

## Chémoprotection indirecte contre les champignons phytopathogènes : concept et applications

Medaht Ali, Bouzid Nasraoui, Philippe Lepoivre, Jean Semal

**D**epuis 1882, la chimiothérapie utilisée pour lutter contre les champignons phytopathogènes est fondée sur l'exploitation des effets biocides de matières actives multisites (essentiellement des composés cupriques, soufrés, azotés et mercuriques), utilisées comme agents préventifs de protection externe par recouvrement des parties aériennes des plantes. Par ailleurs, depuis 1960, des composés unisites ou oligosites, dépourvus de phytotoxicité grâce à la spécificité de leur action fongicide, ont été utilisés par voie systémique comme agents thérapeutiques préventifs ou curatifs [1].

Outre ces traitements à action fongicide, la protection des plantes contre les champignons pathogènes peut être obtenue par voie non biocide, en utilisant des molécules d'origine biotique ou abiotique qui interfèrent avec l'établissement de la relation parasitaire compatible, ou avec le développement de la pathogénèse. Depuis les années 80, de tels modes d'action ont été identifiés chez des substances qui s'avéraient pouvoir protéger les plantes contre certaines infections fongiques, sans présenter de fongitoxicité *in vitro* [2, 3].

Nous proposons d'utiliser le terme de « chémoprotection indirecte » pour désigner l'ensemble des traitements

chimiques non biocides. Cet article présente une analyse du mode d'action de quelques agents chémoprotecteurs, étudiés par notre équipe.

### Matériel et méthodes

Les couples hôte-parasite suivants seront traités : *Ascochyta pisi* Lib. et *Mycosphaerella pinodes* (Berk. et Blox.) Vestergt. sur *Pisum sativum* L., *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint. sur *Phaseolus vulgaris* L. et *Phytophthora citrophthora* R.E. & E.H. Smith sur *Citrus jumbhiri* Lush.

### Effet de l'activité cutinasique sur l'infection du pois par *Mycosphaerella pinodes*

Les conditions de culture du parasite et de l'hôte, ainsi que les techniques d'inoculation ont été décrites antérieurement [4]. Les cutinases fongiques étant inductibles, nous avons étudié l'effet de l'ajout au milieu de culture de différents acides gras commerciaux (ou d'acides gras extraits d'hydrolysats de cutine), sur l'induction *in vitro* de cutinase par *A. pisi* et *M. pinodes* [5, 6]. Par ailleurs, nous avons testé l'effet du diisopropylfluorophosphate (DFP), un inhibiteur des cutinases, sur la pénétration de *A. pisi* et de *M. pinodes* au travers de la cuticule de pois [4]. Enfin, nous avons testé l'effet de l'addition d'acides gras à l'inoculum de *M. pinodes*.

### Effet du triphénylphosphite sur l'infection du haricot par l'agent de la rouille *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint.

Les conditions de multiplication de l'agent de la rouille *U. phaseoli* et les modalités d'inoculation de l'hôte *P. vulgaris* ont été décrites [7]. Le traitement au triphénylphosphite (TPP) est effectué par pulvérisation sur les feuilles primaires du haricot, à différents moments avant ou après l'inoculation avec une suspension de spores. Les effets de l'application d'acide  $\alpha$ -aminooxyacétique (un inhibiteur de la phénylalanine-ammonia lyase) et de cycloheximide (un inhibiteur de la synthèse des protéines) ont été également étudiés [7, 8].

L'observation microscopique des différentes phases de l'infection par *U. phaseoli*, de feuilles traitées ou non par le TPP, a été réalisée selon les techniques précisées antérieurement [9].

### Effet de l'acide phosphoreux sur l'infection de *Citrus jumbhiri* par *Phytophthora citrophthora*

Les modalités de culture des souches de *P. citrophthora*, l'obtention d'un mutant de *P. citrophthora* résistant *in vitro* à l'acide phosphoreux, les modalités de traitement des feuilles de *Citrus* par l'acide phosphoreux, ainsi que la technique d'inoculation des feuilles en survie, ont été publiées [10, 11]. Les éliciteurs inducteurs de phytoalexines, libérés dans le filtrat de culture

M. Ali : Université Ain Shams, 11340 Le Caire, Égypte.  
B. Nasraoui : École Supérieure d'Agriculture, 7119 Le Kef, Tunisie.  
P. Lepoivre, J. Semal : Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, 5030 Gembloux, Belgique.

de *P. citrophthora*, ont été concentrés par précipitation à l'alcool ; leur activité inductrice de la phytoalexine scoparone dans les feuilles de *Citrus* a été quantifiée [12].

### Effet de l'éthionine et du dichlorvos sur la pathogénèse de *Ascochyta pisi* sur pois

Les conditions de culture du pois et de *A. pisi*, ainsi que les techniques d'inoculation ont été décrites [13]. L'effet d'un traitement par l'éthionine ou par divers composés organophosphorés (dont le dichlorvos), sur la synthèse *in vitro* d'ascochitine (une toxine appartenant au groupe des polycétides) par *A. pisi* a été publié [13].

