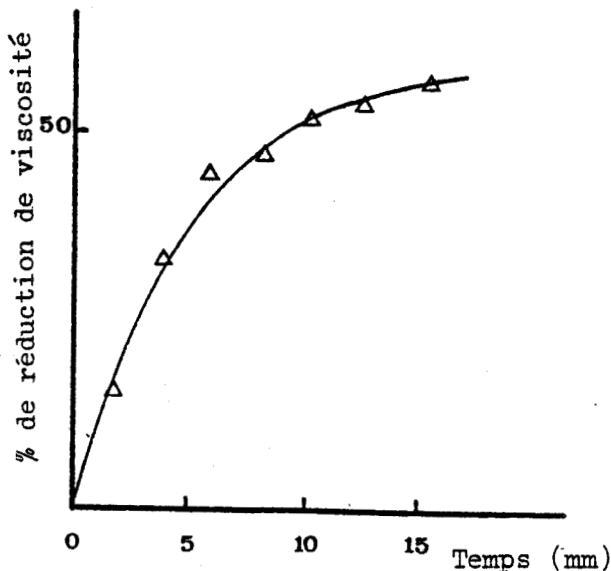
Cinq millilitres de dialysat sont ajoutés à 5 millilitres de tampon de Mac Ilvaine (acide citrique-phosphate bisodique) 0,2 M de pH 5,0 ou 7,0, renfermant 20 mg de poudre de cellulose Whatman CF11 ou de coton hydrophile et du merthiolate 0,002 M comme agent bactériostatique ; le tout est mis à incuber 3 jours à 30°C. La dégradation du substrat insoluble est mise en évidence, entre autres (SOBOTKA, 1974) par l'apparition d'un pouvoir réducteur dans le milieu d'incubation, dû à la libération de glucose.

Dans notre cas, aucun pouvoir réducteur n'apparaît au bout de 3 jours. Le Champignon ne produit donc pas de cellulase de type C<sub>1</sub>.

b) mise en évidence d'une carboxyméthylcellulase :

Cette activité se caractérise et se mesure soit par viscosimétrie, soit par dosage des groupements réducteurs libérés ; 5 ml d'une solution de carboxyméthylcellulose (SIGMA) à 1 % dans du tampon de Mac Ilvaine 0,2 M à pH 5,0 sont introduits dans un viscosimètre et mélangés à 5 ml de dialysat, avec une goutte de toluène. La mesure de l'activité enzymatique et l'expression du résultat se font de la même manière que pour la polyméthylgalacturonase. La perte de viscosité de la solution de carboxyméthylcellulose est la preuve que le Champignon produit une cellulase de type carboxyméthylcellulase. L'enzyme présente une activité maximale à pH 6,0 ; les courbes d'activité sont regroupées dans le graphique 16 .

Graphique 16 : Mise en évidence de l'activité carboxyméthylcellulase et influence du pH sur la vitesse de réaction.



### 3) CARACTERISATION D'HEMICELLULASES

On désigne par hémicellulases toutes les polyosides-hydrolyses qui dégradent les divers polysaccharides neutres, autres que la cellulose, rentrant dans la constitution de la paroi primaire. Le principe consiste à faire agir 0,5 ml de dialysat avec 0,5 ml d'une solution ou d'une solution-suspension de substrat à 1 % dans du tampon de Mac Ilvaine 0,2 M à pH 6,0 et de mesurer dans le temps l'augmentation du pouvoir réducteur par la méthode de NELSON-SOMOGYI, en l'évaluant par rapport à une courbe étalon du monomère correspondant. Les substrats que nous nous sommes procuré dans le commerce sont : du xylane (SIGMA), de la laminarine ( $\beta$ -1,3 glycane) (K.L.L.), du galactane (N.B.C.), du mannane (SIGMA), de l'arabinogalactane (SIGMA) et de l'arabane (SIGMA).

Le filtrat dialysé provoque uniquement la dégradation du xylane et de la laminarine ; aucune activité concernant les 4 autres substrats n'a pu être décelée, même en prolongeant le temps d'incubation. La xylanase et la laminarinase présentent une activité maximale, déterminée après 30 minutes d'incubation, respectivement à pH 6,2 et à pH 6,0.

L'influence de la concentration en substrat et en enzyme sur la vitesse de réaction a été également précisée. Le temps de réaction est de 30 minutes. Dans chaque cas :

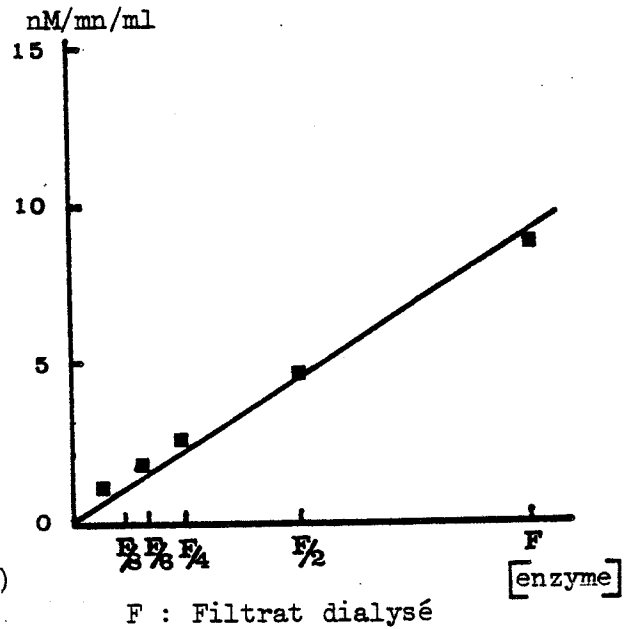
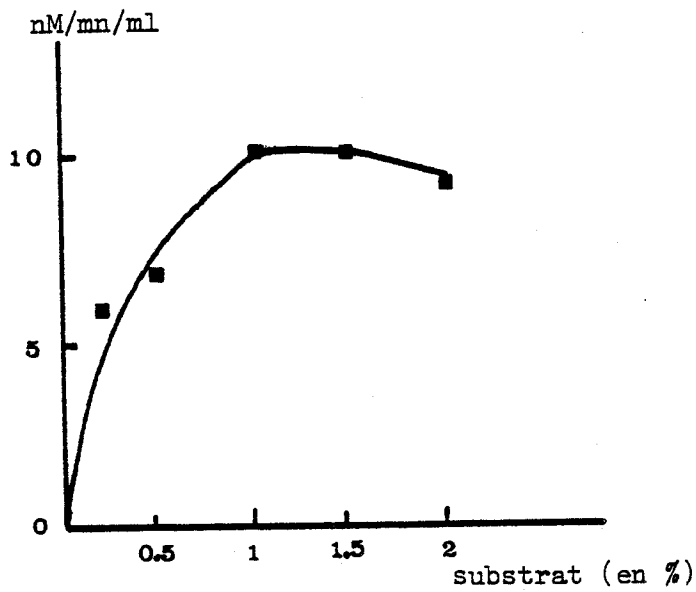
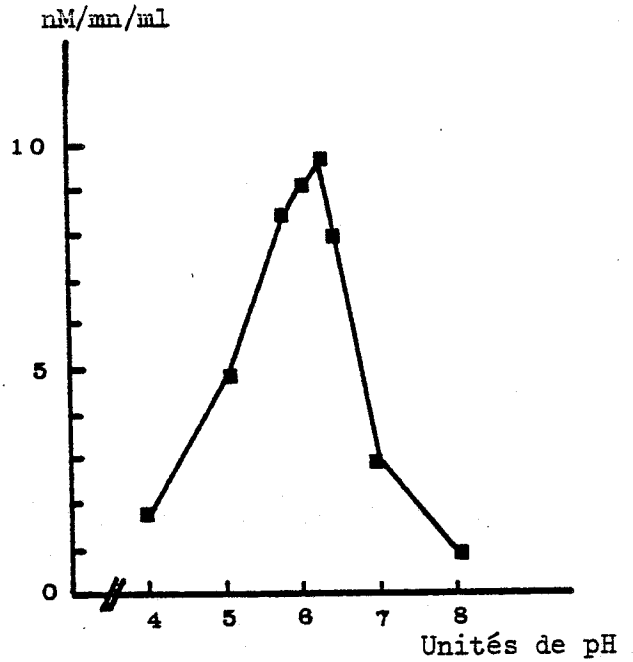
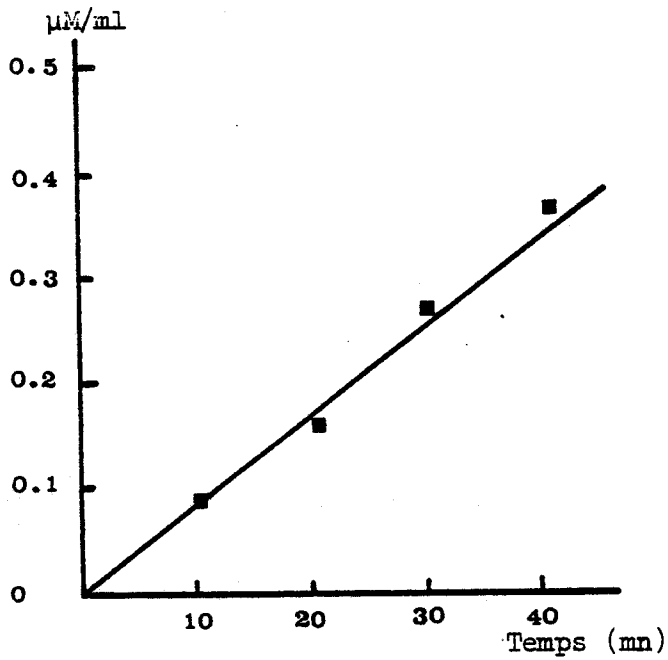
- la réaction est indépendante de la concentration en substrat pour des valeurs supérieures à 1 % ;
- l'enzyme reste toujours saturée quelle que soit sa concentration.

L'ensemble des courbes est regroupé dans les graphiques 17 et 18 .

En résumé, lorsque *Phoma linguam* est mis en présence de parois cellulaires, il produit des enzymes capables de dégrader des substrats de nature pectique, cellulosique et hémicellulosique. Les conditions de culture étant voisines de celles qu'il rencontre dans la plante pendant les premiers jours de l'infection, il est important de connaître, *in vitro*, l'évolution de la synthèse de ces différents biocatalyseurs, essentiellement pour savoir si certains sont produits plus rapidement que d'autres. Les enzymes dont la synthèse est précoce sont en effet susceptibles de jouer un rôle plus déterminant dans l'initiation de la dégradation des parois de l'hôte contaminé que celles produites plus tardivement.

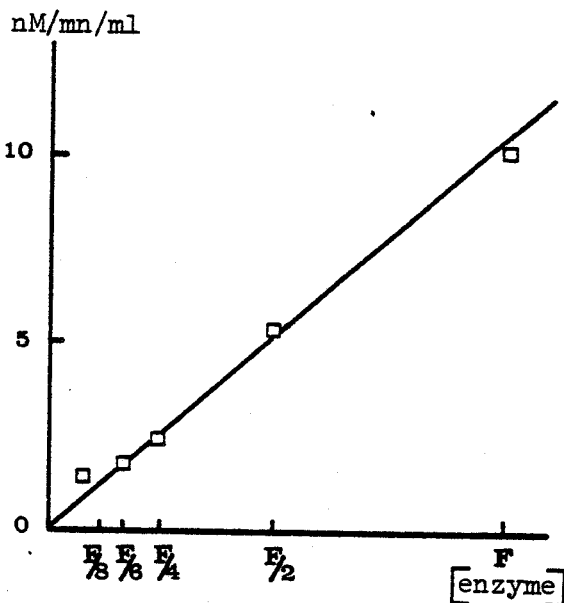
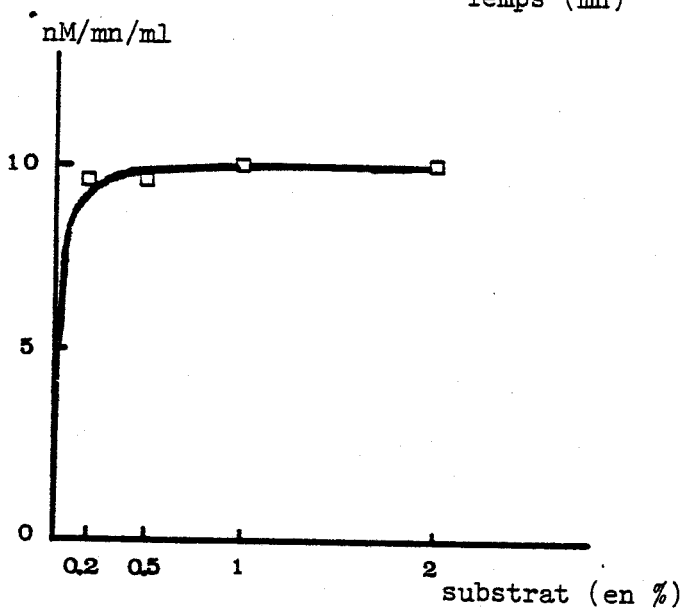
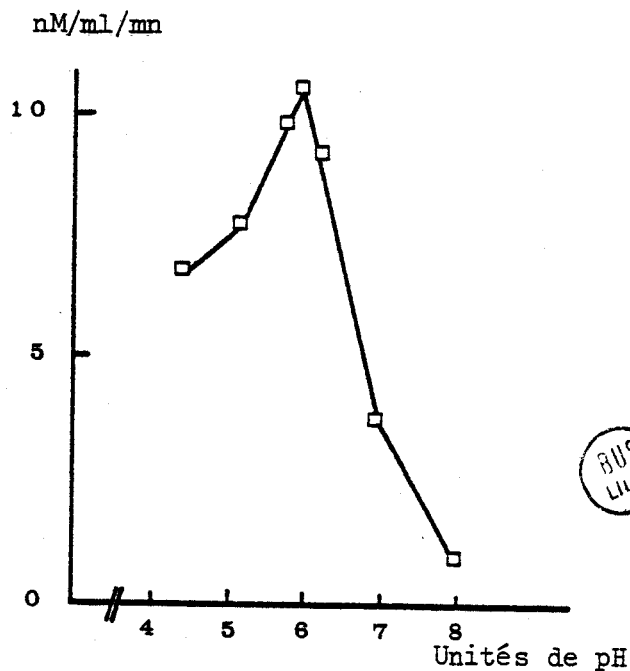
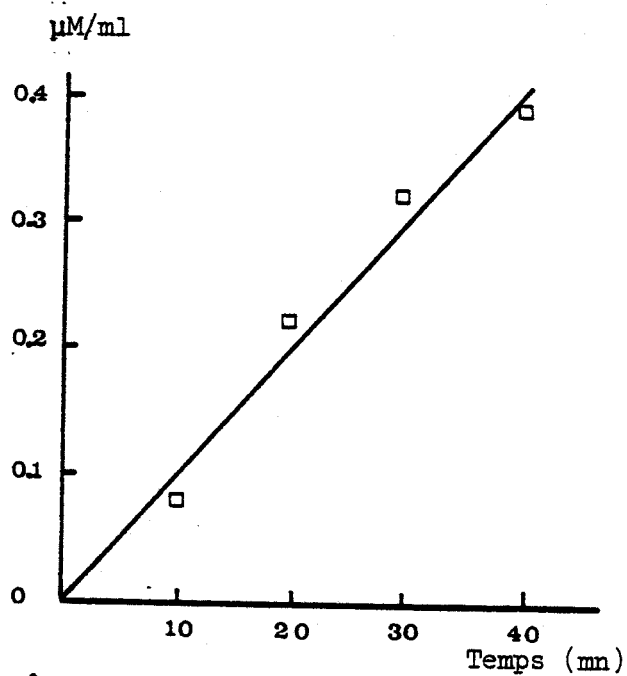


*Graphique 17 : Influence de différents facteurs sur la vitesse de réaction catalysée par la xylanase.*



BHS  
LILLE

Graphique 18 : Influence de différents facteurs sur la vitesse de réaction catalysée par la laminarinase.



F : filtrat dialysé

### III. CINÉTIQUE DE PRODUCTION, *IN VITRO*, DES DIFFÉRENTES GLYCANASES EN PRÉSENCE DE PAROIS CELLULAIRES

A partir du 3<sup>ème</sup> jour de culture et pendant 12 jours, nous avons suivi quotidiennement la production des enzymes caractérisées précédemment. Les cultures sont réalisées en Erlen-Meyer de 300 ml renfermant chacun 20 ml de milieu synthétique et 100 mg de parois, à 20°C et à l'obscurité ; les filtrats sont ensuite recueillis par filtration sur verre fritté, centrifugés et dialysés. Les résultats sont exprimés en unités d'activité enzymatique relative que nous définirons avant de comparer les délais de production des différentes enzymes.

#### 1) DÉFINITION DES UNITÉS D'ACTIVITÉ RELATIVE

##### a) activité polyméthylgalacturonase et carboxyméthylcellulase :

Par la méthode de dosage viscosimétrique, l'unité d'activité s'exprime communément par la formule suivante :  $\frac{1}{t_{50}} \times 100$ , dans laquelle  $t_{50}$  représente le temps nécessaire, à 30°C, pour obtenir 50 % de réduction de viscosité du mélange, l'essai comprenant 5 ml de solution enzymatique et :

- soit 5 ml de solution de pectine de citron à 1 % dans du tampon acétate 0,2 M de pH 4,6 ;
- soit 5 ml de solution de carboxyméthylcellulose à 1 % dans du tampon Mc Ilvaine 0,2 M de pH 6,0.

Les valeurs ont été ramenées, dans les deux cas, à 1 millilitre.

