



Apparition de substances de type phénolamide lors de l'interaction *Dianthus caryophyllus* L. var. "Scania" – *Phytophthora parasitica* Dastur

Michel Ponchet, Josette Martin-Tanguy, Claudine Andréoli, Claude Martin

► To cite this version:

Michel Ponchet, Josette Martin-Tanguy, Claudine Andréoli, Claude Martin. Apparition de substances de type phénolamide lors de l'interaction *Dianthus caryophyllus* L. var. "Scania" – *Phytophthora parasitica* Dastur. *Agronomie*, 1982, 2 (1), pp.37-44. hal-00884350

HAL Id: hal-00884350

<https://hal.science/hal-00884350>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Apparition de substances de type phénolamide lors de l'interaction *Dianthus caryophyllus* L. var. « Scania » — *Phytophthora parasitica* Dastur

Michel PONCHET, Josette MARTIN-TANGUY(*), Claudine ANDRÉOLI & Claude MARTIN(*)

I.N.R.A., Station de Botanique et Pathologie végétale, Villa Thuret, F 06602 Antibes

(*) I.N.R.A., Station de Physiopathologie végétale, Centre de Recherches de Dijon, Domaine d'Epoisses-Bretenières, F 21110 Genlis

RÉSUMÉ

Phénolamides,
Elicitation,
Phytophthora parasitica
Dastur,
Dianthus caryophyllus L.,
Résistance,
Fluorescence,
Acide férulique.

Lorsque des sections basales de boutures d'œillet (*Dianthus caryophyllus* L. var. « Scania ») deviennent résistantes à *Phytophthora parasitica* Dastur, il apparaît des substances très fluorescentes parmi lesquelles un groupe (taches chromatographiques 6-6') semble plus spécifiquement marquer l'état de résistance lorsqu'elles s'accumulent considérablement *in situ*.

Tous ces composés fluorescents ont une nature aminée et possèdent un spectre d'absorption ultra-violet de type hydroxycinnamique. Nous proposons que ces molécules nouvelles, de type phénolamides, puissent servir de marqueurs physiologiques chez l'œillet, en particulier de la résistance à *P. parasitica*. Leur purification en vue d'une identification est en cours.

SUMMARY

Phenolamides,
Elicitation,
Phytophthora parasitica
Dastur,
Dianthus caryophyllus L.,
Resistance,
Fluorescence,
Ferulic acid.

Appearance of phenolamide-like substances in the interaction between *Dianthus caryophyllus* L. var. « Scania » and *Phytophthora parasitica* Dastur

Previous research on the resistance of carnation cuttings to *Phytophthora parasitica* Dastur has shown that a water-soluble elicitor from *P. parasitica*, can induce either resistance of the basal tissues of carnation (cuttings) or biosynthesis, in these tissues, of two fungitoxic phytoalexins.

The present work was performed on three kinds of carnation cuttings (table 1) B.F. : freshly sectioned cuttings, B.R. : B.F. cuttings (rooting) in a perlite substrate for 7 days, B.E. : B.F. cuttings in an elicitor suspension (homogenized mycelium of *P. parasitica* carnation strain 26 in distilled water) for 24 hours.

When *Dianthus caryophyllus* L. var. « Scania » becomes resistant to *P. parasitica* strain 26 (B.E.) we usually observe in the resistant tissues a number of new and highly fluorescent compounds (table 2 and fig. 1). These include a group of substances (chromatographic spots 6-6') which are almost absent from B.R. cuttings, susceptible to *P. parasitica* carnation strain 26. Another group of substances (chromatographic spots 5-5') always accumulates in B.R. cuttings (cf. table 2), and so are considered as good indicators of rhizogenesis. All these compounds have some of the properties of neutral phenolamides : U.V. spectra, amine constitution (table 3), solubility in organic solvent, fluorescence.

The correlation between 6-6' accumulation and resistance to *P. parasitica* carnation strain 26 (table 4) suggests that 6-6' are directly involved in resistance *in vivo*. Purification of these compounds (for identification) is almost achieved and results will be given in a further communication.

I. INTRODUCTION

Une forme de *Phytophthora parasitica* Dastur (Zygomycètes, Pythiacées) très pathogène pour l'œillet (*Dianthus caryophyllus* L.) a été mise en évidence pour la première fois en 1965 (TRAMIER & MERCIER, 1965) dans les Alpes-Maritimes (France) : elle se conserve dans le sol et s'attaque, surtout à la faveur d'une humidité importante, aux collets des plants d'œillet, provoquant alors une pourriture caractéristique. Les jeunes plants obtenus par boutu-

rage sont particulièrement sensibles à ce parasite, au niveau de leur cal rhizogène.

Les recherches effectuées sur l'interaction *Dianthus caryophyllus* L. var. « Scania »-*Phytophthora parasitica* Dastur ont permis de mettre en évidence plusieurs pathotypes de cet agent pathogène et d'en créer de nouveaux par croisements et mutations, tous ayant des aptitudes parasitaires (agressivité, virulence) très différentes vis-à-vis de 3 types de boutures (RICCI & BONNET, 1977 ; MAIA & VENARD, 1978 ; PERISSINOTTO, 1977) :

- boutures fraîchement coupées (B.F.),
- boutures en voie de rhizogénèse (B.R.) (boutures B.F. placées 7 j. sur un milieu perlite sous nébulisateur d'eau),
- boutures élicitées (B.E.) (boutures B.F. trempées 24 h dans une solution élicitrice).