## Résultats et discussion

### Effet des acides gras sur l'activité cutinasique des filtrats de culture et sur l'infection du pois par *Mycosphaerella pinodes*

Lorsque la cutine de pomme est ajoutée comme seule source de carbone au milieu de culture de *M. pinodes* et de *A. pisi*, la cutinase, révélée par son activité estérasique, est libérée dans le milieu avec une activité élevée à la concentration de 0,2 % de cutine. L'addition à ce milieu de 0,3 % d'acides gras extraits d'un hydrolysate de cutine, diminue l'activité estérasique libérée dans le filtrat de culture. Toutefois, une extraction à l'acétone (perméabilisant des membranes fongiques) effectuée à l'issue de la période d'incubation du champignon, restaure l'activité estérasique du filtrat de culture au niveau obtenu avec 0,2 % de cutine. Ces résultats suggèrent qu'en présence de 0,3 % d'acides gras, la libération de cutinase dans le milieu est inhibée, mais non sa synthèse dans les spores en germination, d'où elle est extraite par traitement à l'acétone (Tableau 1). Corrélativement, l'addition à l'inoculum de *M. pinodes* d'acides gras extraits de l'hydrolysate de cutine, pro-

### Tableau 1

#### Activité estérasique (U/ml) du milieu de culture (72 h d'incubation)

| Source de carbone dans le milieu de culture | Libération spontanée |            | Après extraction à l'acétone |            |
|---|----------------------|------------|------------------------------|------------|
|   | A. pisi              | A. pinodes | A. pisi                      | A. pinodes |
| Cutine 0,2 %                                | 2,4                  | 1,2        | 4,7                          | 3,9        |
| Cutine 0,2 % + 0,3 % acides gras*           | 0,8                  | 0,4        | 4,6                          | 3,8        |

\* acides gras extraits d'hydrolysate de cutine de pomme.

### Tableau 2

#### Effets des acides gras sur l'infection du pois par *M. pinodes*

| Traitement  | Symptômes sur folioles de pois après 48 h (échelle 0-3)*** |
|---|--|
| Inoculum  | 3  |
| Inoculum + 0,1 % d'acides gras*                     | 0  |
| Inoculum + 0,1 % d'acides gras (feuilles blessées)  | 3  |
| Inoculum + 0,1 % d'acides gras + cutinase exogène** | 2,4  |

\* acides gras extraits d'hydrolysate de cutine de pomme.

\*\* cutinase libérée dans un milieu de culture de *M. pinodes* contenant 0,2 % de cutine.

\*\*\* (d'après Nasraoui B et al. [4]).

### Tableau 3

#### Activité estérasique (U/ml) dans le milieu de culture 72 h après inoculation par *Ascochyta pisi*

| Source de carbone dans le milieu                    | Libération spontanée | Après extraction à l'acétone |
|---|----------------------|------------------------------|
| Acide junipérique 0,05 %                            | 2,1                  | 4,9                          |
| Acide junipérique 0,5 %                             | 1                    | 4,8                          |
| Acide ricinoléique 0,5 %                            | 0,1                  | 0,5                          |
| Acide junipérique 0,05 % + acide ricinoléique 0,5 % | 0,4                  | 1,6                          |

voque une diminution de l'intensité des symptômes formés sur folioles de pois, allant jusqu'à inhiber totalement l'infection à la concentration de 0,1 % (Tableau 2). Le développement de l'infection est toutefois restauré en ajoutant de la cutinase exogène à l'inoculum, ou en blessant les feuilles avant l'inoculation.

Enfin, nous avons montré que le DFP, un inhibiteur de la cutinase, empêche l'infection des feuilles de pois par *M. pinodes* (Photo 1), sans altérer la germination des spores et la croissance du mycélium en surface de la feuille.

Ces différents résultats indiquent que la cutinase est nécessaire à la pénétration du champignon dans l'hôte et que l'inhibition de l'activité cutinasi- que par traitement au DFP, ou la réduction de son excrétion par adjon- tion d'acides gras extraits d'hydrolysats de cutine, procède dès lors d'une ché- moprotection indirecte.

Afin d'étudier plus avant ces différents effets, des acides gras du commerce ont été ajoutés comme seule source de car- bone au milieu de culture de *A. pisi* et leur capacité à induire la synthèse et/ou la libération d'une activité cuti- nasi- que dans le milieu de culture a été évaluée. L'addition de 0,05 % d'acide junipéri- que à un milieu de culture minéral de *A. pisi* provoque la libéra- tion dans le milieu d'une activité esté- rasi- que qui est plus que doublée par extraction à l'acétone à l'issue de la période de culture du champignon. L'addition de 0,5 % d'acide junipéri- que au milieu de culture induit une moindre libération spontanée d'estérase dans le milieu de culture (par rapport à celle obtenue avec 0,05 %), mais ce niveau est fortement accru après extrac- tion à l'acétone à l'issue de la période de culture (Tableau 3).

En revanche, quand le milieu de cul- ture minéral est supplémenté avec 0,5 % d'acide ricinoléique, l'activité esté- rasi- que libérée par *A. pisi* est très faible, que ce soit avec ou sans extrac- tion à l'acétone. Il en est de même lorsque l'on ajoute 0,5 % d'acide rici- noléique à un milieu de culture con- tenant 0,05 % d'acide junipéri- que.

Ces différents résultats suggèrent que les acides gras ont des effets spécifiques sur l'induction et la libération de cuti- nase par *A. pisi* et pourraient être utili- sés dans la lutte contre des champi- gnons phytopathogènes (Tableau 3).