##### b) activité pectine-trans-éliminase :

En employant la méthode colorimétrique de WEISSBACH et HURWITZ, l'unité d'activité représente la quantité d'enzyme qui provoque, à 30°C, la formation de 1 nanomole de  $\beta$ -formylpyruvate, à 548 nm, par minute et par millilitre, dans un essai renfermant 0,25 ml de solution enzymatique, 0,25 ml de pectine de citron à 0,5 % dans un tampon Tris/HCl 0,2 M de pH 8,8 et 0,5 ml du tampon de pH 8,8. L'essai dure 60 minutes ; les quantités de  $\beta$ -formylpyruvate sont calculées de la même façon que celle décrite auparavant.

c) activité xylanase et laminarinase :

L'unité d'activité représente la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer, à 30°C, 1 nanomole de xylose ou de glucose, par minute et par millilitre, dans un essai d'une durée de 30 minutes, comprenant :

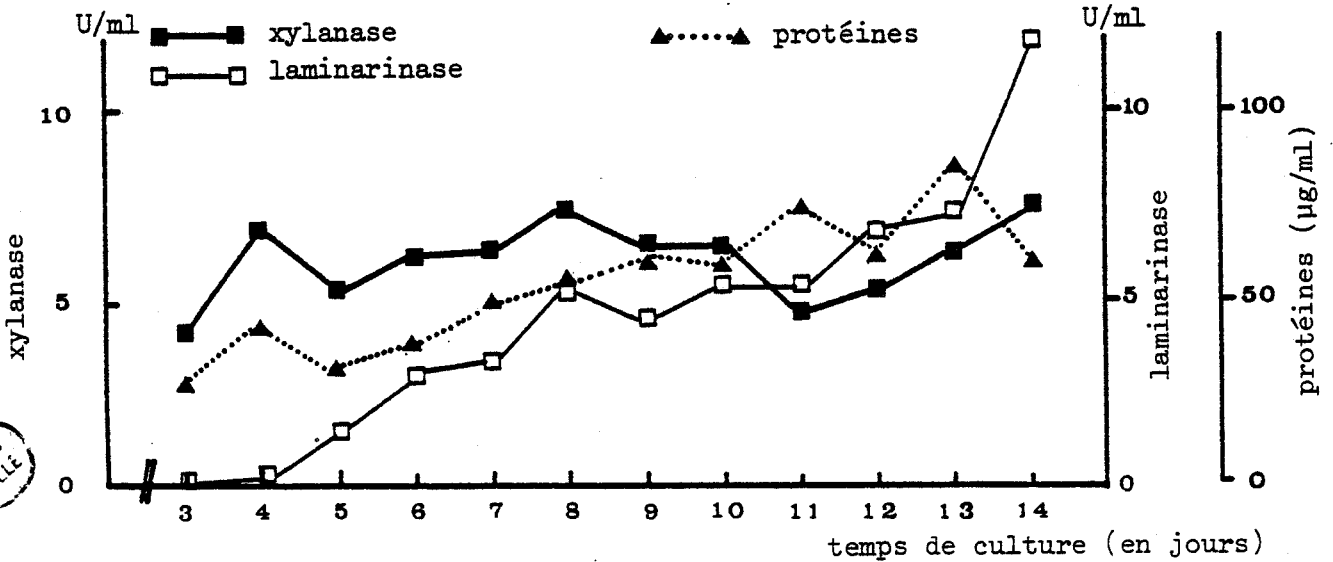
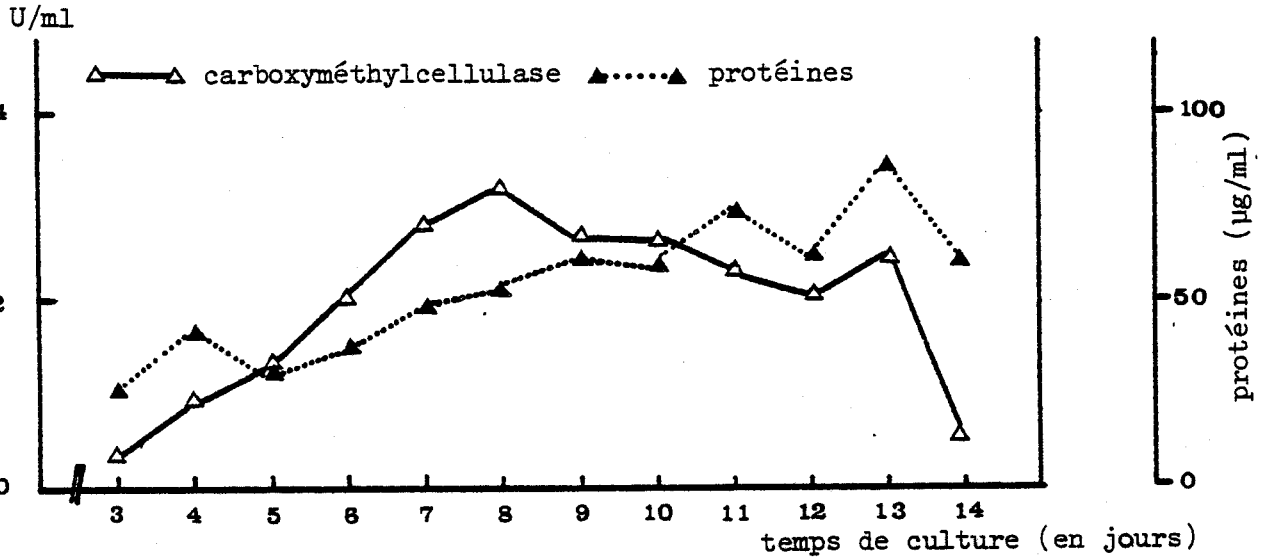
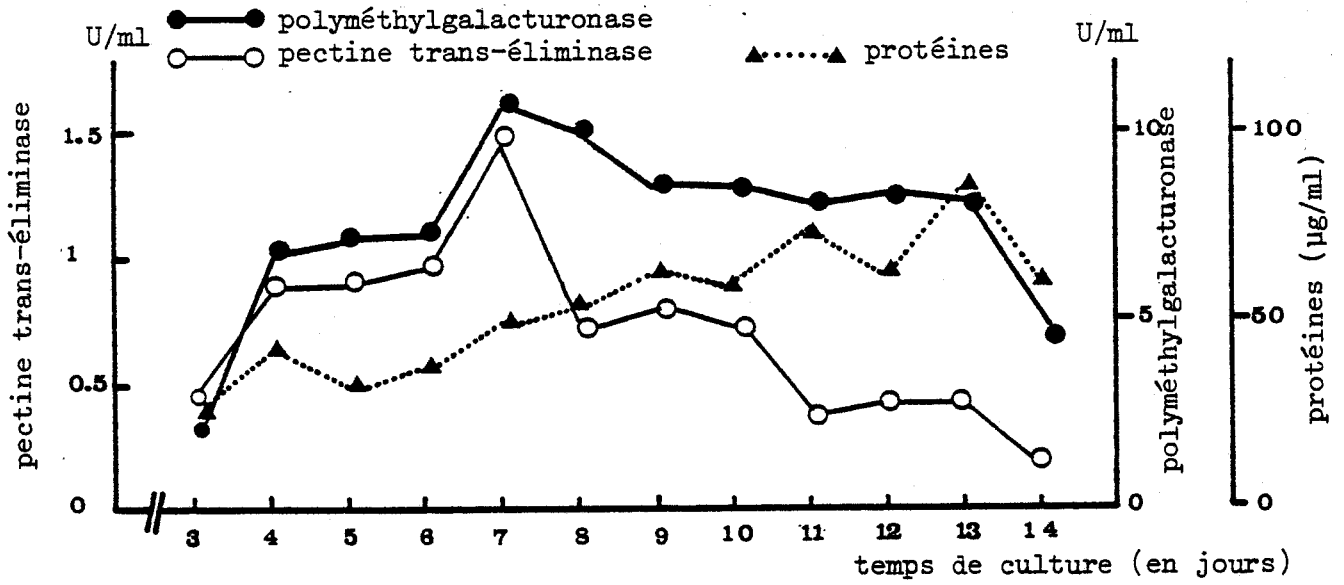
- 0,5 ml de solution enzymatique et :
- soit 0,5 ml d'une solution-suspension de xylane à 1 % dans un tampon de Mc Ilvaine 0,2 M, pH 6,2 ;
- soit 0,5 ml d'une solution de laminarine à 1 % dans du tampon de Mc Ilvaine 0,2 M, pH 6,0.

Parallèlement, les protéines des filtrats sont dosées par la méthode de LOWRY (LOWRY et al., 1951) par rapport à une courbe étalon de sérum-albumine de boeuf (SIGMA).

## 2) RESULTATS

Les différentes évolutions sont représentées dans le graphique 19 . La première enzyme émise dès le 4ème jour de culture est la xylanase ; les autres activités n'apparaissent que plus tardivement, au bout de 7 à 8 jours. A partir du 8ème jour, l'activité pectine trans-éliminase diminue progressivement, alors que la production de carboxyméthylcellulase et de polyméthylgalacturonase reste relativement constante. L'émission de laminarinase n'a lieu qu'au 4ème jour et, après avoir légèrement diminué au 9ème jour, elle augmente progressivement et fortement en fin d'essai. Dans l'ensemble, l'évolution des différentes activités ne concorde pas très bien avec la variation des protéines totales présentes dans les filtrats. Après avoir caractérisé la production séquentielle des diverses glycanases émises dans le filtrat de culture, nous nous proposons d'examiner les effets biologiques de ce filtrat sur des hypocotyles de Chou.

*Graphique 19 : Evolution de la biosynthèse des différentes glycanases produites en présence de parois cellulaires.*



#### IV. PROPRIETES BIOLOGIQUES DU FILTRAT DE CULTURE DE *PHOMA LINGUAM*, OBTENU EN PRESENCE DE PAROIS CELLULAIRES

##### 1) MISE EN EVIDENCE

Il nous a paru très intéressant de déterminer si le substrat particulier que constituent les parois cellulaires d'hypocotyles n'induit pas chez le Champignon, la synthèse de nouvelles molécules, éventuellement les glycanases, susceptibles de provoquer dans la plante-hôte des désordres biochimiques profonds et différents de ceux de la sirodesmine PL.

Le filtrat d'une culture de 6 jours du Champignon, réalisée dans une fiole de Roux en présence de parois cellulaires, est filtré sur verre fritté et centrifugé ; le surnageant est rendu totalement acellulaire par une nouvelle filtration sur filtre Millipore 0,45  $\mu$ , puis dialysé contre 100 volumes d'eau distillée froide. Le filtrat dialysé est alors concentré, à 4°C, dans un appareil à ultrafiltration "Amicon" sur membrane PM 10 et lyophilisé. Au préalable, les protéines contenues dans la solution concentrée sont dosées.

Le résidu lyophilisé est remis en solution par un volume d'eau distillée froide calculé de telle façon que la concentration finale en protéines soit de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ; 0,4  $\mu\text{l}$  (soit 2  $\mu\text{g}$  de protéines) sont injectés dans des hypocotyles de Chou de 3 semaines et les plantules sont laissées à 20°C. Parallèlement, nous avons constitué deux lots témoin : un premier dans lequel nous avons évalué les effets de l'injection de la solution, après l'avoir faite bouillir trois minutes au bain-marie à 100°C, et un second où de la solution de sérum-albumine de boeuf à 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a été injectée.

Quatre à cinq jours après l'infection, les premiers effets toxiques du filtrat se manifestent sous l'aspect d'un bleuissement caractéristique de la région éprouvée, accompagné d'un léger amincissement. Le symptôme évolue ensuite d'une façon rigoureusement analogue à ce que l'on observe en contaminant les hypocotyles par le Champignon. L'amincissement s'accroît et s'étend progressivement à l'ensemble des hypocotyles. A un stade ultime, l'hypocotyle, considérablement desséché, prend une teinte brunâtre, le collet se rompt, entraînant le flétrissement des organes foliaires et la mort de la plantule. Dans le lot témoin, aucune perturbation de ce genre ne s'observe.

Nous avons cherché à déterminer les concentrations limites pour lesquelles ces effets pouvaient encore s'exercer en injectant du filtrat de plus en plus dilué ; nous avons toujours constaté que de très faibles quantités de protéines allant jusqu'à 20 ng induisaient des symptômes ; toutefois, l'effet toxique est considérablement atténué et ne porte pas préjudice à la plante, même longtemps après l'injection. En général, il faut introduire des quantités de protéines supérieures ou égales à 0,5 µg pour provoquer chez le Chou une nécrose profonde et létale.

Le filtrat d'une culture de *Phoma linguam*, réalisée en présence de parois cellulaires d'hypocotyles de Chou, possède donc la propriété d'induire le symptôme typique de la nécrose. Le (ou les) composé(s) phytotoxique(s) est thermolabile et possède une masse moléculaire supérieure à 10 000 puisqu'il n'est pas éliminé par ultrafiltration sur membrane PM 10. Par conséquent, ce composé phytotoxique est autre que la sirodesmine PL dont la masse moléculaire est de 486. Du reste, cette dernière molécule n'a pu être caractérisée en chromatographie sur couche mince à partir d'un extrait chloroformique du filtrat de culture ; par conséquent, dans ces nouvelles conditions de culture, la sirodesmine PL n'est pas produite ou l'est en quantités infinitésimales, la rendant très difficilement décelable.

## 2) MISE AU POINT D'UN TEST D'ACTIVITE BIOLOGIQUE

Compte tenu des effets phytotoxiques particulièrement intéressants, nous avons caractérisé davantage la nature du composé responsable et tenté de l'identifier. A cette fin, nous avons mis au point un test d'activité biologique plus sensible que celui par injection et présentant, en outre, l'avantage d'offrir une bonne proportionnalité entre les quantités de toxine en présence et leurs effets biologiques. Ce test consiste à sectionner des hypocotyles de plantules de Chou âgées de 10 jours juste sous le noeud cotylédonaire et à déposer sur la section 1 µl de solution active concentrée ; les effets se produisent rapidement en provoquant le dessèchement de la région supérieure de l'hypocotyle sectionné. Il suffit ensuite de mesurer la longueur du segment d'hypocotyle aminci, ceci 96 heures après le dépôt ; le test se déroule à 20°C.

Le test par trempage, dans le filtrat de culture, de plantes sectionnées au collet, test couramment utilisé en matière de toxine, ne donne aucun résultat ; le filtrat dialysé doit être concentré 10 fois par ultrafiltration pour que l'on obtienne l'amincissement de la région inférieure de l'hypocotyle, le flétrissement des cotylédons, mais aussi la diffusion des anthocyanes dans le milieu qui prend ainsi une teinte rosée, phénomène que l'on n'observait pas avec la sirodesmine PL.

#### V. VERIFICATION DE LA NATURE INDUCTIBLE OU CONSTITUTIVE DU COMPOSE PHYTOTOXIQUE

Afin de savoir si la biosynthèse du composé phytotoxique est induite par les parois cellulaires ou simplement constitutive, nous avons substitué soit du glucose soit du xylose à la préparation de parois cellulaires, la concentration restant égale à 0,5 %. L'activité biologique des filtrats de culture concentrés, déterminée par injection de 2  $\mu$ g de protéines dans les hypocotyles de Chou, se révèle positive pour les deux sources de glucides. Par conséquent, cette vérification apporte la démonstration de la nature constitutive du composé phytotoxique.

#### VI. EFFETS D'AGENTS DENATURANTS DES PROTEINES SUR L'ACTIVITE PHYTOTOXIQUE DU FILTRAT

En raison de la taille de sa molécule et de son inactivation à 100°C, nous avons vérifié si nous n'étions pas en présence d'un composé phytotoxique de nature peptidique ; pour cela, nous lui avons fait subir l'action de deux agents dénaturants des protéines : la chaleur, mais à une température plus basse qu'à l'ébullition et une enzyme protéolytique, la papaïne, choisie pour sa très faible spécificité d'action.



## 1) ACTION DE LA CHALEUR

L'effet d'un chauffage plus modéré qu'à 100°C est déterminé.

Le filtrat provenant d'une fiole de culture est traité de la même façon que précédemment et concentré au maximum par ultrafiltration ; la membrane PM 10 est lavée avec 3 ml d'eau distillée froide pour remettre en solution les protéines retenues. La solution est ensuite introduite dans un tube à essai qui est placé dans un bain-marie à 70°C ; au préalable, 100 µl ont été prélevés pour l'essai témoin. Toutes les 5 minutes, pendant une demi-heure, une aliquote est pipetée, refroidie et testée biologiquement.

Ainsi, nous avons déterminé qu'un chauffage d'une durée de 5 minutes à 70°C suffit à inhiber totalement l'activité phytotoxique.

## 2) ACTION D'UNE ENZYME PROTEOLYTIQUE

Dix milligrammes de résidu lyophilisé d'un filtrat de culture concentré sont remis en solution dans 4,4 ml de tampon acétate 0,2 M, pH 5,0 auxquels on ajoute 0,1 ml de solution de papaïne (SIGMA, type IV) à 2,2 mg/ml dans le même tampon et 0,5 ml d'une solution de merthiolate  $10^{-3}$  M. Le mélange est mis à incuber 16 heures à 30°C, puis dialysé et lyophilisé. La dialyse est indispensable pour éviter toute interférence du tampon sur l'activité biologique. Deux témoins sont réalisés dans cette expérience, l'un ne renfermant pas de papaïne, l'autre ne contenant que l'enzyme protéolytique. Ces témoins sont traités de la même façon que le mélange.

Chaque résidu est repris par le même volume d'eau distillée froide permettant d'obtenir, pour l'essai enzymatique et le témoin sans papaïne, une concentration finale en protéines de 2 µg/ µl ; ce volume est calculé d'après la quantité initiale de protéines contenues dans les 10 mg de filtrat de culture lyophilisé. Dans les conditions de l'essai, l'action de la papaïne provoque une diminution de 90 % de l'activité phytotoxique. Dans chacun des 3 cas, les valeurs moyennes des longueurs de segments amincis sont les suivantes :

- essai avec papaïne.....3,6 mm
- témoin papaïne seule.....2,1 mm
- témoin sans papaïne.....13 mm

Pour toutes les mesures, les longueurs ont été déterminées à la loupe binoculaire avec un micromètre oculaire.

Ces résultats nous amènent à conclure que le composé phytotoxique est particulièrement thermolabile et effectivement de nature peptidique.

## VII. FRACTIONNEMENT DU FILTRAT DE CULTURE PHYTOXIQUE SUR UN GEL SEPHADEX G-100

La technique de chromatographie par gel filtration permet, en réalisant un tamisage moléculaire, de séparer les différents constituants d'un mélange d'après leur masse moléculaire. Dans notre cas, l'emploi de cette technique présente un double avantage : savoir si l'activité phytotoxique est attribuable à un ou plusieurs composés et déterminer leur masse moléculaire.

