

INSTITUT D'ELEVAGE ET DE MEDECINE VETERINAIRE DES PAYS TROPICAUX

94 - MAISONS-ALFORT

4

(Mémoire D.E.S.S. DE PRODUCTIONS ANIMALES
ET ~~TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES~~
EN REGIONS CHAUDES)

**ETUDE ET ISOLEMENT
DE
SUBSTANCES DE RESISTANCE ELABOREES
PAR
LE PALMIER A HUILE
CONTRE
LE «FUSARIUM OXYSPORUM F. sp. ELAEIDIS»**

2

3) Maisons - Alfort, IERVIT, 1984 - 69 p.

STAGE EFFECTUE AU LABORATOIRE
DE PATHOLOGIE VEGETALE -
O.R.S.T.O.M. - 93 BONDY
1er MAI au 31 JUILLET 1984

MONIQUE MATTER

1

*
* *

Au terme de ce stage, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur A. RAVISE, Directeur de Recherche à l'O.R.S.T.O.M., de m'avoir accueillie dans son Laboratoire de Pathologie Végétale, et dirigée tout au long du travail qui m'a été confié.

Mes remerciements vont également à Monsieur Bruno TAQUET, pour ses conseils et son aide.

Enfin, je remercie chacun de ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à rendre ce stage intéressant.

*
* *

RESUME

La plupart des plantes sont capables de synthétiser les substances de résistance en réponse à une infection parasitaire.

Dans le cas de l'association "Palmier à huile - Fusarium oxysporum F. sp. elaeidis (FOE)", les produits accumulés sont en majorité de nature phénolique. Ils sont biodégradables.

En général les différentes substances présentes simultanément dans les tissus agissent de façon synergique et provoquent une augmentation de l'intensité de la réaction de défense.

L'origine génétique des plants influe sur la synthèse de ces composés. Cette synthèse peut aussi être stimulée ou inhibée par divers médiateurs chimiques. L'acide arachidonique, par exemple, provoque une accumulation de composés dans les tissus, alors que l'acide αoxyaminoacétique a l'effet inverse.

Une connaissance plus approfondie de la nature et des mécanismes de synthèse des substances de résistance permettra une lutte plus efficace contre les ravages occasionnés par cette maladie dans les plantations de Palmier à huile, et par là même l'amélioration de l'approvisionnement en huile de palme des pays en voie de développement.

*

* *

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	6
 <i>PARTIE I : PRESENTATION DU PROBLEME</i> <hr/>	
I L'HUILE VEGETALE DANS L'ALIMENTATION EN AFRIQUE	8
II PRODUCTION D'HUILE DE PALME ET SES FACTEURS LIMITANTS	10
1. La production d'huile de palme	10
2. Les facteurs limitants	11
III ETUDE DE LA FUSARIOSE	12
 <i>PARTIE II : PROBLEMES ABORDES PENDANT LE STAGE</i> <hr/>	
I MECANISMES DE DEFENSE DES PLANTES ET LEUR STIMULATION	15
1. Généralités	15
a) Barrières physiques	
b) Barrières biologiques	
2. Etude des phytoalexines	16
a) Réactions connues dans le monde végétal	
b) Synthèse des phytoalexines	
II INFLUENCE DU GENOME SUR LA RESISTANCE	17
III INFLUENCE DE LA STIMULATION	18
1. Elicitation de la réaction de la plante	18
a) Définition	
b) Phase de détermination	
c) Phase d'expression	
2. Stimulation par des facteurs exogènes	20
a) La prémunition	
b) Les substances stimulatrices	
3. Influence du génome sur la stimulation	22

PARTIE III : MATERIEL ET TECHNIQUES

I	VUE D'ENSEMBLE DE LA DEMARCHE DE TRAVAIL	24
II	MATERIEL VEGETAL	26
III	CONDITIONS DE CULTURE	27
	1. Serres à Bondy	27
	2. Plantations de Côte d'Ivoire	27
	3. Culture <u>in vitro</u>	28
IV	INOCULATION	28
	1. Matériel	28
	2. Modalités d'apport du broyat mycélien	29
	a) En serres	
	b) En pépinière et prépénière	
	c) En culture <u>in vitro</u>	
V	TRAITEMENTS APPLIQUES AUX PLANTS	30
	1. Application d'inhibiteur	30
	2. Application de stimulateurs	31
VI	BROYAGE ET TECHNIQUE D'EXTRACTION	31
	1. Broyage	31
	2. Extraction	31
	3. Préparation de l'échantillon aliquote	32
VII	TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	32
	1. Techniques analytiques	32
	a) Chromatographie en couche mince (C.C.M.)	
	b) Chromatographie liquide à haute performance (Hplc)	
	2. Techniques préparatives	34
	a) Hplc	
	b) Plaques de verre	
	c) Chromatographie liquide sur colonne atmosphérique	
	d) Partitions	
VIII	TESTS DE TOXICITE "IN VITRO"	35
	1. En milieu liquide	35
	a) Test d'inhibition de germination	
	b) Test de longue durée	
	2. En milieu solide	36

IX	DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX	37
X	CARACTERISATION DES SUBSTANCES FONGITOXIQUES	38
XI	BIODEGRADATION	38
	1. But	38
	2. Technique utilisée	39
XII	ETUDE STRUCTURALE	39

PARTIE IV : RESULTATS OBTENUS

I	CARACTERISATION DE L'INFLUENCE DES GENOMES ET DE LA STIMULATION SUR LA RESISTANCE DES PLANTS A LA FUSARIOSE	41
	1. Influence du génome	41
	a) Série pépinière à Dabou	
	b) Série de serres à Bondy	
	2. Essais de stimulation et d'inhibition de la réaction de défense	47
	a) Semis de serres à Bondy	
	b) Traitement à l'AOA <u>in vitro</u> à Dabou	
	c) Traitement à l'AOA <u>in vitro</u> à Bondy	
II	CARACTERISATION DES SUBSTANCES FONGITOXIQUES ET LEURS PROPRIETES	56
	1. Caractérisation des substances fongitoxiques	56
	2. Stabilité des substances fongitoxiques	57
	a) Test de toxicité longue durée	
	b) Biodégradation	
	3. Synergie	58

PARTIE V : DISCUSSION - CONCLUSION

	BIBLIOGRAPHIE	67
--	---------------	----

INTRODUCTION

Face à la faim et à la malnutrition dans le monde de nombreux projets de développement et de recherche dans différents domaines tentent d'apporter leur part de solution à ces problèmes gigantesques.

Nous connaissons par exemple l'importance que doit avoir l'huile végétale dans l'alimentation humaine. Pourtant les déficits en cette matière sont catastrophiques dans les pays en voie de développement, comme l'expriment les données rapportées en première partie de cet exposé.

Une approche de la question a été menée par l'Institut de Recherche des Huiles et Oléagineux (I.R.H.O.) en collaboration avec l'Office de Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (O.R.S.T.O.M.) pour tenter d'améliorer la situation du Palmier à huile en Afrique, particulièrement en Côte d'Ivoire.

Les investigations portent d'une part sur la recherche d'une solution génétique au problème primordial qu'est la Fusariose du Palmier à huile qui ruine actuellement les plantations par des chutes de productivité très importantes.

Par ailleurs, des recherches au laboratoire de Phytopathologie de Bondy (France) sur les substances pouvant être à l'origine de la résistance de la plante au Fusarium, permettent de mieux comprendre ces mécanismes de défense et de lutter plus efficacement contre la maladie.

Une partie de ces recherches, objet principal de notre étude, porte sur l'isolement de ces substances, leur stabilité et la stimulation de leur synthèse, en utilisant des extraits de racines de Palmier à huile.

Une autre approche, également étudiée ici, est celle de l'influence du génome de la plante sur sa capacité de résistance.

PARTIE I

PRESENTATION DU PROBLEME

PARTIE I : PRESENTATION DU PROBLEME

I. L'HUILE VEGETALE DANS L'ALIMENTATION EN AFRIQUE

Par un rapide tour d'horizon de la situation mondiale (20) de l'alimentation, il est flagrant de constater le déséquilibre existant entre la surconsommation des pays dits développés et les déficits nutritionnels des pays en voie de développement. En 1978 par exemple, 28 % de la population mondiale ont consommé 60 % de l'ensemble des lipides disponibles dans l'alimentation humaine. Les déficits énergétiques en PVD sont très fortement ressentis, particulièrement au niveau des enfants. Un meilleur équilibre au plan qualitatif des différents acides gras pourrait améliorer la situation. Pour cela, la consommation en corps gras d'origine végétale, riches en acides gras insaturés devrait être favorisée au détriment des graisses saturées d'origine animale. Il faut remarquer que ces dernières années, la production en matières premières comestibles d'origine végétale a fortement augmenté, de 3,8 % par an entre 1972 et 1980. Ceci est dû en grande partie aux productions d'huile de soja, de palme et de tournesol, qui ont pratiquement doublé en 10 ans, l'huile de soja représentant actuellement près de 45 % de la production mondiale en huiles végétales. Une progression soutenue de ces productions, supérieure au taux d'accroissement de la population mondiale, pourrait donc permettre de combler une partie de ces déficits. Les productions des huiles tropicales de diverses origines sont répertoriées dans le tableau n°1 (17).

Nature de l'huile	Production		Exportation
	Pays principaux	Tonnage 1980-1981 (1 000 t)	(1 000 t)
Soja	USA, Brésil, CEE	13 431	3 477
Arachide	Sénégal, Europe de l'Ouest	2 315	323
Palmiste	Nigéria, Indonésie, Malaisie	607	605
Huile de Palme	Malaisie, Indonésie, Côte d'Ivoire	4 260	3 731
Coprah	Philippines, Indonésie, Indes	2 968	1 567

Tabl. n°1 : Situation mondiale des principales huiles d'origine tropicale (1980 - 1981).

On remarque encore le décalage entre la forte proportion d'huile exportée et les besoins locaux que nous savons très importants.

En Afrique, les sources d'huile alimentaire sont principalement l'arachide, le palmiste et l'huile de palme (3).

* L'arachide :

Elle est destinée principalement à l'huilerie et à la commercialisation. Elle se consomme aussi à l'état naturel ou sous forme de pâte d'arachide. Sa richesse en lipides (40,2 %) la rend très intéressante pour l'alimentation, bien que peu digestible.

* La noix de palme :

Au Cameroun, c'est la seule source de lipides. Elle en contient 56,5 %. Elle est riche en carotène (et donc en vitamine A, ce qui est intéressant pour les enfants).

On extrait de la pulpe l'huile de palme, et de l'amande, l'huile de palmiste.

Les quantités moyennes nécessaires par jour pour une personne sont d'environ : 300 g de noix de palme

ou 30 g d'huile de palme

ou 30 g d'huile d'arachide.

La consommation locale des noix de palme varie beaucoup suivant les régions, mais reste toujours liée à une production au niveau du village (14), les grandes exploitations restant orientées vers l'exportation.

II. PRODUCTION D'HUILE DE PALME ET SES FACTEURS LIMITANTS

1. La production d'huile de palme

Comme nous l'avons vu précédemment, les zones de production du Palmier à huile s'étendent dans le Sud-Est Asiatique, la Colombie, l'Amérique Centrale, la zone tropicale amazonienne, et l'Afrique tropicale humide.

Selon BEK-NIELSEN (6), l'augmentation toujours accélérée de la population mondiale et l'accroissement progressif de la richesse des PVD permettront un bon développement de la culture du palmier à huile, particulièrement dans le Sud-Est Asiatique.

En Afrique, la zone de culture du palmier à huile s'étend dans toute les régions tropicales humides, recouvrant actuellement environ 1.384.000 hectares dans les pays de Côte d'Ivoire, Nigéria, Congo Brazzaville et Dahomey. La production mondiale d'huile de palme et palmiste en 1980 est de 4.900.000 tonnes, avec le plus haut rendement d'huile/ha de tous les oléagineux.

Dans l'exemple de la Côte d'Ivoire, la culture commerciale du palmier à huile se fait dans de grands complexes industriels, pouvant recouvrir jusqu'à 12.000 ha d'un seul tenant. Ils sont localisés sur la côte, principalement dans la région d'Abidjan. Actuellement, la culture recouvre 80.000 ha dont 54.500 ha de plantation industrielle et 25.500 ha de plantations villageoises qui entourent les grands blocs. Douze huileries localisées dans les plantations produisent 153.400 tonnes d'huile et 30.000 tonnes de

palmiste. L'importance économique relative de ce produit par rapport aux autres productions industrielles est exprimée dans les chiffres à l'exportation suivants (1978) :

<i>1978</i>	<i>Tonnage (1000 t)</i>	<i>Valeur (en milliards CFA)</i>
<i>Café</i>	<i>250.000</i>	<i>61</i>
<i>Cacao</i>	<i>200.000</i>	<i>63</i>
<i>Huile de palme et palmiste</i>	<i>185.000</i>	<i>10</i>

Tabl. 2 : Exportations d'huile de palme et palmiste (Côte d'Ivoire, 1978).

Outre l'exportation, l'huile de palme est utilisée dans l'alimentation africaine, comme nous l'avons vu.

Enfin, elle s'intègre dans de plus faibles proportions en savonnerie, en industries agro-alimentaires pour la fabrication de margarine, et en cosmétique (glycérine).

2. Les facteurs limitants

Les facteurs limitant la production de l'huile de palme sont surtout les maladies et les insectes.

A tous les stades de développement, le Palmier à huile est susceptible d'être atteint d'une maladie (la Cercosporiose surtout, la Fusariose, l'Anthracnose et l'Helminthosporiose à un degré moindre), ou d'être victime des insectes défoliateurs appartenant à différents genres de Lépidoptères, de Coléoptères, d'Orthoptères et des insectes piqueurs suceurs. Le mode de traitement et l'appareillage doivent être adaptés en fonction du stade végétatif du palmier et de la surface colonisée par l'agent nuisible (21).

Citons par exemple les dégâts causés par le complexe Leptopharsa-Pestalotopsis, surtout en Colombie et en Amérique centrale. L'insecte est un Hémiptère Tingidae, le Leptospharsa gibbicarina F. Durant la saison sèche,

il se localise en grand nombre dans les parties inférieures des feuilles, où ses piqûres sont particulièrement visibles sur la face supérieure par une zone blanchâtre sans chlorophyle. Ces blessures sont une porte d'entrée à l'agent pathogène, le Pestalotopsis qui détruit complètement le parenchyme des feuilles. La destruction du feuillage entraîne une forte baisse de production des arbres infectés, qui a déjà pu atteindre 40 %, tant en régime, qu'en poids moyen (8).

Dans les zones de culture africaine, c'est la Fusariose qui est la maladie cryptogamique du Palmier à huile la plus importante (24).

En Côte d'Ivoire par exemple, on estime qu'elle occasionne chaque année la disparition d'environ 10.000 Palmiers à huile, dans la seule savane de Dabou. Récemment, on l'a aussi détectée en zone forestière. Elle constitue donc une menace pour les 60.000 ha de Palmiers à huile plantés dans ces zones-là.

Les traitements fongicides sur de grandes zones seraient efficaces, mais sont pratiquement inconcevables à cause de leur coût. Dans le cas de maladies vasculaires, la recherche de matériel végétal résistant est le seul moyen efficace de lutte. Actuellement, d'importantes recherches sont en cours, en particulier à Dabou, en Côte d'Ivoire.

III. ETUDE DE LA FUSARIOSE

Le champignon responsable de la Fusariose du Palmier à huile est le Fusarium Oxysporum Elaeidis (FOE). C'est un champignon imparfait (Deutéromycète) appartenant à l'ordre des hyphales.

Le champignon attaque la plante par les racines et provoque différents symptômes (24) :

- sur les jeunes plantes attaquées, on observe un rabougrissement de la première feuille, et un aspect chétif de la plantule. La coupe du pseudobulbe révèle un brunissement des vaisseaux qui correspond à la présence du parasite dans la plante.

- sur les plantes adultes, on observe aussi l'arcure des feuilles, suivie de leur flétrissement qui conduit à la mort de l'hôte. Ces troubles sont la conséquence de l'occlusion des vaisseaux de xylème par le parasite, avec la cessation progressive du flux de sève brute. En général, les symptômes apparaissent environ huit mois après l'infectation, ou 4,5 mois si celle-ci est réalisée à un stade très précoce.

Depuis plusieurs années, l'I.R.H.O. se penche sur le problème causé par cette maladie.

Dans la plantation expérimentale de Robert-Michaux en Côte d'Ivoire, différentes recherches sont mises en place. Des observations de contaminations de jeunes plants par le FOE avaient révélé des variations de sensibilités de différentes lignées à la Fusariose. Ces résultats ont été exploités, par des tests effectués à grande échelle en vue d'obtenir des lignées existantes. De nombreux essais et plusieurs milliers de croisements ont permis de reconnaître des géniteurs transmettant des facteurs de résistance, puis d'établir des plans de croisement aboutissant à la production de semences tolérantes à la Fusariose. Le caractère d'un arbre ou d'un croisement est défini par un indice qui est d'autant plus faible que le matériel végétal est tolérant. Mais le mécanisme génétique reste encore mal connu (19). L'inoculation de différents génomes au stade pépinière ou pré-pépinière, permet de tester, par l'apparition ou non des symptômes de la maladie quelques mois plus tard, leur degré de résistance à la Fusariose.