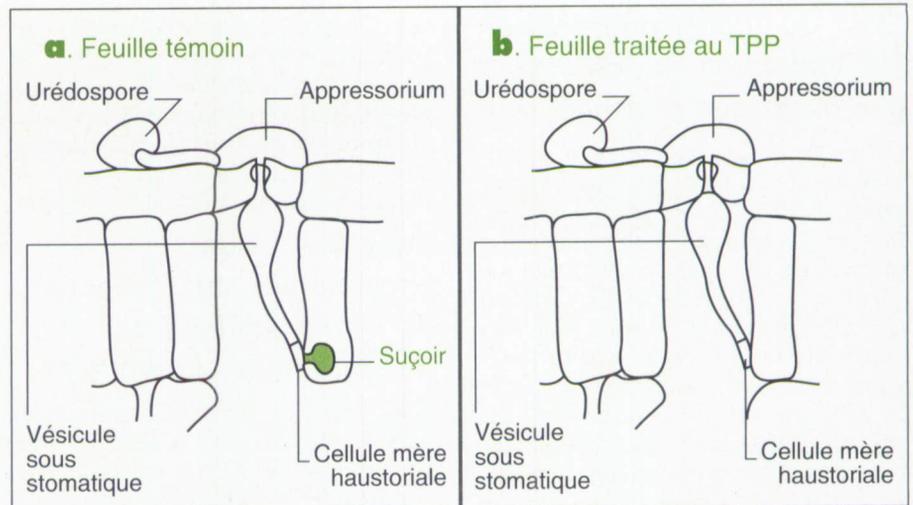


Figure 1. Section transversale d'une feuille montrant les structures de l'infection par l'agent d'une rouille.

Figure 1. Cross section of a leaf showing the structures of an infecting rust fungus. (a. control leaf; b. leaf treated with TPP).

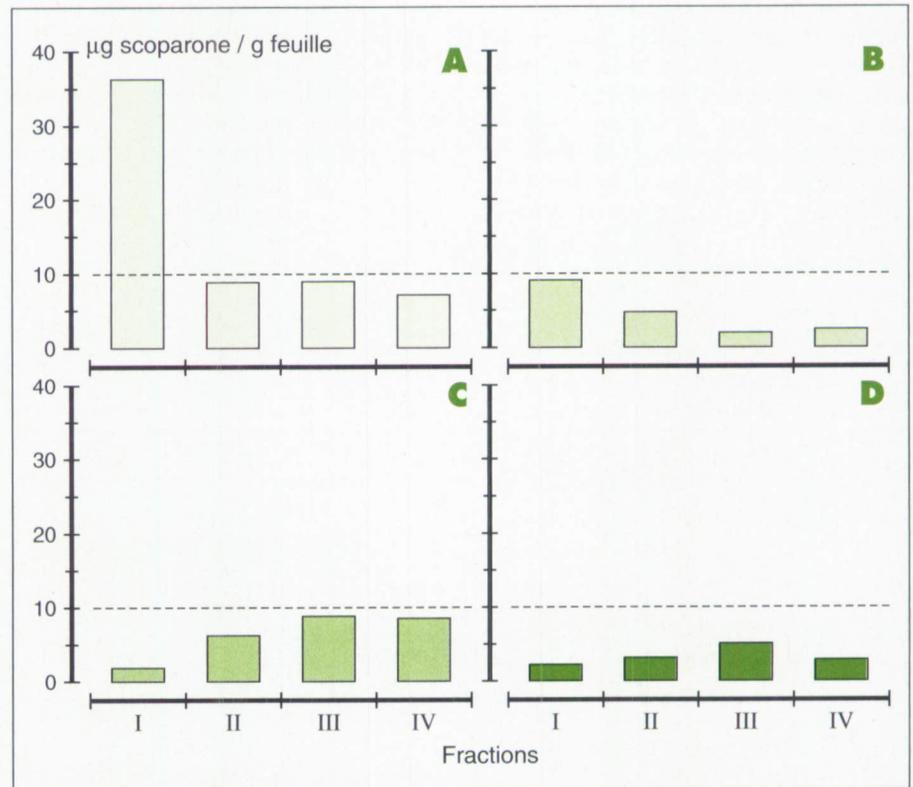


Figure 2. Activité élicitrice de scoparone induite dans les feuilles de *Citrus jumbhiri* par différentes fractions du filtrat obtenu après l'incubation de *Phytophthora citrophthora* dans l'acide phosphoreux. A : souche sensible *in vitro* à l'acide phosphoreux et prétraitée à l'acide phosphoreux ; B : souche sensible *in vitro* à l'acide phosphoreux et non prétraitée à l'acide phosphoreux ; C : souche résistante *in vitro* à l'acide phosphoreux et prétraitée à l'acide phosphoreux ; D : souche résistance *in vitro* à l'acide phosphoreux et non prétraitée à l'acide phosphoreux.

Figure 2. Scoparone elicitor activity induced in *Citrus* leaves by different fractions of the filtrate obtained after incubation of *Phytophthora citrophthora* in phosphorous acid. A : *In vitro* phosphorous acid-sensitive strain pretreated with phosphorous acid ; B : *In vitro* phosphorous acid-sensitive strain non-pretreated with phosphorous acid ; C : *In vitro* phosphorous acid-resistant strain pretreated with phosphorous acid ; D : *In vitro* phosphorous acid-resistant strain non-pretreated with phosphorous acid.

## Effet du triphénylphosphite sur l'infection du haricot par *Uromyces phaseoli*

Quand les feuilles de haricot sont traitées avec 125 µg/ml de triphénylphosphite (TPP) à 2 jours avant l'inoculation de *U. phaseoli*, la formation des pustules du champignon est réduite de 95-97 % [7]. Le taux de germination des urédospores et la formation des appressoriums ne sont pas affectés significativement par le traitement avec le TPP. De même, la formation des vésicules sous-stomatiques, le développement des hyphes infectants et la différenciation des cellules mères haustoriales se produisent normalement chez les plantes traitées (figure 1).