### 1) PRINCIPE

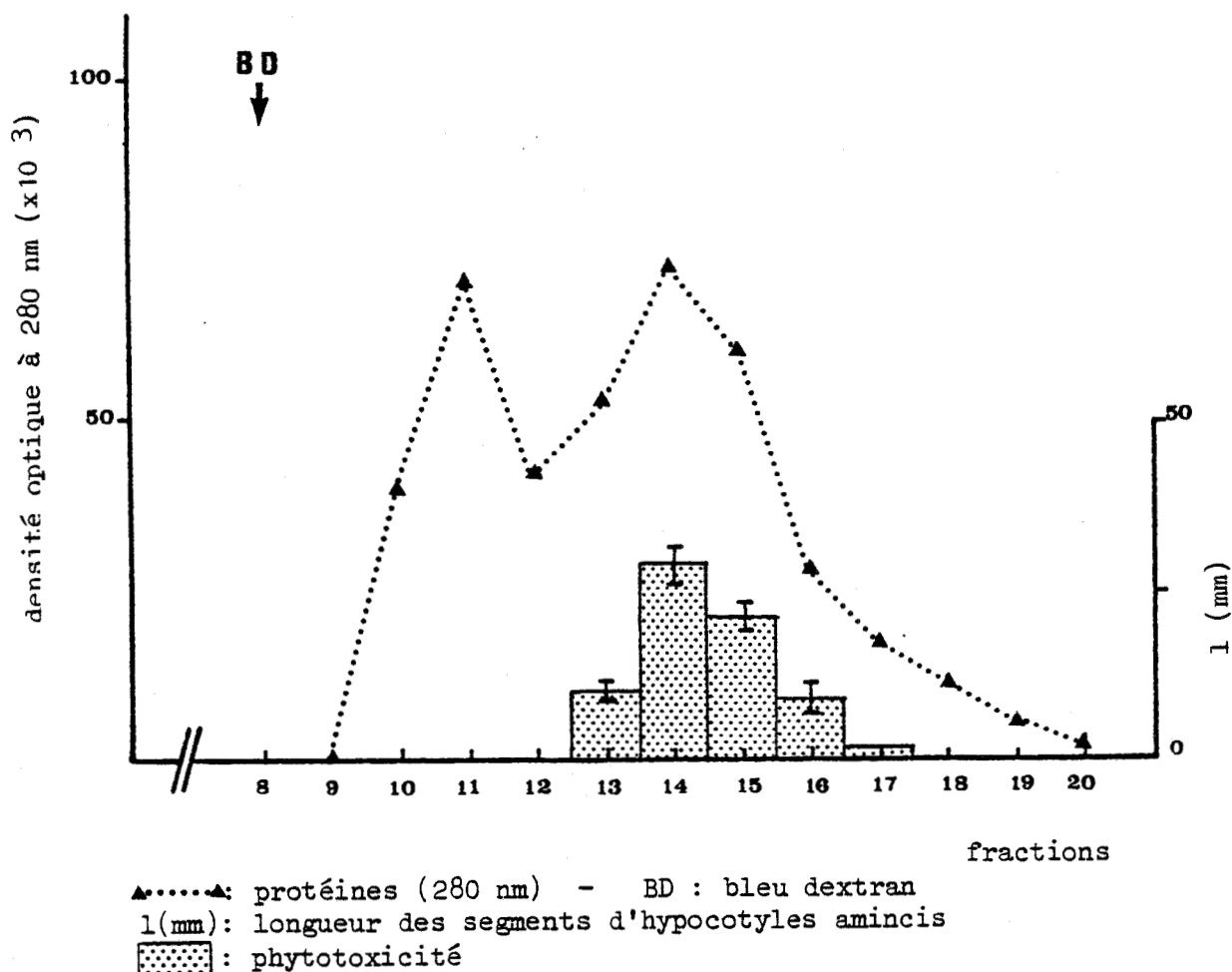
Une colonne à chromatographie (L.K.B. 2137) de 2,6 cm de diamètre est remplie jusqu'à une hauteur de 51 cm d'un gel Sephadex G-100, 10-40  $\mu$ , équilibré avec un tampon phosphate de potassium mono-bipotassique 0,05 M, pH 7,0 renfermant du KCl 0,1 M. Le filtrat lyophilisé provenant de 2 fioles de culture (1 g de parois) est repris par 3 ml du tampon phosphate ; la solution est centrifugée pour éliminer les résidus insolubles puis chromatographiée. L'élution est réalisée avec le tampon d'équilibration, la vitesse étant fixée à 15 ml/h à l'aide d'une pompe péristaltique à vitesse variable "Perpex" ; 20 fractions de 10 ml sont collectées au moyen d'un collecteur de fractions. Toutes ces opérations sont réalisées à basse température. Le diagramme d'élution des protéines du filtrat est établi en mesurant chaque fraction au spectrophotomètre à 280 nm. Du bleu dextran a été également employé pour déterminer le volume mort de la colonne.

Pour déterminer l'activité biologique des fractions, 2 ml sont prélevés dans chaque tube, dialysés contre de l'eau distillée et lyophilisés dans des tubes à hémolyse ; les résidus sont repris par 25  $\mu$ l d'eau distillée et testés biologiquement au moyen du test par décapitation.

## 2) RESULTATS

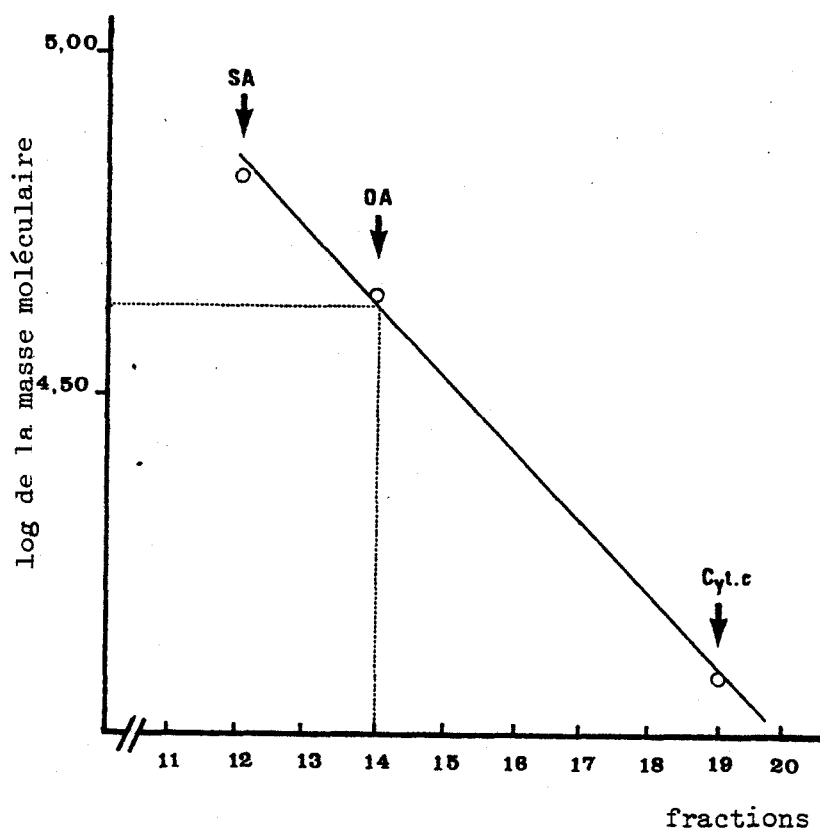
Comme le représente le diagramme d'élution (graphique 20), l'activité phytotoxique se trouve répartie dans les fractions 13 à 17, la valeur maximale étant obtenue pour un volume d'élution de 140 ml. Le profil d'élution permet de penser qu'un seul composé ou plusieurs de masse moléculaire très voisine sont en cause ; les protéines se résolvent en deux zones, l'une d'elles contenant l'activité phytotoxique.

Graphique 20 : Fractionnement sur gel Sêphadex G100 "Superfine" d'un filtrat de culture phytotoxique obtenu en présence de parois cellulaires d'hypocotyles de Chou.



La masse moléculaire des protéines contenues dans la fraction la plus phytotoxique (la fraction 14) a été estimée d'après une courbe étalon établie, dans les mêmes conditions opératoires, avec de la sérum-albumine de boeuf ( $M=67\ 000$ ) (SIGMA), de l'ovalbumine ( $M=45\ 000$ ) (SIGMA) et du cytochrome C de coeur de cheval ( $M=12\ 400$ ) (SIGMA). D'après cette courbe étalon qui est reportée dans le graphique 21, on peut estimer à  $42\ 700 \pm 5\ 200$  la masse moléculaire des protéines éluées avec  $140 \pm 5$  ml de tampon.

Graphique 21 : Estimation de la masse moléculaire des protéines contenues dans la fraction phytotoxique 14.



SA : sérum-albumine ; OA : ovalbumine ; Cyt.c : cytochrome c

## VIII. PURIFICATION DU COMPOSE PHYTOTOXIQUE

La phytotoxicité des filtrats de cultures réalisées en présence de parois cellulaires étant due vraisemblablement à une seule protéine de

masse moléculaire voisine de 42 700, nous avons mis au point un protocole de purification destiné à isoler cette molécule en vue de la caractériser. Toutes les étapes de purification qui seront décrites ci-après se déroulent à +4°C.

L'obtention de grandes quantités de parois cellulaires d'hypocotyles de Chou comme substrat de culture du Champignon a constitué un sérieux obstacle pour récupérer suffisamment d'activité phytotoxique, la taille des hypocotyles de plantules de Chou de 15 jours étant particulièrement petite. Les Choux sont cultivés en phytotrons, à 20°C.

La première étape de purification consiste en une chromatographie par échanges d'ions avec une DEAE Sephadex A<sub>50</sub> (PHARMACIA) équilibrée avec un tampon Tris/HCl 0,05 M de pH 7,6, dans une colonne de 2,6 cm de diamètre et 15 cm de haut.

Le filtrat de 5 fioles de culture, filtré et centrifugé préalablement, est concentré par ultrafiltration jusqu'à environ 10 ml ; le volume est ensuite amené à 100 ml avec le tampon d'équilibration et chromatographié sur l'échangeur. La vitesse de débit est fixée à 6 ml/heure. Après passage de la totalité de la solution, l'échangeur est lavé avec 200 ml du tampon, à la même vitesse ; les composés fixés sont ensuite élués par 150 ml d'un gradient continu en NaCl 0-0,3 M dans le même tampon. La vitesse d'éluion reste inchangée et 20 fractions de 7,5 ml sont collectées ; cette opération terminée, 200 ml de tampon contenant du NaCl 0,5 M sont passés sur la colonne.

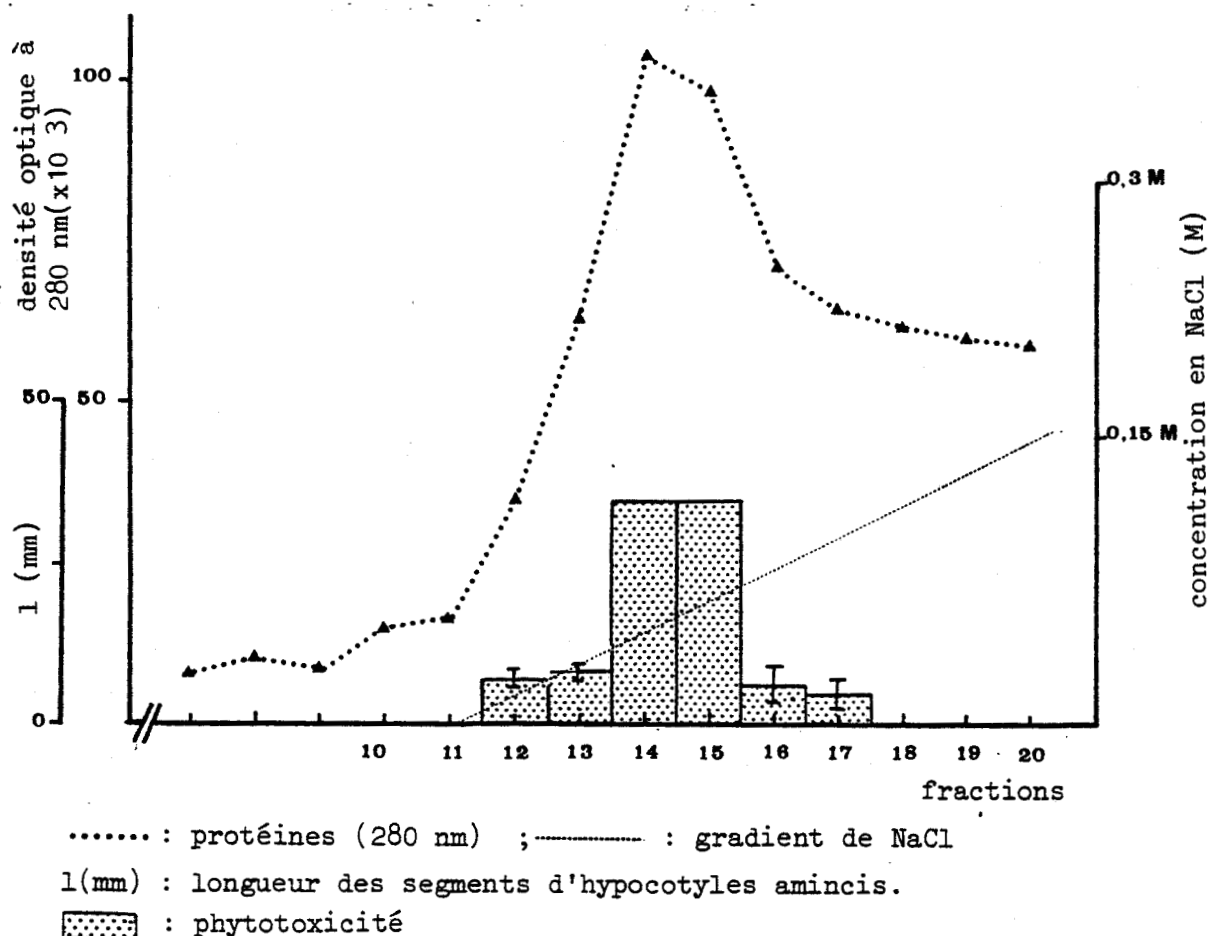
Le profil du gradient continu en NaCl est établi en mesurant chaque fraction par réfractométrie<sup>22</sup>, les protéines sont dosées à 280 nm.

L'effluent ainsi que le tampon de lavage enrichi en NaCl sont concentrés par ultrafiltration, dialysés contre un grand volume d'eau distillée et lyophilisés ; pour chaque fraction du gradient, 2 ml sont également dialysés et lyophilisés. Les résidus sont repris par 25 µl d'eau froide et testés biologiquement.

On ne détecte aucun effet toxique pour l'effluent, ni pour la solution finale de lavage. L'activité biologique est essentiellement retrouvée dans les fractions 14 et 15 du gradient d'éluion (graphique 22) et par conséquent se trouve éluée dans nos conditions opératoires pour une concentration en NaCl voisine de 0,045 M.

\* Nous remercions Mlle MARTINAGE de l'Institut du Cancer pour son concours.

Graphique 22 : Chromatographie sur DEAE Sephadex A<sub>50</sub> d'un filtrat de culture phytotoxique obtenu en présence de parois cellulaires d'hypocotyles de Chou.



La valeur du pH est très importante pour la fixation du composé phytotoxique sur l'échangeur ; en effet, celui-ci n'est pas retenu quand on emploie soit un tampon acétate de sodium 0,05 M de pH 5,0, soit un tampon citrate-phosphate de même molarité de pH 6,5.

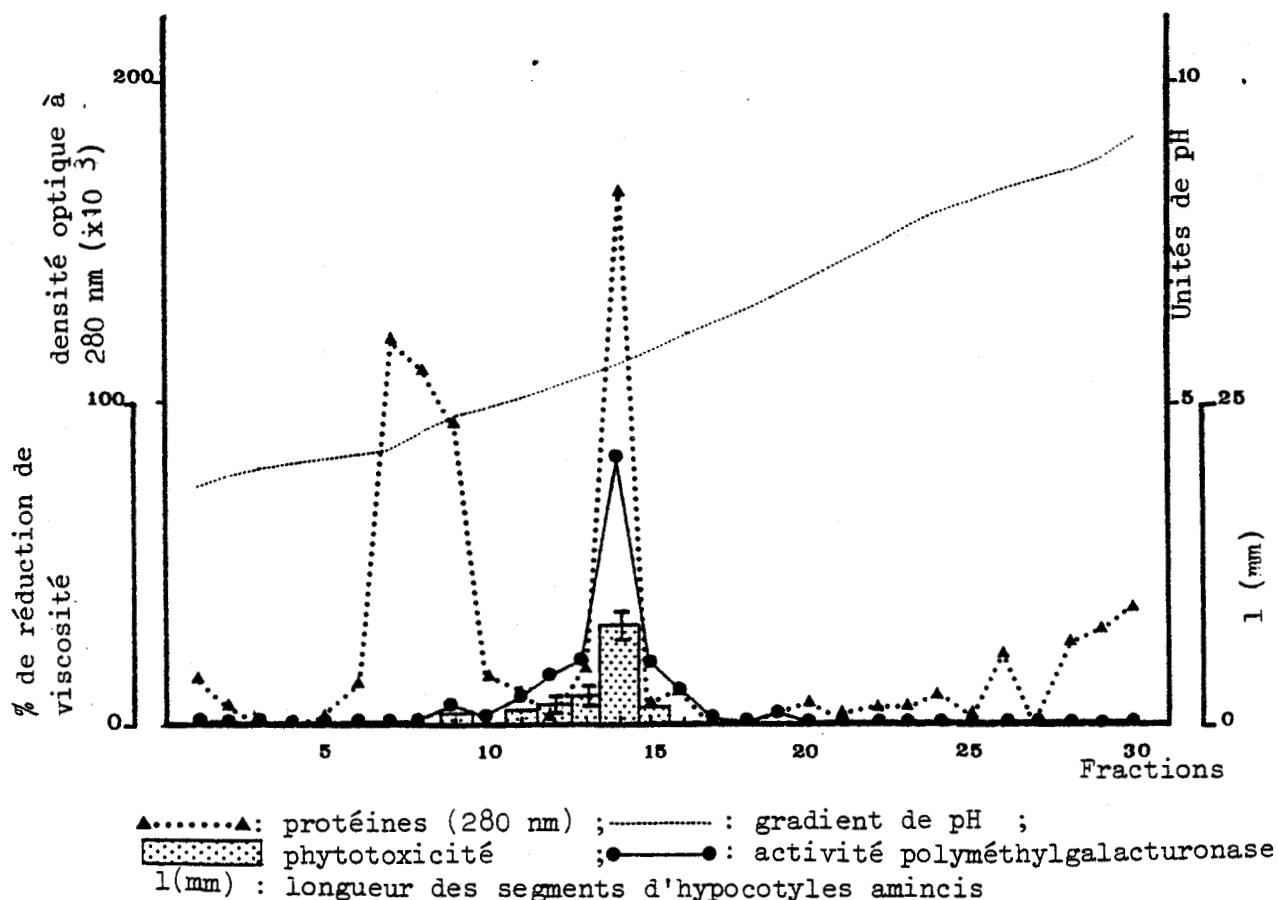
Les fractions 14 et 15 sont ensuite combinées, dialysées et lyophilisées ; le résidu est repris par 3 ml d'une solution d'ampholine pour être soumis dans une seconde étape, à une électrofocalisation préparative sur couche épaisse d'Ultradex (L.K.B.), dans une gamme large de pH 3,5-10 selon une technique décrite par RADOLA, en 1970. L'échantillon est déposé avec un applicateur après que l'on ait concentré le gel pendant deux heures à température

ambiante. Les opérations sont réalisées à l'aide d'un appareil Multiphor (L.K.B. 2117) et à puissance constante grâce à une alimentation stabilisée (L.K.B. 2103). Après un temps de migration de 16 heures, le gel est découpé en 30 bandes de largeur égale au moyen d'une grille de fractionnement. Chaque fraction est recueillie à la spatule dans un entonnoir obstrué par du nylon et éluée par 5 ml d'eau distillée. Les éluats sont ajustés ensuite à 5 ml dans une éprouvette de précision de 10 ml ; le profil du gradient de pH est établi en mesurant chaque fraction au pH mètre et les protéines sont dosées à 280 nm.