PARTIE II

PROBLEMES ABORDES PENDANT LE STAGE

PARTIE II : PROBLEMES ABORDES PENDANT LE STAGE

I. MECANISMES DE DEFENSE DES PLANTES ET LEUR STIMULATION

1. Généralités

Le parasitisme résulte de l'association de deux organismes dont l'un vit aux dépens de l'autre. Dans notre cas, il s'agit du champignon Fusarium Oxysporum F. sp. elaeidis qui parasite le Palmier à huile. Au cours des confrontations de populations naturelles de végétaux et de leurs parasites, s'est différenciée une sélection naturelle de plantes tolérantes ou résistantes. Les caractères proviennent souvent de plantes sauvages qui poussent dans les zones où sévissent les parasites, et sont transférés dans les plantes cultivées par hybridation (19). Leur expression correspond à la synthèse de barrières élaborées par la plante lors de l'infection parasitaire, qui peuvent être de nature physique ou biochimique.

a) Barrières physiques :

KUNOH et ISHIZAKI (15) ont mis en évidence la formation de cals et de papilles caractéristiques à l'endroit où le parasite pénètre dans l'Orge. Par diffraction aux Rayons X, ils y détectent une accumulation de silice, de calcium, de manganèse. Au microscope électronique, des agrégats cytoplasmiques apparaissent dans les zones infectées. On observe aussi la lignification des cellules infectées, provoquée par l'approche de l'hyphe mycélien.

b) Barrières biochimiques :

Par ailleurs, les plantes hôtes élaborent des facteurs de résistance nommés phytoalexines, très variés, suivant les familles botaniques.

2. Etude des phytoalexines

a) Réactions connues dans le monde végétal :

La première phytoalexine isolée, a été la rhisitine (sesquiterpène) de la Pomme de terre, en 1960 (25). Depuis, plusieurs autres ont pu être découvertes. La structure chimique des phytoalexines est caractéristique de la famille des plantes qui les produisent. Par exemple, la phaséoline du haricot, ou différentes glyceollines du soja, sont des phénols du groupe des ptérocarpanes. Chez les solanacées, par contre, les sesquiterpènes prédominent. Cependant, chez certaines grandes familles végétales, telles que les liliacées, les crucifères, et les cucurbitacées, aucune phytoalexine n'a encore été isolée.

b) Synthèse des phytoalexines :

D'après SMITH (25) l'accumulation locale des phytoalexines dans la plante résistante se fait dans les cellules mortes du lieu de pénétration du champignon, alors que leur synthèse a lieu dans les cellules périphériques. Le champignon est donc en contact avec des quantités importantes de produit fongitoxique. La résistance de la plante sera due, soit à l'inhibition de la croissance du champignon, soit au seul fait de la mort des cellules, le rôle des phytoalexines devenant alors secondaire. Il s'agit alors d'une réaction d'hypersensibilité.

Les plantes sensibles sont, elles aussi, capables de synthétiser de telles substances, mais dans de moindres proportions ou plus tardivement et d'une façon diffuse dans l'ensemble des tissus. Ceci est encore mal connu.

Enfin, les phytoalexines ne semblent pas être des inhibiteurs spécifiques des champignons. Selon BAILEY (3) leur production serait consécutive à la synthèse d'un éliciteur endogène dans les cellules mourantes. D'autres auteurs proposent une certaine spécificité au niveau

des glucanés de surface des champignons, qui peuvent entraîner la mort des cellules. Peut-être la plante posséderait-elle elle-même des réactions de dégradation des phytoalexines, empêchant leur accumulation.

II. INFLUENCE DU GENOME SUR LA RESISTANCE

L'influence du génome sur la tolérance des lignées de Palmier à huile à la Fusariose a pu être mise en évidence par l'étude comparée de la résistance de plants issus de différents géniteurs (24).

A la fin d'un test, les lignées sont classées les unes par rapport aux autres, par ordre de sensibilité croissante à la Fusariose. A partir de ces résultats on refait des croisements entre les plants les moins sensibles, on les teste à nouveau, et si les résultats sont concordants, on plante ce type de matériel dans les zones où la Fusariose cause des dégâts.

Corrélativement, des recherches en laboratoire ont pu montrer que l'origine des géniteurs influait sur la synthèse de composés fongitoxiques par la plante après inoculation.

L'ensemble de ces résultats révèle l'importance de bien choisir les géniteurs des plants (24).

Actuellement, les essais portent sur des croisements entre géniteurs Pisiféra et Dura. Ils n'interviennent pas de la même façon dans la descendance et on a pu mettre en évidence l'influence prépondérante du géniteur Pisiféra dans le comportement des lignées face à la Fusariose. En suivant l'évolution de la maladie au champ, on constate de très grandes différences entre les lignées. A cinq ans, certaines ont un pourcentage de plants fusariés inférieur à 2, tandis que d'autres présentent 20 à 25 %. La limite acceptable après cinq années de plantation peut être estimée à 5 %.

Dans un proche avenir, le potentiel de graines résistantes susceptibles d'être produits annuellement pourrait correspondre à une surface d'environ 1000 ha. L'inoculation des lignées effectuée en préépinière permet de reconnaître très tôt les lignées sensibles, et de les éliminer, offrant un gain de temps et de place très précieux à une amélioration plus rapide de la situation des plantations dans les zones fusariées.

III. INFLUENCE DE LA STIMULATION

1. Elicitation de la réaction de la plante (10)

a) Définition :

L'élicitation est la stimulation des réactions de défense de l'hôte, nécessitant absolument la présence du champignon.

La modulation des synthèses de phytoalexines est un facteur déterminant de la résistance de la plante.

b) Phase de détermination :

Dans le phénomène d'accumulation de ces substances, on distingue d'abord une phase de détermination correspondant à la reconnaissance entre les substances produites par le parasite, et celles codées par le(s) gène(s) de résistance à l'hôte.

- Effet des éliciteurs :

Les éliciteurs sont des substances, ou des molécules du parasite qui entraînent la production de phytoalexines par la plante hôte.

On en observe une accumulation importante dans le cas des réactions de résistance. Cependant, leur rôle exact reste encore très controversé. Dans l'exemple de la combinaison "Soja - Phytophthora megasperma Var. sojae" (Pms), les éliciteurs seraient, pour certains auteurs, des glycoprotéines de la race du pathogène, alors que pour d'autres, il s'agirait de polysaccharides du pathogène, élicitant la production de phytoalexines même chez des plantes non hôtes du micromycète. D'autres éliciteurs, de nature glucanique ou peptidique ont aussi été isolés sur plusieurs parasites.

Ainsi des glucanés sont portés par les parois du Colletotrichum lindemuthianum agent de l'antracnose du haricot, des polypeptides et des hexose-amines par les hyphes de Fusarium solani.

- Effets des facteurs de spécificité :

D'après les études sur le "Soja - Pms", la spécificité serait due à un glycopeptide non éliciteur provenant de races avirulentes du pathogène, capable de protéger les plantules vis-à-vis de races virulentes. Lors des interactions d'avirulence, ils activeraient les défenses primaires de l'hôte, qui, en ralentissant la croissance du parasite, permettrait l'accumulation des phytoalexines dans la plante. Celles-ci n'interviendraient donc qu'à un second niveau de résistance.

c) Phase d'expression :

- Stimulus métabolique général :

Les phytoalexines dérivent du métabolisme de l'acétate et des phénylpropanoïdes. L'action des éliciteurs ne concerne pas spécifiquement l'un de ces métabolismes, mais correspond à un stimulus général, impliquant une synthèse de novo d'acides nucléiques et de protéines. Ceci a été particulièrement étudié par des mesures de taux d'incorporation d'Uridine - 3H dans les RNA de la plante. Pour les auteurs qui attribuaient la résistance à des mécanismes primaires, il serait probable également que celles-ci soit modulée par des inhibiteurs de transcription et de traduction.

L'accumulation de phytoalexine est donc due, soit à une activation consécutive à l'élicitation des voies biosynthétiques des phytoalexines, soit à l'inhibition et le blocage total de leur renouvellement, selon d'autres auteurs.

- Modulation de la biosynthèse des phytoalexines :

La régulation de l'activité des enzymes responsable de la biosynthèse des phytoalexines est encore mal connue.

Certains enzymes sont particulièrement bien étudiées. Par exemple, la Phényl-alanine-ammoniac-lyase (PAL) qui est la clé de synthèse de tous les phénylpropanoïques à partir d'acides aminés aromatiques, les transférases qui modifient la structure des acides cinnamiques, ainsi que les Co-A-Ligases, qui orientent les flux de synthèse des composés phénoliques vers diffé-

rentes voies, par exemple celle des isoflavonoïdes chez les légumineuses aboutissant à la production de ptérocarpanes, ont toutes un rôle certain dans la modulation de la biosynthèse des phytoalexines.

L'utilisation d'inhibiteurs compétitifs de ces enzymes (et non des inhibiteurs de synthèse protéiques qui risqueraient d'interférer avec d'autres voies de synthèse) a montré que l'inhibiteur est capable de moduler, voire de supprimer la production de phytoalexine.

- Biodégradation des phytoalexines par la plante :

Les plantes elles-mêmes peuvent dans certains cas, transformer, voire dégrader les phytoalexines, cette potentialité étant parfois induite ou stimulée par les éliciteurs. Dans l'exemple "Soja - Pms" on a pu constater que l'élicitation biotique entraîne une augmentation de la biosynthèse de phytoalexines alors que l'éliciteur abiotique inhibe sa dégradation. D'autre part, l'accumulation de phytoalexine dans les cotylédons d'une plante résistante est due, non à des vitesses de biosynthèse différentes, mais à une biodégradation ralentie.

2. Stimulation par des facteurs exogènes

a) La prémunition :

Certains agents peuvent agir sur la plante hôte, contre le parasite, soit par compétition physique, soit par antagonisme chimique, ou encore par changements métaboliques chez l'hôte, qui entraînent sa résistance (26).

L'insertion sur blessure d'un organisme non pathogène, ou l'exposition de la plante à une race moins agressive peut entraîner l'immunité.

Le mécanisme de la prémunition serait le suivant :

- *D'abord une action inductrice initiale, localisée au niveau d'une feuille, par une bactérie, un virus ou un champignon. Quelques essais d'induction par des métabolites phytotoxiques qui induisent des symptômes comparables à ceux de la maladie ont conduit à une protection, mais ceci dans des conditions expérimentales très précises.*
- *Ensuite, l'exportation d'un signal vers les autres parties de la plante.*
- *Enfin, la mise en alerte de moyens de défense à distance (modification des surfaces cellulaires, accumulation de lignine...).*

b) Les substances stimulatrices (2)

Elles n'interviennent jamais directement sur le pathogène ni sur le métabolisme de l'hôte, mais interfèrent dans la confrontation hôte - parasite. Certains inducteurs sont des constituants mêmes des parois bactériennes et fongiques. D'autres sont des inducteurs naturels ou synthétiques de formule chimique établie.

Citons simplement l'impact important de certaines cytokinines, comme la kinétine, l'éthylène et d'autres. Certains fongicides, tout en agissant sur les champignons pathogènes, modifient la physiologie de l'hôte en devenant inducteurs de résistance. Le tris-O-éthyl phosphonate d'aluminium (TEPA) est particulièrement étudié (1, 7, 13, 27). Son action provoque par exemple un retard de l'expression de symptômes nécrotiques (1), et une diminution du nombre de lésions. La modification de la réponse de l'hôte est en partie physiologique, en agissant comme stimulateur de la production de phytoalexines et d'autres composés phénoliques qui s'accumulent dans la zone de nécrose bloquante de la plante.

L'induction de la production de phytoalexines ne se réalise que chez les plants inoculés, préalablement traités au TEPA.

3. Influence du génome sur la stimulation

Le génome peut avoir une influence sur la réponse de la plante aux éliciteurs. Ceci a pu être mis en évidence, en particulier sur le Palmier à huile. Au laboratoire, nous avons montré que la synthèse de certains composés phénoliques jouant un rôle dans la résistance des plants à la Fusariose, était, sous l'action de l'éliciteur, plus ou moins stimulée suivant le génome.

PARTIE III

MATERIEL ET TECHNIQUES

PARTIE III : MATERIEL ET TECHNIQUES

I. VUE D'ENSEMBLE DE LA DEMARCHE DE TRAVAIL

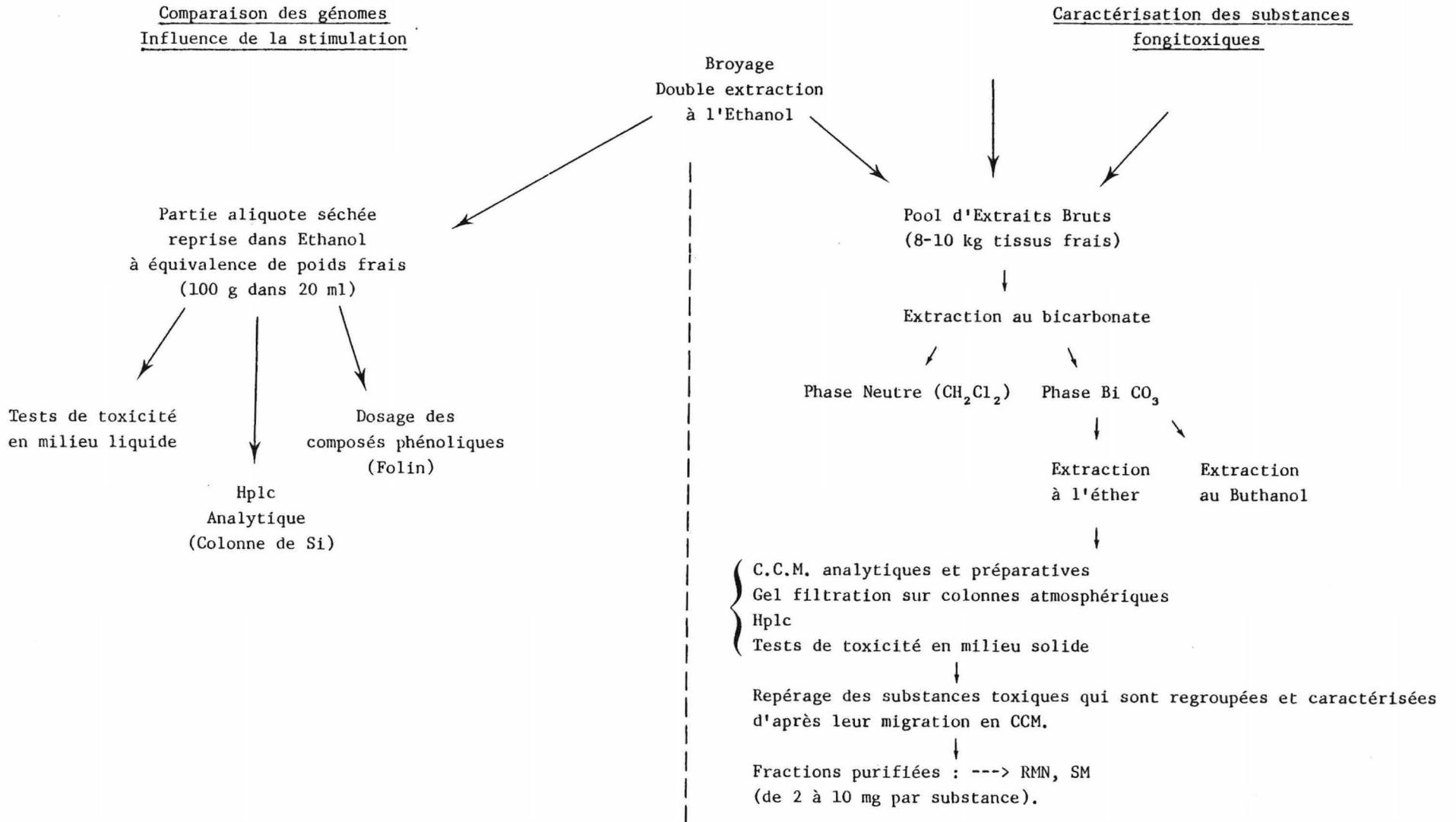
Notre démarche poursuit simultanément deux objectifs :

- *D'une part, elle consiste en l'analyse de l'influence du génome sur l'élaboration de substances fongitoxiques, et sa stimulation par différents médiateurs chimiques.*
- *D'autre part, nous nous intéressons à la purification et l'identification de ces substances.*

Nous pouvons résumer cela en Fig. 1.

Fig.1 PROTOCOLE GENERAL

Racines de palmier à huile



II. MATERIEL VEGETAL

Les racines testées proviennent soit des serres de Bondy, soit des pépinières et prépépinières de Côte d'Ivoire.

Nous travaillons sur plusieurs séries de semis d'origine différentes :

- Série en provenance des serres de Bondy : origine génétique :

S 1	(L 269 D x D 115 D) x L 2 T
S 6	Idem
S 33	(L 269 D x D 115 D) x (L 2 T x L 5 T)
S 346	L 4869 D x L 1183 P
S 357	L 5157 D x L 1570 P
S 358	L 5157 D x L 2257 P
S 372	L 4939 D x L 2257 P
S 374	L 5089 D x L 1183 P

- Série en provenance des pépinières de Dabou : origine génétique :

S 940	D 10 D x L 2 T
S 943	L 2 T x D 10 D
S 946	D 10 D x L 2 T

- Série en provenance de culture in vitro. Deux séries ont été testées : chacune a subi un traitement à l'AOA (Acide α oxy-amino-acétique), soit à Dabou, soit en serres, à Bondy. Les racines issues des expériences à Dabou sont regroupées en trois catégories :

Plants traités à l'AOA
Plants non traités d'aspect sain
Plants non traités fusariés.

Les expériences en serres à Bondy sont regroupées en deux catégories :

Plants non traités à l'AOA
Plants traités à l'AOA.

III. CONDITIONS DE CULTURE

1. Serres à Bondy

Les graines germées nous parviennent directement de Côte d'Ivoire. Elles sont mises en terre dans des pots individuels.