La différence entre plantes traitées et non traitées avec le TPP se marque au niveau des suçoirs : ceux-ci ne se forment pas dans les feuilles traitées, alors qu'ils sont très nombreux chez les feuilles témoins inoculées, non traitées avec le TPP. L'arrêt de l'infection semble donc résulter d'événements s'exprimant au niveau du contact entre le champignon et les cellules du mésophylle. La suppression de l'effet protecteur du TPP par prétraitement

des feuilles avec l'acide α-aminoxyacétique (12 à 50 µg/ml) ou avec la cycloheximide (2,5 µg/ml), suggère que le métabolisme des phénylpropanoïdes et la synthèse *de novo* de protéines sont impliqués dans l'expression de cette résistance induite.

## Effet de l'acide phosphoreux sur l'infection de *Citrus jumbhiri* par *Phytophthora citrophthora*

Nous avons étudié la libération d'une activité élicitrice de scoparone (une phytoalexine des *Citrus*) en traitant des feuilles avec le filtrat obtenu par incubation du mycélium de *P. citrophthora* dans l'acide phosphoreux. Après incubation dans H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>, le mycélium d'une souche de *P. citrophthora* sensible *in vitro* à l'acide phosphoreux (EC 50 = 6,5 µg/ml) relâche davantage d'éliciteurs de scoparone que le mycélium d'une souche tolérante (EC 50 = 125 µg/ml) [12].

L'activité élicitrice libérée par la souche sensible prétraitée avec H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>, se retrouve dans une fraction particulière après chromatographie sur colonne (figure 2). L'application de cette frac-

tion protège les feuilles de *Citrus* contre l'infection par *P. citrophthora* (figure 3, Photo 2), alors que les substances libérées par la souche tolérante traitée par H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>, ou par les deux souches non traitées avec H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>, n'induisent pas d'effet protecteur.

## Effet de l'éthionine et du dichlorvos sur l'infection du pois par *Ascochyta pisi*

Lorsque *A. pisi* infecte le pois, on observe l'émission d'une toxine : l'ascochitine. Aux concentrations qui n'affectent pas significativement la germination des conidies et la formation des appressoriums, le prétraitement des folioles de pois avec l'éthionine ou le dichlorvos (inhibiteurs de la synthèse d'ascochitine *in vitro*), réduit significativement le diamètre des lésions, sans affecter leur nombre. L'application d'ascochitine (100 ppm) sur le feuillage des plantes prétraitées avec l'éthionine ou le dichlorvos, restaure le diamètre des lésions formées par *A. pisi* (Tableau 4), tout en étant dépourvue de phytotoxicité sur les plantes non inoculées.

| Préparation élicitrice  | SS* + H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>  |   | SS  |   | SR** + H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>  |   | SR  |   |
|---|---|---|---|---|--|---|---|---|
|   | SS  | SR  | SS  | SR  | SS   | SR  | SS  | SR  |
| Souche inoculée   | SS  | SR  | SS  | SR  | SS   | SR  | SS  | SR  |
| Intensité des symptômes   |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Concentration en scoparone (µg/ml)  | 75,0  | 70,9  | 12,3  | 14,9  | 18,3   | 19,1  | 14,1  | 14,3  |
| *Souche sensible <i>in vitro</i> à l'acide phosphoreux<br>**Souche résistante <i>in vitro</i> à l'acide phosphoreux |   |   |   |   |  |   |   |   |

Figure 3. Effets d'éliciteurs relâchés dans les filtrats de culture par deux souches de *Phytophthora citrophthora* sur l'infection de *Citrus jumbhiri* par *P. citrophthora*. 30 µg (équivalent glucose) d'éliciteurs sont déposés 2 h avant l'inoculation des feuilles de *Citrus jumbhiri* par *P. citrophthora*.

Figure 3. Effects of elicitors released in the culture filtrates by two strains of *Phytophthora citrophthora* on the infection of *Citrus jumbhiri* by *P. citrophthora*. 30 µg (glucose equivalent) of elicitors were placed onto *Citrus jumbhiri* leaves 2 h before inoculation by *P. citrophthora*.

## Diversité des mécanismes de chémoprotection indirecte

Le processus de l'infection d'une feuille à partir de spores d'un champignon phytopathogène débute par l'établissement d'un contact entre les deux protagonistes de la relation parasitaire, suivi de la germination de la spore fongique, de la formation d'un appressorium et de la pénétration d'un hyphes infectant au travers de la cuticule ou via les stomates.

Les exemples traités dans cet article illustrent la diversité des mécanismes d'action de substances qui protègent les plantes contre les infections fongiques en interférant avec le déroulement de la relation parasitaire ou avec le développement des symptômes (figure 4).

Les agents de l'antracnose du pois (*M. pinodes* et *A. pisi*) illustrent le cas de couples hôte-parasite pour lesquels la pénétration au travers de la cuticule implique une activité cutinasique. L'inhibition de l'induction, de la libération, ou de l'activité de la cutinase, par des composés organophosphorés ou par des acides gras, arrête le processus de l'infection *via* un mécanisme de chémoprotection indirecte.