L'activité biologique de chaque fraction est mesurée après dialyse et lyophilisation de 1,5 ml d'éluat, les résidus étant repris par 25 µl d'eau distillée.

Les résultats sont représentés dans le graphique 23 ; 6 fractions se révèlent phytotoxiques dont une nettement plus que les 5 autres, la fraction 14 correspondant à un pic étroit de protéine dont le point isoélectrique est de 5,65.

*Graphique 23 : Electrofocalisation en couche épaisse d'Ultradex dans une gamme large de pH (3,5-10) des fractions phytotoxiques 14 et 15 obtenues après chromatographie sur DEAE A<sub>50</sub> du filtrat de culture phytotoxique.*



L'homogénéité de cette protéine est vérifiée par électrophorèse sur disques de gel de polyacrylamide à 7,5 % ; le tampon de migration est du Tris/Glycocolle pH 8,3 ; une intensité de 2 m A est appliquée à chaque tube et du bleu de bromophénol est utilisé pour établir le front de migration. Les protéines sont ensuite colorées au bleu de Comassie R<sub>250</sub>. La coloration ne révèle qu'une seule bande de protéine assez diffuse.

Après dialyse, 0,5 ml de la solution de protéine sont mis en présence des substrats tamponnés correspondant aux différentes glycanases caractérisées antérieurement ; chaque activité est mesurée par les méthodes déjà décrites.

Après 2,5 minutes d'incubation, la viscosité de la solution de la solution de pectine est réduite de 82 %, aucune autre activité n'ayant pu être caractérisée. Par conséquent, la protéine phytotoxique dont le point isoélectrique est de 5,65 est l'endopolyméthylgalacturonase.

Dans le tableau 13 , nous avons reporté le schéma de purification de l'enzyme ainsi que les différentes valeurs permettant d'évaluer le degré de purification et le rendement que nous avons obtenu à partir de 500 ml de milieu de culture.

*Tableau 13 : Représentation des étapes de purification de l'endopolyméthylgalacturonase.*

	Unités d'activité relative (U <sub>AR</sub> )	Protéines (en mg)	Unités d'activité spécifique (U <sub>AR</sub> /protéines)	Rendement %	Degré de Purification
Ultrafiltration sur PM 10	3265	55	59	100	
DEAE Sephadex A <sub>50</sub> fractions 14 et 15	1917	3,7	518	58	18
Electrofocalisation 3,5-10 fraction 14	760	0,27	2814	23	49



Le nombre d'unités d'activité relative ( $U_{AR}$ ) est calculé comme auparavant, d'après le temps mis par l'enzyme à réduire de 50 % la viscosité d'une solution de pectine de citron à pH 4,6. Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY, par rapport à une courbe étalon de sérum-albumine de boeuf. Le rendement exprime le pourcentage d'unités d'activité relative, obtenu à chaque étape de purification, par rapport au nombre initial d'unités. Le degré de purification est calculé en rapportant le nombre d'unités d'activité spécifique, obtenu pour chaque étape de purification, au nombre initial d'unités.

#### IX. RELATION ENTRE AGRESSIVITE DU CHAMPIGNON ET BIOSYNTHESE DE LA POLYMETHYLGALACTURONASE

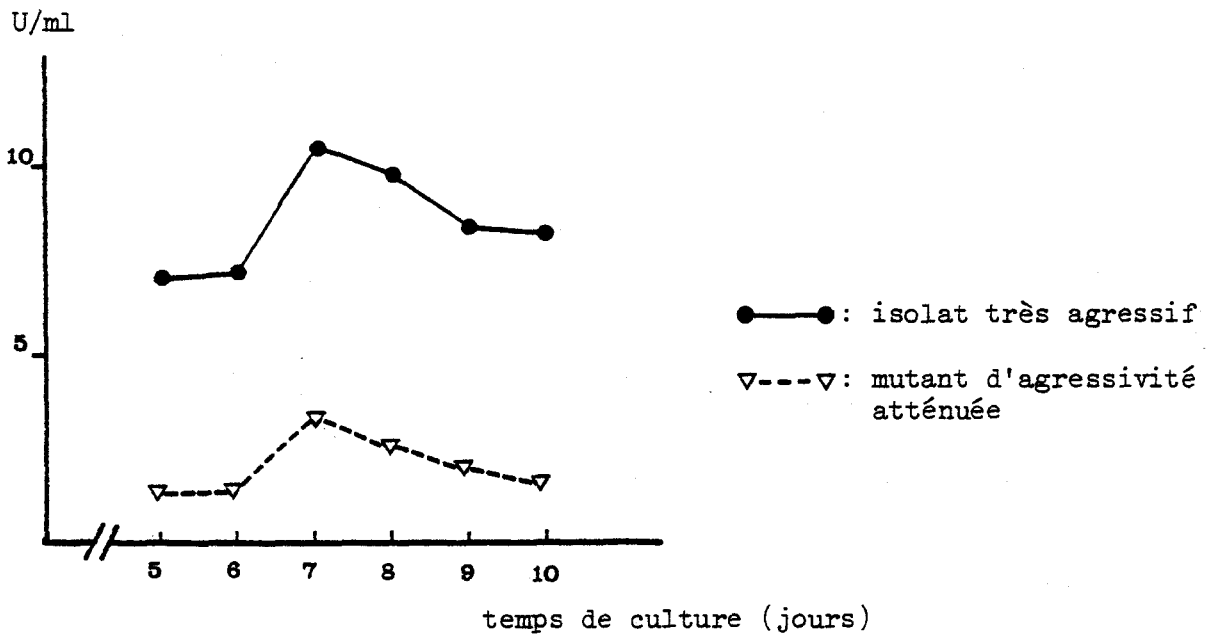
Dans des conditions de production analogues à celles décrites auparavant, nous avons comparé l'évolution de la biosynthèse de l'enzyme entre la souche très agressive et un mutant beaucoup moins agressif induit par l'action de la nitrosoguanidine. Nous n'avons malheureusement pu maintenir en culture le mutant naturel issu de l'isolat agressif ; pour cette raison, nous avons recherché une autre souche par mutagenèse. L'utilisation de concentrations plus élevées en agent mutagène, soit 60  $\mu\text{g/ml}$ , nous a permis de ne récupérer que peu de souches dont l'agressivité a été mesurée en contaminant des plantules de Chou.

Le mutant réussit à provoquer la formation de macules cotylédonaire sur toutes les plantes contaminées, mais 5 jours après la souche agressive. La différence est plus nette en ce qui concerne la nécrose des hypocotyles : au bout de 6 semaines d'incubation, 92 % des plantes contaminées par l'isolat agressif sont nécrosées contre 25 % seulement pour le mutant.

L'activité des filtrats est mesurée par viscosimétrie ; les résultats, exprimés en unités d'activité relative, sont regroupés dans le graphique 24. La biosynthèse de l'enzyme évolue d'une façon à peu près identique dans les deux cas, mais les quantités produites par le mutant sont environ 3 fois

plus faibles que celles émises par la souche agressive ; ceci se renouvelle à chaque répétition. Il existe donc une bonne corrélation entre l'atténuation de l'agressivité et la diminution des quantités de polyméthylgalacturonase produites, *in vitro*, en présence de parois cellulaires.

Graphique 24 : Comparaison entre la biosynthèse, *in vitro*, de la polyméthylgalacturonase par deux souches d'agressivité très différente.



## X. LA POLYMETHYLGALACTURONASE EST UNE ENZYME EXTRACELLULAIRE

Quelle proportion de l'activité totale, produite *in vitro*, représente l'activité extracellulaire de l'enzyme ?.

*Colletotrichum lindemuthianum* produit deux polygalacturonases extracellulaires de masse moléculaire différente et une polygalacturonase restant liée à la surface du mycélium, possédant des caractéristiques identiques à l'une des deux enzymes extracellulaires (CANTENYS et BARTHE, 1979). Notre démarche consiste à savoir si toute l'activité polyméthylgalacturonase produite par *Phoma lingam* se retrouve uniquement sous forme extracellulaire ou bien si elle est

répartie en plusieurs fractions : à l'intérieur et à la surface du mycélium ainsi que dans le milieu de culture, et dans quelles proportions.

Pour cela, au 6ème jour, le contenu de 4 fioles de culture réalisée en présence de parois cellulaires est filtré sur verre fritté ; le mycélium est rincé 2 fois par 200 ml d'eau distillée, les filtrats et les eaux de rinçage étant combinés et centrifugés pour éliminer les conidies. Le mycélium est ensuite remis en suspension dans 100 ml de tampon phosphate mono-bipotassique de forte molarité 0,5 M, pH 7,0 afin de solubiliser les protéines liées à la surface mycélienne par simple augmentation de la force ionique du milieu. Après une nouvelle filtration, la solution tamponnée est conservée ; elle renferme l'activité dite "de surface". Le mycélium est à nouveau rincé à l'eau distillée avant d'être broyé avec un broyeur de type "ultra-turrax", dans 50 ml de tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,0. Après centrifugation, on ne garde que le surnageant avec lequel on mesure l'activité intramycélienne.

Avant d'effectuer les dosages, les trois sources d'enzyme que représentent les filtrats, la solution tamponnée et l'extrait mycélien, sont dialysées ; 5 ml de chaque sont utilisés. Le nombre total d'unités d'activité relative contenu dans chaque fraction, ainsi que les pourcentages respectifs de l'activité totale produite qu'ils représentent, sont :

- pour l'activité extracellulaire	2180 unités soit	97,15 %
- pour l'activité "de surface"	59,5 unités soit	2,65 %
- pour l'activité intramycélienne	4,6 unités soit	0,20 %

L'enzyme produite se trouve dans sa quasi-totalité sous forme extracellulaire, ce qui rend son intérêt encore plus grand dans l'initiation du processus d'attaque du Chou par le Champignon.

En raison de la faible activité produite, nous n'avons pas cherché à déterminer, pour l'instant, si l'enzyme liée à la surface mycélienne correspond à la même protéine ou à une protéine différente de celle de l'enzyme extracellulaire.

## XI. DISCUSSION

Comme la plupart des Champignons phytopathogènes, *Phoma lingam* produit, en culture pure, suffisamment d'enzymes susceptibles de provoquer d'importantes altérations des parois cellulaires dans les plantes contaminées. Le fait que dans des hypocotyles de Chou, la dégradation des parois soit moins rapide que dans le cas d'autres maladies est lié à la biosynthèse plus tardive et moins intense des différentes glycanases dont l'optimum n'est atteint qu'à partir des 7ème et 8ème jours de culture, pour la plupart d'entre elles.

Lorsqu'on fournit une préparation de parois cellulaires de l'hôte à des Champignons phytopathogènes, les différentes glycanases sont émises dans un ordre déterminé (AURIOL, 1973 ; MULLEN et BATEMAN, 1975 ; AGARWAL et al., 1978), les premières enzymes synthétisées étant généralement les polygalacturonases (SHERWOOD, 1966 ; ENGLISH et al., 1971 ; JONES et al., 1972 ; MULLEN et BATEMAN, 1975 ; AGARWAL et al., 1978). Dans des conditions de culture similaires, *Phoma lingam* produit de façon précoce une xylanase, la biosynthèse de cette enzyme étant même pluriphasique puisqu'on obtient une activité maximale aux 4ème, 8ème et 13ème jours de culture. La production optimale des autres enzymes a lieu plus tard, au 7ème jour pour la polyméthylgalacturonase et la pectine trans-éliminase et au 8ème jour pour la laminarinase et la carboxyméthylcellulase. On remarque toutefois, à l'exception de la laminarinase, que toutes les enzymes sont détectables après 3 jours de culture et que les activités deviennent assez importantes dès le 4ème jour. Ces résultats nous amènent à effectuer une première constatation : Dans le cas où les hypocotyles sont contaminés directement par des conidies de *Phoma lingam*, l'action du Champignon ne commence à se manifester qu'à partir du 6ème jour d'incubation ; nous pouvons constater que le temps nécessaire à l'extériorisation des premiers symptômes dans ce cas est tout à fait compatible avec le délai de production des différentes glycanases participant à la dégradation des parois.

L'évolution de la biosynthèse est pratiquement différente d'une enzyme à l'autre ; on sait que les modifications de pH survenant au cours de la culture ont une incidence certaine sur les processus de synthèse (HANCOCK, 1966 ; AGARWAL et al., 1978). Il faut tenir compte également de l'augmentation progressive de la teneur du milieu en mono ou oligosaccharides, résultant de l'hydrolyse des différents polysaccharides et dont nous avons déjà souligné les effets parfois

représseurs. A la concentration de 0,5 %, le xylose ou le glucose ont une incidence différente sur la biosynthèse des glycanases de *Phoma linguam*. Le xylose augmente fortement la production de xylanase et réprime celle de la laminarinase tandis que le glucose inhibe uniquement la biosynthèse de carboxyméthylcellulase.

Compte tenu des résultats que nous avons obtenus, *in vitro* uniquement, l'une de ces enzymes, la polyméthylgalacturonase paraît jouer un rôle fondamental dans la pathogenèse, puisqu'elle est la seule responsable des effets phytotoxiques manifestés par les filtrats de culture. Une bonne relation existe, en outre, entre sa biosynthèse et l'agressivité du Champignon. Pour certaines verticillioses, et dans le cas de la fusariose de la Tomate, les enzymes pectolytiques ont été implicitement associées à l'expression de la maladie (GOTHOSKAR, 1955 ; WOOD, 1961 ; LEAL et VILLANUEVA, 1962 ; BLACKHURST, 1963 ; KAMAL et WOOD, 1965) ; malheureusement, l'utilisation de préparations enzymatiques hautement purifiées amène parfois à reconsidérer ce rôle, car les effets toxiques ne sont pas toujours reproduits (WANG et KEEN, 1970). Ceci démontre bien que seuls les effets biologiques produits par des enzymes pures doivent être pris en compte pour pouvoir affirmer leur rôle pathogénique.

Des enzymes pectolytiques purifiées sont capables d'engendrer, *in vitro*, la mort des cellules végétales en provoquant soit un processus de macération de fragments de tissus de la plante-hôte ou d'autres végétaux, soit en plasmolysant des protoplastes (BATEMAN, 1963 ; MOUNT et al., 1970 ; GARIBALDI et BATEMAN, 1971 ; TSENG et MOUNT, 1974 ; BASHAM et BATEMAN, 1975). L'hypothèse selon laquelle la valeur généralement basique du point isoélectrique des protéines serait responsable des propriétés toxiques a été émise (DREW et al., 1970). Toutefois, BATEMAN a isolé des cultures de *Sclerotium rolfsii*, une polygalacturonase ayant un point isoélectrique acide de 5,2, capable de produire des effets toxiques sur le Haricot (BATEMAN, 1972) ; de même, ULRICH montre qu'une polygalacturonase de point isoélectrique égal à 5,5, produite par *Pseudomonas cepacia*, peut pénétrer à l'intérieur de cellules végétales (ULRICH, 1975).

La polyméthylgalacturonase produite par *Phoma linguam* possède également un point isoélectrique acide. Quelques hypothèses peuvent être émises

concernant son mode d'action. Cette enzyme peut très bien modifier les échanges intercellulaires, comme l'a déjà proposé MOUNT à propos d'une pectate trans-éliminase d'*Erwinia carotovora* (MOUNT et al., 1970), en perturbant les mécanismes d'échanges au niveau du plasmalemma, soit directement, soit indirectement, en altérant les polysaccharides qui lui sont liés et dont plusieurs auteurs ont déjà décrit l'existence (ALBERSHEIM et KILLIAS, 1963 ; ROLAND, 1969 ; ROLAND et VIAN, 1971). L'action préalable de la polyméthylgalacturonase pourrait également permettre l'hydrolyse des polysaccharides pariétaux par les autres glycanases ; ceci a déjà été signalé pour une polygalacturonase d'*Aspergillus flavus* que les auteurs ont qualifiée de "wall-modifying enzyme" (KARR et ALBERSHEIM, 1970). Une autre polygalacturonase produite par *Colletotrichum lindemuthianum* possède les mêmes propriétés (ENGLISH et al., 1972). En ce qui concerne notre problème, nous pensons qu'une étude ultrastructurale et cytochimique fine de l'action de l'enzyme introduite dans les hypocotyles de Chou pourra permettre de comprendre réellement les événements qui aboutissent à la formation de la nécrose.

La polyméthylgalacturonase de *Phoma lingam* possède une masse moléculaire voisine de 42 700, ce qui la différencie d'autres polygalacturonases fongiques de taille plus petite (WANG et KEEN, 1970 ; COOKE et al., 1976 ; LIU et LUH, 1978) ou plus importante (URBANEK et ZALEWSKA, 1975 ; BARTHE et REME 1976 ; COOKE et al., 1976). Dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites précédemment pour la purification de la protéine phytotoxique, on ne caractérise qu'un seul pic d'activité polyméthylgalacturonase lorsqu'on soumet un filtrat de culture à un fractionnement par tamisage moléculaire sur un gel "Séphadex" G 100 "Superfine" ou à une chromatographie par échanges d'ions sur une DEAE Sephadex A<sub>50</sub>. Il n'en est pas de même pour d'autres polygalacturonases fongiques pour lesquelles plusieurs pics d'activité sont obtenus (SWINDBURNE et CORDEN, 1967 ; TANI et NANBA, 1969 ; BARTHE et REME, 1976). Par contre, par électrofocalisation, plusieurs isoenzymes d'importance mineure sont identifiées, leur point isoélectrique respectif étant : 4,70 - 5,25 - 6,05 et 6,70 (graphique 23).

