



**HAL**  
open science

## Toxicité vis-à-vis du tabac des fractions purifiées d'un filtrat de culture de *Phytophthora cryptogea* Pethyb. & Laff

Philippe Bonnet, Alain Poupet, Maud Bruneteau, G. Rouse

### ► To cite this version:

Philippe Bonnet, Alain Poupet, Maud Bruneteau, G. Rouse. Toxicité vis-à-vis du tabac des fractions purifiées d'un filtrat de culture de *Phytophthora cryptogea* Pethyb. & Laff. *Agronomie, EDP Sciences*, 1985, 5 (3), pp.275-282. hal-00884759

**HAL Id: hal-00884759**

**<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00884759>**

Submitted on 1 Jan 1985

**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.

# Toxicité vis-à-vis du tabac des fractions purifiées d'un filtrat de culture de *Phytophthora cryptogea* Pethyb. & Laff.

Philippe BONNET, Alain POUPET & Maud BRUNETEAU (\*)

avec la collaboration de G. ROUSSE

I.N.R.A., Station de Pathologie végétale, bd du Cap, F 06602 Antibes

(\*) Université Claude Bernard Lyon I, Laboratoire de Biochimie microbienne, F 69622 Villeurbanne Cedex

## RÉSUMÉ

Une souche de *Phytophthora cryptogea*, isolée de gerbera, est cultivée sur milieu liquide de PLICH (1979) durant 21 j, à 24 °C, sans agitation. Sur le filtrat de culture, fortement toxique à l'égard de feuilles de tabac, un schéma de purification a été mis au point afin d'isoler et de caractériser la substance toxique. Après dialyse et précipitation au sulfate d'ammonium (50 p. 100 P/v), le culot est chromatographié sur D.E.A.E. cellulose (fig. 1) ; la fraction non liée (DI), toxique, est alors chromatographiée sur C.M. cellulose, où elle se sépare en 2 pics dont seul le pic lié (CII) est toxique (fig. 2). La fraction (CII) est ensuite purifiée sur Sephadex G50 (fig. 4A) : le pic GI, renfermant surtout glucose et mannose, n'est pas toxique, le pic GII, toxique, est de nature peptidique (tabl. 2). Toutes les fractions obtenues lors des diverses étapes de purification ont été testées quant à leur toxicité vis-à-vis de feuilles détachées de tabac (tabl. 1) et le schéma de purification, appliqué 3 fois à 2 filtrats de culture, a donné des résultats identiques. Enfin, filtrat brut et fraction purifiée (CII) se montrent également sensibles à la température et à l'action de la pronase (tabl. 3 et 4).

**Mot clé additionnel :** *Chromatographie.*

## SUMMARY

*Toxicity to tobacco of different fractions from a culture filtrate of Phytophthora cryptogea.*

A strain of *Phytophthora cryptogea* was grown on PLICH liquid medium (stationary culture for 21 days at 24 °C). Crude culture filtrate was highly toxic to tobacco leaves and consequently a purification procedure was devised to isolate the toxic substance. The toxicity was assayed at each step of purification using the tobacco leaf test (table 1). After dialysis and precipitation with ammonium sulfate (50 % W/v), the toxic pellet was chromatographed on D.E.A.E. cellulose with 10 mM tris-acetate buffer (pH 8) and the same buffer containing 0.25 and 1 M NaCl (fig. 1). The non-bound fraction (DI) proved toxic and was further fractionated on CM-cellulose with 10 mM sodium acetate-acetic acid (pH 5) alone and with 0.5 M NaCl. The (DI) fraction was resolved into a non-bound peak (CI), devoid of toxicity and a second peak (CII) eluted with 0.5 M NaCl and toxic to tobacco leaves (fig. 2). The CII fraction was then further purified by exclusion chromatography on Sephadex G50 eluted with water (fig. 4A). The excluded peak (GI) was not toxic but a second one (GII) proved toxic and behaviour on Sephadex G25 is shown on fig. 4B. The crude culture filtrate and the (CII) fraction lost their toxicity on tobacco when heated (30 min at 120 °C) at pH 8 or 10 (the toxicity being preserved if heated at pH 4 and 6) or digested by Pronase (Tables 3 and 4). Chemical analysis (Table 2) indicated that fraction (GI) contained mainly mannose and glucose and that (GII) appeared to be probably a peptide. The purification procedure applied three times on two different culture filtrates of the same strain gave identical results.

**Additional key word :** *Chromatography.*

## I. INTRODUCTION

Des travaux antérieurs (CSINOS & HENDRIX, 1977 à 1979) ont montré que les broyats mycéliens de certaines espèces de *Phytophthora* (*P. cryptogea* Pethyb. & Laff, *P. drechsleri* Tucker, *P. erythrosetpica* Pethyb.

et *P. megasperma* Drechsl.) sont toxiques à l'égard de divers cultivars de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) provoquant, sur plants, un nanisme accompagné de nécroses foliaires et un flétrissement rapide sur feuilles détachées. Peu de données cependant sont fournies quant aux caractéristiques de la substance toxique hormis que

la toxicité est thermostable à pH acide mais non à pH alcalin. Quant aux 11 souches de *P. cryptogea* utilisées par CSINOS & HENDRIX (1978), elles proviennent soit du sol (seule souche non toxique), soit de diverses plantes (tomate, aster, carthame, pomme de terre...) mais aucune ne provient de gerbera.