Outre les substances agissant sur l'activité cutinasique, il existe d'autres composés antipénétrants dont le mode d'action est mal connu. Ainsi, les traitements des organes végétaux par des cires, des huiles, des silicones ou par divers polymères utilisés comme anti-transpirants, ont des effets protecteurs vis-à-vis de nombreux parasites (notamment oïdium et rouille chez le blé et *Botrytis cinerea*) [14]. Les films anti-transpirants, bien que biologiquement inertes, pourraient constituer une barrière mécanique à la pénétration, ou créer, par leur hydrophobicité, des conditions réduisant la disponibilité de l'eau nécessaire aux premières étapes de l'infection fongique, ou encore modifier le métabolisme foliaire.

Une fois que l'agent pathogène a franchi la barrière cuticulaire, des traitements chémoprotecteurs stimulant les mécanismes de défense de la plante peuvent rendre la relation parasitaire incompatible et déboucher sur la protection de l'hôte.

Ainsi, le traitement de certaines plan-

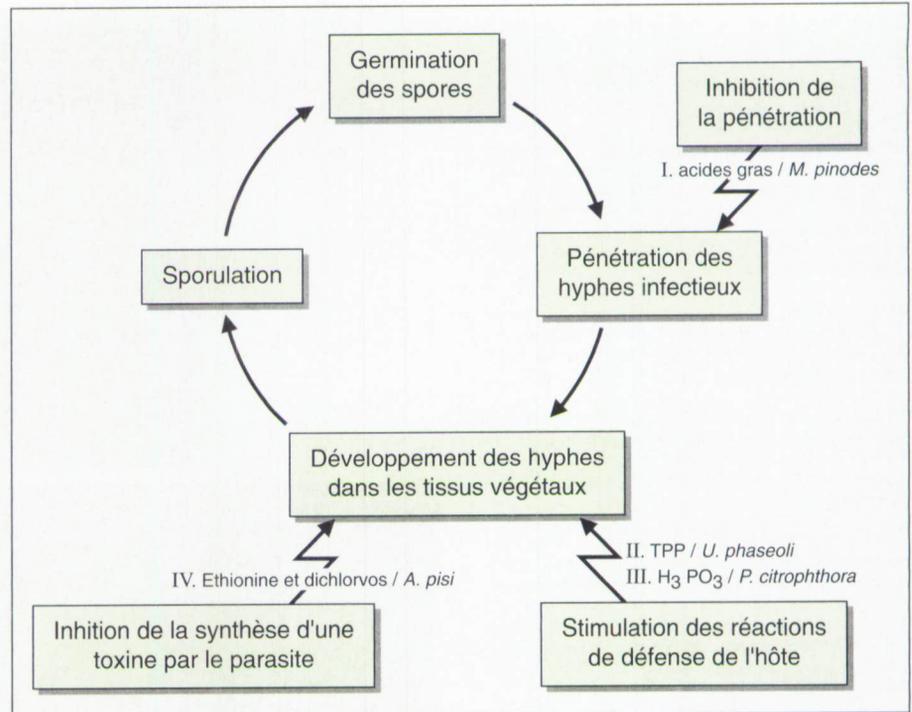


Figure 4. Mécanismes de chémoprotection indirecte. I. Addition d'acides gras à l'inoculum de *Mycosphaerella pinodes* sur le pois ; II. Effets du traitement du haricot au triphénylphosphite sur l'infection par *U. phaseoli* ; III. Effets du traitement des feuilles de *Citrus* avec l'acide phosphoreux sur l'infection par *P. citrophthora* ; IV. Effets du traitement du pois à l'éthionine et au dichlorvos sur l'infection par *A. pisi*.

Figure 4. Mechanisms of indirect chemoprotection. I. Addition of fatty acids to the inoculum of *Mycosphaerella pinodes* on the pea ; II. Effects of triphenylphosphite treatment on bean infection by *U. phaseoli* ; III. Effect of  $H_3PO_3$  treatment of *Citrus* leaf on infection by *P. citrophthora* ; IV. Effects of ethionine and dichlorvos treatment on pea infection by *A. pisi*.

tes avec l'éthyl-phosphite d'aluminium (dont le métabolite actif est l'acide phosphoreux) assure une protection contre l'infection par divers Phycomycètes. Plusieurs modes d'action du  $H_3PO_3$  ont été envisagés, notamment l'effet fongitoxique direct, la réduction du pouvoir pathogène, ou l'activation des réactions de défense de l'hôte [15, 16].