## XII. CONCLUSION

*Phoma linguam* possède donc un équipement enzymatique suffisant pour lui permettre d'altérer profondément les structures pariétales des cellules d'hypocotyles de Chou ; ceci confirme parfaitement les observations faites en microscopie électronique. L'absence d'enzymes capables de dégrader les fibres cristallines de cellulose ainsi que les polymères à mannose, galactose ou arabinose qui entrent généralement dans la constitution des hémicelluloses, pourrait expliquer la présence du matériel fibrillaire contenu dans les vésicules à l'emplacement des parois lorsque l'attaque parasitaire atteint un stade avancé.

Les propriétés biologiques très particulières d'une enzyme, la polyméthylgalacturonase, plus précisément l'isoenzyme ayant un point isoélectrique de 5,65, sa nature extracellulaire ainsi que l'existence d'une relation entre sa biosynthèse et l'agressivité du Champignon, nous permettent d'assimiler cette protéine à une "nécrotoxine" ; cette appellation reflète bien, en effet, le rôle primordial que l'expérimentation conduit à attribuer à cette enzyme dans les processus d'attaque de *Phoma linguam* et permet, en outre, de discerner son action de celle de la sirodesmine PL, phytotoxine à effet secondaire.

## CONCLUSION DE LA DEUXIÈME PARTIE

En conclusion de cette seconde partie, nous pouvons souligner l'importance de l'action des glycanases fongiques et plus particulièrement d'une polyméthylgalacturonase dans l'induction de la nécrose chez le Chou. En effet, les résultats acquis à propos d'une toxine, la sirodesmine PL, ne permettent pas de considérer cette molécule comme ayant une action déterminante dans les mécanismes d'attaque du Champignon. Son rôle plutôt secondaire se limiterait à accélérer un processus de dégradation tissulaire déjà en cours ; néanmoins et pour plus de certitude, il serait bon de savoir exactement à partir de quel stade de l'infection a lieu la biosynthèse de ce composé.

Si la sirodesmine PL ne semble pas jouer un rôle primordial dans le déclenchement du processus nécrotique, en revanche les glycanases paraissent y contribuer fortement ; c'est du moins ce que montrent les observations effectuées au microscope électronique et c'est ce que tend à prouver les nets effets cytotoxiques manifestés par la polyméthylgalacturonase.



*Photo 8 :*

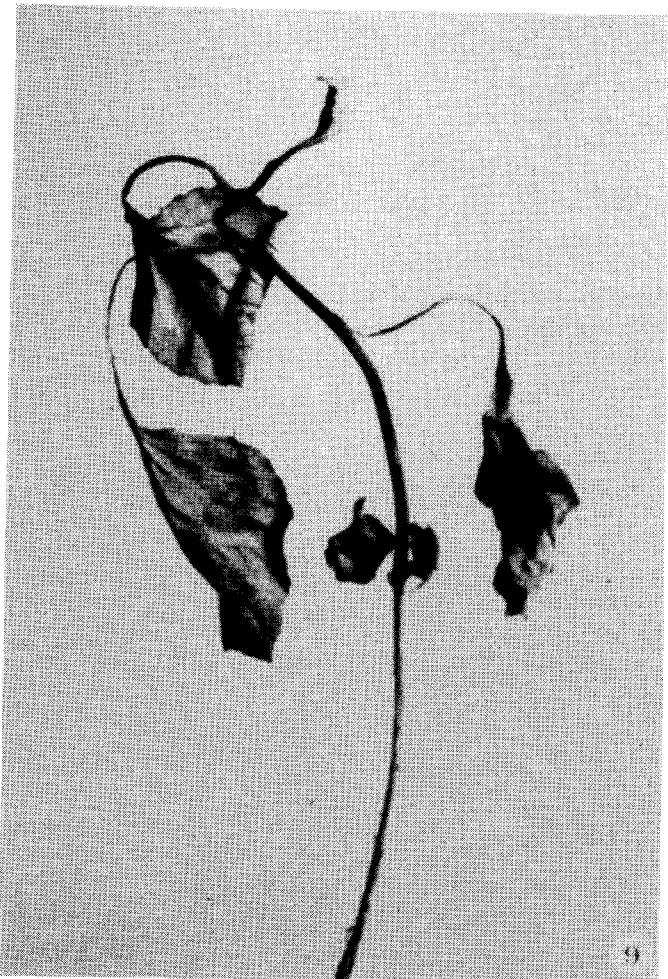
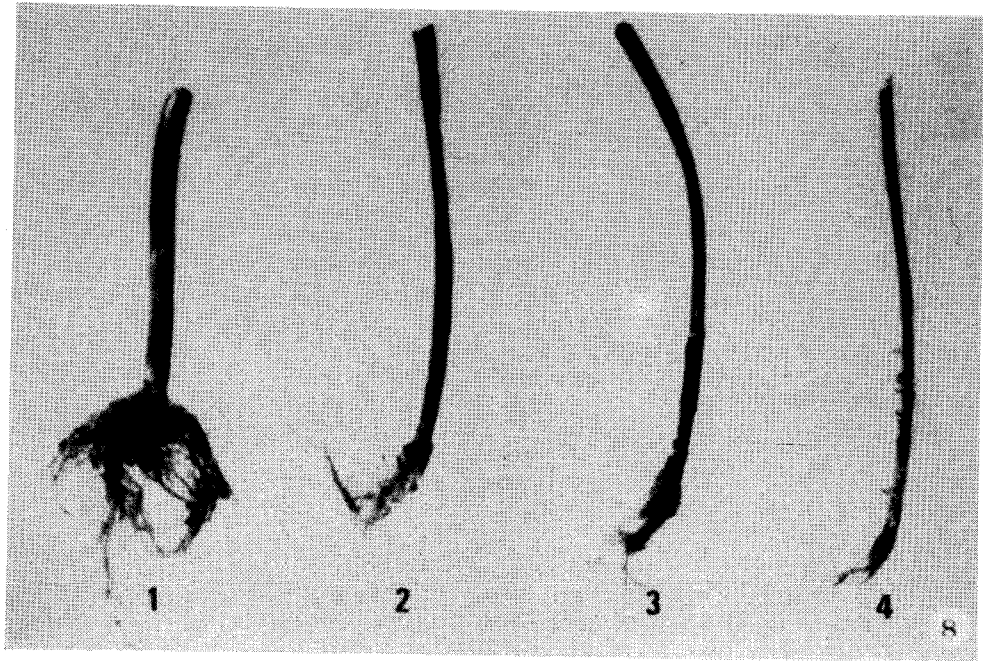
Evolution du symptôme nécrotique induit par l'injection dans des hypocotyles de Chou rouge d'un filtrat de culture réalisée en présence de parois cellulaires d'hypocotyles : bleuissement caractéristique de la région éprouvée (1) puis amincissement et extension progressive du phénomène à l'hypocotyle en entier (2, 3,4).

*Photo 9 :*

Stade final de l'évolution du processus nécrotique provoqué par l'injection du filtrat phytotoxique : dessèchement des organes foliaires et rupture de l'axe hypocotylé au niveau du collet.

*Photo 10 :*

L'injection de doses infraléthales de filtrat phytotoxique dans des hypocotyles de Chou rouge provoque la formation de nombreuses racines adventives au niveau de la région éprouvée.

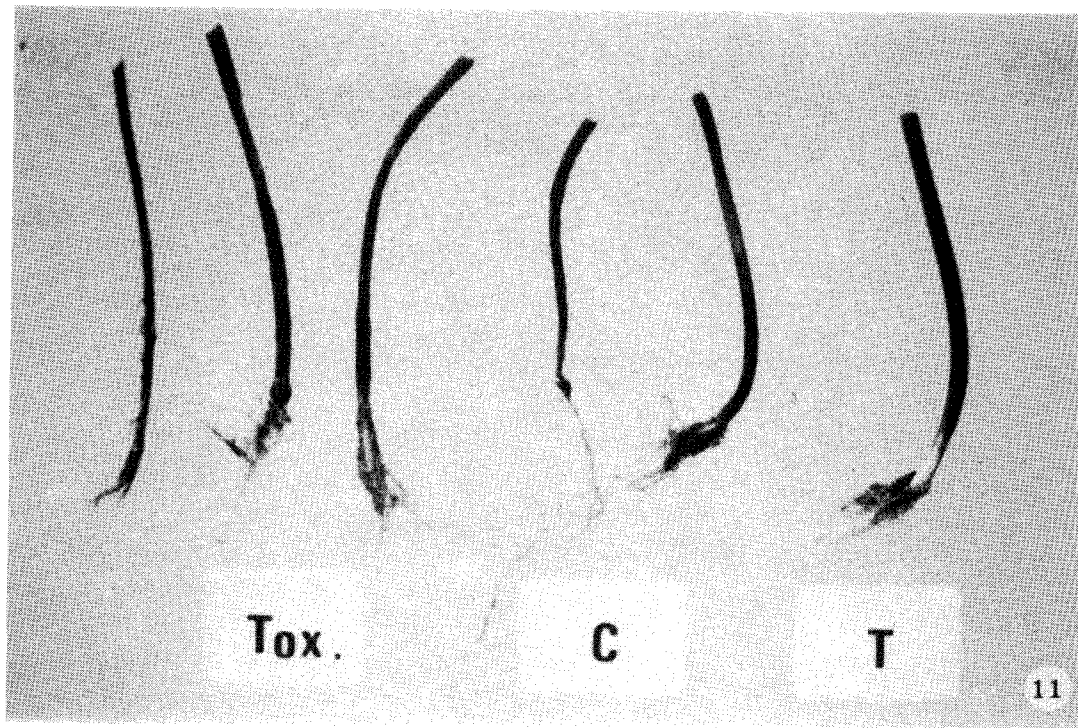


*Photo 11 :*

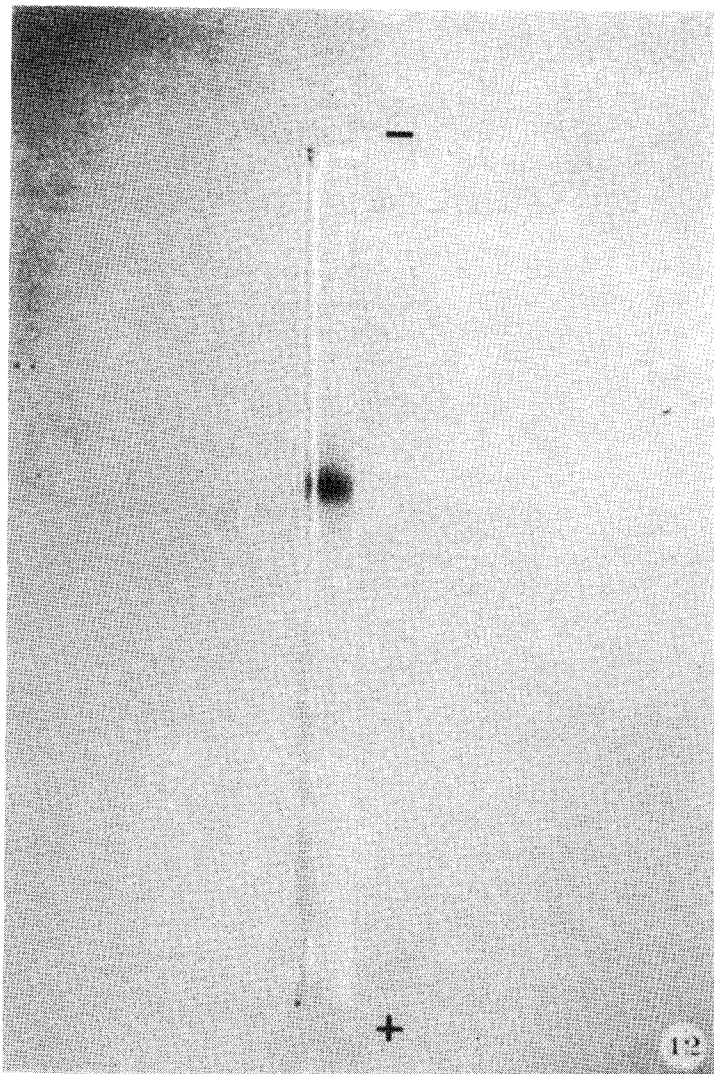
Comparaison entre les effets du filtrat phytotoxique (Tox.) et ceux du Champignon (C) sur des hypocotyles de Chou rouge. (T) : hypocotyle témoin.

*Photo 12 :*

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de la molécule phytotoxique purifiée après chromatographie sur DEAE Sephadex A<sub>50</sub> et électrofocalisation préparative.



11



BUS  
LILLE

12

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Pour dégager les principaux résultats de notre travail et en indiquer quelques perspectives de recherche, il convient de le situer dans l'ensemble des connaissances relatives à l'évolution de la maladie sur les Crucifères attaquées par *Leptosphaeria maculans*.

Les études épidémiologiques très nombreuses effectuées sur des espèces cultivées du genre *Brassica*, allant des diverses variétés de Chou aux différents cultivars de Colza, montrent qu'il existe de multiples conditions favorisant plus ou moins la contamination mais conduisant à un même processus infectieux une fois l'agent pathogène en place.

La contamination naturelle des Crucifères maraîchères et oléagineuses ne s'effectue pas de la même façon ; pour les premières, le rôle des semences contaminées est prépondérant en raison de la forte densité des semis réalisés en pépinières (environ 80 kg de graines/ha). Dans ce cas, la maladie se manifeste généralement par une fonte de semis et pour les plantes dont la graine est saine, par une attaque plus tardive aboutissant à la nécrose du collet visible parfois lors du repiquage en champ mais souvent beaucoup plus tardivement. Pour

les plantes oléagineuses de plein champ le processus est différent ; les semis sont beaucoup moins denses (4 kg de graines/ha) et ce sont surtout les résidus de culture qui portent la responsabilité de la transmission de la maladie. En effet, quelles que soient les régions, les données climatiques, les cultivars utilisés et la qualité des graines, il n'existe pas de cultivars de Colza indemnes de la maladie ; en conséquence après l'abaissement de la température estivale, des périthèces se forment à l'automne sur les pailles demeurées à la surface du sol après la récolte. Dès que les conditions atmosphériques le permettent, les ascospores sont libérées et vont contaminer massivement les nouvelles cultures. Si l'attaque a lieu très tôt après la levée, les plantules présenteront rapidement une nécrose léthale du collet tandis qu'une contamination plus tardive (fin octobre) n'engendrera de symptômes graves qu'à la reprise de la végétation. La maladie de la nécrose des Crucifères est donc une maladie cryptogamique qui, selon le stade physiologique de la plante au moment de la contamination, peut évoluer en une nécrose léthale rapidement ou plus lentement.

Notre première démarche a consisté à reproduire d'une manière répétitive la maladie dans des conditions contrôlées de culture. Pour cela, nous avons limité notre étude aux contaminations de plantules au stade cotylédonaire. A partir de là, nous avons été confronté d'une part avec le mode d'infection des plantes et d'autre part avec la recherche d'un hôte très sensible. La difficulté d'obtenir régulièrement des périthèces, *in vitro*, nous a contraint à préférer les pycniospores comme source d'inoculum ; l'isolement d'une souche agressive nous a permis de constater qu'en conditions contrôlées, les conidies possèdent un pouvoir d'infectivité élevé alors qu'elles ne jouent qu'un rôle tout à fait mineur dans la contamination naturelle des cultures. Confrontées à des espèces cultivées et parentes du genre *Brassica* -le Chou, la Navette et le Colza- ces conidies provoquent des symptômes d'amplitude très variable selon l'espèce, le cultivar et la température. Grâce à la très grande sensibilité qu'il manifeste au Champignon, ce qui avait d'ailleurs été perçu par différents auteurs, le Chou constitue le matériel végétal idéal pour étudier les modalités de l'agression parasitaire chez un hôte très sensible. De plus, alors que la température n'a aucune influence sur la résistance du Chou à l'agression, nous avons montré que l'expression de la tolérance chez certains cultivars de Colza est liée à une température de culture relativement basse. Ceci permet de comprendre en partie pourquoi en raison de l'affaiblissement de la résistance dû à des températures plus élevées, l'implantation du Colza connaît certaines difficultés dans des régions plus chaudes telle que l'Espagne.

Le modèle biologique de base étant défini, nous avons pu aborder l'aspect cytophysiologique du parasitisme en examinant dans un premier temps à l'échelle ultrastructurale, les perturbations provoquées dans les hypocotyles par l'agent pathogène. Certaines observations se sont révélées particulièrement intéressantes ; la première concerne la pénétration passive des conidies dans la plante par les stomates. On comprend ainsi aisément pourquoi, dans la nature, les ascospores jouent un rôle épidémiologique beaucoup plus déterminant que les pycniospores. Quelques ascospores suffisent pour contaminer une plante et y provoquer une nécrose létale ; ces ascospores germent très vite même à basse température, contrairement aux pycniospores, et les filaments mycéliens émis sont capables de pénétrer rapidement soit par les ouvertures naturelles soit en perforant la cuticule et la paroi de l'épiderme. Pour que les pycniospores puissent infecter une plante, il faut qu'elles soient émises en très grand nombre de façon à ce que quelques unes pénètrent par l'ouverture des stomates. Le second point se rapporte au mode d'envahissement de la plante entière par le Champignon. L'observation de nombreuses sections d'hyphes à l'intérieur des vaisseaux du bois d'hypocotyles et de cotylédons contaminés apporte la preuve que le mycélium peut migrer très rapidement à travers les différents organes de la plante. Ceci permet de comprendre que des inoculations réalisées uniquement au niveau des hypocotyles de Chou puissent engendrer la formation de macules cotylédonaires, toujours localisées soit en bordure des nervures soit en bordure du cotylédon, ceci bien avant l'apparition de la nécrose. On peut également supposer que la propagation rapide du mycélium dans les tissus conducteurs de la hampe florale permet au Champignon d'accéder aux organes reproducteurs de la plante et de provoquer ainsi la contamination des graines à l'intérieur des siliques ; cet aspect fait l'objet de travaux actuellement en cours.