La possibilité d'éliciter les boutures d'œillet, par trempage dans le filtrat d'une suspension aqueuse de zoospores germées de *P. parasitica* souche œillet, avait été mise en évidence en 1974 (LUCAS & PONCHET, 1974). Cette élicitation induit la résistance des boutures d'œillet à toutes les souches de *P. parasitica*, de même que l'apparition de substances de type phytoalexine, fongitoxiques, au niveau des sites élicités (LUCAS & PONCHET, 1974). Des travaux plus récents ont permis de montrer qu'il y avait, après élicitation, synthèse *in vivo* de 2 substances : l'une, très fongitoxique, absorbant le rayonnement ultra-violet (254 nm) et l'autre émettant une fluorescence sous rayonnement ultra-violet (366 nm) (PERISSINOTTO, 1977 ; RICCI & JACQUEMOND, 1978).

Ce mécanisme d'élicitation semble assez proche de ceux déjà décrits par d'autres auteurs (KEEN, 1975 ; ALBERSHEIM & ANDERSON-PROUTY, 1975 ; ALBERSHEIM & VALENT, 1978 ; AYERS *et al.*, 1976) et dans lesquels des motifs polysaccharidiques (éliciteurs) isolés d'agents pathogènes sont capables d'induire chez l'hôte la synthèse de phytoalexine.

Une étude effectuée sur l'interaction entre différents tabacs et le VMT (MARTIN-TANGUY *et al.*, 1973 ; MARTIN-TANGUY *et al.*, 1976) a permis de montrer qu'un nouveau groupe de molécules, appelées phénolamides, marquait de manière très précise le phénomène de résistance du tabac au VMT. Il nous a semblé intéressant de rechercher une extension de ces observations, faites sur un modèle plante-virus, à un modèle plante-micromycète.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Système pathologique

De l'ensemble des travaux effectués sur l'interaction œillet-*P. parasitica*, nous avons retenu, pour notre étude, le système figuré au tableau 1.

B. Matériel végétal

Les boutures d'œillet sont récoltées en serre, stockées en chambre froide (+ 4 °C, pendant moins d'un mois) entre leur récolte et leur utilisation qui nécessite de recouper la section basale cicatrisée de ces boutures.

C. Test de résistance

Nous avons utilisé, pour contrôler le taux d'inféctibilité des différents types de boutures, un test par inoculation de leurs sections basales par des suspensions calibrées de zoospores de *P. parasitica* souche œillet (souche 26). A cet effet, des lots de 20 boutures (ayant subi le même traitement) sont inoculés par dépôt de 2 000 zoospores par section basale de bouture ; le taux d'infection est noté 5 j après inoculation. Ce choix, permettant de faire varier la pression d'inoculum, présente toutefois l'inconvénient d'être sujet à des variations dues au comportement des zoospores, sensibles aux chocs osmotiques et dont la germination, donnant une hyphes mycélienne, est souvent aléatoire.

TABLEAU 1

Système œillet-*P. parasitica* utilisé
Carnation-*P. parasitica* system involved in resistance study

Souche de <i>P. parasitica</i> <i>P. parasitica</i> strain		
Boutures Cuttings	Souche Oeillet 26 Carnation strain 26	Autres souches (44, 90, 102) Other strains (44, 90, 102)
B.F.	+++	+ à/to ++
B.R. 7 j.	++	0
B.E. 24 h.	0	0

26 : souche isolée sur Œillet (Isolate from Carnation).

44 : souche isolée sur *Citrus* sp. (Isolate from *Citrus* sp.).

90 : souche isolée sur *Acacia* sp. (Isolate from *Acacia* sp.).

102 : souche isolée sur *Iris* sp. (Isolate from *Iris* sp.).

B.F. : boutures fraîchement sectionnées (Freshly sectioned cuttings).

B.R. : boutures B.F. placées 7 j. sur perlite et sous nébulisateur d'eau (B.F. cuttings in perlite medium and under mist for 7 days).

B.E. : boutures B.F. trempées 24 h. dans une solution élicitrice (B.E. cuttings placed in elicitor suspension for 24 h).

0 : boutures résistantes (Resistant cuttings).

+ à/to ++ : boutures sensibles (Susceptible cuttings).

+++ : très sensibles (Very susceptible).

D. Élicitation

L'éliciteur utilisé est une suspension d'un broyat mycélien de la souche 26 de *P. parasitica*, cultivée sur milieu malt liquide (1 p. 100 p/v) en fiole de Roux. L'ensemencement se fait par dépôt de zoospores (10⁴ zoospores environ) afin d'avoir une culture homogène. Le champignon est récolté après 15 j de prolifération, rincé à l'eau distillée, puis essoré sur filtre étamine. Il sera ensuite dilacéré et broyé dans du méthanol, filtré puis relavé plusieurs fois, successivement par du méthanol, du chloroforme puis de l'éther de pétrole. Ce processus permet de récupérer un « culot » mycélien débarrassé des lipides très abondants chez *P. parasitica*, et constitué pour l'essentiel de parois mycéliennes. Ce culot est séché (50 °C), pulvérisé en broyeur à billes ; la poudre obtenue est mise en suspension dans l'eau distillée (10-30 mg/100 ml).