Les conditions de culture sont les suivantes :

Température de 22 à 27°C

Humidité de 50 à 80 %

Eclairage à l'appoint avec lampes de type HLRG (Philips), 400 W chacune, pour maintenir 12 heures d'éclairage par jour.

Les traitements insecticides sont indispensables :

Albolinéum et Pentax pour lutter contre les araignées rouges.

Nutrition minérale :

20 g Urée

20 g Sulfate de Magnésium

40 g Potassium

10 l Eau

administré à raison de 50 ml par pot (taille des pots : 12 cm).

2. Plantations de Côte d'Ivoire

Les plants sont cultivés en pépinières et prépépinières dans les conditions naturelles.

3. Culture "in vitro"

Les graines germées sont placées dans des pots suivant Fig. 2 :

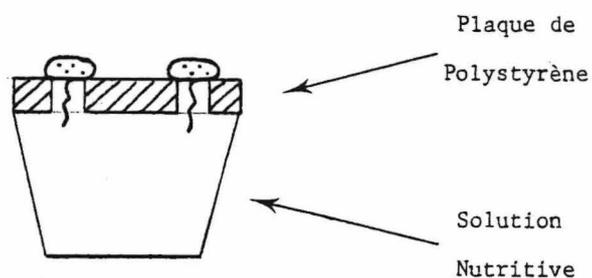


Fig. 2 : Culture in vitro

Composition de la solution nutritive :

$NO_3 NH_4$	163 mg
$NO_3 K$	204 mg
$(NO_3)_2 Ca$	475 mg
$PO_4 H_2Na$	208 mg
$SO_4 Mg$	125 mg
$Cl_2 Mn$	54 mg
Oligoéléments	(Traces)
pH	5,8

Les essais in vitro à Dabou et à Bondy sont réalisés dans les mêmes conditions de culture.

IV. INOCULATION

1. Matériel

Les inoculations se font par un apport de broyat mycélien de Fusarium oxysporum F. sp. elaeidis, souche M₈₀ A, en provenance de Côte d'Ivoire.

Le broyat est obtenu après passage au mixer d'une culture de mycélium isolé de palmiers fusariés, et cultivé sur milieu synthétique, de composition suivante :

Glucose	30 g
NO ₃ Na	2g
PO ₄ H ₂ K	1,4 g
SO ₄ Mg	0,75 g
(SO ₄) ₃ Fe ₂	1 Cristal
H ₂ O	1 l
Stérilisation	1/4 d'h à 120° C

2. Modalités d'apport du broyat mycélien

a) En serres :

L'inoculation a lieu à quatre mois (stade pépinière). Elle se fait avec un broyat de culture de FOE de $4 \cdot 10^6$ propagules environ, déposé à la base des racines. La récolte de l'ensemble des racines a lieu cinq semaines plus tard.

b) En pépinière et prépépinière :

L'inoculation se fait sept semaines après de repiquage des plantules en pépinières pleine terre, avec 10 ml d'inoculum déposé sur les racines adventives que l'on recouvre ensuite de terre.

Une variante est d'inoculer 20 ml d'inoculum, au stade prépépinière (un mois et demi après repiquage de la graine germée) lorsque la plante a une feuille et demie.

Huit mois après l'inoculation en pépinière et quatre mois et demi après celle en prépépinière, les symptômes foliaires de Fusariose sont enregistrés à titre indicatif. Les pseudobulbes sont ensuite coupés, afin de repérer le brunissement des vaisseaux qui correspond à la présence du parasite dans la plante. Chaque lignée est caractérisée par un indice représentatif de la sensibilité des lignées à la Fusariose.

$$i = \frac{p. 100 \text{ de plants fusariés de la lignée} \times 100}{p. 100 \text{ de plants fusariés sur l'ensemble des lignées}}$$

Les lignées à indice le plus faible sont les plus résistantes. Les racines des plants sains sont récoltées en vue des analyses ultérieures, les autres sont éliminées.

c) En culture "in vitro"

Les graines germées sont placées sur solution nutritive pendant huit semaines, jusqu'à formation de deux racines bien développées. A ce stade, les jeunes plants sont inoculés, en coupant l'extrémité des racines et en les plongeant pendant 24 heures dans une suspension de microconidies. La durée d'inoculation est de cinq semaines.

Remarque : En serre, l'inoculation s'est faite en tube à essai, contrairement à Dabou où de plus grands récipients sont utilisés.

V. TRAITEMENTS APPLIQUES AUX PLANTS

Pour l'étude de l'influence de stimulateurs ou d'inhibiteurs de la synthèse des substances phénolique sur la résistance des plants, plusieurs traitements sont envisagés.

1. Application d'inhibiteur

- En culture de serres :

L'AOA (Acide α - oxy-amino-acétique) inhibiteur des voies de synthèse des phénylpropanoïdes, a été appliqué à raison de 16 mg dans 20 ml, par application et par plant, une fois par semaine. Le premier apport se fait une semaine avant l'inoculation FOE et se poursuit par application hebdomadaire cinq semaines après.

- En culture "in vitro"

L'essai a été conduit en comparant 40 plantules placées sur milieu nutritif normal et 40 plantules sur milieu avec AOA à raison de 250 μ M/l. Les solutions sont renouvelées chaque semaine.

2. Application de stimulateurs

Les éliciteurs testés sont les suivants :

- . Acide arachidonique, éliciteur du Phytophthora infestans,
- . Hexosamines, éliciteurs du Fusarium solani.

Les traitements consistent en l'application hebdomadaire de 1,2 mg dans 25 ml d'acide arachidonique, ou 1,5 mg dans 25 ml d'Hexosamine (la Galactosamine dans notre cas). Les fréquences et la durée globale du traitement sont identiques à celles suivies dans le cas de l'AOA.

VI. BROYAGE ET TECHNIQUE D'EXTRACTION

Les racines en provenance de Dabou sont conservées dans l'éthanol, dans des flacons de plastique, et stockées à 0° C. Les racines des plants de serre sont directement congelées. Le poids frais des racines est indiqué pour chaque motif.

1. Broyage

Un broyage fin des racines est nécessaire à une bonne extraction. Après un découpage préliminaire, les racines sont reprises dans un volume d'Ethanol pur correspondant à deux fois leur poids, puis sont broyées au mixer.

2. Extraction

Après 24 heures de diffusion à l'obscurité, l'extrait est séparé des racines auxquelles on fait subir une deuxième extraction dans les mêmes conditions. Les deux séries sont réunies et stockées à 0° C.

3. Préparation de l'échantillon aliquote

On prélève ensuite un volume aliquote de l'extrait brut que l'on sèche et ramène à une concentration de 5 g/ml dans l'Ethanol. Le reste de tous les motifs es regroupé et lyophilisé, formant un stock global de substances. Le matériel est alors prêt pour les analyses ultérieures.

VII. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

1. Techniques analytiques

a) Chromatographie en couche mince (c.c.m.)

Pour analyser la composition d'un extrait non purifié, on dépose celui-ci sur plaques à gel de Sicile avec matière luminescente (254 nm), de dimension 20 x 20 cm (Plaques G F).

Différents systèmes d'éluants sont utilisés au cours des manipulations. Nous les spécifierons au fur et à mesure.

Les plaques sont ensuite observées sous lumière ultra-violette (UV) (à 254 nm et 366 nm). Les différents spots peuvent être comparés à des témoins synthétiques migrant dans les mêmes conditions.

Ces plaques sont traitées à la paranitranidine, pour révéler les composés phénoliques.

D'autres réactifs peuvent être utilisés.

On repère les substances par leur RF (référence front) :

$$RF = \frac{\text{Distance de migration du produit}}{\text{Distance parcourue par l'éluant}}$$

b) Chromatographie liquide à haute performance (Hplc)

Le dispositif utilisé est représenté Fig. 4. On utilise une colonne de Silice 5 μ , 20 cm.

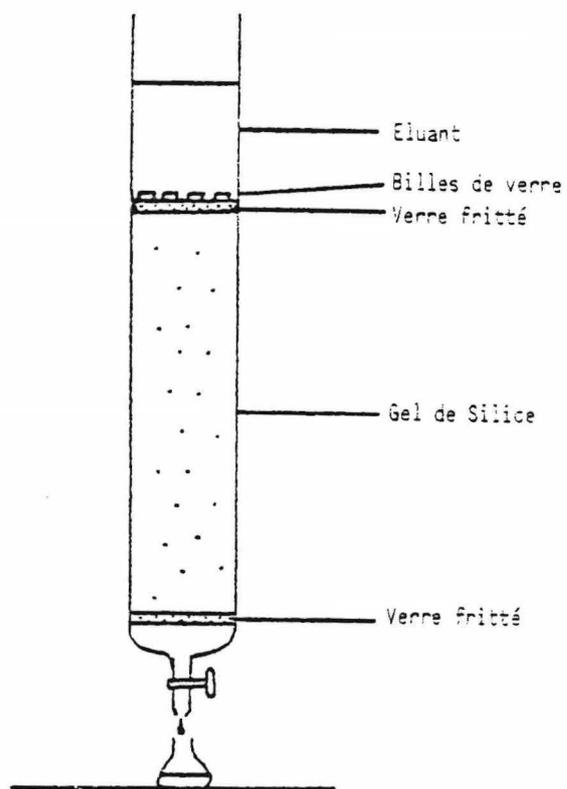


Fig. 3 : Colonne de gel filtration

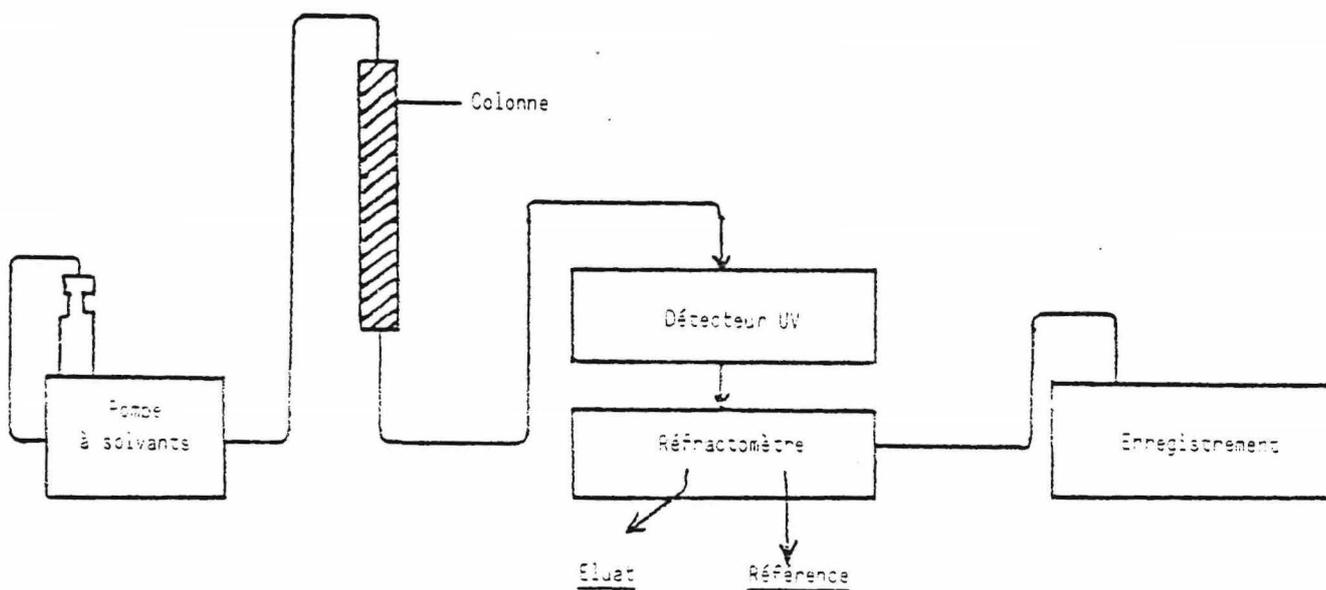


Fig. 4 : Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

2. Techniques préparatives

a) Hplc

Les colonnes utilisées dans ce cas sont diverses :

- Colonnes de silice identiques à celle utilisée pour l'analyse,
- Colonne en phase réverse ODS (Octo-decyl-silice), où les substances les plus polaires vont être éluées les premières. Elle est surtout utilisée dans le cas de séparation de substances polaires.

b) Plaques de verre

Pour séparer et récupérer les différentes substances précédemment analysées sur plaques analytiques, on utilise des plaques de verre (20x20 cm), sur lesquelles on dépose une couche épaisse (5 mm environ) de Silice préparée comme suit (pour cinq plaques) :

50 g de Silice GF 254

110 ml d'eau

Les plaques sont séchées à l'air puis activées au four à 120° C pendant une heure. Après le dépôt de la substance, puis la migration dans le système d'éluants appropriés, la limite des positions des différentes substances est appréciée à l'UV. Les bandes sont grattées et récupérées séparément dans un solvant constitué d'un mélange Acétate d'Ethyle 90 %, Methanol 10 %).

Puis, après passage sur filtre millipore (0,2 μ), les fractions sont séchées et pesées, et sont prêtes aux analyses suivantes.

c) Chromatographie liquide sur colonne atmosphérique

Les colonnes utilisées sont de dimension 60 cm de long et 3 cm de diamètre. Le gel de Silice est gonflé sous agitation dans du Methanol. Après mise en place du gel dans la colonne, un verre fritté et des billes de verre sont déposés en surface pour éviter toute modification de structure dans le gel (Fig. 3)

d) *Partitions :*

Le but est d'extraire des substances phénoliques d'un mélange aqueux. On fait une partition eau - acétate d'Ethyle. L'extrait est requis dans un volume d'eau distillée et déposé dans une ampoule à décanter. On rajoute un volume précis d'Acétate d'Ethyle. Après une forte agitation on laisse décanter. Les substances phénoliques sont récupérées dans la phase acétate d'éthyle.

VIII TESTS DE TOXICITE "IN VITRO"

1. *En milieu liquide*

a) *Test d'inhibition de germination*

La toxicité contenue dans les extraits est testée sur le FOE (Fusarium oxysporum F. sp. elaeidis).

- *Préparation de la sporée :*

Le FOE est repiqué régulièrement sur milieu synthétique nutritif gélosé et incubé à 30° C.

Les spores sont reprises dans un volume de milieu de culture liquide FOE (cf page 21).

- *Préparation des essais :*

La sporée est répartie dans des erlens de 25 ml à raison de 2 ml/erlen. On rajoute l'extrait à tester, de telle sorte que l'on ait environ entre 20 et 100 % de germination.

Les erlens sont bouchés et mis en agitation une nuit à 27°C. La lecture se fait par comptage en microscopie optique.

On détermine :

$$\text{le taux de germination} = \frac{\text{Nombre de spores germées}}{\text{Nombre total de spores}} \times 100$$

$$\text{le taux d'inhibition} = \frac{\% \text{ de germination témoin} - \% \text{ germination essai}}{\% \text{ de germination du témoin}}$$

b) Test de longue durée :

- But : vérifier la stabilité de la fongitoxicité des substances dans le temps.
- Manipulation : Les erlens sont préparés de la même façon que pour le test d'inhibition de germination, avec des concentrations un peu plus élevées en extrait à tester. Ils sont ensuite mis en incubation statique à 30° C pendant 3 à 5 jours.

2. En milieu solide

- But : Détecter les substances toxiques après migration sur plaques de Silice.
- Manipulation : Préparation de la sporée : Pour une meilleure visualisation des plages toxiques, on utilise une souche de Cladosporium cladosporioides, régulièrement repiquées sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Les spores sont filtrées et recueillies dans du milieu PDA liquide.

Composition du milieu PDA :

Potato Dextrose Agar	40g
Polymyxine	20ppm
Eau distillée	1 l

La sporée est pulvérisée sur les plaques chromatographiques ainsi qu'une solution nutritive PDA préalablement fondue et maintenue en surfusion.

Les plaques sont fixées dans un grand becher fermé à atmosphère saturée en eau. Le tout est placé dans l'étuve à 30° C pendant trois à quatre jours.

Les substances toxiques apparaissent sous forme de taches blanches, où le *Cladosporium* n'a pas poussé.

IX. DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX

C'est le dosage des composés phénoliques totaux d'un essai.

Dans un volume de 24 ml d'eau distillée on ajoute l'essai à analyser (pour les racines de Palmier à huile : l'équivalent de 250 mg de poids frais).

Puis :

- Apport de 0,25 ml de réactif de Folin, en agitant, et laisser reposer cinq minutes.
- Ajouter 0,5 ml de Na_2CO_3 à 20 %.
- Agiter régulièrement,
Laisser une heure à température ambiante,
Lire la densité optique à 725 nm.

La référence contient seulement les réactifs.

La gamme étalon est établie avec de l'acide chlorogénique.

X. CARACTERISATION DES SUBSTANCES FONGITOXIQUES

Le pool d'extrait brut correspondant à 8 à 10 kg de tissus frais subit une partition dont le but est de séparer partiellement les substances toxiques avant d'entreprendre leur purification et d'étudier leur toxicité. La partition en phase bicarbonate fixe les substances acides ou phénoliques. La phase neutre est extraite au butanol. Ensuite la phase bicarbonatée est acidifiée pour libérer les phénols qui sont extraits à l'éther puis au butanol.

La phase bicarbonatée est fractionnée sur colonne de silice atmosphérique à l'aide d'éluants de polarité croissante (hexane, acétate d'éthyle/méthanol, méthanol 90 %). Les différentes fractions sont ensuite purifiées sur plaques de silice préparatives, puis sur colonnes Hplc ODS. Parallèlement on effectue des tests de toxicité sur supports solides pour repérer les fractions toxiques.