Un troisième élément positif peut être dégagé de l'étude ultrastructurale. En effet, les mécanismes d'action du Champignon sur les structures cellulaires laissent penser que le processus nécrotique se déclenche avec la lyse progressive et intense des parois cellulaires plutôt que par suite de l'action d'une toxine diffusible. Dans le cadre de la recherche des déterminants moléculaires du pouvoir pathogène, nous avons caractérisé la production d'une toxine, la sirodesmine PL, dans les filtrats de culture du Champignon ainsi que dans les hypocotyles nécrosés ; toutefois, certains aspects concernant son rôle pathogénique nous conduisent à écarter l'hypothèse selon laquelle cette molécule

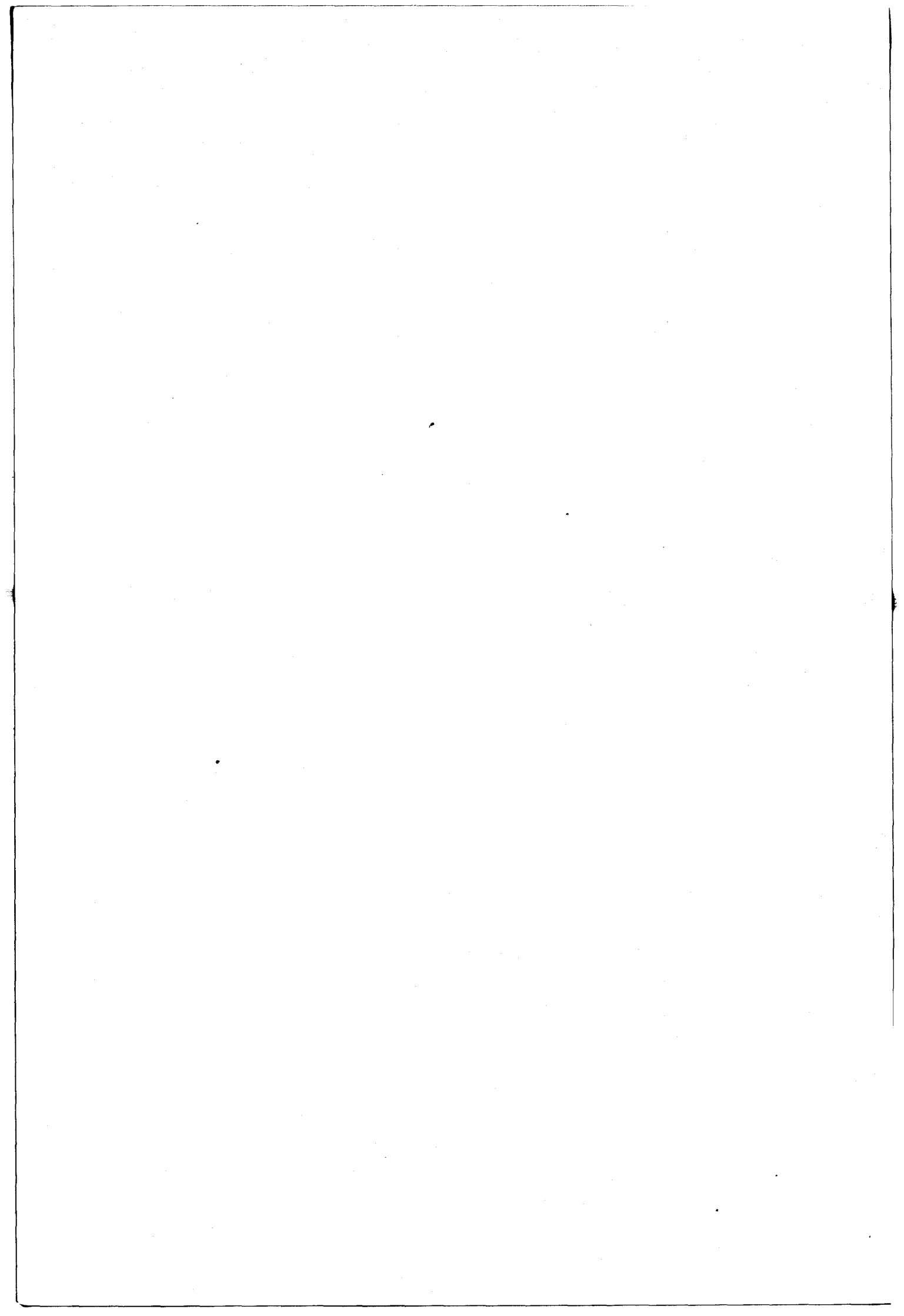
initierait le processus de la nécrose. Néanmoins, comme nous l'avons mentionné auparavant, il serait intéressant de situer sa biosynthèse par rapport à l'évolution de la maladie. Ceci permettrait de savoir si cette toxine joue un rôle synergique des autres déterminants du pouvoir pathogène en participant aux processus de dégradation tissulaire ou si sa synthèse n'est qu'un évènement tardif de ce processus.

Alors qu'aucune observation à l'échelle ultrastructurale ne permet d'envisager une intervention précoce de la sirodesmine PL, par contre l'action des glycanases fongiques apparaît déterminante dans la pathogenèse. Le Champignon produit des enzymes capables de dégrader des substrats de nature pectohémicellulosique ce qui se manifeste sur le plan cytologique par l'observation de la migration du mycélium dans la région sous cuticulaire de la paroi de l'épiderme qui est riche en ce type de composés. Parmi ces enzymes, la polyméthylgalacturonase présente un intérêt particulier en raison de ses effets phytotoxiques, mais cette enzyme n'est pas la première émise dans les filtrats de culture en présence de parois cellulaires ; une xylanase est biosynthétisée beaucoup plus précocement. En est-il de même dans les hypocotyles contaminés et quelle est la contribution effective de ces différentes enzymes dans la dégradation des parois ? Le temps imparti pour présenter ce travail ne nous a malheureusement pas permis de développer de façon plus approfondie cette étude enzymologique et en particulier l'action *in situ* de ces biocatalyseurs ; ceci constituera l'objet de nos prochaines recherches.

Si les propriétés catalytiques de ces différentes enzymes déterminent effectivement le succès de l'infection, on peut donner une explication purement physiologique au net ralentissement de l'évolution de la maladie observé dans la nature pendant l'hiver. On peut concevoir que la chute des températures provoque durant cette période une diminution de la vitesse d'hydrolyse des polysaccharides pariétaux soit directement soit en modifiant la physiologie de la plante. En tout cas ceci suffirait à rendre peu probable l'hypothèse selon laquelle la reprise de la maladie au printemps serait due à une nouvelle émission d'ascospores. Du reste, en conditions contrôlées, on observe que la vitesse d'action du Champignon dans les plantes contaminées est toujours proportionnelle à la température ambiante.



Malgré son caractère incomplet, l'étude enzymologique nous ouvre des perspectives dont certaines pourront se concrétiser dans un avenir très proche. Le but que nous nous sommes fixé est d'essayer de comprendre les mécanismes qui provoquent une réaction de tolérance au Champignon chez certains cultivars de Colza pour éventuellement faire déboucher notre étude fondamentale sur le domaine de la sélection en agronomie. A cet effet, nous envisageons de déterminer dans l'immédiat la sensibilité de nombreux cultivars de Colza au filtrat de culture réalisé en présence de parois cellulaires ainsi qu'à la polyméthylgalacturonase purifiée. Les premiers essais que nous avons réalisés avec le filtrat sur quelques cultivars sont encourageants. Toutefois, l'action de l'enzyme pure ne peut être envisagée à grande échelle qu'en mettant au point une nouvelle méthode de production et de purification permettant d'en obtenir des quantités appréciables. En outre, les propriétés physicochimiques de cette protéine devront être approfondies.



## B I B L I O G R A P H I E

- AGARWAL G.P., KULHARA D. et BISEN P.S., 1978. - Factors affecting the *in vitro* production of pectolytic and cellulolytic enzymes by bean leaf pathogen *Curvularia lunata* and *Colletotrichum demotium*. *Biochem. Physiol. Pflanz., DDR*, 172, 3, 277-283.
- ALABOUVETTE C., 1969. - Contribution à l'étude des modes de conservation et de dissémination de *Phoma lingam* (Tode) Desm. Thèse 3ème Cycle, Nancy.
- ALABOUVETTE C. et BRUNIN B., 1970. - Recherches sur la maladie du Colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. I. Rôle des restes de culture dans la conservation et la dissémination du parasite. *Ann. Phytopathol.*, 2 (3), 463-475.
- ALABOUVETTE C., BRUNIN B. et LOUVET J., 1974. - Recherches sur la maladie du Colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. IV. Pouvoir infectieux des pycniospores et sensibilité variétale. *Ann. Phytopathol.*, 6 (3), 265-275.
- ALBERSHEIM P., 1960. - Über die Bildung von ungesättigten Abbauprodukten durch ein pektinabbauendes Enzym. *Helv. Chem. Acta*, 43, 1482-1426.
- ALBERSHEIM P. et KILLIAS U., 1963. - Histochemical localization at the electron microscope level. *Am. J. Bot.*, 50, 732-745.
- ALBERSHEIM P., JONES T.M. et ENGLISH P.D., 1969. - Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 7, 171-194.
- ANDERSON J.L. et WALKER J.C., 1962. - Histology of watermelon anthracnose. *Phytopathology*, 52, 650-653.

- ARGOUDELIS A.D. et REUSSER F., 1971. - Melanicidins, a new family of antibiotics. *J. Antibiotics*, 24, 383-389.
- ARGOUDELIS A.D., 1972. - Melanicidins II, III and IV, new "3-6-epidithiodiketopiperazine" antibiotics. *J. Antibiotics*, 25, 171-178.
- ARINZE A.E. et SMITH I.M., 1979. - Production of polygalacturonase complex by *Botriodiplodia theobromae* and its involvement in the rot of sweet potato. *Physiol. Plant Pathol.*, 14 (2), 141-152.
- ARUN NEHEMIAH K.M., 1978. - Trans eliminative degradation of carboxymethylcellulose by *Alternaria brassicae* (Berk.). *Acta bot. indica*, IND, 6 (1), 118-120.
- AURIOL P., 1973. - Recherches sur le mécanisme d'infection de *Colletotrichum lagenarium*. Action sur les polysides des parois cellulaires d'un hôte sensible. Thèse, Toulouse.
- BAKER C.J., WHALEN C.H. et BATEMAN D.F., 1977. - Xylanase from *Trichoderma pseudokoningii*: purification, characterization and effects on isolated plant cell walls. *Phytopathology*, 67, 1250-1258.
- BARBETTI M.J., 1975. - Effects of temperature on development and progression in rape of crown canker caused by *Leptosphaeria maculans*. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 15, 705-708.
- BARBETTI M.J., 1976. - The role of pycniospores of *Leptosphaeria maculans* in the spread of blackleg disease in rape. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 16, 911-914.
- BARTHE J.P. et REME A.M., 1976. - Etude des races physiologiques de *Colletotrichum lindemuthianum*: polygalacturonases extra et intracellulaires produites par les races  $\beta$  et  $\delta$  *in vitro*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 282 (12), 1163-1166.
- BASHAM H.G. et BATEMAN D.F., 1975. - Relationship of cell death in plant tissue treated with a homogenous endo-pectate lyase to cell wall degradation. *Physiol. Plant Pathol.*, 5, 249-261.
- BASSETT C., SHERWOOD R.T., KEPLER J.A. et HAMILTON P.B., 1967. - Production and biological activity of fomannosin, a toxic sesquiterpene metabolite of *Fomes annosus*. *Phytopathology*, 57, 1046-1052.
- BATEMAN D.F., 1963. - The "macerating enzyme" of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 53, 1178-1186.
- BATEMAN D.F. et MILLAR R.L., 1966. - Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 4, 119-146.
- BATEMAN D.F., 1970. - Depletion of the galacturonic acid content in bean hypocotyl cell walls during pathogenesis by *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 60, 1846-1847.
- BATEMAN D.F., 1972. - The polygalacturonase complex produced by *Sclerotium rolfsii*. *Physiol. Plant. Pathol.*, 2, 175-184.

- BATEMAN D.F., JONES T.M. et YODER O.C., 1973. - Degradation of corn cell walls by extracellular enzymes produced by *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology*, 63, 1523-1529.
- BAUTE R., DEFFIEUX G., BAUTE M.A., FILLEAU M.J. et NEVEU A., 1976. - Un nouveau metabolite fongique du groupe des épithio-3,6-dioxo-2,5 pipérazines : l'épicorazine A, isolée d'une souche d'*Epicoccum nigrum* Link. (Adéomycètes). *Tetrahedron Letters*, 44, 3943-3944.
- BERNARD N., 1909. - Remarques sur l'immunité chez les Plantes. *Extr. Bull. Inst. Pasteur*, tome VII, n° 9, 369.
- BHUSHAN MANDAVA N., ORELLANA R.G., WARTHEN J.D., WORLEY J.F. Jr., DUTKY S.R., FINEGOLD H. et WEATHING B.C., 1980. - Phytotoxins in *Rhizoctonia solani* : Isolation and biological activity of m-hydroxy and m-methoxyphenylacetic acids. *J. Agric. Food Chem.*, 28 (1), 71-75.
- BIEHN W.L. et DIMOND A.E., 1970. - Effect of carbon sources on the production of polygalacturonase by *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*, 60, 1284 (Abstr.).
- BIEHN W.L. et DIMOND A.E., 1971. - Effect of pectin source and sugars on polygalacturonase production by *Ceratocystis ulmi*. *Phytopathology*, 61, 745-746.
- BILODEAU M., 1973. - Etude de la carboxyméthylcellulase produite par *Ceratocystis ulmi*. Thèse de Maîtrise, Département de Biochimie, Univ. Laval, Québec (d'après OUELETTE, 1978).
- BLACKHURST F.M., 1963. - Induction of *Verticillium* wilt disease symptoms in detached shoots of resistant and of susceptible tomato plants. *Ann. Appl. Biol.*, 52, 79-88.
- BOEREMA G.H. et VAN KESTEREN H.A., 1964. - The nomenclature of two fungi parasitizing *Brassica*. *Persoonia*, vol. 3, 17-28.
- BOUDART G., 1978. - Phytotoxine et nécrose des hypocotyles de Crucifères infectées par *Leptosphaeria maculans* (Ces. et de Not.) et sa forme imparfaite *Phoma linguam*. *Phytopathol. Z.*, 92, 76-82.
- BOUSQUET J.F. et BARBIER M., 1972. - Sur l'activité phytotoxique de 3 souches de *Phoma exigua* et la présence de cytochalasine B (ou phomine) dans leur milieu de culture. *Phytopathol. Z.*, 75, 365-367.
- BOUSQUET J.F., 1973. - Isolement d'une substance phytotoxique des filtrats de culture de *Phoma exigua* var. *inoxidabilis*. *Ann. Phytopathol.*, 5 (3), 289-291.
- BOUSQUET J.F., PEREZOU J.P., DEVRYS M. et BARBIER M., 1977. - Sur une toxine produite par le Champignon *Phoma linguam* Tode, parasite du Colza. Isolement et propriétés. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 284 (11), 927-929.
- BRACKER C.E., 1967. - Ultrastructure of fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 5, 343-374.

- BRACKER C.E., 1968. - Ultrastructure of the haustorial apparatus of *Erysiphe graminis* and its relationship to the epidermal cell of barley. *Phytopathol.*, 58, 12-30.
- BRACKER C.E. et LITTLEFIELD L.J., 1973. - Structural concepts of host pathogen interfaces. In : Fungal pathogenicity and the plant's response, BYRDE R.J.W., CUTTING C.V. Eds., London, Academic Press, 159-318.
- BREWER D., HANNAH D.E. et TAYLOR A., 1966. - The biological properties of 3,6-epidithiadiketopiperazines. Inhibition of growth of *Bacillus subtilis* by gliotoxins, sporidesmins and chaetomin. *Can. J. Microbiol.*, 12, 1187-1195.
- BREWER D. et TAYLOR A., 1967. - The biological properties of 3,6-epidithiadiketopiperazines. Degradation of gliotoxin-B by *Bacillus subtilis* (HLX 373). *Can. J. Microbiol.*, 13, 1577-1589.
- BREWER D., DUNCAN J.M., JERRAM W.A., LEACH C.K., SAFE S., TAYOR A., VINING L.C., ARCHIBALD R. Mc G., STEVENSON R.G., MIROCHA C.J. et CHRISTENSEN C.M., 1972. - Ovine ill-thrift in Nova Scotia. 5 - the production and toxicology of chaetomin, a metabolite of *Chaetomium* spp. *Can. J. Microbiol.*, 18, 1129-1137.
- BRIAN P.W., CURTIS P.J., HEMMING H.G., JEFFERYS E.G., UNWIN C.H. et WRIGHT J.M., 1951. - Alternaric acid : a biologically active metabolic product of *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) Jones et Grout. Production, isolation and anti-fungal properties. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 619-632.
- BRIAN P.W., ELSON G.W., HEMMING H.G. et WRIGHT J.M., 1952. - The phytotoxic properties of alternaric acid in relation to the etiology of plant diseases caused by *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) Jones et Grout. *Appl. Biol.*, 39 (21), 308-321.
- BRUCE W.E., DUTCHER J.D., JOHNSON J.R. et MILLER L.L., 1944. - Gliotoxin, the antibiotic principal of *Gliocladium fimbriatum*. II. General chemical behaviour and crystalline derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 614-616.
- BRUNIN B., 1970. - La nécrose du collet de Colza. Rôle étiologique des ascospores de *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. Etude histologique de l'infection. Thèse 3ème Cycle, Lille.
- BRUNIN B. et LACOSTE L., 1970. - Recherches sur la maladie du Colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. II. Pouvoir pathogène des ascospores. *Ann. Phytopathol.*, 2, 3, 477-488.
- BUDDIN W., 1934. - The canker and the dry rot diseases of swedes. *Ministry of Agric. and Fish.*, London, Bulletin 74, 47.
- BUGBEE W.M., 1973. - Sucrose and cell walls as factors affecting *Phoma* storage rot of sugar beet. *Phytopathology*, 63, 480-484.
- BUSH L.V. et WALKER J.C., 1958. - Studies of cucumber anthracnose. *Phytopathology*, 48, 302-304.