E. Mise en évidence des substances de type phénolamide

L'extraction de ces substances à partir de matériel végétal fraîchement prélevé (sections de bouture, feuilles etc...) se fait par broyage dans le méthanol, puis filtration et lavage du culot par plusieurs volumes de méthanol. Les filtrats sont réunis, concentrés à sec sous vide et réextraits par un mélange eau-acétate d'éthyle (1/1 v/v). Les phases sont séparées en ampoule à décanter et la phase eau, lavée 3 fois par de l'acétate d'éthyle, est éliminée tandis que les phases acétate d'éthyle sont réunies, concentrées à sec sous vide et reprises par du méthanol (environ 10 ml/g MF). La mise en évidence des substances contenues dans cet extrait se fait par chromatographie bidimensionnelle descendante sur papier Whatman n° 2 (dimension 1 : BEE Butanol-Ethanol-Eau 412 v/v, dimension 2 : Eau distillée pH 5,5) et exposition de ces chromatogrammes sous U.V. (254 nm, 360 nm).

La purification de ces molécules se fait soit sur colonne de cellulose (gradient eau/méthanol 1 p. 100 acétique), soit sur colonne de silicagel (gradient chloroforme/méthanol) soit, enfin, sur colonne de polyvinylpyrrolidone (méthanol).

III. RÉSULTATS

A. Substances du système œillet-*P. parasitica*

Une analyse d'extraits méthanoliques des sections basales des boutures B.F., B.R. et B.E. (tabl. 1) nous permet de mettre en évidence de nombreuses substances fluorescentes au niveau des boutures B.R. et B.E., substances totalement absentes dans les boutures B.F. et dont les caractéristiques sont données par le tableau 2 et la figure 1. Précisons, de plus, que les témoins des boutures B.E. trempés dans l'eau distillée au lieu de solution élicitrice, n'accumulent que des traces de ces composés fluorescents.

Les boutures B.E. contiennent des quantités très importantes de substances de type 6-6' (fig. 1 et tabl. 2). La

purification de ces composés nous permet de constater que les taches chromatographiques 6-6' sont en fait constituées d'au moins 4 molécules superposées.

Dans les cals rhizogènes des boutures B.R., on note une accumulation importante de composés de type 5-5' (fig. 1 et tabl. 2), tandis que le groupe 6-6' est très minoritaire.

En conséquence, nous avons ici 2 phénomènes physiologiques : rhizogénèse — cicatrisation et élicitation, marqués par un équilibre différent de 2 groupes de substances, proches du point de vue comportement chromatographique. Lorsque 6-6' est très majoritaire et 5-5' présent en faible quantité, nous sommes en présence de boutures résistantes à toutes les souches de *P. parasitica* tandis que si l'équilibre est inversé (5-5' très important, 6-6' presque absent) les boutures, cicatrisées et en voie de rhizogénèse, sont résistantes aux souches « non œillet » de *P. parasitica*, mais sensibles à la souche œillet du parasite.

Les principales molécules décrites ont été purifiées en très faible quantité et ont fait l'objet d'analyses préliminaires : spectres ultra-violet et analyse d'amines constituantes (PONCHET, 1981), (tabl. 3). Tous ces composés aromatiques, insolubles dans l'eau, ont un spectre caractéristique

TABLEAU 2

Caractéristiques de substances rencontrées chez l'œillet (fig. 1)
Main substances with some of their properties found in carnation cuttings

COMPOSÉS COMPOUNDS	FLUORESCENCE		R _F × 100		ABONDANCE/IMPORTANCE		
	366 nm + NH ₃	254 nm	BEE	H2O	B.F.	B.R.	B.E.
1 v	bleutée	verte	90	5	0	+	++
1 b	0	bleu pâle	92	8	0	?	+
2	0	violette	40	7	0	+	++
3 α	vert franc	0	42	3	0	++	++
3 α'			45	69			
3 β			65	3			
3 β'			65	70			
4	0	violette	50	5	0	++	?
5	0	violette	60	15-23	0	+++	+
5'	0	violette	54	10-25	0	+++	+
6	violette	verte	65	20-40	0	+	++++
6'	violette	verte	52	25	0	+	+++
I (**)	0	bleu argenté	55	35	0	?	++
II (**)	0	bleu argenté	60	55	0	?	++
PT (*)	violette	violette	85	45-65	traces	traces	traces
FT (*)	verte	violette	85	30-55	traces	traces	traces

0 à/to +++++ : absent à très abondant (Intensity on chromatograms).

(*) Composés à l'état de traces dans les boutures, abondants dans les fleurs d'œillet et de diverses espèces végétales, PONCHET (1981) (Traces only in cuttings, but large quantities known to be present in carnations and other flowers) (PONCHET, 1981).

(**) Composés dont la nature n'a pas été étudiée (Unknown and unstudied compounds).

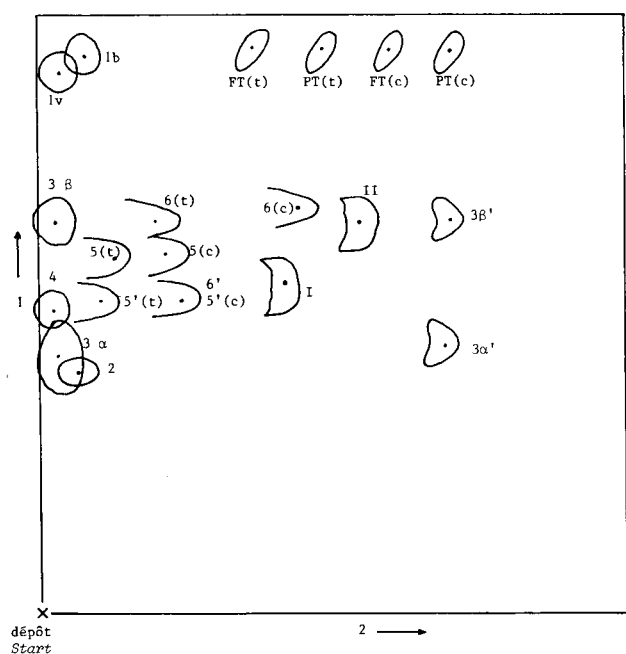


Figure 1

Chromatogramme théorique représentant les substances (taches chromatographiques) trouvées chez l'œillet (tabl. 2).