Au cours de la purification on regroupe les substances ayant des propriétés identiques de migration et de toxicité. Par le jeu des différentes techniques chromatographiques les substances toxiques sont cernées de plus en plus près. Les étapes de purification des principes actifs contenus dans la phase neutre sont semblables. Les substances purifiées sont ensuite analysées en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et en Spectrométrie de Masse (SM).

XI. BIODEGRADATION

1. But

Le but est de comparer la composition d'un extrait racinaire avant et après un séjour prolongé en présence du champignon afin de déterminer si les substances toxiques sont biodégradées ou non.

2. Techniques utilisées

Trois séries de tubes sont préparées :

- . Milieu + Inhibiteur
- . Milieu + Champignon
- . Milieu + Inhibiteur + Champignon.

Les substances inhibitrices sont utilisées à des concentrations doubles de leur seuil de toxicité 100 sur germination de spores (concentration d'extrait pour laquelle on observe 100 % d'inhibition de germination). Chaque tube à hémolyse contient 1 ml de milieu. Un fragment de dimension standard de mycélium de FOE est déposé dans les tubes concernés. L'observation se fait après quatre à huit jours d'incubation. Après une partition acétate d'éthyle/eau, les substances intéressantes sont recueillies dans la phase acétate d'éthyle qui est filtrée (filtre-seringue : 0,2 μ). La composition des échantillons est analysée d'une part en comparant leurs spectres Ultra-Violet aux spectres des substances de synthèse, et d'autre part en observant leur migration sur plaques Spleicher (Eluant : hexane 100, acétate d'éthyle 75).

XII. ETUDE STRUCTURALE DES SUBSTANCES

Arrivés à nos limites de purification des substances, celles-ci sont envoyées au laboratoire des médiateurs chimiques à Brouessy. Les techniques utilisées pour en déterminer la nature exacte sont la Spectrométrie de Masse et la Résonance Magnétique Nucléaire. Une explication plus détaillée de ces techniques n'entre pas dans le cadre de cet exposé.

PARTIE IV

RESULTATS OBTENUS

PARTIE IV : RESULTATS OBTENUS

I. CARACTERISATION DE L'INFLUENCE DES GENOMES ET DE LA

STIMULATION SUR LA RESISTANCE DES PLANTS A LA FUSARIOSE

1. Influence du génome

Les trois lignées en provenance de Dabou S 940, S 943, S 946 sont issues de deux mêmes géniteurs, mais l'une d'elles provient d'un croisement inversé (S 943). L'intérêt de ce travail est de visualiser l'influence du cytoplasme femelle sur la résistance des plants.

Parmi les semis de serre cultivés à Bondy, nous avons choisi quatre génomes S 6, S 346, S 358, S 372, sur lesquels nous avons procédé à l'ensemble des tests. Les autres ont été classés uniquement d'après leur teneur en composés phénoliques totaux et l'importance relative des pics Hplc.

a) Série pépinière à Dabou :

- Indice de sensibilité :

Cet indice a été établi à Dabou pour les trois semis que nous avons testés.

S 940	Indice 35
S 943	Indice 131
S 946	Indice 107

La lignée S 940 serait donc la plus résistante car elle possède l'indice le plus faible. Viendrait ensuite le semis 946 et enfin le 943 qui se révélerait être le plus sensible.

- Recherche au laboratoire :

L'ensemble des résultats des tests biologiques de toxicité des extraits pour le FOE, ainsi que les dosages de Folin et les spectres Hplc sont représentés Fig. 5, 6 et Tableau 3.

A première vue, ces graphiques montrent une certaine analogie entre les semis 940 et 946 alors que le semis 943, qui est un cytoplasme inversé, semble se différencier dans les trois cas.

- Tests de toxicité :

Ils ont été conduits à environ un mois d'intervalle, dans un premier temps les essais 1, 2, 3 et dans un second temps les essais 7, 9 et 10 (Fig. 5). Les différences de résultats entre ces deux groupes d'expérience ne s'expliquent que par la dégradation des extraits au cours du temps, reponsable probablement d'une perte de leurs propriétés toxiques, malgré leur stockage au froid (0°C). L'adjonction d'un antioxydant n'est pas envisageable à cause des nombreux effets secondaires qui l'accompagneraient. Cependant, l'extrait du semis 943 paraît être plus toxique que les deux autres.

Dans les tests 1 à 3 on constate la forte toxicité des extraits bruts (entre 10 et 25 % de germination pour une concentration de 30 mg/ml). Remarquons que la forte variabilité des résultats pour la concentration de 30 mg/ml par rapport à ceux de 40 mg/ml est due à un effet de seuil en-dessous duquel la concentration en substances est insuffisante pour provoquer des perturbations métaboliques généralisées dans les cellules du thalle.

Le témoin (milieu + spores) a été estimé à une valeur moyenne de 90 % de germination. Cependant, dans 20 % des cas nous avons observé des taux faibles de germination, probablement liés à l'état physiologique de la sporée de FOE.

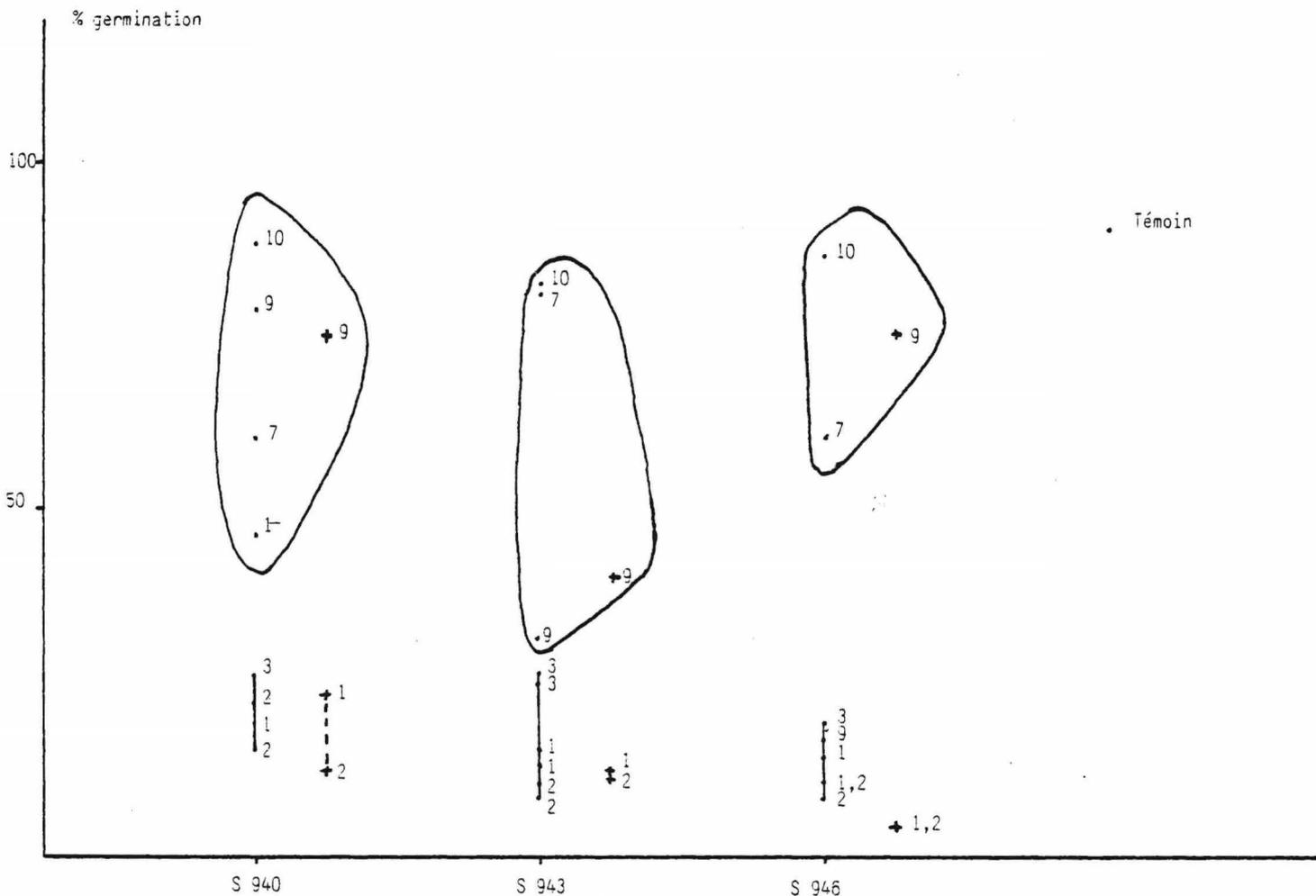
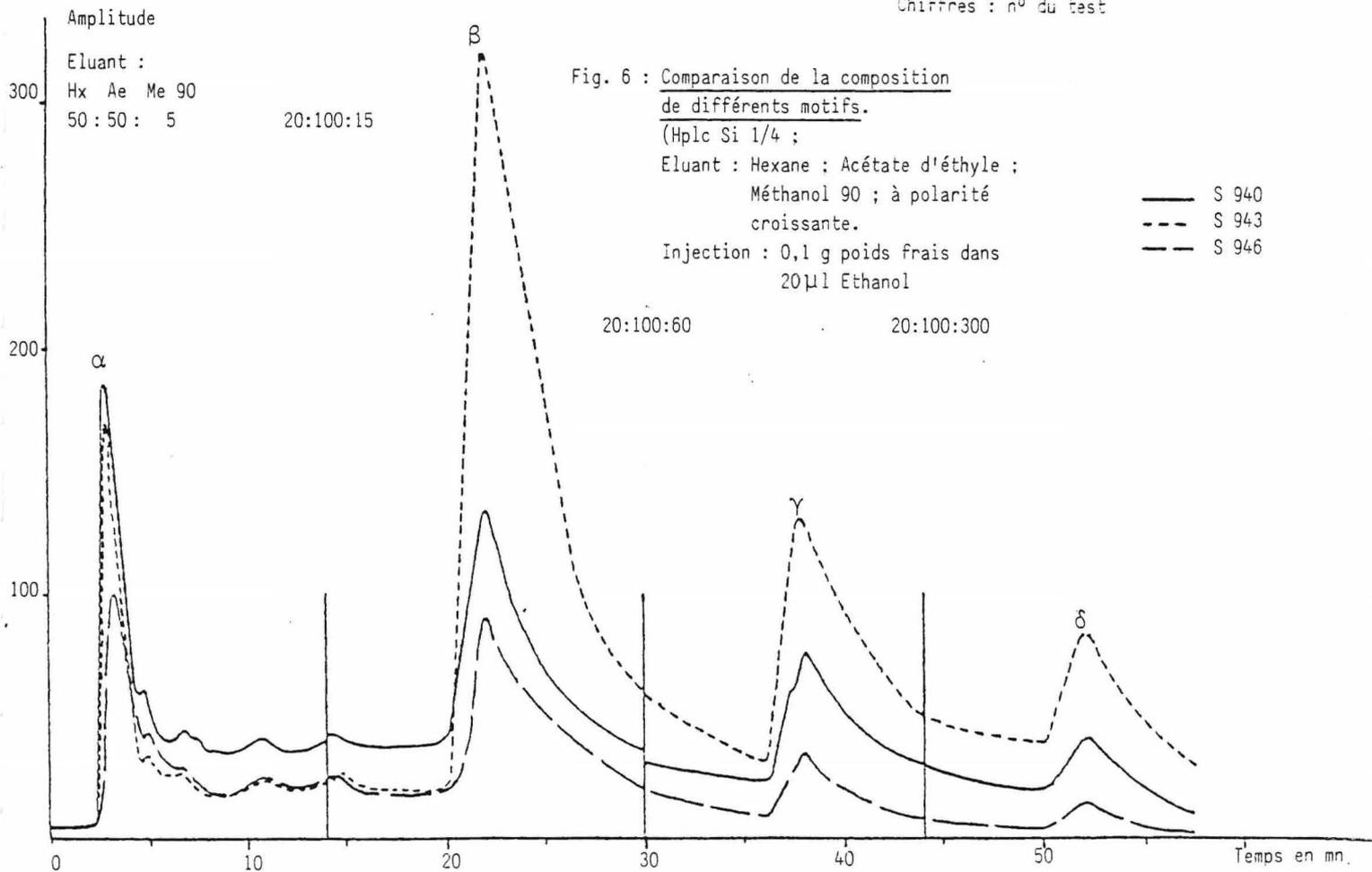


Fig. 5 : Toxicité des semis 940 à 943 :

• à 30 mg/ml
+ à 40 mg/ml
Chiffres : n° du test



- Dosages de Folin et spectres Hplc :

Motif	Teneur exprimée en μg équivalent d'acide chlorogénique/g de tissus frais
940	2 100
943	2 900
946	1 300

Tableau 3 : Influence du génome sur la teneur des extraits racinaires en composés phénoliques totaux.

Le semis 943 contient visiblement plus de composés phénoliques (toxiques ou non) que les deux autres. Or, comme nous le verrons plus loin, les pics α et β des spectres Hplc représentent les phénols jouant un rôle important dans la résistance. Les substances beaucoup plus polaires des pics γ et δ correspondent aux phénols oxydés aux tanins également dosés dans les phénols totaux.

En Fig. 6 nous constatons l'importance du pic β du semis 943 (à cytoplasme inversé). Cette accumulation de substance se traduit par une forte teneur en composés phénoliques totaux (Tabl. 3) ainsi qu'une toxicité supérieure de ce semis vis-à-vis du FOE (Fig. 5). Le semis 940 semblerait former plus de substances de résistance que le semis 946, bien que cela ne soit pas représentatif au niveau des tests de toxicité (Fig. 5).

- Conclusions :

Ces résultats concourent à reconnaître une influence du génome parental et du sens de croisement sur la résistance des plants à la Fusariose. Des deux géniteurs D 10 D et L 2 T, lorsque le géniteur D 10 D est utilisé comme récepteur (cas du semis 943), on observe une nette augmentation de synthèse de composés phénoliques associés à la résistance.

Tous les autres facteurs étant inchangés, il existe une forte présomption que la différence de réaction résulte de l'influence du cytoplasme femelle par rapport au semis 940. Des situations analogues ont déjà été observées pour la résistance à la Fusariose.

- Remarque :

Le classement des semis par ordre de toxicité décroissante est : S 943, S 940, S 946. Ceci est en incohérence avec les indices de sensibilité des lignées. Bien que les causes de divergence entre le comportement en préépinière et les résultats des analyses ne soient pas connues, celles-ci peuvent tenir à l'influence des facteurs du milieu (température, humidité du sol, flore prémunisante du sol).

b) Semis des serres de Bondy :

Les figures 7 et 8 représentent le classement de l'ensemble des semis suivant leur teneur en composés phénoliques totaux et les valeurs relatives des différents pics de la chromatographie Hplc. Les semis S 358, S 372, S 357, S 374 et S 346, âgés de quatre mois, ont de plus fortes teneurs en composés appartenant principalement au pic β (Fig. 7). que les autres, c'est-à-dire S 6, S 33, S 1 et les plants non inoculés (NI), âgés de huit mois.

En l'occurrence les semis 1 et 6, qui ont les mêmes parents, L 2 T et (L 269 D x D 115 D), réagissent de façon identiques à l'inoculation. Le parent L 5157 D, commun au S 357 et au S 358, ainsi que le parent L 2257 P, commun au S 358 et au S 372 transmettent des propriétés de synthèse de composés appartenant au pic β . Ils pourraient être sélectionnés pour leur aptitude à résister au FOE. Par contre, le parent (L 5089 D x L 1183 P) du semis S 346 et S 374 semble nettement moins intéressant.

En-dehors des propriétés intrinsèques des géniteurs interviennent aussi les effets de combinaison entre les génomes parentaux. Le parent (L 269 D x D 115 D) se combine efficacement avec L 2 T (cas de S 1 et S 6), alors que pour le S 33, sa combinaison au parent (L 2 T x L 5 T) donne des résultats nettement moins bons.

Remarquons la très faible concentration en phénols dans les tissus des semis non inoculés. Ceci prouve bien que la synthèse des substances phénoliques de résistance est consécutive à l'infection.