- CUNNINGHAM G.C., 1927. - Dry-rot of swedes and turnips : its cause and control. *N. Zeal. Dept. Agric. Bull.* 133.
- CURTIS P.J., GREATBANKS D., HESP B., FORBES CAMERON A. et FREER A.A., 1977. - Sirodesmins A, B, C and G, antiviral epipolythiopiperazine-2,5-diones of fungal origin : X-Ray analysis of Sirodesmin A diacetate. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 180-189.
- DARGENT R. et TOUZE A., 1974. - Etudes cinétiques en microscopie électronique des interactions entre *Colletotrichum lagenarium* et les cellules foliaires de *Cucumis melo*. *Can. J. Bot.*, 52, 1319-1327.
- DAY P.R. et SCOTT K.J., 1973. - Scanning electron microscopy of fresh material of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Plant Pathol.*, 3, 433-435.
- DE BARY A., 1886. - Ueber einige Sclerotinien und Sclerotinienkrankheiten. *Bot. Zeit.*, 44, 377-474.
- DELON R., REISINGER O. et MANGENOT F., 1973. - Etude aux microscopes photonique et électronique de racines de Tomate var. "Marmande" atteintes de la maladie liégeuse. *Ann. Phytopathol.*, 5, 151-162.
- DELON R., 1975. - Etude ultrastructurale et cytochimique de racines de Tomate (*Lycopersicum esculentum* var. Marmande) parasitées par *Colletotrichum coccodes* (Wallr) Hughes. *Phytopathol. Z.*, 84, 4, 322-342.
- DELON R. et MANGENOT F., 1975. - Etude ultrastructurale des interactions hôte-parasite. I. L'hétérosporiose de l'Iris. *Can. J. Bot.*, 53, 18, 1994-2005.
- DEMAZIERE J.B., 1846. - Treizième notice. *Ann. Sci. Nat.*, III, ser. VI, 79.
- DE VAY J.E., LUKEZIC F.L., SINDEN S.L., ENGLISH H. et COPLIN D.L., 1968. - A biocide produced by pathogenic of *Pseudomonas syringae* and its possible role in the bacterial canker disease of peach trees. *Phytopathology*, 58, 95-101.
- DIMOND A.E. et WAGGONER P.E., 1953. - On the nature and the role of vivotoxins in plant disease. *Phytopathology*, 43, 229-235.
- DONE J., MORTIMER P.H., TAYLOR A. et RUSSELL D.W., 1961. - The production of sporidesmin and sporidesmolides by *Pithomyces chartarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 26, 207-222.
- DORN S., 1974. - Zur Rolle von Isomarticin, einem Toxin von *Fusarium martii* var. *pisi*, in der Pathogenese der Stengel - und Wurzelfäule an Erbsen. *Phytopathol. Z.*, 81, 193-239.
- DOUX-GAYAT A., AURIOL P., LOSELEAU J.P. et TOUZE A., 1978. - Degradation of muskmelon cell wall by the xylanases of *Colletotrichum lagenarium*. *Plant Physiol.*, 42, 301-306.

- BUSHNELL W.R., 1972. - Physiology of fungal haustoria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 10, 151-176.
- BYTHER R.S. et STEINER G.W., 1972. - Use of helminthosporoside to select sugarcane seedlings resistant to eye spot disease. *Phytopathology*, 62, 466-470.
- BYWATER J., 1959. - Infection of peas by *Fusarium solani* var. *martii* forma 2 and the spread of the pathogen. *Brit. Mycol. Soc. Trans.*, 42, 201-212.
- CAMPBELL R., 1970. - An electron microscope study of exogenously dormant spores, spore germination, hyphae, and conidiophores of *Alternaria brassicicola*. *New Phytol.*, 69, 287-293.
- CANTENYS D. et BARTHE J.P., 1979. - Etude comparée des polygalacturonases extracellulaires et des polygalacturonases "de surface" produites, *in vitro*, par *Colletotrichum lindemuthianum*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 289, 1183-1186.
- CERVONE F., SCALA A., FORESTI M., CACACE M.G. et NOVIELLO C., 1977. - Endopolygalacturonase from *Rhizoctonia fragariae*. Purification and characterization of two isoenzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 482, 379-385.
- CERVONE F., SCALA A. et SCALA F., 1978. - Polygalacturonase from *Rhizoctonia fragariae* : further characterization of two isoenzymes and their action towards strawberry tissue. *Physiol. Plant Pathol.*, 12, 19-26.
- CESATI V. et DE NOTARIS G., 1963. - Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri. *Comment. Soc. Critt. Ital.* 1, 254-256.
- CHAMBERLAND H. et OUELETTE G.B., 1977. - Formes d'inclusions osmiophiles dans les cellules de *Ceratocystis ulmi*. *Can. J. Bot.*, 55, 695-710.
- CHAN Yu. HO et SACKSTON W.E., 1972. - Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by virulent and avirulent isolates of *Sclerotium bataticola* during disease development in sun flowers. *Can. J. Bot.*, 12, 2449-2453.
- CHRISTOU T. et SNYDER W.C., 1962. - Penetration and host parasite relationships of *Fusarium solani* f. *phaseoli* in the bean plant. *Phytopathology*, 52, 3, 219-226.
- COLE R.J., KIRKSEY J.W., CUTLER H.G., DOUPNIK B.L. et PECKHAM J.C., 1973. - Toxin from *Fusarium moniforme* effects on plants and animals. *Science*, 179, 1324-1326.
- COOKE R.D., FERBER C.E.M. et KANAGASABAPATHY L., 1976. - Purification and characterization of polygalacturonases from a commercial *Aspergillus niger* preparation. *Biochim. Biophys. Acta*, 452, 440-451.
- COOPER R.M. et WOOD R.K.S., 1975. - Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.*, 5, 135-156.
- CRUICKSHANK I.A.M. et PALMER T.P., 1954. - Resistance of swede varieties to dry rot (*Phoma lingam*). *N. Zeal. J. Sci. Tech.*, 36, 122-128.



- DREW M.C., SEEAR J. et Mc LAREN A.D., 1970. - Entry of basic macromolecules into barley roots. *Am. J. Bot.*, 57, 837-843.
- EGLI T.A., 1969. - Untersuchungen über den Einfluß von Schwermetallen auf *Fusarium lycopersici* Sacc. und den Krankheitsverlauf der Tomatenwelke. *Phytopathol. Z.*, 66, 223-252.
- EHRlich M.A. et EHRlich H.G., 1971. - Fine structure of the host-parasite interfaces in mycoparasitism. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 9, 155-184.
- EL-KHADEM M., 1968. - Die Bedeutung von Aflatoxinen für die durch *Aspergillus flavus* verursachte Keimlingskrankheit der Ernuß. *Phytopathol. Z.*, 61, 218-231.
- ELLIS J.R. et Mc CALLA T.M., 1973. - Effects of patulin and method of application on growth stages of wheat. *Appl. Microbiol.*, 25, 562-566.
- ENGLISH P.D., JURALE J.B. et ALBERSHEIM P., 1971. - Host-pathogen interactions. II. Parameters affecting polysaccharide degrading enzyme secretion by *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. *Plant Physiol.*, 47, 1-6.
- ENGLISH P.D., MAGLOTHIN A., KEEGSTRA K. et ALBERSHEIM P., 1972. - A cell wall-degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Physiol.*, 49, 293-297.
- FANELLI C., CACACE M.G. et CERVONE F., 1978. - Purification and properties of two polygalacturonases from *Trichoderma koningii*. *J. gen. Microbiol.*, 104, 305-309.
- FEREZOU J.P., RICHE C., QUESNEAU-THIERRY A., PASCARD-BILLY C., BARBIER M., BOUSQUET J.F. et BOUDART G., 1977. - Structures de deux toxines isolées des cultures du Champignon *Phoma linguam* Tode : la sirodesmine PL et la désacétylsirodesmine PL. *Nouveau Journal de Chimie*, 1 (4), 327-334.
- FEREZOU J.P., QUESNEAU-THIERRY A., BARBIER M., KOLLMANN A. et BOUSQUET J.F., 1979. - Structure and synthesis of Phomamide, a new piperazine-2,5-dione related to the sirodesmins, isolated from the culture medium of *Phoma linguam* Tode. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1-3.
- FEREZOU J.P., QUESNEAU-THIERRY A., SERVY C., ZISSMANN E. et BARBIER M., 1980. - Sirodesmin PL biosynthesis in *Phoma linguam* Tode. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1739-1746.
- FERRARIS L., GARIBALDI A. et MATTA A., 1974. - Polygalacturonase and polygalacturonate trans-eliminase production *in vitro* and *in vivo* by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathol. Z.*, 81 (1), 1-14.
- FIELDING A.H. et BYRDE R.J.W., 1969. - The partial purification and properties of endopolygalacturonase and  $\alpha$ -L-arabino furanosidase secreted by *Sclerotinia fructigena*. *J. Gen. Microbiol.*, 58, 73-84.

- FUCKEL L., 1870. - Symbolae mycologicae. *Jahrb. Nass. Ver. Naturk.*, 23-24.
- GARIBALDI A. et BATEMAN D.F., 1971. - Pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi* and their effects on plant tissue. *Physiol. Plant Pathol.*, 1, 25-40.
- GAÜMANN E., BRAUN R. et BAZZIGHER G., 1950. - Über die induzierte Abwehrreaktionen bei Orchideen. *Phytopathol. Z.*, 17, 36-62.
- GAÜMANN E., 1954. - Toxins and plant diseases. *Endeavour*, 13, 198-204.
- GAÜMANN E., 1957. - Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology*, 47, 342-357.
- GAÜMANN E., 1960. - Nouvelles données sur les réactions chimiques de défense chez les Orchidées. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 250, 1944-1947.
- GIBBS J.N. et BRASIER C.M., 1973. - Correlation between cultural characters and pathogenicity in *Ceratocystis ulmi* from Britain, Europe and North America. *Nature, London*, 241, 381-383.
- GOODENOUGH P.W. et KEMPTON R.J., 1974. - Regulation of the synthesis of an extracellular polygalacturonase by *Pyrenochaeta lycopersici* when grown in media with limited carbon sources. *Phytopathol. Z.*, 81, 78-84.
- GOODMAN R.N., HUANG S. et HUANG P.Y., 1974. - A host specific phytotoxic polysaccharide from apple tissue infected by *Erwinia amylovora*. *Science*, 183, 1081-1082.
- GOTHOSKAR S.S., SCHEFFER R.P., WALKER J.C. et STAHMANN M.A., 1955. - The role of enzymes in the development of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology*, 45, 381-387.
- GROVE S.N. et BRACKER C.E., 1970. - Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi : vesicles and Spitzenkörper. *J. Bact.*, 104, 989-1009.
- HALLIWELL G., 1966. - Solubilization of native and derived forms of cellulose by cell-free microbial enzymes. *Biochem. J.*, 100, 315-320.
- HALLIWELL G. et MOHAMMED R., 1971. - Interactions between components of the cellulase complex of *Trichoderma koningii* on native substrates. *Arch. Mikrobiol.*, 78, 295-309.
- HANCHEY P. et WHEELER H., 1971. - Pathological changes in ultrastructure : tobacco roots infected with *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology*, 61, 33-39.
- HANCOCK J.G., MILLAR R.L. et LORBEER J.W., 1964. - Role of pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Botrytis* leaf blight of onion. *Phytopathology*, 54, 932-935.
- HANCOCK J.G. et MILLAR R.L., 1966. - Relative importance of polygalacturonase trans-eliminase and other pectolytic enzymes in southern anthracnose, spring black stem and *Stemphylium* leaf spot of alfalfa. *Phytopathology*, 56, 1112-1113.

- HANCOCK J.G., 1967. - Hemicellulose degradation in sun flower hypocotyls infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 57, 203-206.
- HAUSER D., WEBER H.P. et SIGG H.P., 1970. - Isolierung und Strukturaufklärung von Chaetocin. *Helv. Chem. Acta*, 53 (5), 1061-1073.
- HAUSER D., LOOSLI H.R. et NIKLAUS P., 1972. - Isolierung von 11  $\alpha$ , 11'  $\alpha$ -dihydrochaetocin aus *Verticillium terreum*. *Helv. Chem. Acta*, 55, 6, 2182-2187.
- HAWKER L.E. et HENDY R.J., 1963. - An electron-microscope study of germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.*, 33, 43-46.
- HELD A.A., 1972. - Host-parasite relations between *Allomyces* and *Rozella*. Parasite penetration depends on growth response of host cell wall. *Arch. Mikrobiol.*, 82, 128-139.
- HOAGLAND D.R. et SNYDER W.C., 1933. - Nutrition of strawberry plants under controlled conditions : (A) effects of deficiencies of boron and certain other elements, (B) susceptibility to injury from sodium salt. *Amer. Soc. Hort. Sci. Proc.*, 30, 228-294.
- HOITINK H.A., PELLETIER R.L. et COULSON J.G., 1966. - Toxemia of halo blight of beans. *Phytopathology*, 56, 1062-1065.
- HOLM L., 1957. - Etudes taxonomiques sur les Pléosporacées. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, t. 14, 3, 188p.
- HORSFALL J.G. et DIMOND A.E., 1957. - Interactions of tissue sugar, growth substances and disease susceptibility. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenpathol. Pflanzenschutz.*, 64, 415-421.
- HORTON J.C. et KEEN N.T., 1966. - Sugar repression of endopolygalacturonase and cellulase synthesis during pathogenesis by *Pyrenochaeta terrestris* as a resistance mechanism in onion pink root. *Phytopathology*, 56, 908-916.
- HOWELL C.R., 1976. - Use of enzyme deficient mutants of *Verticillium dahliae* to assess the importance of pectolytic enzymes in symptom expression of *Verticillium* wilt of cotton. *Physiol. Plant Pathol.*, 9 (3), 279-283.
- HUGHES W., 1933. - A study of *Phoma lingam* (Tode) Desm. and of the dry-rot : its causes, particularly in swede turnips. *Sci. Proc. roy. Dublin Soc.*, 20 (34), 495-529.
- HUSAIN A. et KELMAN A., 1958. - Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 48, 155-165.
- ISHIDA N. et AKAI S., 1968. - Electron microscopic observation of cell wall structure during appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 35, 68-74.

- JOHNSON J.C., 1969. - "Halo-less" halo blight of french bean in Queensland. *Qd. J. Agric. Anim. Sc.*, 26, 293-302.
- JONES T.M., ANDERSON A.J. et ALBERSHEIM P., 1972. - Host-pathogen interactions. IV. Studies on the polysaccharide degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.*, 2, 153-166.
- JOSEFSSON E., 1967. - Content of rhodanidogenic glucosides in some *Brassica* crops. *J. Sci. Fd Agric.*, 18, 492-495.
- KALYANASUNDARAM R., 1955. - Bioassay of *Fusarium* toxin - Agar-cup method for quantitative evaluation. *J. Indian Bot. Soc.*, 34, 43-46.
- KAMAL M. et WOOD R.K.S., 1965. - Pectic enzymes secreted by *Verticillium dahliae* and their role in the development of the wilt disease of cotton. *Ann. Appl. Biol.*, 44, 322-340.
- KARR, A. et ALBERSHEIM P., 1970. - Polysaccharide degrading enzymes are unable to attack plant cell walls without prior action by a "wall-modifying enzyme". *Plant Physiol.*, 46, 69-80.
- KEEN N.T. et HORTON J.C., 1966. - Induction and repression of endopolygalacturonase synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. *Can. J. Microbiol.*, 12, 443-453.
- KEEN N.T., LONG M. et ERWIN D.C., 1972. - Possible involvement of a pathogen produced protein-lipopolsaccharide complex in *Verticillium* wilt of cotton. *Physiol. Plant Pathol.*, 2, 317-331.
- KERN H. et NAEF-ROTH S., 1971. - Phytolysin, ein durch pflanzenpathogene Pilze gebildeter mazerierenden Faktor. *Phytopathol. Z.*, 71, 231-246.
- KERN H., 1972. - Phytotoxins produced by *Fusaria*. In : Phytotoxins in plant diseases, (WOOD R.K.S., BALLIO A., GRANITI A., eds), London - New York, Academic Press, 35-48.
- KERSETZ Z.I., 1955. - Pectic enzymes. In : Methods in Enzymology, Academic Press, Interscience Publishers, New York, 158.
- KNOX-DAVIES P.S., 1974. - Penetration of maize leaves by *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology*, 64, 1468-1470.
- LABORDA F. et MAXWELL D.P., 1976. - Ultrastructural changes in *Cladosporium cucumerinum* during pathogenesis. *Can. J. Microbiol.*, 22 (3), 394-403.
- LACOSTE L., 1965. - Biologie naturelle et culturale du genre *Leptosphaeria* Cesati et de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. Thèse, Toulouse.
- LACOSTE L., LOUVET J., ANSELME C., ALABOUVETTE C., BRUNIN B. et PIERRE J.G., 1969. - Rôle de *Phoma lingam* (Tode) Desm. et de sa forme parfaite *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. dans les épidémies de nécrose du collet de Colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger). *C.R. Acad. Agric. Fr.*, 55, 981-989.

- LANDES M. et HOFFMANN G.M., 1979. - Ultrahistological investigations of the interactions in compatible and incompatible systems of *Phaseolus vulgaris* and *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathol. Z.*, 96, 330-351.
- LAZAROVITS G. et HIGGINS V.J., 1976. - Ultrastructure of susceptible, resistant and immune reactions of tomato to races of *Cladosporium fulvum*. *Can. J. Bot.*, 54 (3-4), 235-249.
- LEAL J.A. et VILLANUEVA J.R., 1962. - Lack of pectic enzyme production by non-pathogenic species of *Verticillium*. *Nature*, 195, 1328-1329.
- LESEMANN D.E. et FUCHS W.H., 1970. - Die Ultrastruktur des Penetrationsvorganges von *Olpidium brassicae* an Kohlrabiwurzeln. *Arch. Mikrobiol.*, 71, 20-30.
- LITTLEFIELD L.J. et BRACKER C.E., 1972. - Ultrastructural specialization at the host-pathogen interface in rust infected flax. *Protoplasma*, 74, 271-305.
- LIUH Y.K. et LUH B.S., 1978. - Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Rhizopus arrhizus*. *J. Food Sci.*, 43, 721-726.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LUDWIG A.R., 1957. - Toxin production by *Helminthosporium sativum* P.K. and B and its significance in disease development. *Can. J. Bot.*, 35, 291-304.
- LUKE H.H., WARMKE H.E. et HANCHEY P., 1966. - Effects of the pathotoxin victorin on root and leaf of *Avena* species. *Am. J. Bot.*, 56 (10), 1178-1183.
- LUKE H.H. et GRACEN V.E. Jr., 1972. - *Helminthosporium* toxins. In microbial toxins, vol. VIII, (KADIS S., CIEGLER A., AJL S.J., eds) New York London, Academic Press, 139-168.
- LUMSDEN R.D., 1969. - *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean and the production of cellulase. *Phytopathology*, 59, 653-657.
- McGEE D.C., 1977. - Black leg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.) of rapeseed in Victoria : sources of infection and relationship between inoculum, environmental factors and disease severity. *Aust. J. Agric. Res.*, 28, 53-62.
- McGEE D.C. et EMMETT R.W., 1977. - Black leg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.) of rapeseed in Victoria : crop losses and factors which affect disease severity. *Aust. J. Agric. Res.*, 28, 47-51.
- McKAY B., 1956. - Dry rot and canker of swedes. In : Crucifer diseases in Ireland. *Dublin, at the sign of the three candles*, 38-48.
- McKEEN W.E. et BHATTACHARYA P.K., 1970. - Limitation of infection by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* culture CR3 by the Algerian gene MI a in barley. *Can. J. Bot.*, 48, 1109-1113.