Theoretical chromatographic distribution of the carnation compounds (table 2).

1: BEE 412 v/v Butanol-Ethanol-Eau (BEW 412 v/v Butanol-Ethanol-Water)

2: Eau (water) pH 5,5

t: trans, c: cis.

Caractéristiques des composés (Properties of the compounds): tableau 2 (table 2).

TABLEAU 3

Nature de quelques substances rencontrées chez l'œillet: spectre d'absorption ultra-violets, libération par hydrolyse

Nature of several of the main compounds found in carnation: U.V. spectra, hydrolysis (released amines)

Composés Compounds	Maximum U.V. nm Spectre/Spectra U.V. maximum nm	Amines libérées HC1 2N 5 h 100 °C Released amines
1v	315-277-250	Spm, Spd, Put
3	320-295	Tym
4	?	Put
5	308-270-254	Spm, Put, Spd, 2 i
5'	308-270-254	Spm, Put, Spd, 2 i
6	310-270	Spd, Put, Spm, 4 i
6'	310-280-242	Spm, Spd, Put, 2 i
PT	?	Tym
FT	?	Tym

Put: Putrescine
Spd: Spermidine
Spm: Spermine
Tym: Tyramine
i: Pics inconnus

du noyau cinnamique substitué: maximum vers 310 nm et 290 nm avec cependant, en plus, un maximum vers 250 nm. 6 et 5 montrent une isomérisation classique de type cis-trans, alors que 3 possèdent 4 isomères (3 α et 3 β' étant les plus abondants). De plus, tous ces composés, mis à part 3 libérant de la tyramine, semblent constitués d'amines aliphatiques, souvent au nombre de plusieurs: putrescine, spermidine, spermine (tabl. 3). Ceci peut être imputable à une mauvaise séparation préliminaire des composés à hydrolyser, impliquant la présence de plusieurs molécules libérant une amine dans les fractions hydrolysées, ou encore à un artéfact de manipulation ayant pour conséquence la présence accidentelle d'amines résiduelles dans ces fractions hydrolysées; ce qui signifierait, dans ce dernier cas, que ces dérivés de nature cinnamique, sauf 3 libérant des quantités importantes de tyramine, ont une structure particulière ne comprenant pas en tout cas les amines trouvées classiquement combinées aux dérivés hydroxycinnamiques: putrescine (RYABININ & IL'INA, 1949, 1950; WHEATON & STEWART, 1965; HOLLERBACH & SPITELLER, 1970; MIZUSAKI *et al.*, 1970, 1971; BUTA & IZAC, 1972; MARTIN-TANGUY *et al.*, 1973, 1976, 1978, 1979; MBADIWE, 1973; DELETANG, 1974; CABANNE *et al.*, 1976, 1977; CABANNE, 1980; BERLIN, 1981; PONCHET, 1981), cadavérine (MARTIN-TANGUY *et al.*, 1979), hydroxyputrescine (STOESSL *et al.*, 1969), agmatine (STOESSL, 1965), spermidine (DELETANG, 1974; CABANNE *et al.*, 1976, 1977; CABANNE, 1980; MARTIN-TANGUY *et al.*, 1978, 1979; ELLESTAD *et al.*, 1978), spermine (MARTIN-TANGUY *et al.*, 1978, 1979), phénéthylamine (PONCHET, 1981), tyramine (RONDEST *et al.*, 1968; CABANNE *et al.*, 1977; CABANNE, 1980; MARTIN-TANGUY *et al.*, 1978, 1979; YOSHIHARA *et al.*, 1978; PONCHET, 1981), octopamine (YOSHIHARA *et al.*, 1978), tryptamine (EHMANN, 1974), détectables grâce à la méthode d'analyse utilisée.

B. Substances 6-6' et résistance

En faisant varier différents paramètres, nous avons essayé de vérifier le marquage, par les substances 6-6', de la résistance de l'œillet à *P. parasitica*.

1. Eliciteurs d'origine différente

Nous avons préparé des suspensions élicitrices à partir de mycélium de différentes souches de *P. parasitica* (souche 102 isolée sur *Iris* sp., souche 90 isolée sur *Acacia* sp., souche 44 isolée sur *Citrus* sp., souche H₁₈ issue du croisement 44 × 26, souche C₅ mutant avirulent de la souche 26) toutes ces souches étant non pathogènes (s.s.) vis-à-vis de boutures cicatrisées d'œillet. Nous avons également préparé un éliciteur à partir de mycélium de *Fusarium oxysporum* f. *dianthi*, autre agent pathogène de l'œillet.

Il apparaît que toutes ces suspensions élicitrices induisent au niveau de sections fraîches de boutures d'œillet à la fois une résistance totale (100 p. 100) à la souche 26 (tabl. 4) et une accumulation importante de 6-6' (comparable pour les différents éliciteurs).