### Tableau 4

#### Effets de l'éthionine et du dichlorvos sur les lésions produites par *Ascochyta pisi* sur feuilles de pois

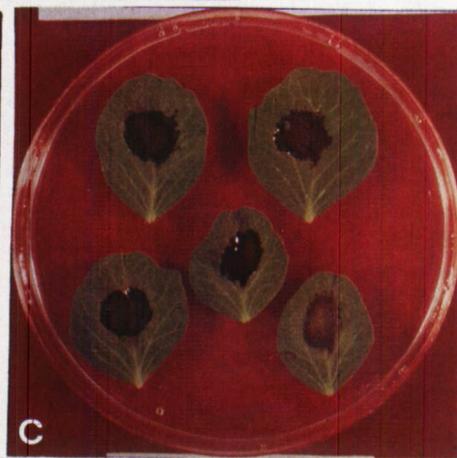
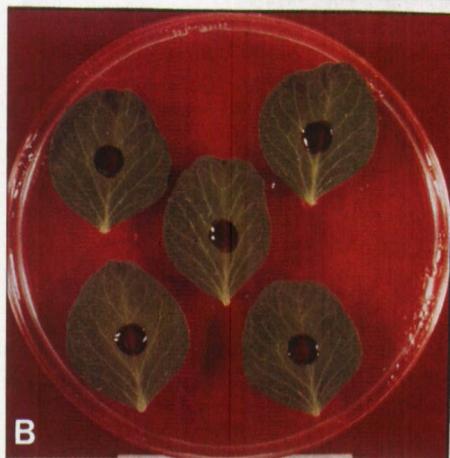
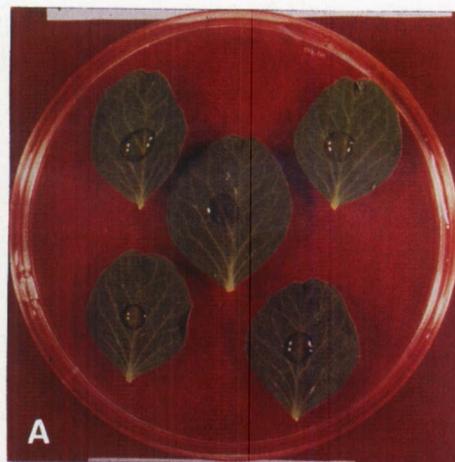
| Traitement*             | Diamètre des lésions ( $\mu\text{m}$ ) | Nombre de lésions |
|-------------------------|--|-------------------|
| Témoin                  | 219                                    | 21                |
| <b>Ethionine</b>        |  |                   |
| 200 ppm                 | 154                                    | 19                |
| 400 ppm                 | 83                                     | 20                |
| 200 ppm + a** (100 ppm) | 237                                    | 22                |
| 400 ppm + a (100 ppm)   | 224                                    | 18                |
| <b>Dichlorvos</b>       |  |                   |
| 25 ppm                  | 101                                    | 20                |
| 50 ppm                  | 98                                     | 22                |
| 25 ppm + a (100 ppm)    | 209                                    | 25                |
| 50 ppm + a (100 ppm)    | 225                                    | 23                |

\*. Traitement des feuilles 24 heures avant l'inoculation

\*\* a = ascochitine.

## Références

1. Trinci APJ, Ryley JK. *Mode of action of antifungal agents*. Cambridge : Cambridge University Press, 1984 : 405.
2. Vyas SC. Fungicide-induced host resistance. In : *Non-target effects of agricultural fungicides*. Boca Raton : CRC Press, 1988 : 227-37.
3. Wade M. Antifungal agents with an indirect mode of action. In : Trinci APJ, Ryley JK, eds. *Mode of action of antifungal agents*. Cambridge : Cambridge University Press, 1984 : 282-98.
4. Nasraoui B, Lepoivre P, Barthelemy JP, Semal J. Evidence of cutinase activity released by *Ascochyta pinodes* and *Ascochyta pisi*. *Med Fac Landbouww Rijksuniv, Gent* 1990 ; 55 : 835-42.
5. Nasraoui B, Lepoivre P, Lognay G, Semal J. Induction and release of cutinase activity from *Ascochyta pisi* by cutin and by commercial fatty acids. *Arch Int Phys Biochem et Biophys* 1991 ; 99 : B70.
6. Nasraoui B, Lepoivre P, Semal J. Effect of commercial fatty acids on cutinase release by *Ascochyta pisi*. *J Phytopath* 1992 (sous presse).
7. Rusuku G, Lepoivre P. Effets du triphénylphosphite sur l'infection du haricot par *Uromyces phaseoli* var. *typica* (Pers.) Wint. *Bull Rech Agron, Gembloux* 1983 ; 18 : 223-30.
8. Rusuku G, Lepoivre P, Meulemans M, Semal J. Effects of triphenylphosphite on bean rust development. *Plant Disease* 1984 ; 68 : 154-5.
9. Evrard P, Lepoivre P. Effet du dichlorure de triphénylbismuth vis-à-vis de la rouille du haricot et de la rouille de la féverole. *Parasitica* 1983 ; 39 : 117-27.
10. Ali MK, Lepoivre P, Semal J. *In vitro* selection of *Phytophthora citrophthora* isolates resistant to phosphorous acid and fosethyl-Al. *Med Fac Landbouww Rijksuniv, Gent* 1988 ; 53 : 597-604.
11. Ali MK. Prémunition contre l'infection de feuilles de *Citrus jumbhiri* Lush. par des souches de *Phytophthora citrophthora* en présence de tris-o-éthyl phosphate d'aluminium. *Bull Rech Agron, Gembloux* 1989 ; 24 : 329-34.
12. Ali MK, Lepoivre P, Semal J. Fosetyl-Al treatment of mycelium of *Phytophthora citrophthora* releases a higher scoparone elicitor activity from a fosetyl-Al sensitive strain than from an insensitive mutant. *Fruit* 1991 ; 46 : 51-5.
13. Lepoivre P. Effet de l'éthionine et de différents composés organophosphorés sur la synthèse *in vitro* de l'ascochitine par *Ascochyta pisi* (Lib.). *Med Fac Landbouww Rijksuniv, Gent* 1982 ; 47 : 252-60.
14. Ayish Y, Ziv O, Katan J. Control of grey mould (*Botrytis cinerea*) with film-forming polymers. *Plant Pathology* 1990 ; 39 : 249-54.
15. Dustan RH, Smillie RH, Grant BR. The effect of sub-toxic levels of phosphonate on the metabolism and potential virulence factors of *Phytophthora palmivora*. *Physiol Mol Plant Pathol* 1990 ; 36 : 205-20.
16. Saindrenan P, Barchietto T, Bompeix G. Effects of phosphonate on the elicitor activity of culture filtrates of *Phytophthora cryptogea* in *Vigna unguiculata*. *Plant Science* 1990 ; 67 : 245-51.
17. Bompeix G, Fettouche F, Saindrenan P. Mode d'action du phosetyl Al. *Phytiatrie-Phytopharmacie* 1981 ; 30 : 257-72.