- McKEEN W.E., 1974. - Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 64, 461-467.
- McMILLAN J.D., PHAFF H.J. et VAUGHN R.H., 1964. - The patterns of action of an exopolygalacturonic acid trans-eliminase from *Clostridium multi-fermentans*. *Biochemistry*, 3 (4), 572-578.
- MARCHANT R., 1966. - Wall structure and spore germination in *Fusarium culmorum*. *Ann. Bot.*, 30, 821-830.
- MARCHANT R. et ROBARDS A.W., 1968. - Membrane systems associated with plasma-lemma of plant cells. *Ann. Bot.*, 32, 457-471.
- MARCHANT R. et MOORE R.T., 1973. - Lomasomes and plasmalemmasomes in Fungi. *Protoplasma*, 76, 235-247.
- MILLER P.A., TROWN P.W., FULMOR W., MORTON G.O. et KARLINER J., 1968. - An epidithiopiperazinedione antiviral agent from *Aspergillus terreus*. *Biochem. Biophys. Research Com.*, 33 (2), 219-221.
- MILLERD A. et SCOTT K., 1955. - A phytopathogenic toxin formed in barley infected with powdery mildew. *Aust. J. Sci.*, 18, 63-64.
- MINATO H., MATSUMOTO M. et KATAYAMA T., 1971. - Verticillin A, a new antibiotic from *Verticillium sp.* *Chem. Comm.*, 44-45.
- MOUNT M.S., BATEMAN D.F. et BASHAM H.G., 1970. - Induction of electrolyte loss, tissue maceration and cellular death of potato tissue by an endo-polygalacturonate trans-eliminase. *Phytopathology*, 60, 924-931.
- MULLEN J.M. et BATEMAN D.F., 1971. - Production of an endo-polygalacturonate trans-eliminase by a potato dry-rot pathogen, *Fusarium roseum "Avenaceum"* in culture and in diseased tissue. *Physiol. Plant Pathol.*, 1, 363-373.
- MULLEN J.M. et BATEMAN D.F., 1975. - Polysaccharide degrading enzymes produced by *Fusarium roseum "Avenaceum"* in culture and during pathogenesis. *Physiol. Plant Pathol.*, 6 (3), 233-246.
- MÜLLER E., 1953. - Kulturversuche mit Ascomyceten. I. *Sydowia*, vol. 7, 325-334.
- MÜLLER E. et TOMASEVIC M., 1957. - Kulturversuche mit einigen Arten der Gattung *Leptosphaeria* Ces. et de Not. *Phytopathol. Z.*, 29, 287-294.
- MURRAY G.M. et MAXWELL D.P., 1974. - Ultrastructure of conidium germination of *Cochliobolus carbonus*. *Can. J. Bot.*, 52, 2335-2340.
- MURRAY G.M. et MAXWELL D.P., 1976. - Ultrastructure and lipid identification during conidium germination of *Stemphylium sarcinaeforme*. *Can. J. Microbiol.*, 22 (1), 92-100.
- NACHMIAS A., BARASH I., SOLEL Z. et STROBEL G.A., 1977. - Purification and characterization of a phytotoxin produced by *Phoma tracheiphila*, the causal agent of malsecco disease of citrus. *Physiol. Plant Pathol.*, 10, (2), 147-157.

- NAGEL C.W. et VAUGHN R.H., 1961. - The characteristics of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 93, 344-352.
- NELSON N., 1944. - A photometric adaptation of the Somogi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380.
- NEUSS N., NAGARAJAN R., B.B. MOLLOY et HUCKSTEP L.L., 1968. - Aranotin and related metabolites. II. Isolation, characterization and structure of two new metabolites. *Tetrahedron Letters*, 42, 4467-4471.
- NEVINS D.J., ENGLISH P.D. et ALBERSHEIM P., 1968. - Changes in cell wall polysaccharides associated with growth. *Plant Physiol.*, 43, 914-922.
- NORTON J.B.S., 1919. - Hot water treatment for black leg of cabbage. *Phytopathology*, 9, 50-51.
- ORCIVAL J., 1963. - Sur l'altération des chloroplastes du séneçon vulgaire parasité par une urédinale. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 257, 751-753.
- ORCIVAL J., 1972. - Structure et évolution des chloroplastes dans la feuille d'*Euphorbia amygdaloides* parasitée par *Endophyllum euphorbiae sylvaticae*. *Ann. Sci. Nat.*, 12<sup>ème</sup> série, XIII (3), 323-345.
- OTTA J.D. et ENGLISH H., 1971. - Serology and pathology of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology*, 61, 443-452.
- OUELETTE G.B., 1978. - Light and electron microscope studies on cell wall breakdown in American elm xylem tissues infected with Dutch elm disease. *Can. J. Bot.*, 56 (2), 2666-2693.
- PARES R.D. et GREENWOOD A.D., 1977. - Ultrastructure of the host-parasite relationships of *Pseudoperonospora humuli* on hops. *Aust. J. Bot.*, 25, 585-598.
- PATIL S.S. et DIMOND A.E., 1968. - Repression of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by sugars and its effect on symptom reduction in infected tomato plants. *Phytopathology*, 58, 676-682.
- PATIL S.S., HAYWARD A.C. et EMMONS R., 1974. - An UV-induced nontoxigenic mutant of *Pseudomonas phaseolicola* of altered pathogenicity. *Phytopathology*, 64 (5), 590-595.
- PAUS F. et RAA J., 1973. - An electron microscope study of infection and disease development in cucumber hypocotyls inoculated with *Cladosporium cucumerinum*. *Physiol. Plant Pathol.*, 3, 461-464.
- PETRIE G.A., 1978. - Occurrence of a highly virulent strain of black leg (*Leptosphaeria maculans*) on rape in Saskatchewan (1975-77). *Can. Plant Dis. Surv.*, 58, 21-25.
- POLE EVANS I.B., 1907. - The cereal rusts. I. The development of their uredo mycelia. *Ann. Bot.*, 21, 441-466.

- POLITIS D.J. et WHEELER H., 1973. - Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Physiol. Plant Pathol.*, 3, 465-471.
- PORTER F.M., 1966. - Protease activity in diseased fruits. *Phytopathology*, 56, 1424-1425.
- POUND G.S., 1947. - Variability in *Phoma lingam*. *J. Agr. Res.*, 75, 113-133.
- PREISS J. et ASHWELL G., 1963. - Polygalacturonic acid metabolism in bacteria. I. Enzymatic formation of 4-deoxy-L-threo-5-hexoseulose uronic acid. *J. Biol. Chem.*, 238, 1571-1576.
- PRESSEY R. et AVANTS J.K., 1973. - Two forms of polygalacturonase in tomatoes. *Biochem. Biophys. Acta*, 309, 363-369.
- PRINGLE R.B. et SCHEFFER R.P., 1964. - "Host-specific plant toxins". *Ann. Rev. Phytopathol.*, 2, 133-156.
- PUHALLA J.E. et HOWELL C.R., 1975. - Significance of endopolygalacturonase activity to symptom expression of *Verticillium* wilt in cotton, assessed by the use of mutants of *Verticillium dahliae* Kleb. *Physiol. Plant Pathol.*, 7 (2), 147-152.
- REESE E.T., 1956. - A microbiological progress report. Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol.*, 4, 39-45.
- REISS J., 1971. - Hemmung der Keimung der Kresse (*Lepidium sativum*) durch Aflatoxin B<sub>1</sub> und Rubratoxin B. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 162, 363-367.
- REYNOLDS E.S., 1963. - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208-212.
- RICHE C., PASCARD-BILLY C., DEVYS M., GAUDEMER A. et BARBIER M., 1974. - Structure cristalline et moléculaire de la phoménone, phytotoxine produite par le Champignon *Phoma exigua* var. *non oxydabilis*. *Tetrahedron Letters*, 32, 2765-2766.
- RICHMOND D.V. et PRING R.J., 1971. - Fine structure of germinating *Botrytis fabae* Sardinia conidia. *Ann. Bot.*, 35, 493-500.
- RIGGLE J.H. et DUNLEAVY J.M., 1974. - Histology of leaf infection of susceptible and resistant soybeans by *Peronospora manshurica*. *Phytopathology*, 64, 522-526.
- RIJKENBERG F.H.J. et TRUTER S.J., 1973. - Haustoria and intercellular hyphae in the rusts. *Phytopathology*, 63, 281-286.
- ROLAND J.C., 1969. - Mise en évidence sur coupes ultrafines de formations polysaccharidiques directement associées au plasmalemme. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 269, 939-942.



- ROLAND J.C. et VIAN B., 1971. - Réactivité du plasmalemme végétal : étude cytochimique. *Protoplasma*, 73, 121-137.
- RONALDSON J.W., TAYLOR A., WHITE E.P. et ABRAHAM R.J., 1963. - Sporidesmins. Part I. Isolation and characterization of sporidesmin and sporidesmin B. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 3172-3180.
- RUDOLPH K., 1976. - Non-specific toxins. In : *Physiological plant pathology*, (HEITEFUSS R. and WILLIAMS P.H. eds) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 4, 270.
- RUFFNER F., 1971. - Production and bioassay of phytotoxins, In : *Phytotoxins in plant diseases* (WOOD R.K.S., BALLIO A. et GRANITI A. eds) London and New York, Academic Press, 53.
- SACCARDO P.A., 1883. - *Sylloge Fungorum*. 2.
- SACHS J.B., NAIR V.M.G. et KUNTZ J.E., 1970. - Penetration and degradation of cell wall in oaks infected with *Ceratocystis fagacearum*. *Phytopathology*, 60, 1399-1404.
- SAFE S. et TAYLOR A., 1972. - Sporidesmins. Part XIII. Ovine ill-thrift in Nova Scotia. Part III. The characterization of Chaetomin, a toxic metabolite of *Chaetomium cochliodes* and *Chaetomium globosum*. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 472-479.
- SANWAL B.D., 1956. - Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. *Phytopathol. Z.*, 25, 333-384.
- SAUVET C., 1979. - Systémie et phytotoxines de *Phoma exigua* Desm. var. *foveata* (Foister) Boerema, agent de la gangrène de la Pomme de terre. *Thèse 3ème Cycle, Lille*.
- SCALA A., CAMARDELLA L., SCALA F. et CERVONE F., 1980. - Multiple forms of polygalacturonase in two strains of *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Microbiol.*, 116 (1), 207-212.
- SCHLÖSSER E., 1971. - The *Cercospora beticola* toxin. *Phytopathol. Medit.*, 10, 154-158.
- SCHNEIDER A. et DARGENT R., 1977. - Localisation et comportement du mycélium de *Taphrina deformans* dans le mésophylle et sous la cuticule des feuilles de pêcher (*Prunus persica*). *Can. J. Bot.*, 55, 2485-2495.
- SCOTT G.E. et FUTRELL M.C., 1970. - Response of maize seedlings to *Fusarium moniliforme* and a toxic material extracted from this fungus. *Plant Disease Repr.*, 54, 483-486.
- SELBY K. et MAITLAND C.C., 1967. - Components of *Trichoderma viride* cellulase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 254-257.

- SHERWOOD R.T., 1966. - Pectin-lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other Fungi. *Phytopathology*, 52, 279-286.
- SILVERMAN W., 1960. - A toxin extract from Marquis wheat infected by race 38 of the stem rust fungus. *Phytopathology*, 50, 130-136.
- SINDEN S.L., DURBIN R.D., UCHYTIL T.F. et LAMAR C., 1969. - The production of convulsions by an exotoxin from *Pseudomonas tabaci*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 14, 82-88.
- SKIPP R.A. et DEVERALL B.J., 1972. - Relationships between fungal growth and host changes visible by light microscopy during infection of bean hypocotyls (*Phaseolus vulgaris*) susceptible and resistant to physiological race of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Plant Pathol.*, 2, 357-374.
- SMITH H.C., 1956. - *Leptosphaeria napi*, the perithecial form of *Phoma lingam* causing dry-rot disease of *Brassica*. *N. Zeal. Sci. Rev.*, 14, 116-117.
- SMITH H.C. et SUTTON B.C., 1964. - *Leptosphaeria maculans*, the ascogenous state of *Phoma lingam*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 47, 159-165.
- SOMOGYI M., 1952. - Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, 19-23.
- SPALDING D.H., WELLS J.M. et ALLISON D.W., 1973. - Catabolite repression of polygalacturonase pectin lyase and cellulase synthesis in *Penicillium expansum*. *Phytopathology*, 63, 840-844.
- SPURR A.R., 1969. - A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26, 31-43.
- STEELE J.A. et MIROCHA C.J., 1971. - Identification of tenuazonic acid as an important toxic substance produced by *Alternaria* spp. *Phytopathology* 61, 913 (Abst.).
- STROBEL G.A., HESS W.M. et STEINER G.W., 1972. - Ultrastructure of cells in toxin-treated and *Helminthosporium sacchari* - infected sugarcane leaves. *Phytopathology*, 62, 339-345.
- STRUNZ G.M., KAKUSHIMA M., STILLWELL M.A. et HEISSNER C., 1973. - Hyalodendrin : a new fungi toxic epidithiodioxopiperazine produced by a *Hyalodendron* species. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 2600-2602.
- SWINDBURNE T.R. et CORDEN M.E., 1967. - Dissociation and recombination of a polygalacturonase complex during ion exchange chromatography. *Nature*, 213, 286-287.
- SYROP M., 1975. - Leaf curl disease of almond caused by *Taphrina deformans* (Berk) Tull. II. An electron microscope study of the host-parasite relationship. *Protoplasma*, 85, 57-69.

- TANI T. et NANBA H., 1969. - Qualitative nature of macerating activities in culture filtrates of *Botrytis cinerea*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 35, 1-9.
- TAYLOR A., 1971. - The toxicology of sporidesmins and other epipolythiadioxopiperazines. In: Microbial toxins (KADIS S., CIEGLER A. et AJL S.J. eds.) Academic Press, New York, vol. 7, 363.
- THIERY J.P., 1967. - Mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie*, 6, 987-1018.
- THURLING N. et VENN L.A., 1977. - Variation in the responses of rapeseed (*Brassica napus* and *B. campestris*) cultivars to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) infection. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 17, 445-451.
- TISDALE W.B., 1920. - Iris leaf spot caused by *Didymellina iridis*. *Phytopathology* 10, 148-163.
- TROWN P.W., 1968. - Antiviral activity of N,N'-diméthyl-epidithiapiperazinedione, a synthetic compound related to the gliotoxins, LL-S88 $\alpha$  and  $\beta$  chetmonin and the sporidesmins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 33, 402-407.
- TSENG T.C. et BATEMAN D.F., 1968. - Production of phosphatidases by phytopathogens. *Phytopathology*, 58, 1437-1438.
- TSENG T.C. et MOUNT M.S., 1974. - Toxicity of endopolygalacturonate trans-eliminase, phosphatidase, and protease to potato and cucumber tissue. *Phytopathology*, 64, 229-236.
- ULRICH J.M., 1975. - Pectic enzymes of *Pseudomonas cepacia* and penetration of polygalacturonase into cells. *Physiol. Plant Pathol.*, 8, (1), 37-44.
- UMEZURIKE G.M., 1970. - Cellulase and  $\beta$ -Glucosidase components in culture filtrates from *Botryodiplodia theobromae* Pat. *J. Exp. Bot.*, 21, 639-650.
- URBANEK H. et ZALEWSKA-SOBLZAK J., 1975. - Polygalacturonase of *Botrytis cinerea* E 200 Pers. *Biochim. Biophys. Acta*, 377, 402-409.
- WAKSMAN S.A. et BUGIE E., 1944. - Chaetomin, a new antibiotic substance produced by *Chaetomium cochliodes*. I. Formation and properties. *J. Bacteriol.*, 48, 527-530.
- WALKER J.C., 1922. - Seed treatments and rainfall in relation to the control of cabbage black-leg. *U.S.D.A. Bull.*, 1029, 27p.
- VAN DER PLANK J.E., 1968. - Disease resistance in plants. Academic Press, New York, London, 215 p.
- WANG M.C. et KEEN N.T., 1970. - Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 141, 749-757.

- WARD E.W.B., LEBEAU J.B. et CORMACK M.W., 1961. - Grouping of isolates of a low temperature basidiomycete on the basis of cultural behaviour and pathogenicity. *Can. J. Bot.*, 39, 297-306.
- WARREN L., 1960. - Thiobarbituric acid spray reagent for deoxy sugars and sialic acids. *Nature*, 186, 237.
- WEISSBACH A. et HURWITZ J., 1959. - The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.*, 234 (4), 705-709.
- WHEELER H. et LUKE H.H., 1963. - Microbial toxins in plant disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, 17, 223-242.
- WHITE G.A. et TRUELOVE B., 1972. - The effects of aflatoxin B<sub>1</sub>, citrinin and ochratoxin A on amino acid uptake and incorporation by cucumber. *Can. J. Bot.*, 50, 2659-2664.
- WHITE J.A., CALVERT O.H. et BROWN M.F., 1973. - Ultrastructural changes in corn leaves after inoculation with *Helminthosporium maydis*, race T. *Phytopathology*, 63, 296-300.
- WHITNEY R.D. et BOHAYCHUK W.P., 1976. - Pathogenicity of *Polyporus tomentosus* and *P. tomentosus* var. *eireinatus* on seedlings of 11 conifer species. *Can. J. For. Res.*, 6, 129-131.
- WHITNEY R.D. et W.P. BOHAYCHUK, 1977. - Variation of *Polyporus tomentosus* in cultural characteristics and pathogenicity on conifer seedlings. *Can. J. Bot.*, 55, 10, 1389-1398.
- WOOD R.K.S., 1960. - Pectic and cellulolytic enzymes in plant disease. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 11, 299-322.
- WOOD R.K.S., 1961. - *Verticillium* wilt of tomatoes - the role of pectic and cellulolytic enzymes. *Ann. Appl. Biol.*, 49, 120-139.
- WOOD R.K.S., 1967. - *Physiological plant pathology*. Oxford : Blackwell Scientific Publ. Ltd. (d'après BATEMAN, 1976).
- WOOD R.K.S., 1973. - Specificity in plant disease. In : *Fungal Pathogenicity and the Plant's Response*, (BYRDE R.J.W. et CUTTING C.V. eds.) London, Academic Press, 1-16.
- WOOD P.Mc. R. et BARBETTI M.J., 1977. - A study on the inoculation of rape seedlings with ascospores and pycniospores of the blackleg disease causal agent. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.*, 43, 1-2, 79-80.
- WRIGHT D.E., 1968. - Toxins produced by Fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22, 269-282.

WYNN W.K., 1976. - Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus : response to a surface contact stimulus. *Phytopathology*, 66, 2, 136-147.

ZUCKER M. et HANKIN L., 1971. - Inducible pectate lyase synthesis and pathogenicity of *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Microbiol.*, 10, 1313-1318.