Ce phénomène d'induction ne semble donc pas être un processus spécifique, dû à la reconnaissance du parasite compatible (souche œillet 26) par l'hôte. Il est probablement lié à un processus général de la reconnaissance de motifs moléculaires exogènes, la spécificité parasitaire résultant plutôt de l'intégration de facteurs multiples tels que vitesse de progression *in situ* propre au champignon,

TABLEAU 4

Sensibilité à la souche œillet 26, de boutures d'œillet (récoltées en janvier 1980) soumises à différents traitements
 Susceptibility of carnation cuttings (harvested January 1980) to *P. parasitica* carnation strain

Type de boutures Kind of cuttings	Boutures contaminées Infected cuttings	% résistance
Témoins : B.F. (a) Control sample : B.F.	19	5
B.E. 48 h [*] .	0	100
Témoins B.E. : 48 h dans l'eau distillée (a) Control sample B.E. : 48 h in distilled water	11	45 (*)
Absorption d'acide férulique Ferulic acid absorption	48 h $\nearrow 10^{-3}$ M	3
	$\searrow 10^{-4}$ M	85
		60

Lots de 20 boutures inoculées par 2 000 zoospores (Batches of 20 cuttings inoculated with 2 000 zoospores).

Eliciteurs du *P. parasitica* souches 26 (a), 102 (b), 90 (b), H₁₈ (b), C₅ (b) et du *Fusarium oxysporum* f. *dianthi* (a) (Elicitors from *P. parasitica* strain 26 (a), 102 (b), 90 (b), H₁₈ (b), C₅ (b), and from *Fusarium oxysporum* f. *dianthi* (a)).

(a) 3

(b) 1 Répétitions (Replicates)

(c) 2

(*) Une résistance importante (45 p. 100) est obtenue après 48 h dans l'eau distillée, elle est due à la cicatrisation des tissus sectionnés. Vis-à-Vis de *P. parasitica*, ces boutures se comportent presque comme les boutures. B.R. (tabl. 1).

ses besoins trophiques... (DARTIGUES, 1979) qui font que seules les souches spécifiques sont capables d'éviter les barrières de défense de l'hôte avant leur mise en place.

2. Variations physiologiques

Nous avons utilisé les travaux effectués par N. MAÏA (résultats non publiés) sur les variations saisonnières de la sensibilité de l'œillet à *P. parasitica* souche 26. Ces travaux démontrent que l'œillet possède, au cours d'une année, une période de très forte résistance au mois de janvier et une période de très forte sensibilité vers les mois d'octobre-novembre. Nous avons constaté que durant cette dernière période, les boutures « élicitées », sensibles à la souche 26 (d'après RICCI, résultats non publiés), n'accumulaient que des traces de substances (en particulier 6-6'), tandis que pendant la période de résistance, on assiste, après élicitation, à une accumulation considérable de ces composés. Nous avons pu constater, là encore, une complète corrélation entre l'apparition importante de 6-6' et la résistance de l'œillet à *P. parasitica* souche œillet.

3. Incorporation d'acide férulique

Considérant les acides hydroxycinnamiques comme pré-curseurs éventuels de ces substances à nature cinnamique, nous avons fourni, à des sections basales de boutures, de l'acide férulique en solution (10^{-3} M et 10^{-4} M) dans l'eau distillée.

Nous avons porté notre choix sur l'acide férulique, car

c'est, avec l'acide caféique, l'acide hydroxycinnamique le plus fréquemment trouvé combiné à d'autres molécules (sucres, acides organiques...) chez les végétaux et chez l'œillet en particulier. De plus, contrairement à l'acide caféique, c'est une molécule stable et peu sensible à l'oxydation.

Dans les sections de boutures ayant absorbé pendant 48 h de l'acide férulique 10^{-4} M, nous avons observé une apparition en faible quantité de substances 6-6' et parallèlement une résistance accrue à *P. parasitica* souche œillet. Ces boutures sont en moyenne plus résistantes que les témoins ayant absorbé de l'eau distillée (tabl. 4).

A 10^{-3} M, l'acide férulique est phytotoxique et on observe une accumulation très importante de férulylglucose. Il semblerait que ce soit un processus courant de détoxification des acides phénoliques (SCHLEPPHORST & BARZ, 1979), les rendant ainsi moins lipophiles, donc moins toxiques vis-à-vis des systèmes membranaires. Ces boutures contenant des quantités importantes de férulylglucose sont en majorité résistantes à *P. parasitica* souche œillet. Leur taux de résistance se situe autour de 85 p. 100, bien supérieur à celui des témoins correspondants trempés dans l'eau (tabl. 4).

Ces sections de boutures accumulant du férulylglucose et devenues résistantes contiennent, 5 j après inoculation, des quantités importantes de 6-6' tandis que le férulylglucose a disparu. Nous proposons que ce dernier constitue une forme disponible d'acide férulique, rapidement incorporable dans les composés de type 6-6'. En effet, le temps de latence que l'on observe toujours entre la stimulation de synthèse des molécules à squelette cinnamique (esters hydroxycinnamiques, coumarines, flavonoïdes...) et leur apparition est en fait le temps d'activation des enzymes, comme la PAL, responsables de la biosynthèse des acides cinnamiques.

Dans le cas de l'œillet, la présence de férulylglucose supprime probablement ce temps de latence, les molécules pouvant alors être combinées rapidement et induire très vite la résistance.