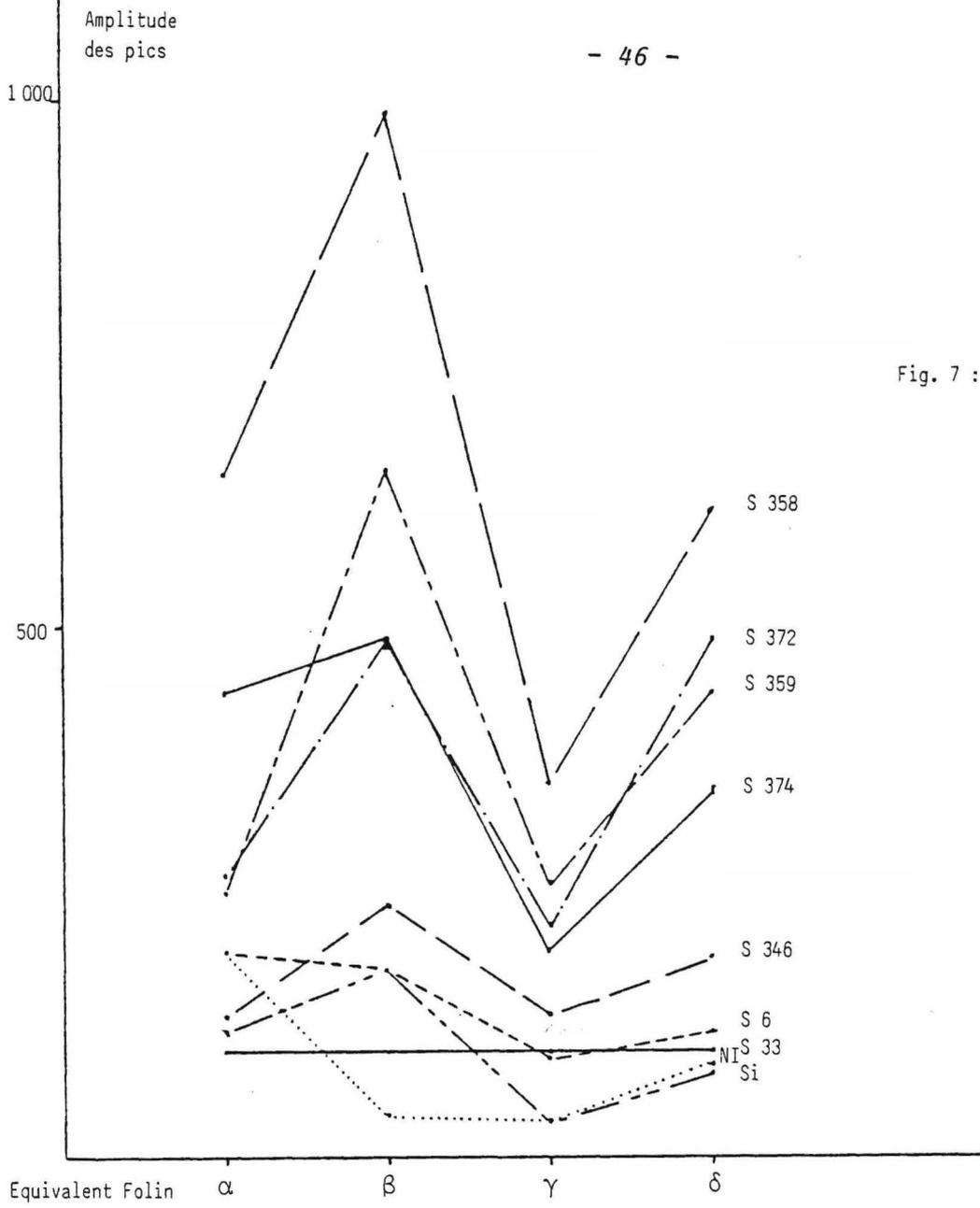


Fig. 7 : Comparaison de l'amplitude des pics Hplc entre les différents génomes réponse au FOE.

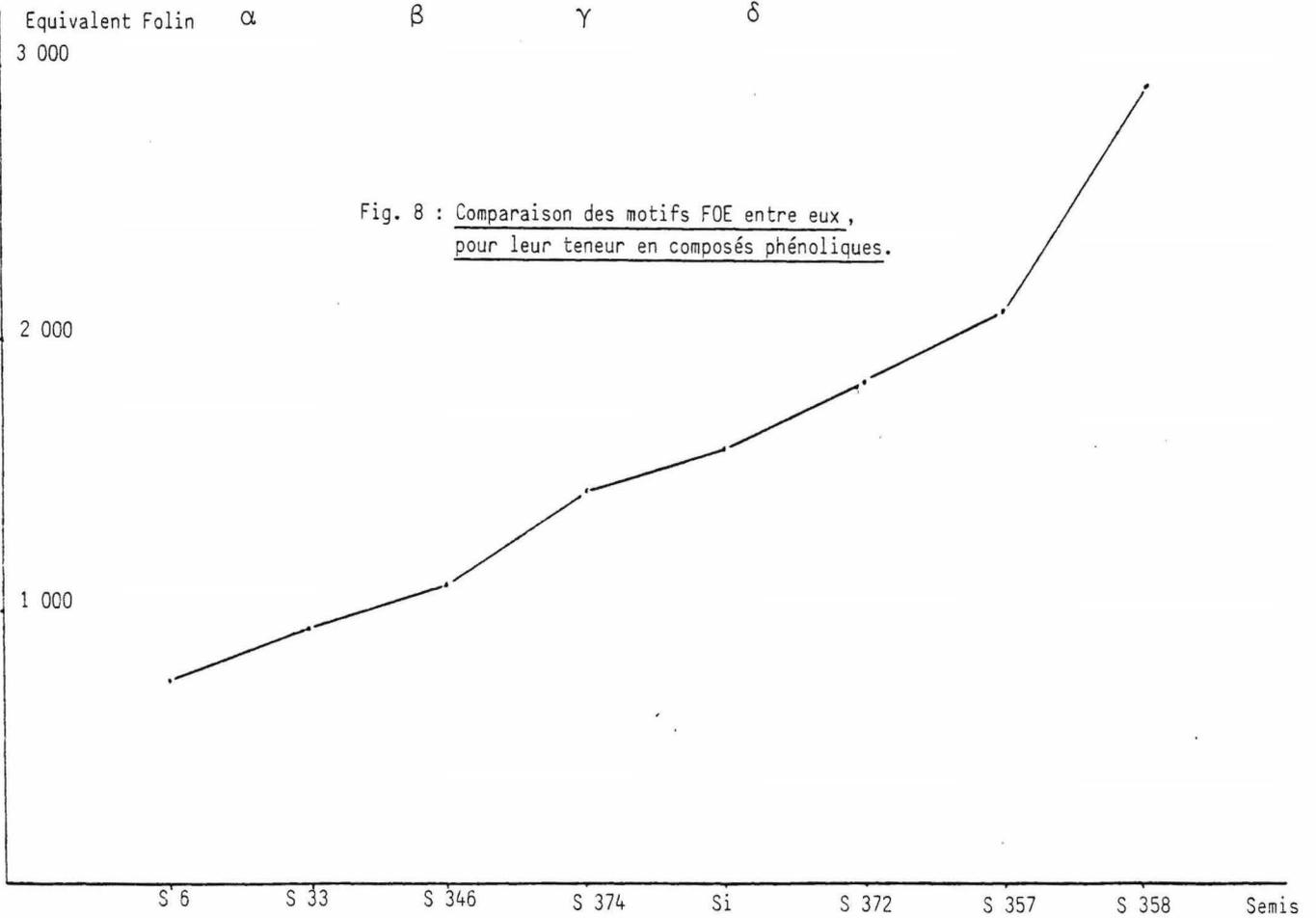


Fig. 8 : Comparaison des motifs FOE entre eux, pour leur teneur en composés phénoliques.

Une comparaison plus approfondie a été menée pour les semis S 6, S 346, S 372, S 358 pour lesquels les résultats de toxicité et de dosage de Folin sont représentés en Fig. 9 (page suivante). A une concentration équivalente en poids de tissus frais, les semis S 6 et S 346 contiennent beaucoup moins de substances toxiques que S 358 et S 372. Remarquons que nous retrouvons l'analogie entre S 372 et S 358, qui ont les mêmes parents.

Conclusion :

Le génome d'un semis joue un rôle important dans la capacité de celui-ci à coder pour la synthèse de substances de défense. Celles-ci sont pour la plupart de nature phénolique. Ces produits sont toxiques *in vitro*. Par ailleurs, plus leur concentration augmente, plus la toxicité des extraits augmente à équivalence de poids frais (Fig. 9). Il est possible d'apprécier la concentration en substances toxiques par Hplc.

2. Essais de stimulation et d'inhibition de la réaction de défense

a) Semis des serres de Bondy :

Deux semis, S 6 et S 346, ont été soumis à des traitements par différentes substances :

- * Un inhibiteur de la synthèse des phényl propanoïdes : Acide α oxyaminoacétique (AOA). Cette substance est un inhibiteur compétitif de la phényl-alanine-amoniaque-liase (PAL).
- * Deux substances de synthèse dont les structures sont analogues à celles d'éliciteurs fongiques :

- . Acide arachidonique (Ara), mimant un éliciteur extrait du Phytophthora infestans,
- . Galactosamine (Gal) correspondant à l'un des éliciteurs porté par les Fusarium sp., notamment Fusarium solani.

Leur composition, proche de celle des parois du champignon, stimule la réaction de défense de la plante.

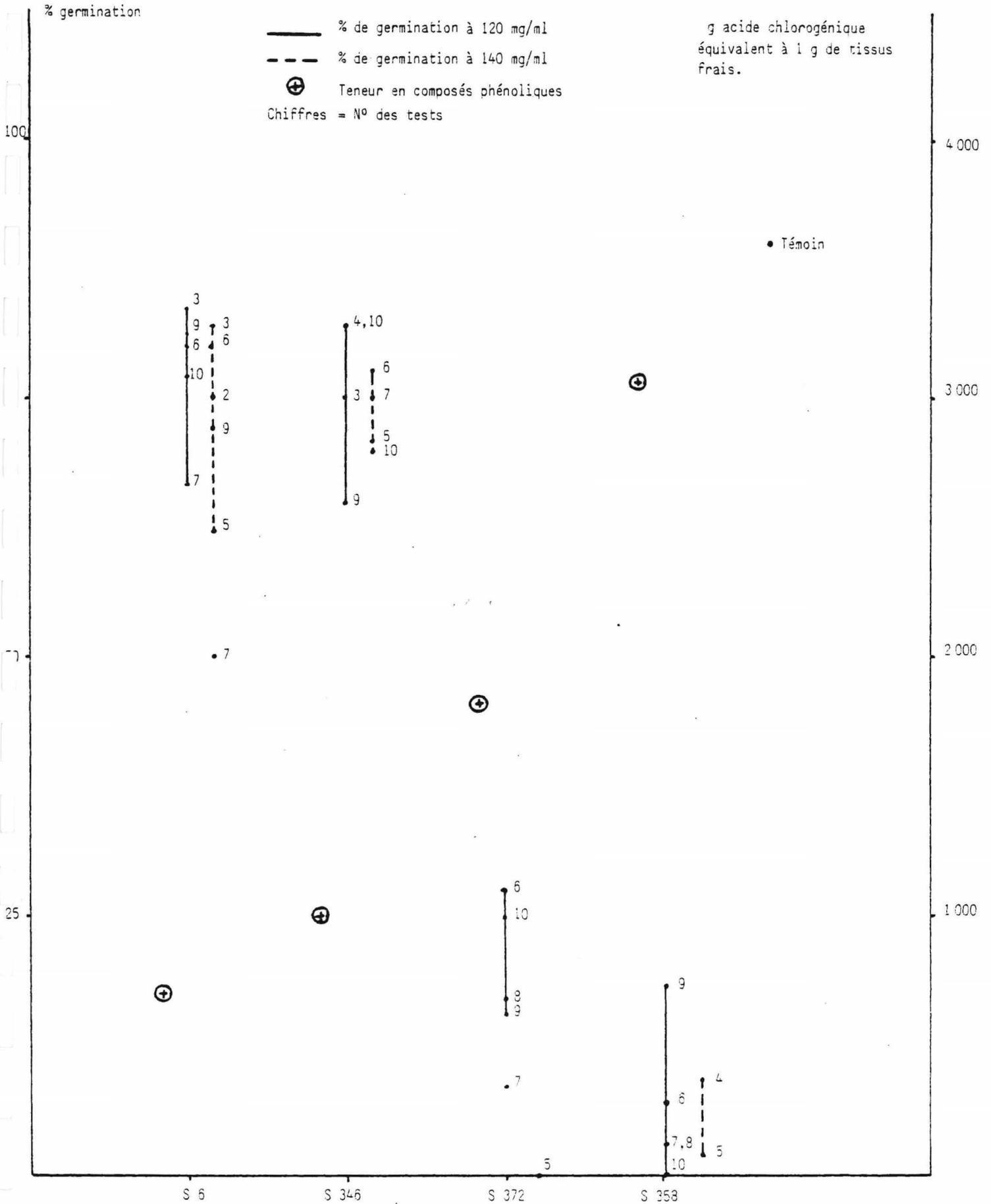


Fig. 9 : Influence des génomes sur la toxicité des plants vis-à-vis du F0E et sur leur teneur en composés phénoliques.

- Action de l'AOA :

Contrairement aux résultats attendus, l'application d'AOA provoque une accumulation importante de composés phénoliques. Elle apparaît Fig. 10 (Dosage de Folin). Ces produits ont une fongitoxicité in vitro sur des spores FOE. La Fig. 11 montre l'importance relative de l'accumulation des substances aux autres traitements. Cette réaction de stress est due à un apport massif d'AOA provoquant un dérèglement des réactions de la plante qui a accumulé des substances toxiques au lieu d'en limiter la synthèse. Dans ce cas, l'AOA n'a pas pénétré ni diffusé dans les tissus des racines contrairement aux expériences correspondantes à concentrations plus faibles, mais il a provoqué un choc physiologique brutal, sans doute au niveau du cortex.

- Action des éliciteurs :

Dans les deux cas de traitements, la synthèse de composés phénoliques a été accrue par rapport au motif FOE seul (Fig. 11) et la toxicité des substances synthétisées est confirmée à équivalence de poids frais par les résultats des tests de toxicité in vitro (Fig. 10). Pour les deux semis, on observe une baisse du pourcentage de germination in vitro des spores de FOE de 65 % après traitement à l'acide arachidonique et une baisse légèrement moindre (60 %) dans le cas de l'application de galactosamine.

Pour le semis 346 nous constatons une augmentation de 130 % de la teneur des composés phénoliques totaux sous l'action de l'Ara. La Fig. 11 met en évidence qu'une grande partie correspond à des substances polaires (pic δ) participant faiblement à la résistance de la plante.

Par contre, dans le cas du semis 6 l'augmentation de la teneur en composés phénoliques n'est que d'environ 50 %. Cette augmentation correspond à l'inhibition de germination de 60 % en toxicité in vitro. L'application d'Ara ne provoque pas d'augmentation importante de composés polaires dans ce cas (Hplc). Ainsi, comparons S 6 et S 346 : le premier, avec une faible augmentation de concentration de produits phénoliques, réagit mieux que le second. Il y a donc une synthèse sélective. Par ailleurs, nous constatons une influence du génome sur la stimulation de ces composés par l'Ara (Fig. 12). En prenant comme référence S 6, nous observons une capacité beaucoup plus importante de S 346 à synthétiser les substances de résistance. Ceci est confirmé par les observations des dosages de Folin et par les résultats des tests de toxicité.