**Photo 1.** Effet du diisopropylfluorophosphate (DFP) sur l'infection des feuilles de pois par *Mycosphaerella pinodes* (observations effectuées 48 h après l'inoculation).  
A : Inoculum de *M. pinodes* + DFP (10mM)  
B : Inoculum de *M. pinodes*  
C : Inoculum de *M. pinodes* + DFP (10 mM) sur feuilles blessées.

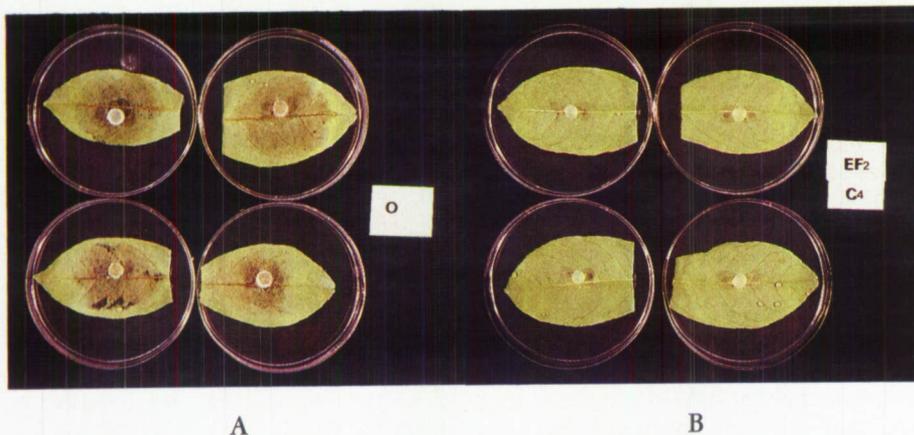
**Photo 1.** Effect of diisopropylfluorophosphate (DFP) on the infection of pea leaves by *Mycosphaerella pinodes* (observations made 48 h after inoculation).  
A : Inoculum of *M. pinodes* + DFP (10mM)  
B : Inoculum of *M. pinodes*  
C : Inoculum of *M. pinodes* + DFP (10mM) on wounded leaves.

Dans le cas de *P. citrophthora*, la libération spécifique d'une fraction élicitrice de scoparone, par traitement avec  $H_3PO_3$ , du mycélium d'une souche sauvage sensible *in vitro* à l'acide phosphoreux, avec corrélativement une protection des feuilles de *Citrus* contre l'infection par *P. citrophthora*, montre le caractère de chémoprotection indirecte du traitement avec  $H_3PO_3$ . L'effet du TPP sur l'infection du haricot par *U. phaseoli* suggère également un mode d'action indirect, aboutissant à la suppression de la relation trophique entre le champignon et les cellules de la plante hôte.

Enfin, l'exemple de l'ascochitine d'*A. pisi* montre comment il est possible, en conditions de laboratoire, d'inhiber la synthèse d'une toxine impliquée dans le développement d'une maladie fongique, avec réduction corrélatrice de l'intensité des symptômes.

## Caractéristiques de la chémoprotection indirecte

L'utilisation depuis 1972 du phoséthyl d'aluminium dans le vignoble français n'a pas entraîné de développement de souches de *Plasmopora viticola* (Berk et Curt.) résistantes [17] et il semble que



**Photo 2.** Effet d'éliciteurs de scoparone sur l'infection de feuilles de Citrus par *Phytophthora citrophthora* (souche sauvage). A = feuilles non traitées ; B = feuilles traitées avec la fraction I (figure 2A) du filtrat obtenu après inoculation de *P. citrophthora* en présence de  $H_3PO_3$ .

**Photo 2.** Effect of scoparone elicitors on the infection of Citrus leaves by *Phytophthora citrophthora* (wild strain). A = untreated leaves ; B = leaves treated with fraction I (figure 2A) of the filtrate obtained after incubation of *P. citrophthora* in the presence of  $H_3PO_3$ .

## Summary

### Indirect chemoprotection against plant pathogenic fungi : concept and applications

M. Ali, B. Nasraoui, P. Lepoivre, J. Semail

*Chemoprotection of plants against pathogenic fungi can be either direct (fungitoxic effects of fungicides) or indirect (treatments interfering with host-parasite relations).*

*A variety of models studied at the Faculty of Agricultural Sciences in Gembloux, are presented to illustrate this concept.*

#### The cutinase-based model

*Ascochyta pisi and Mycosphaerella pinodes are both pathogens of pea leaves. Upon in vitro culture of these fungi, using glucose as sole carbon source, no cutinase was released into the culture medium. When cutin was added to the mineral culture medium as sole carbon source, cutinase (as revealed by esterase activity) was induced and released by germinating spores and growing mycelium of both fungi. A similar in vitro induction and release of cutinase was obtained by adding 0.1 % fatty acids extracted from hydrolysed cutin to the culture medium. Cutinase release (but not cutinase induction) was inhibited by 0.3 % fatty acids. Similar results were obtained using the commercially available juniperic acid.*

*Infection was restored by wounding, or by adding exogenous cutinase to the inoculum, thus suggesting that fatty acid-induced inhibition was due*

*to interference with cutinase induction and/or release.*

*The triphenylphosphite-based model*  
*When sprayed onto bean leaves 2 days before inoculation with Uromyces phaseoli, triphenylphosphite (TPP) at 125 µg/ml, prevented the formation of rust pustules.*