De plus, les zoospores inoculées sont peut-être très sensibles à l'acide férulique qui reste détectable à l'état de traces au niveau des sections de boutures l'ayant absorbé et on sait que les acides hydroxycinnamiques ont, comme l'acide caféique (KOIKE *et al.*, 1979) ou l'acide férulique (résultats non publiés), une activité antibiotique élevée.

Toutefois, la propriété qu'a l'acide férulique d'induire la résistance *in vivo* après son incorporation, a déjà été signalée (SRIDHAR *et al.*, 1979).

C. Localisation des substances 6-6'

Lorsqu'on élicite une section basale de bouture d'œillet, on observe une accumulation très importante de 6-6' jusqu'à 5 mm au-dessus de la section, moins importante entre 5 et 10 mm et indétectable par nos moyens au-dessus de 10 mm. Cette accumulation est donc très locale (environ 1 cm autour du stimulus) mais elle nécessite la présence de feuilles sur la bouture. En effet, si on élicite des sections de tige d'œillet, dépourvue de feuilles, aucune substance ne s'accumule ; par contre, des fragments de feuilles seuls sont capables de synthétiser ces composés. La présence de la feuille est donc nécessaire pour que ces molécules soient biosynthétisées.

En outre, nous avons pu mettre en évidence les zones d'accumulation préférentielle de ces molécules (surtout 6-6') par leur forte fluorescence à 254 nm. Pour cela, nous avons réalisé des empreintes de sections longitudinales et transversales de boutures d'œillet qui sont obtenues par



Fig. 2

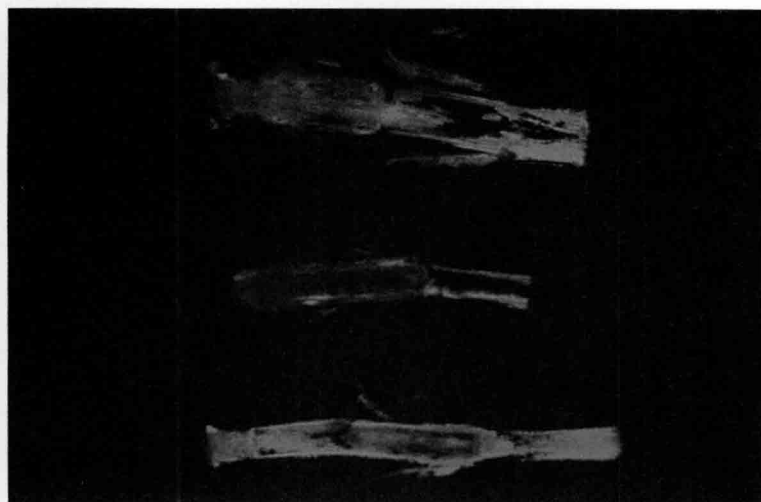


Fig. 3

Figures 2, 3

Empreintes de sections longitudinales élicitées de boutures d'œillet, exposées au rayonnement ultra-violet (254 nm).

Prints from longitudinal sections of elicited carnation cuttings, viewed under ultra-violet (254 nm).

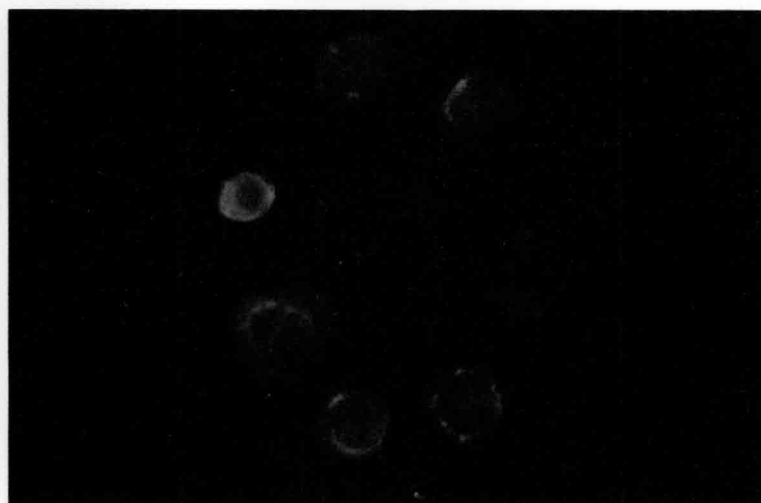


Fig. 4

Figure 4

Empreintes de sections transversales élicitées de boutures d'œillet, exposées au rayonnement ultra-violet (254 nm).

Prints from transverse sections of elicited carnation cuttings, viewed under ultra-violet (254 nm).

simple application, sous pression légère, des sections de boutures sur papier chromatographique Whatman n° 2 légèrement imbibé de méthanol. (Les sections de boutures sont élicitées pendant 48 h.)

L'observation de ces empreintes sous U.V. (254 nm) nous permet de constater que :

1) celles des boutures trempées pendant 48 h (dans l'eau distillée) ou fraîchement coupées, n'émettent aucune fluorescence et sont à peine décelables par leur légère absorption du rayonnement ultra-violet,

2) celles des boutures élicitées pendant 48 h émettent une forte fluorescence verte, caractéristique de 6-6' (planche 1, fig. 2, 3, 4). Une observation plus approfondie montre que les zones les plus fluorescentes correspondent aux sections de nœuds, de feuilles et de tissus périphériques (tissus conducteurs, parenchymes chlorophylliens) tandis que les zones centrales des entrenœuds, constituées par un parenchyme médullaire, n'émettent qu'une faible fluorescence.