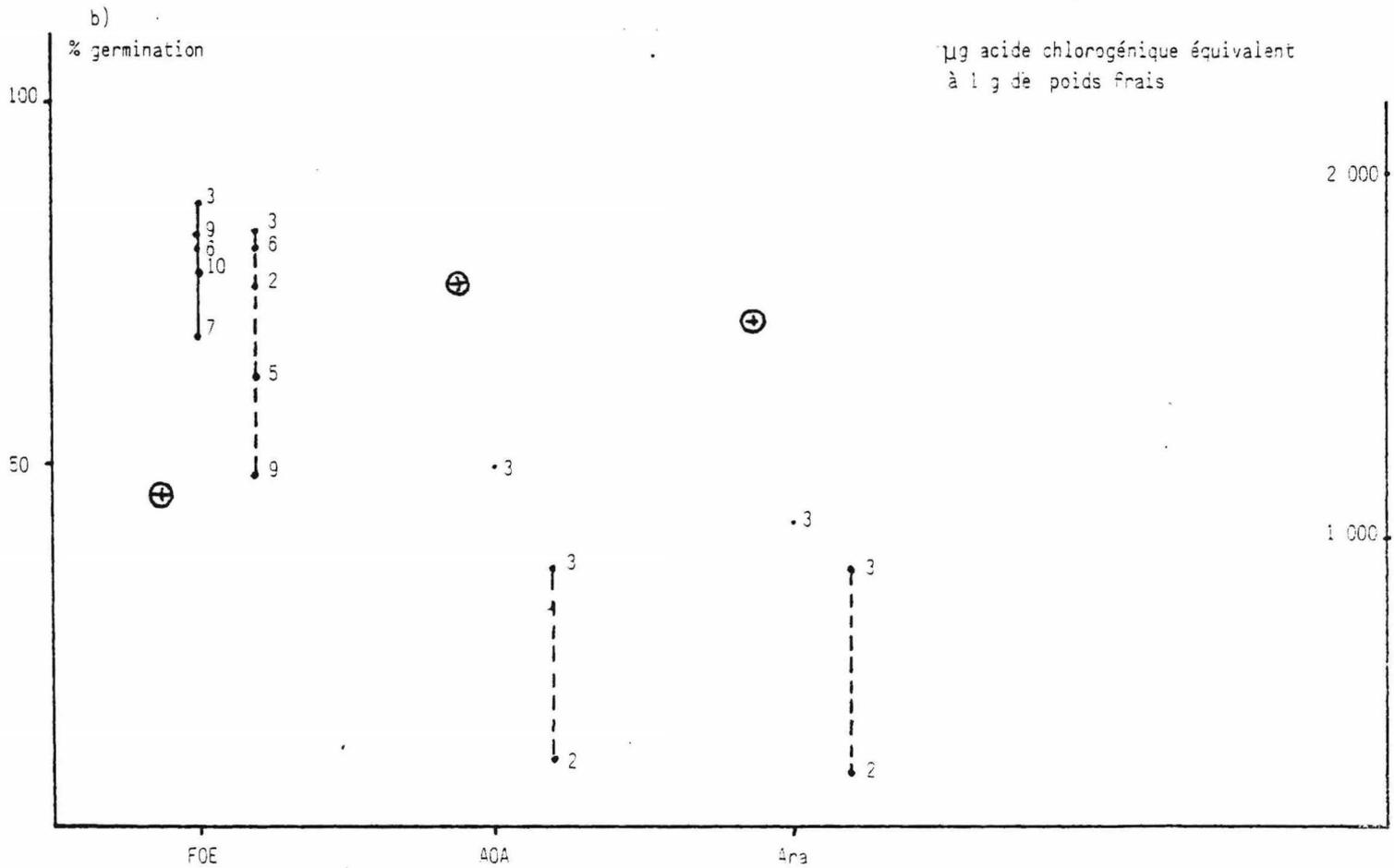
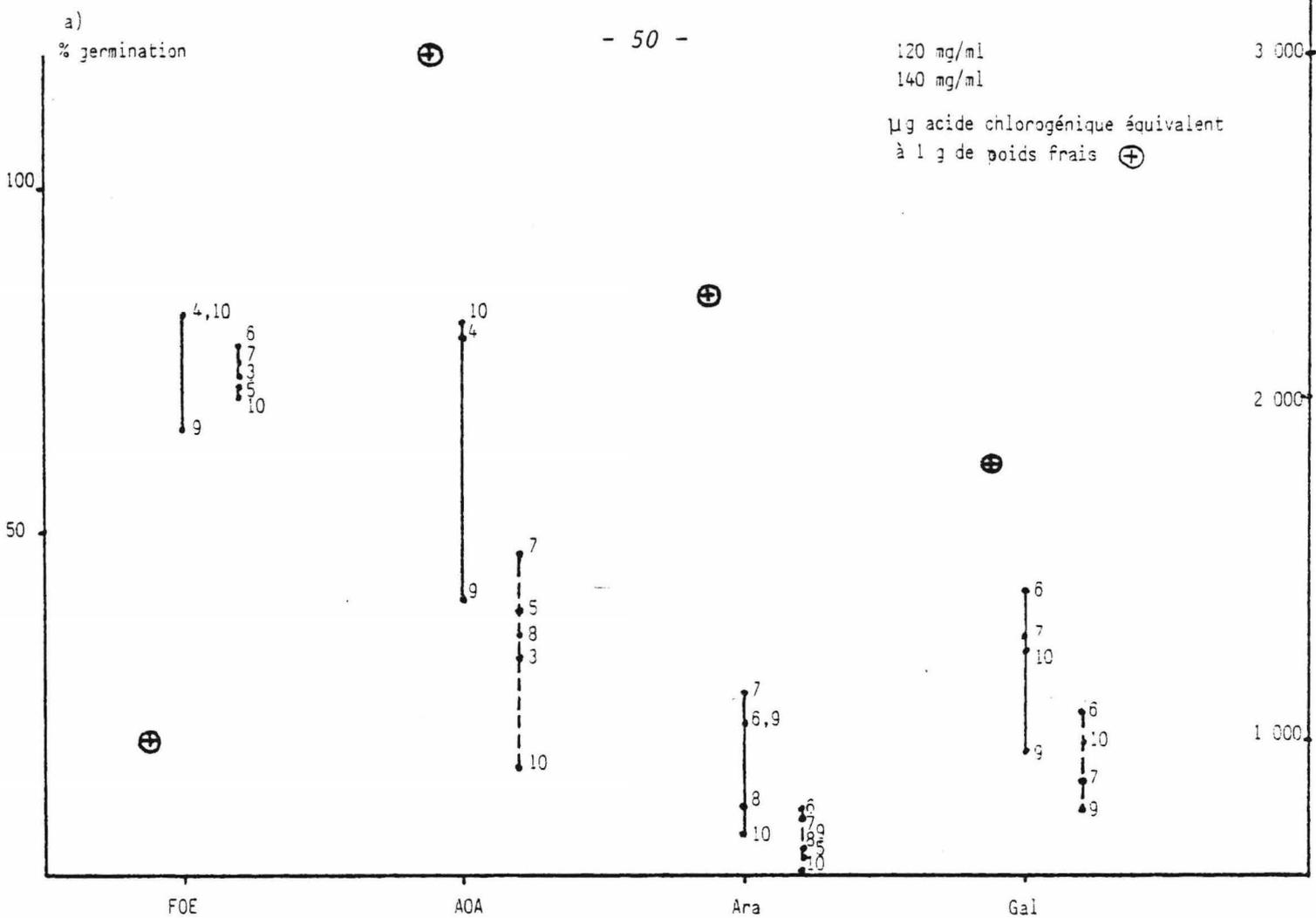


Fig. 10 : Influence de la stimulation sur la toxicité des semis 346 (a) et 6 (b) vis-à-vis du Fusarium, et sur la teneur en Phénols.

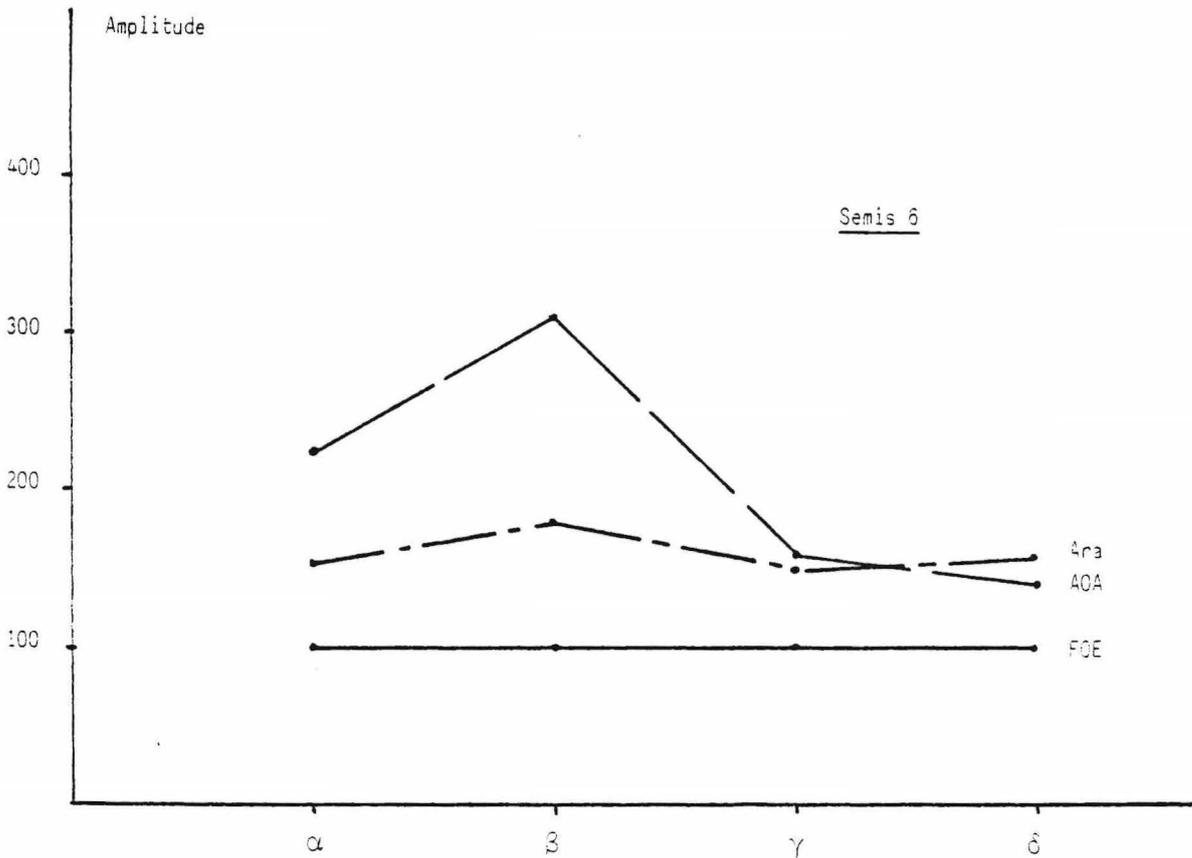
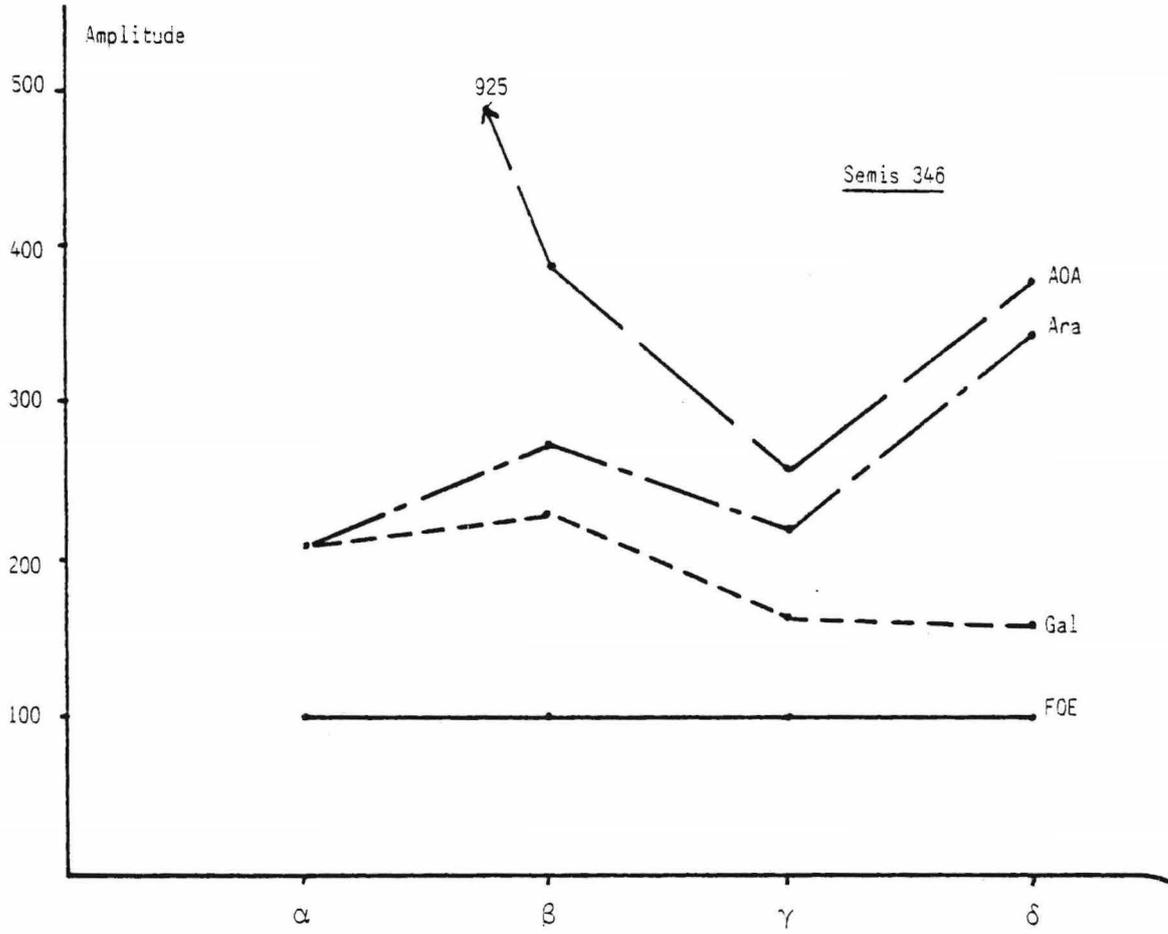


Fig. 11 : Influence de l'AOA, Ara, Gal sur les pics Hoic.

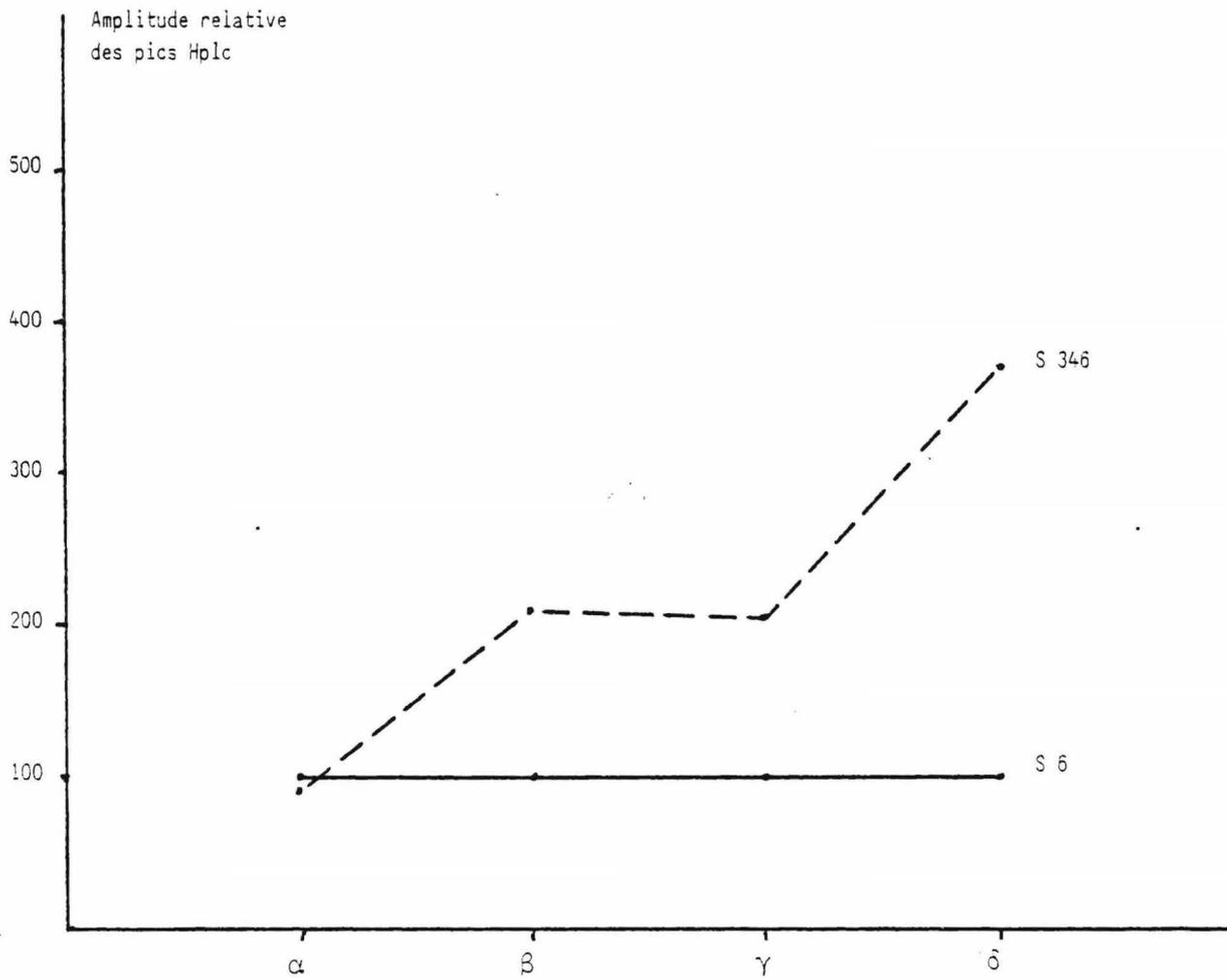


Fig. 12 : Influence du génome sur la stimulation de la synthèse de substances de résistance, par l'acide arachidonique.

- Conclusion :

L'action élicitrice de l'acide arachidonique et de la galactosamine est incontestable. Elle conduit à l'augmentation de la teneur des plants en composés phénoliques, en particulier de ceux qui participent à la résistance à la Fusariose, provoquant une baisse de germination du FOE in vitro. Là encore, certains génomes sont plus aptes que d'autres à réagir à cette stimulation.

Le traitement à l'AOA doit être fait avec précaution car un apport trop important provoque une réaction de stress aboutissant à une accumulation importante de composés jouant un rôle dans la résistance. D'autres essais de traitement à l'AOA ont donc été conduits.

b) Traitement à l'AOA in vitro à Dabou :

Sur les 40 plants inoculés seuls, 7 ont été fusariés alors que 16 n'ont manifesté aucun symptôme de la maladie. Les 17 restants ont subi des nécroses et ont dû être éliminés. Les 40 plants inoculés, traités à l'AOA, ont tous été retrouvés vivants.

- Analyse comparative des spectres Hplc (Fig. 13) :

L'application de l'inhibiteur a provoqué une chute de la synthèse des substances phénoliques. La comparaison des chromatogrammes fait apparaître une nette accumulation de facteurs de résistance dans les tissus des plants d'aspect sain, non traités, au niveau des pics α et β . Dans ces deux pics, les teneurs sont quasi identiques pour les tissus des plants infectés et ceux traités à l'AOA. On constate en outre d'importantes quantités de tanins ou de substances oxydées (pics γ et δ).

- Dosage des composés phénoliques totaux :

Motif	Teneur exprimée en μg équivalent d'acide chlorogénique/g de tissus frais
Fusarié, non traité AOA	3 000
Aspect sain, non traité AOA	3 500
Aspect sain, traité AOA	2 500

Tableau 4 : Teneur des extraits bruts en composés phénoliques totaux.