*Spore germination, growth of hyphae on the leaf surface, formation of appressoria, penetration through stomata, formation of substomatal vesicles and development of infection hyphae, all proceeded normally on TPP-treated leaves, but no haustoria were formed.*

*Both α-aminoxyacetate (an inhibitor of the phenylpropanoid pathway) and cycloheximide (an inhibitor of protein synthesis) suppressed the inhibitory effect of TPP, when applied to TPP-treated leaves one day before inoculation. Apparently, TPP triggered a mechanism which prevented the formation of haustoria.*

*The phosphorous acid-based model*  
*Eliciting activity released by Phytophthora citrophthora, upon incubation in  $H_3PO_3$ , was evaluated by measuring the induction of scoparone accumulation in tissues of Citrus leaves. Upon incubation in phosphorous acid, the mycelium of a sensitive strain (but not that of a strain resis-*

*tant to  $H_3PO_3$ ) caused a significant scoparone-eliciting activity, and protected Citrus leaves from infection by both the sensitive or resistant strains of *P. citrophthora*.*

*The strain-specific release of scoparone elicitors, upon phosphorous acid treatment, explains why preinoculation of  $H_3PO_3$ -treated Citrus leaves with a sensitive strain releasing elicitors in the presence of phosphorous acid, protected such leaves against subsequent infection by a  $H_3PO_3$ -resistant strain.*

#### The ascochitine-based model

*Ethionine and dichlorvos, two inhibitors of in vitro synthesis of the polypeptide ascochitine by Ascochyta pisi, decreased the diameter (but not the number) of lesions formed on pea leaves, when sprayed one day before inoculation with the fungus. Symptom intensity was restored by applying exogenous ascochitine, thus suggesting that the protection effect was due to interference with ascochitine synthesis.*

*As shown, indirect chemoprotection may protect plants through various mechanisms which prevent host penetration, stimulate host resistance, or limit pathogenesis.*

*Cahiers Agricultures 1992 ; 1 : 47-54.*

le développement à grande échelle de biotypes pathogènes résistants vis-à-vis de ce composé soit peu probable. Nous avons montré que l'inoculation de feuilles de *Citrus*, traitées par l'acide phosphoreux, avec une souche sensible de *P. citrophthora*, protège contre l'infection subséquente par un mutant de *P. citrophthora* tolérant *in vitro* vis-à-vis de  $H_3PO_3$  [12]. Dès lors, on peut faire l'hypothèse qu'un tel mutant, qui serait formé au sein d'une population de spores de souches sauvages sensibles, ne pourrait se propager dans une plante traitée, étant

bloqué par les mécanismes de défense induits par les souches sensibles. Le criblage de molécules à effet chémoprotecteur indirect requiert des techniques particulières portant sur des couples hôte-parasite déterminés. Par exemple, le traitement à l'acide phosphoreux protège la tomate (mais non la pomme de terre) contre l'infection par *Phytophthora infestans* ; cet effet n'aurait pas été détecté en utilisant la seule pomme de terre comme plante hôte. Le spectre d'action plus ou moins large des molécules chémoprotectrices à

action indirecte, dépendra des mécanismes mis en jeu. Les inhibiteurs de la synthèse d'ascochitine ne sont actifs que vis-à-vis des toxines appartenant aux groupes des polycétides, ce qui réduit le nombre de couples hôte parasite potentiellement concernés par ces traitements. Par contre, les mécanismes d'induction et d'activité enzymatique des cutinases étant conservés chez nombre de champignons, cette enzyme pourrait s'avérer particulièrement intéressante comme cible de molécules chémoprotectrices à large spectre d'action ■

---

## Résumé

Plusieurs modèles illustrent le concept de la chémoprotection indirecte qui présente d'intéressantes perspectives dans la lutte contre les champignons phytopathogènes.

L'induction et la libération de cutinase à partir de spores en germination ou de mycélium de *Ascochyta pisi* ou *Mycosphaerella pinodes* sont stimulées ou inhibées par des acides gras, en fonction de leur nature et de leur concentration. Les acides gras extraits d'un hydrolysat de cutine inhibent l'infection du pois par *M. pinodes* ; cette inhibition est levée par un apport de cutinase exogène, ou en blessant la

surface de la feuille inoculée.

Le traitement au triphénylphosphite inhibe l'infection du haricot par l'agent de la rouille *Uromyces phaseoli*. Cette inhibition s'exprime en bloquant la formation des suçoirs dans les cellules parenchymateuses, sans affecter la germination, la formation des appressoriums, le développement des hyphes pénétrants, ou la différenciation de la cellule mère de l'haustorium.

Le développement de *Phytophthora citrophthora* dans les feuilles de *Citrus* est inhibé par traitement à l'acide phosphoreux. Le mécanisme en cause

repose sur des effets indirects : après traitement avec l'acide phosphoreux, le champignon libère des éliciteurs de scoparone, une phytoalexine des *Citrus*. L'application de ces éliciteurs protège les feuilles de *Citrus* contre l'infection par *P. citrophthora*. L'éthionine et le dichlorvos, deux inhibiteurs de la synthèse *in vitro* d'ascochitine, une toxine de *Ascochyta pisi*, diminuent le diamètre des lésions formées par ce champignon sur les feuilles de pois. Les symptômes sont rétablis après un apport d'ascochitine exogène, ce qui suggère que la protection est due à l'inhibition de l'ascochitine.