Il apparaît, par conséquent, que l'accumulation et probablement la biosynthèse de ces substances (surtout 6-6') sont surtout localisées au niveau des parenchymes chlorophylliens et des tissus conducteurs.

IV. DISCUSSION

Au cours de cette étude, nous avons constaté que l'accumulation des substances 6-6' « marquait » parfaitement la résistance de l'œillet, variété « Scania », à la souche pathogène 26 de *P. parasitica*. Une étude de l'apparition de ces molécules *in situ* devrait permettre de déterminer un seuil minimum au-delà duquel les tissus accumulant ces composés deviennent résistants à *P. parasitica* souche œillet pour une pression d'inoculum donnée.

De plus, il semble que les substances 5-5' soient de bons marqueurs de la cicatrization et de la rhizogénèse.

Il reste, cependant, plusieurs points à éclaircir : identification de ces molécules de nature cinnamique, purification en quantité suffisante en vue d'expérimentation *in vitro* et dosage. L'étude de l'action *in vitro* de ces molécules devrait apporter des indications sur leur rôle éventuel tant chez l'œillet que chez *P. parasitica* : fongitoxicité, hormones de stimulation... et de rechercher un lien avec la lignification, récemment observée (POITRINEAU, 1980), des parois des premières cellules élicitées. Le dosage de toutes ces molécules a été partiellement réalisé en HPLC (High Performance Liquid Chromatography) et pourrait contribuer à une connaissance plus fine des séquences d'apparition de ces composés en fonction des stimulus physiologiques. Ajoutons que l'emploi de cette méthode de dosage a confirmé l'existence de plusieurs composés superposés sur les taches chromatographiques 6-6'.

Nous pensons qu'une meilleure connaissance de la biochimie de ces molécules devrait aboutir à une nouvelle approche de l'interaction œillet-*P. parasitica* durant les premières phases de l'infection. En effet, l'apparition de 6-6' est précoce (dès 6-8 h après élicitation) et sa concentration est maximale vers 48-72 h : dans une section basale de bouture élicitée, nous avons estimé qu'il y avait environ 10^{-5} à 5×10^{-5} M de 6-6' (en équivalent hydroxycinnamique à 310 nm), ce qui est considérable.

Une purification de toutes ces molécules est en cours et fera l'objet d'une prochaine communication.

Reçu le 20 mai 1981.

Accepté le 25 septembre 1981.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier E. PERDRIZET et J. PREVOST (I.N.R.A.-Dijon) pour leur coopération (analyses d'amines).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albersheim P., Anderson-Prouty A., 1975. Carbohydrates, proteins, cell surfaces and the biochemistry of pathogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 31-52.
- Albersheim P., Valent Barbara, 1978. Host-pathogen interactions in plants. *J. Cell Biol.*, **78**, 627-643.
- Ayers A., Ebel J., Valent B., Albersheim P., 1976. Host-pathogen interactions. X-Fractionation and biochemical activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.*, **57**, 760-765.
- Berlin J., 1981. Formation of putrescine and cinnamoyl putrescines in tobacco cell cultures. *Phytochemistry*, **20**, 53-55.
- Buta J., Izac R., 1972. Solanaceae : caffeoylputrescine in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, **11**, 1188-1189.
- Cabanne F., 1980. Etude de nouveaux dérivés hydroxycinnamiques au cours du développement de *Nicotiana tabacum* L. var. *Xanthi* n.c. Thèse Doc. ès-Sciences naturelles, Univ. Dijon, 191 p.
- Cabanne F., Martin-Tanguy J., Perdrizet E., Vallée J. C., Grenet L., Prevost J., 1976. Présence de composés phénoliques liés à des polyamines dans les feuilles de *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* n.c. sain. Apparition contemporaine de l'induction florale de la plante. *C.R. Acad. Sci. Paris, D*, **282**, 1959-1962.
- Cabanne F., Martin-Tanguy J., Martin C., 1977. Phénolamines associées à l'induction florale et à l'état reproducteur de *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* n.c. *Physiol. vég.*, **15**, 429-443.
- Dartigues V., 1979. Essai de détermination du support physiologique de l'agressivité dans le couple Œillet-*Phytophthora parasitica*. Mémoire de D.E.A., I.N.A. Paris-Grignon-Univ. Orsay, 20 p.
- Deletang J., 1974. Présence de caffeoylputrescine, caffeoylspermidine et de dicaffeoylspermidine chez *Nicotiana tabacum*. *Ann. du Tabac* (SEITA), **2** (11), 124-130.
- Ehmann A., 1974. N (p-coumaryl) tryptamine and N ferulyltryptamine in kernels of *Zea mays*. *Phytochemistry*, **13**, 1979-1983.
- Ellestad G., Cosulich D., Broschard R., Martin J., Kunstmann M., Morton G., Lancaster J., Fulmor W., Lovell F., 1978. Glycocinnamoylspermidines, a new class of antibiotics. 3. The structures of LL-BM 123 β , γ_1 and γ_2 . *J. am. chem. Soc.*, **100**, 2515-2524.
- Hollerbach A., Spittler G., 1970. Die Struktur des Paucins. *Mh. Chem.*, **101**, 141-156.
- Keen N. T., 1975. Specific elicitors of plant phytoalexine production : determinants of race specificity in pathogens. *Science*, **187**, 74-75.
- Koike S., Iizuka T., Mizutani J., 1979. Determination of caffeic acid in the digestive juice of silkworm larvae and its antibacterial activity against the pathogenic *Streptococcus faecalis* AD-4. *Agric. biol. Chem.*, **43**, 1727-1731.
- Lucas P., Ponchet J., 1974. Production par l'œillet d'une substance de type phytoalexine inhibitrice d'une souche pathogène de *Phytophthora nicotianae parasitica* (Dastur) Waterh. *Ann. Phytopathol.*, **6**, 494-495.
- Maia N., Venard P., 1978. Parasitisme de l'œillet par *Phytophthora parasitica*. I. Etude génétique du pouvoir pathogène chez le *Phytophthora parasitica* de l'œillet. *Ann. Phytopathol.*, **10**, 391-404.
- Martin-Tanguy J., Martin C., Gallet M., 1973. Présence de composés aromatiques liés à la putrescine dans divers *Nicotiana* virosés. *C.R. Acad. Sci. Paris, D*, **276**, 1433-1435.
- Martin-Tanguy J., Martin C., Gallet M., Vernoy R., 1976. Sur de puissants inhibiteurs naturels de multiplication du virus de la Mosaïque du Tabac. *C.R. Acad. Sci. Paris, D*, **282**, 2231-2234.
- Martin-Tanguy J., Cabanne F., Perdrizet E., Martin C., 1978. The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. *Phytochemistry*, **17**, 1927-1928.