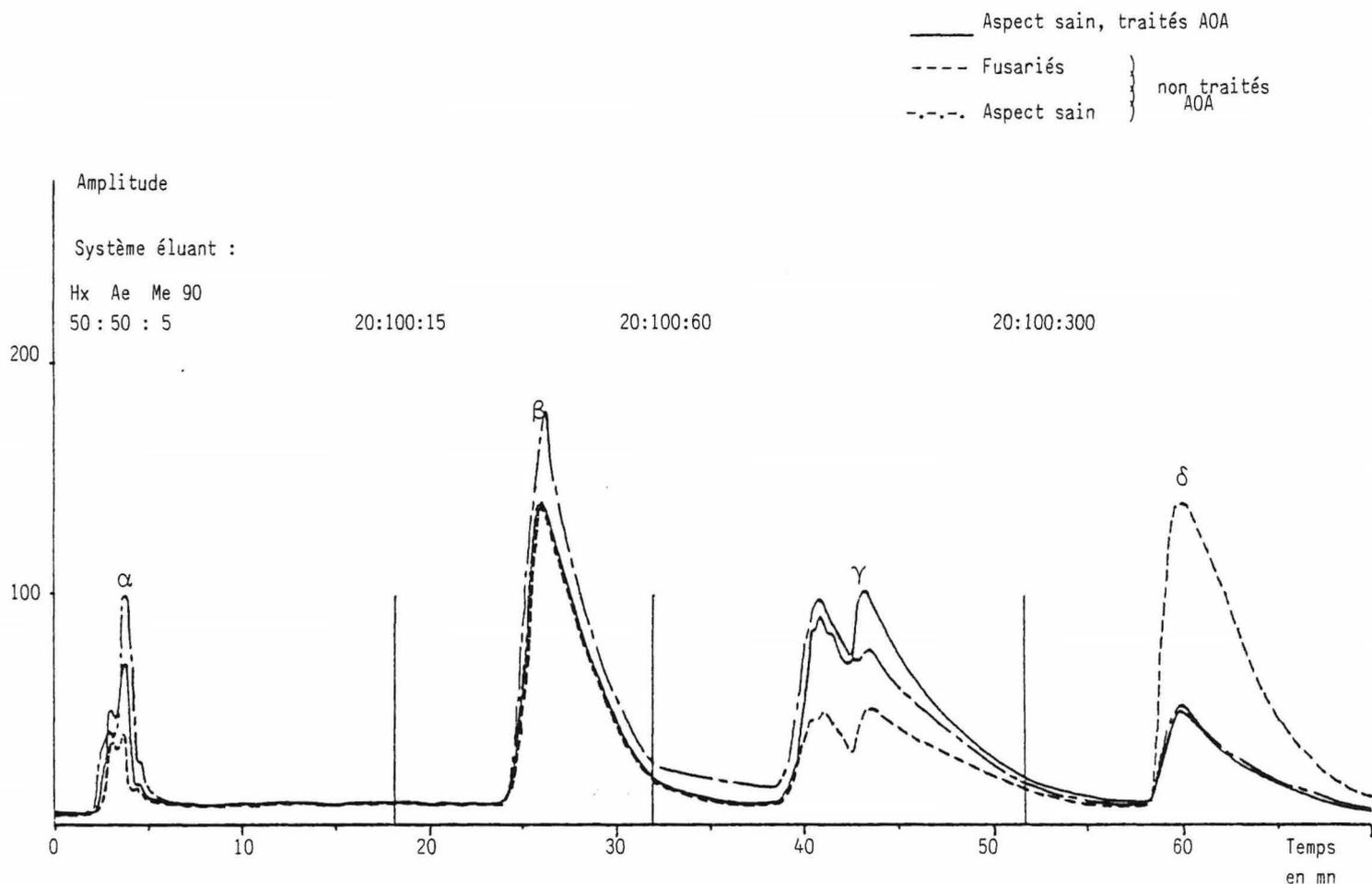


Fig. 13 : Influence de l'AOA sur la teneur des composants racinaires.

Essai in vitro, Dabou.

Hplc Si 1/4

Eluant : Hexane, Acétate d'éthyle, Méthanol 90 à polarité croissante.

Injection : 0,1 g poids frais dans 20 μ l d'éthanol.

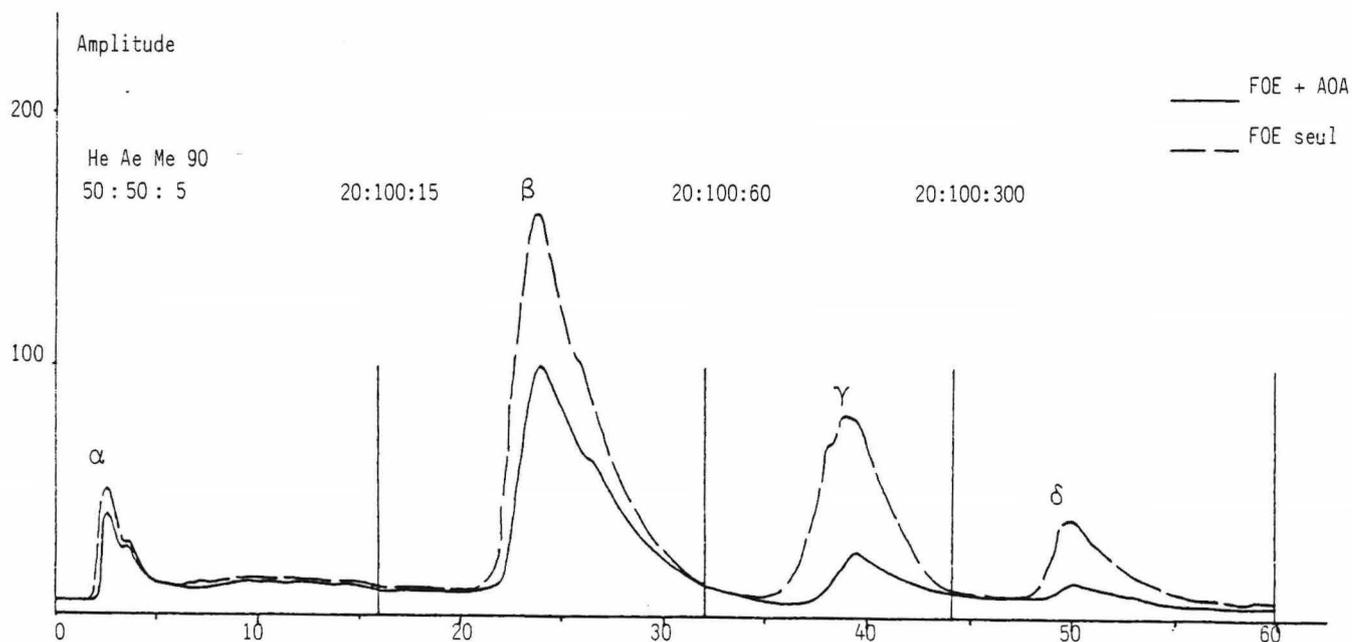


Fig. 14 : Influence de l'AOA sur la teneur des composants racinaires.

Essai in vitro, Bondy.

Mêmes conditions d'éluion que Fig. 13.

Les plants tolérants d'aspect sain, non traités à l'AOA, contiennent le plus de composés phénoliques. La forte baisse de ceux-ci dans les plants traités à l'AOA est consécutive à l'action de l'inhibiteur sur la synthèse de ces composés. Par contre, la teneur importante en phénol dans les plants fusariés (visible sur les dosages de Folin) correspond à la présence des substances oxydées et/ou polymérisées (Fig. 13, Chromatographie Hplc comparative).

- Conclusion :

Dans ce cas, nous pouvons relever une action dépressive de l'AOA sur la synthèse des composés fongitoxiques d'après les tests et les dosages effectués. Ceci aurait dû correspondre à un fort pourcentage de plants fusariés dans le cas du traitement à l'AOA, or ce n'est pas le cas. Peut-être est-ce dû à un retard de la manifestation des symptômes lié aux perturbations physiologiques.

c) Traitement à l'AOA in vitro à Bondy :

- Remarque :

En serre, les conditions d'inoculation des plants ont abîmé les racines. Elles peuvent être tenues pour responsables d'une diffusion passive de l'AOA dans les racines, et ont occasionné des perturbations physiologiques conduisant à d'importantes nécroses. Une partie des plants inoculés non traités a été alors utilisée pour le test. Les plants traités à l'AOA, dix jours après l'inoculation, ne manifestent plus ces perturbations, car la blessure de l'inoculation a eu le temps de se rétablir. L'essai est arrêté avant l'expression des symptômes.

- Analyse comparative des spectres Hplc (Fig. 14) :

L'application d'inhibiteur entraîne une baisse importante de substances dans les tissus au niveau de chacun des pics Hplc.

- Dosages de Folin :

Motif	Teneur exprimée en μg équivalent d'acide chlorogénique/g de tissus frais
FOE	2 600
FOE + AOA	380

Tableau 5 : Influence du traitement AOA "in vitro" à Bondy, sur la teneur des racines en composés phénoliques totaux.

Au vu de ces résultats, les plants traités à l'AOA ont une synthèse plus faible en composés phénoliques totaux que les plants traités à FOE seul.

- Conclusion :

L'AOA a donc une action dépressive sur la synthèse des composés phénoliques. Par ailleurs, en comparant ces résultats à ceux de Dabou, on constate qu'à équivalence de poids frais, les racines de Dabou contiennent beaucoup plus de substances phénoliques. Les conditions naturelles de température, d'humidité, de luminosité jouent certainement un rôle non négligeable dans l'expression des symptômes des réactions de défense.

II. CARACTERISATION DES SUBSTANCES FONGITOXIQUES ET LEURS PROPRIETES

1. Caractérisation des substances

Actuellement, plusieurs composés ont pu être séparés, appartenant pour la plupart à la famille des composés phénoliques. Deux d'entre eux ont vu leur structure élucidée : le parahydroxybenzoate d'éthyle et le parahydroxybenzaldéhyde.

Deux autres substances ont pu être isolées et présentent les caractéristiques suivantes :

* Substance C :

- . Toxique
- . RF en Hexane 50, Acétate d'éthyle 50, Méthanol 20 : Résiduel à 0,17
- . Absorption à 287 et 260 nm.

On suppose la présence d'un aldéhyde d'après les révélations et les tests comparatifs des substances de synthèse.

* Substance γ :

- . Très toxique,
- . Forte analogie avec C et les benzoates d'après l'absorption UV (260 ; 238),

Elle ferait partie des phénylpropanoïdes.

Les résultats de SM et de RMN n'étant pas encore définitif, nous ne pouvons plus aller plus avant dans nos suppositions.

Remarque :

D'autres fractions manifestent de la toxicité, mais elles ne sont pas assez purifiées pour être identifiées.

2. Stabilité des substances fongitoxiques

a) Tests de toxicité de longue durée :

- But :

C'est une première approche qualitative pour observer la stabilité de l'efficacité des substances fongitoxiques dans le temps. Elle doit être confirmée par d'autres techniques.

- Résultats :

Nous avons testé plusieurs extraits bruts de motifs particulièrement toxiques, ainsi que les substances purifiées. Dans tous les cas, il y a eu croissance du mycélium.

On suppose une dégradation des substances ou une concentration d'extraits inférieure au seuil de toxicité. Ceci nous a conduits à étudier de plus près ce phénomène par des tests de biodégradation.

b) Biodégradation :

- But :

L'objet de la manipulation est de vérifier la biodégradation des substances fongitoxiques élaborées par la plante.

- Résultats et conclusions :

Quatre substances ont été testées :

- . le parahydroxybenzoate d'éthyle de synthèse (POH Bzte),
- . le parahydroxybenzaldéhyde de synthèse (POH Bald),
- . la substance C,
- . la substance γ .

Les résultats et conclusions sont représentés Fig. 15 et Tableau 6 (pages suivantes).

3. Synergie

- But :

A ce stade de purification, il est intéressant de vérifier si les différentes substances inhibitrices d'un extrait brut ont chacune une action indépendante, ou si, au contraire, leur association entraîne une variation de la sensibilité des spores de FOE (effet synergique ou antagoniste).

Ces tests concernent les substances suivantes :

- . le parahydroxybenzoate d'éthyle de synthèse (POH Bzte),
- . le parahydroxybenzaldéhyde de synthèse (POH Bald),
- . la substance γ ,
- . la bande 4 (Bde 4) provenant d'une séparation partielle sur plaque préparative.

Front du solvant

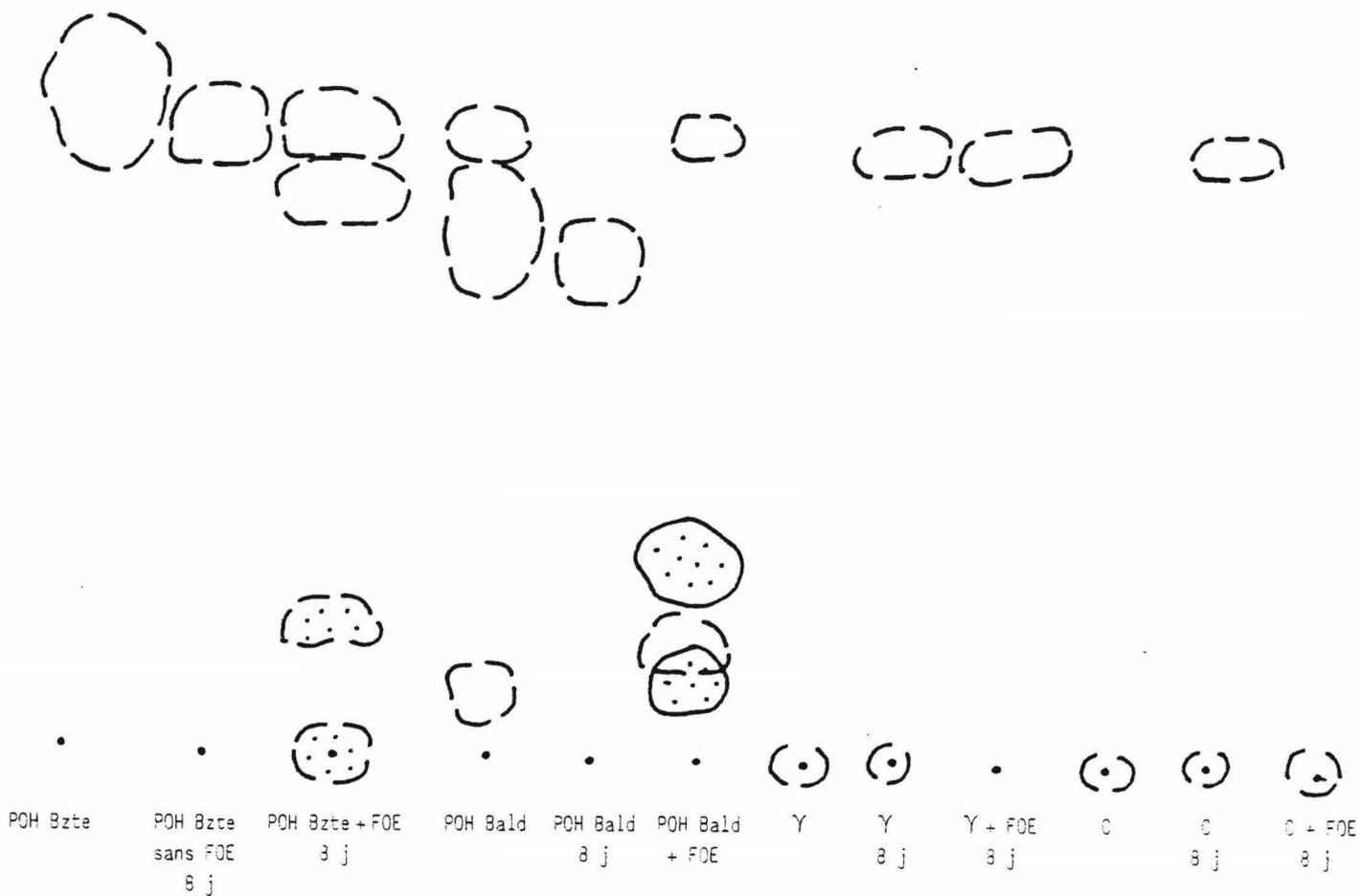


Fig. 15 : Chromatographie en couche mince (plaque Spieicher) de composés testés par blouégradation.

Eluant : Hexane 100 ; Acétate d'éthyle 75.

$\lambda = 366 \text{ nm}$

 Paranitranidine positif.

Tableau 6 : Interprétation des spectres et CCM de biodégradation de quatre substances fongitoxiques

SUBSTANCE	ABSORPTION MAXIMALE	INTERPRETATION	CONCLUSION
<p>POH Bzte 140 µg/ml</p> <p>POH Bzte seul, après huit jours</p> <p>POH Bzte + FOE après huit jours</p>	<p>260 ; 225</p> <p>287 ; 260</p> <p>289 ; 276 ; 268 ; <u>260</u> ; 252 ; 248.</p>	<p>* Absence de FOE : le POH Bzte reste intact.</p> <p>* Présence de FOE : Dégradation plus lente et partielle du POH Bzte.</p>	<p>Substance sensible à une biodégradation naturelle par les bactéries et par l'air.</p>
<p>POH Bald 300 µg/ml</p> <p>POH Bald seul, après huit jours</p> <p>POH Bald + FOE après huit jours</p>	<p>237 ; 246</p> <p>277 ; 256</p>	<p>* Substance peu sensible aux manifestations extérieures. (O₂ et bactéries).</p> <p>* Présence de FOE : Décomposition en trois substances (d'après les plaques) dont deux sont PN+.</p>	<p>Substance stable, mais biodégradable en plusieurs composants phénoliques par les enzymes du FOE.</p>
<p>γ 135 µg/ml</p> <p>γ seul, après huit jours</p> <p>γ + FOE, après huit jours</p>	<p>260 ; 238</p> <p>286 ; 260</p>	<p>* Peu stable. Décomposition en milieu aqueux à pH faible et température 30°C en un produit proche du benzoate d'éthyle.</p> <p>* Action FOE : Dégradation en produit ayant les mêmes caractéristiques spectrales que la biodégradation de C et que la modification du POH Bzte après huit jours.</p>	<p>Substance peu stable. Forte analogie avec C et POH Bzte. Serait apparenté à des phénylpropanoïques, facilement dégradables.</p>
<p>C 135 µg/ml</p>	<p>287 ; 260</p>	<p>* Semble stable, non dégradé par le champignon. Produit de dégradation identique à γ.</p>	<p>L'UV suggère l'existence d'aldéhyde. Produit stable. C'est un composant de γ.</p>

PN+ = Paranitranidine positive.

N.B. Les essais avec le produit C (après 8 jours et en présence de FOE) n'ayant pu être répétés par manque de matériel, les résultats ne figurent pas dans ce tableau.

- Résultats :

La Fig. 16 présente les résultats obtenus.

Le faible nombre de répétitions entraîne une grande variabilité des résultats. Nous nous garderons d'émettre des appréciations formelles. Cependant, nous pouvons tirer plusieurs informations de ces tests.

Le POH Bzte a une bonne synergie avec γ d'une part, et avec le POH Bald d'autre part. Celle-ci est fortement accentuée lorsque les trois substances sont testées simultanément.

La substance γ accroît la toxicité du milieu d'incubation non proportionnellement à sa concentration lorsqu'elle est associée au POH Bzte ou au POH Bald. Mais elle a très peu d'action avec la Bde 4. La Bde 4 est très peu toxique. Son association avec les autres substances ne paraît pas modifier leur toxicité.

- Conclusion :

Ces résultats ne sont qu'une première approche, mais malgré le faible nombre de répétitions dû à des quantités restreintes d'extraits, ils démontrent l'existence probable d'une synergie d'action des substances fongitoxiques élaborées par la plante. Il serait intéressant de poursuivre ces investigations afin de déterminer plus précisément la synergie dans différentes combinaisons de substances.

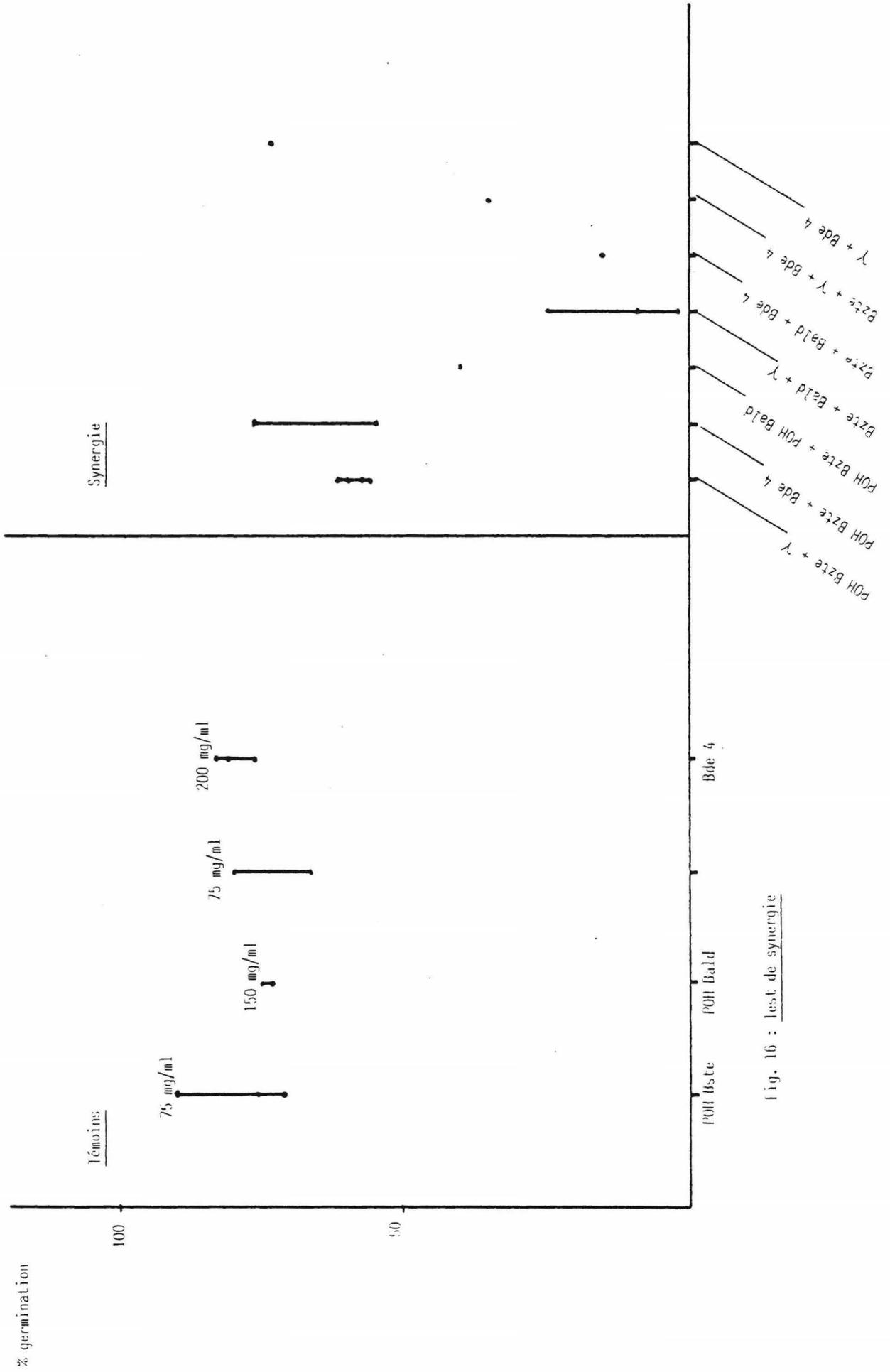


Fig. 16 : Test de synergie

PARTIE V

DISCUSSION - CONCLUSION

PARTIE V : DISCUSSION - CONCLUSION

L'étude sur l'identification de la nature des substances de résistance élaborées par le Palmier à huile contre le Fusarium oxysporum F. sp. elaeidis nous a conduits à l'isolement de plusieurs composés. La plupart sont de nature phénolique, comme SMITH (25) a déjà pu le montrer dans le cas de nombreuses plantes. Sauf pour cinq d'entre elles, la structure exacte des substances de résistance n'a pas été élucidée pour l'instant. Néanmoins nous avons pu éprouver in vitro la toxicité de plusieurs produits partiellement purifiés, notamment les substances γ et C. Une fois la structure de ces composés établie, on pourrait envisager de les synthétiser à grande échelle et de venir en aide aux défenses naturelles de la plante par des traitements appropriés.

Ces substances n'agissent pas de façon indépendantes. Nous avons pu mettre en évidence un effet de synergie entre elles. Les quantités disponibles de produits naturels sont réduites et cela limite les essais. La synergie semble importante entre la substance γ et les composés de la série benzoïque. Cette complémentarité tient probablement à la diversité des cibles métaboliques des inhibiteurs sur les fonctions vitales dans les spores et dans les filaments germinatifs. Plusieurs études ont établi que les composés phénoliques inhibent les échanges d'oxygène, perturbent la perméabilité cellulaire et modifient ou annulent les systèmes enzymatiques (23).

Notre première approche de l'étude de la biodégradation de ces substances nous a montré qu'après quatre à cinq jours d'incubation le champignon était capable de synthétiser des enzymes de dégradation de phytoalexines qui entraînaient la formation de produits intermédiaires moins toxiques. Les étapes de dégradation ont été étudiées par BARZ (4) pour de nombreuses familles de phytoalexines. La plante est donc amenée à synthétiser ces substances de façon continue. Une étude plus poussée de leur biodégradation et des produits intermédiaires formés dans le cas du Palmier à huile permettrait des applications directes sur le terrain au niveau de l'efficacité des substances de traitement utilisées. Par ailleurs, l'étude cinétique de la biodégradation nous donnerait une appréciation de la fréquence optimale d'application des substances en vue d'une meilleure protection des plants.

L'influence de l'origine génétique des plants sur la résistance à la Fusariose avait déjà été constatée au champ (MEUNIER, 19). Nos résultats confirment cette influence du génome et la visualisent par la différence de toxicité observée entre les divers extraits bruts de racines testés, ainsi que par les variations d'accumulation des substances phénoliques dans les tissus. Les recherches à ce niveau sont de toute première importance et permettront d'utiliser dès le départ des géniteurs intéressants. Nos résultats mettent en évidence des différences de comportement dès le stade pré-pépinière. L'application de nos tests pour caractériser la tolérance des lignées au stade précoce permettrait une économie de temps et de place. En outre, il apparaît que, parmi les lignées résistantes issues du croisement D 115 x L 2 T pour des taux de tolérance de 60 à 80 % en symptôme macroscopique, la dissection des bulbes met en évidence des attaques de Fusariose atteignant 60 % (Recherches IRHO, 1983-1984).

L'influence de substances élicitrices des phytoalexines est connue dans de nombreux cas. Conformément aux résultats de HADWIGER et LOSCHKE (12) nous observons l'augmentation de la teneur des racines en substances de résistance après traitement aux hexosamines. L'acide arachidonique a aussi été reconnu dans plusieurs cas comme éliciteur des phytoalexines, en particulier pour la Pomme de terre infectée par Phytophthora infestans (BOSTOCK, 8, 9). Il serait intéressant d'étudier sur le Palmier à huile la cinétique de cette accumulation et de la métabolisation de l'acide arachidonique comme l'ont fait PREISIG et KUC sur la Pomme de terre (22).

L'action inhibitrice de l'acide α oxyaminoacétique (AOA) vis-à-vis de la PAL avait déjà été mise en évidence dans le cas de l'interaction "Tabac - Virus de la Mosaïque du Tabac" (18), et des Phytophthora de la Tomate (7). Dans de bonnes conditions de travail, nous aboutissons aux mêmes conclusions, à savoir une baisse de l'accumulation de substances fongitoxiques sous l'action de l'AOA. Ce résultat indique que la réaction de défense est modulable et qu'elle correspond pour une part importante au flux de synthèse de produits phénoliques.

Une connaissance approfondie des substances qui stimulent l'accumulation de composés fongitoxiques, de leur mécanisme et leurs conditions d'action, pourra avoir des conséquences importantes au niveau pratique. En effet, les phytoalexines à structure chimique identifiée pourront être synthétisées et appliquées artificiellement sur les plants. Des études de toxi-

cité en fonction des structures et des substituants ont déjà été réalisées in vitro pour de nombreux produits (23). Cependant, plusieurs conditions doivent être remplies pour injecter des phytoalexines de synthèse :

- . une pénétration convenable dans les tissus sans phytotoxicité,*
- . une bonne diffusion à partir du point de pénétration dans les vaisseaux,*
- . une stabilité chimique durable correspondant à l'insensibilité vis-à-vis des enzymes de dégradation de l'hôte ou du parasite,*
- . un prix de revient rentabilisation.*

Ces recherches sur l'amélioration de l'état sanitaire des plantations pourront avoir une forte incidence technique. Actuellement, une mortalité des plants supérieure à 10 % en dix ans cause un préjudice grave. Il appartient donc aux équipes de recherche de calculer la variation du pourcentage des plants fusariés par rapport aux plants sains, ainsi que les rendements en fonction de l'état sanitaire des cultures. L'application de ces recherches entraîneraient plusieurs modifications, en particulier au niveau des traitements des plantations. Leur rentabilité à l'échelle du village, comme à celle de l'industrie, doit être soigneusement étudiée et conduire à la prise de mesures adéquates. Ceci impliquerait certaines contraintes de rigueur et d'exactitude des techniques de traitements. Le paysannat serait-il prêt à les assumer en vue d'une augmentation de gain ? L'aboutissement du projet ne peut passer que par une éducation progressive du paysannat. Sur le plan politico-économique l'Etat est confronté au choix du maintien de la maladie à l'état endémique, et donc de l'importation pour compenser les pertes, ou alors du traitement de la maladie malgré les coûts qu'il implique, pour tendre à une meilleure autonomie du pays.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ABU-JAWDAH (Y.), KUMMERT (J)
Effect of aliette on AMV infection of Bean leaves and on the resultant alterations in the Patterns of proteins and peroxidases.
Phytopath. Z., 1983, 108, 294-303.
- 2 AHL (P.),
Lutte contre les microorganismes pathogènes des végétaux : les inducteurs de résistance.
Phytopath. Z., 1984, 198 (1), 45-64.
- 3 BAILEY (J.-A.)
Constitutive elicitors from Phaseolus vulgaris ; a possible cause of phytoalexin accumulation.
Ann. Phytopathol., 1980, 12 (4), 395-402.
- 4 BARZ (W.), WILLEKE (U.), WELTRING (K.-M.)
Microbial degradation of phytoalexins and related compounds.
Ann. Phytopathol., 1980, 12 (4), 435-452
- 5 BASCOULERGUE (P.)
Notions d'Hygiène alimentaire, Paris, ORSTOM, s.d.
Coll. Initiation Documentation et Techniques n° 1.
- 6 BEK-NIELSEN (B.)
Forecasting consumption and long term costing of palm oil.
Oléagineux, Vol. 38, n° 3, Mars 1983, 161-170.
- 7 BOMPEIX (G.), RAVISE (A.), RAYNAL (G.), et Col.
Modalité de l'obtention des nécroses blocantes sur feuilles détachées de tomate par l'action du TEPA. Hypothèses sur son mode d'action in vitro.
Ann. Phytopathol., 1980, 12 (4), 337-351.
- 8 BOSTOCK (R.M.), KUCK (J.A.), LAINE (B.A.)
*Eicosapentanoïc and arachidonic acids from *P. infestans* elicit fungitoxic sesquiterpens in the potato.*
Science, 1981, 212, 67-69
- 9 BOSTOCK (R.M.), NUCKLES, HENFLING, KUC (J.A.)
Effects of Potato tubers Age and Storage on Sesquiterpenoïd stress Metabolic accumulation, steroid glycoalcaloids accumulation, and response to Absissic and Arachidonic acids.
Phytopathol. 1983, 73 (3).
- 10 FRITIG (B.), LEGRAND (M.)
Modulation de l'élicitation. Contrôle des taux de Phytoalexines à différents niveaux : biosynthèse, détoxificatuibn suppression.
Ann. Phytopathol., 1980, 12 (4), 411-422
- 11 GENTY (P.), GARZON (M.A.), GARCIA (R.)
Dégâts et contrôles de complexe Leptopharsa-Pestalotiopsis chez le Palmier à huile.
Oléagineux, Vol. 38, n° 5, Mai 1983, 291-299.

- 12 HADWIGER, LOSCHKE
Molecular communication in host-parasite interaction : Hexosamin polymers as regulators compounds in race-specific and other interactions.
Phytopath., Vol. 71, n° 7, 1981.
- 13 HILL (D.H.), COLE (R.J.)
Fosetyl - Aluminium, an effective systemic fungicide for the control of Phytophthora diseases of cocoa (Theobroma cacao).
Colloque International sur la protection des cultures tropicales, 8-10 juillet 1981, Lyon.
- 14 JOSEPH (A.), LEFRANCOIS (P.)
Notes sur quelques habitudes alimentaires dans la plaine des Mbos.
In : Prospection entomologique sur les vecteurs de maladies tropicales et quelques aspects nutritionnels dans la plaine des Mbos - Cameroun.
Yaoundé, ORSTOM, 1974, Multigraphié.
- 15 KUNOH (H.), ISHIZAKI (H.)
Accumulation of chemical elements around the penetration sites of Erysiphe graminis hordei on barley leaf epiderms : (III) micromanipulation and X-ray analysis of Silicon.
Physiological Plant Pathology, 1976, 8, 91-96.
- 16 La Côte d'Ivoire
Paris, Edition J.A., 1978
(Coll. Atlas Afrique).
- 17 Marchés Tropicaux et Méditerranéens
Numéro Spécial : Marchés Tropicaux et Méditerranéens 1981.
N° 1893, Paris, 19 février 1982.
- 18 MASSALA (R.)
Utilisation d'inhibiteurs compétitifs de la phénylammoniacyclase (PAL) en pathologie végétale. Application à l'étude du rôle des phénylpropanoïdes dans la résistance hypersensible aux virus.
Thèse, Université Strasbourg I, 131 p., 1981.
- 19 MEUNIER (J.), RENARD (J.L.), GUILLEC (G.)
Hérédité de la résistance à la Fusariose chez le Palmier à huile Elaeis guineensis Jacq.
Oléagineux, Vol. 34, n° 12, Déc. 1979, 555-559.
- 20 MIRALLES (J.)
Recherches de nouvelles ressources en Huiles végétales.
Oléagineux, Vol. 38, n° 12, Déc. 1983.
- 21 PHILIPPE (R.), BERCHOUX (C. De), MARIAN (D.)
Les techniques de traitement : dans les plantations de Palmier à huile en Côte d'Ivoire : Méthodes et appareillage.
Oléagineux, Vol. 38, n° 6, Juin 1983, 349-363.
- 22 PREISIG (C.L.), KUC (J.A.)
Metabolism in potato of arachidonic acid : a fungal elicitor of phytoalexin accumulation and hypersensitivity.
Plant. Physiol., 1983, 72, (1).

- 23 RAVISE (A.), KIRKIACHRIAN (B.S.), CHOPIN (J.), KUNESCH (G.)
Composés phénoliques et analogues structuraux de phytoalexines. Influence des structures et des substituants sur l'inhibition in vitro de micromycètes et d'enzymes lytiques.
Ann. Phytopathol., 1980, 12 (4), 335-336.
- 24 RENARD (J.L.), GASCON (J.P.), BACHY (A.)
Recherche sur la Fusariose au Palmier à huile.
Oléagineux, 27e année, n° 12, Déc. 1972, 581-591.
- 25 SMITH (I.M.)
Phytoalexines : Revue.
Ann. Phytopathol., 1980, 12 (4), 321- 328.
- 26 TOUZE (A.), ROSSIGNOL (M.)
La protection biologique des plantes contre des infections bactériennes et fongiques.
Ann. Phytopathol., 1980, 12 (4), 457-465.
- 27 ZENTMYER (G.A.)
Control of Phytophthora root rot of avocado.
Colloque International sur la protection des cultures tropicales, 8-10 juillet 1981, Lyon.

*

* *