- Martin-Tanguy J., Deshayes A., Perdrizet E., Martin C., 1979.** Hydroxycinnamic acid amides (HCA) in *Zea mays*: distribution and changes with cytoplasmic male sterility. *Febs. Letter*, **108**, 176-178.
- Mbadiwe E., 1973.** Caffeoylputrescine from *Pentaclethra macrophylla*, *Phytochemistry*, **12**, 2546.
- Mizusaki S., Tanabe Y., Noguchi M., 1970.** A new aromatic amide, caffeoylputrescine from callus tissue culture of *Nicotiana tabacum*. *Agr. biol. Chem.*, **34**, 972-973.
- Misusaki S., Tanabe Y., Noguchi M., Tamaki E., 1971.** P-coumaroylputrescine, caffeoylputrescine, feruloylputrescine from callus tissue culture of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, **10**, 1347-1350.
- Perissinotto J., 1977.** Etude de l'interaction *Phytophthora parasitica*-œillet. Aspect quantitatif et applications. *Mémoire de fin d'études*, Diplôme E.N.S.H., Versailles. 52 p.
- Poitrineau E., 1980.** Contribution à l'étude des relations hôte-parasite dans le couple *Phytophthora parasitica*-œillet. *Mémoire de fin d'études* E.S.I.T.P.A. 58 p.
- Ponchet M., 1981.** Les phénolamides, nouvelle classe biochimique de marqueurs d'événements physiologiques. *Thèse de Docteur-Ingénieur*, I.N.A. Paris-Grignon. 265 p.
- Ricci P., Bonnet Ph., 1977.** On the selective resistance of carnation cuttings to isolates of *Phytophthora parasitica*. *Acta Hort.*, **71**, 143-144.
- Ricci P., Jacquemond M., 1978.** Induced resistance of *Phytophthora parasitica* Dastur in carnation cuttings (*Dianthus caryophyllus* L.). *Proc. 3rd intern. Cong. Phytopathol.*, Munich, 16-23 August.
- Rondest J., Das C., Polonsky J., 1968.** Sur un nouvel amide naturel, le N (p-hydroxy-phenyl)- β -benthyl p-hydroxycinnamide, isolé de *Evodia belahe* B. (Rutacées). *Bull. Soc. chim. Fr.*, **6**, 2411-2414.
- Ryabinin A., Il'Ina E., 1949.** (En russe) Recherches sur un alcaloïde isolé de la plante *Salsola subaphylla* Cam. var. *arenaria* Drob. *Doklady Akad. Nauk SSSR*, **67**, 513-516.
- Ryabinin A., Il'Ina E., 1950.** The alkaloid of *Salsola subaphylla*. *Chem. Abstr.*, **44**, 1455.
- Schlepphorst R., Barz W., 1979.** Metabolism of aromatic acids in plant cell suspension cultures. *Planta med.*, **36**, 333-342.
- Sridhar R., Mohanty S., Anjaneyulu A., 1979.** *In vivo* inactivation of Rice Tungro virus by ferulic acid. *Phytopathol. Z.*, **94**, 279-281.
- Stoessl A., 1965.** The antifungal factors in barley. III. Isolation of p-coumaroylagmatine. *Phytochemistry*, **4**, 973-976.
- Stoessl A., Rohringer R., Samborski D., 1969.** 2-hydroxyputrescine amides as abnormal metabolites of wheat. *Tetr. Letters*, **33**, 2807-2810.
- Tramier R., Mercier S., 1965.** *Phytophthora nicotianae* f. *parasitica* (Dastur) Waterh. nouveau parasite de l'œillet en France. *Phytopathol. mediterr.*, **4**, 176-177.
- Wheaton T., Stewart I., 1965.** Feruloylputrescine: isolation and identification from *Citrus* leaves and fruit. *Nature*, **206**, 620-621.
- Yoshihara T., Takamatsu S., Sakamura S., 1978.** Three new phenolic amides from the roots of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Agric. biol. Chem.*, **42**, 623-627.