On peut constater par ailleurs que ce sont surtout les filtrats de culture de *Phytophthora* qui ont été utilisés pour la mise en évidence de substances phytotoxiques et pour la purification ou la caractérisation de ces substances (WOLF, 1953 ; WOLF & WOLF, 1954 ; RONNEBECK, 1956 ; GRANITI, 1969 ; BALLIO *et al.*, 1972 ; PAXTON, 1972 ; LEE, 1973 ; BEHNKE, 1977 ; PLICH & RUDNICKI, 1979 ; WOODWARD *et al.*, 1980 ; KANAIYAN & SUBBA, 1981 ; BREIMAN & BARASH, 1981). Nous avons donc d'abord vérifié au cours d'essais préliminaires que nous obtenions, avec 3 isolats de *P. cryptogea* provenant de gerbera, des résultats comparables à ceux de CSINOS (1977b, c, 1978) : nécroses foliaires par inoculation du champignon soit par le sol, soit sur plant de tabac, toxicité du filtrat de culture sur feuilles détachées de tabac et thermostabilité de l'effet toxique à pH acide, mais non à pH alcalin. L'un de ces isolats a été ensuite choisi, mis en culture, et des essais de purification de la substance toxique à l'égard du tabac ont été entrepris sur le filtrat de culture.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. Champignon, technique de culture, filtrat de culture

Un isolat de *P. cryptogea* (n° 52), issu de gerbera en 1972 dans les Alpes-Maritimes (France) et fortement pathogène sur cette plante (ATHANASSIOU *et al.*, 1981), est cultivé sur un milieu liquide contenant par litre : 0,5 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,25 g de  $\text{SO}_4\text{Mg}7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g d'aspargine, 1 mg de thiamine, 5 g d'extrait de levure et 25 g de glucose, le pH étant ajusté à 6 (PLICH & RUDNICKI, 1979, milieu 5).

Distribué à raison de 100 ml en fioles de Roux, le milieu est autoclavé (115 °C, 30 mn) et chaque fiole estensemencée par 4 pastilles de mycélium prélevées en bordure d'une culture du champignon sur milieu Malt-gélose. Après 21 j de culture stationnaire (24 °C, 16 h lumière), le milieu de culture est séparé du mycélium par filtration sur Büchner (pH final de 5,8 pour le filtrat n° 5), passé sur filtre Millipore (0,22 µm), concentré 10 fois ( $C \times 10$ ) par évaporation sous vide à 40 °C et le filtrat de culture est conservé au congélateur. Les diverses étapes de purification ont été réalisées une fois sur 20 ml d'un 1<sup>er</sup> filtrat de culture (FC n° 3), puis 2 autres fois sur un 2<sup>e</sup> filtrat de culture (FC n° 5), d'abord sur 20 ml (FC 5A), puis sur 150 ml (FC 5P).

### B. Dialyses et précipitation au sulfate d'ammonium

Un volume donné du filtrat concentré ( $C \times 10$ ) est dialysé (tube à dialyse VISKING « cellulose casing » retenant P.M. > 6 à 8 000) contre 10 fois son volume d'eau distillée à 4 °C, l'eau étant renouvelée après 2 et 5 h, la dernière dialyse durant 16 h environ. Volume interne ( $\Delta I$ ) et dialysat externe ( $\Delta E$ ) sont concentrés

par évaporation sous vide jusqu'à un volume correspondant au volume initial.

La précipitation au sulfate d'ammonium s'effectue par addition de 50 p. 100 (poids/volume) de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  pendant une nuit à 4 °C, suivie d'une centrifugation de 20 mn à 15 000 g. Le surnageant (S50), après dialyse contre de l'eau, est réduit au volume initial ( $C \times 10$ ) ; le culot (C50), dissous dans un faible volume d'eau, est également dialysé, ajusté avec de l'eau à la moitié du volume initial ( $C \times 20$ ), puis à la concentration de départ ( $C \times 10$ ) par addition d'un volume égal de tampon Tris 20 mM pH 8.

### C. Chromatographies par échange d'ions et chromatographie en perméation sur gel

Les chromatographies sur échangeurs d'ions sont réalisées soit sur colonne de D.E.A.E. cellulose (Cellex D Biorad, l = 160 mm,  $\varnothing = 25$  mm), soit sur colonne de carboxy-méthyl-cellulose (Cellex Biorad, l = 120 mm,  $\varnothing = 22$  mm). Pour la chromatographie sur échangeur d'anions, les composés non liés sont élués par le tampon Tris 10 mM pH 8 (WOODWARD *et al.*, 1980) et les composés adsorbés par un gradient discontinu 0,25-1 et 2 M de NaCl dans ce même tampon. Pour la chromatographie sur échangeur de cations, l'éluant est le tampon acétate de Na 10 mM pH 5 (WOODWARD *et al.*, 1980) ; les composés adsorbés sont élués par un gradient de 0,5 et 1 M de NaCl dans ce même tampon. L'absorption est lue à 280 nm et on récupère séparément les éluations correspondant à chaque tampon. Les chromatographies en perméation sur gel sont effectuées sur colonnes Sephadex (Pharmacia, Fine Chemicals) G50 (l = 105 mm,  $\varnothing = 1,5$  mm), G25 (l = 105 mm,  $\varnothing = 1,3$  mm) et G10 (l = 105 mm,  $\varnothing = 1,8$  mm). L'éluant est l'eau distillée.

### D. Tests biologiques

A chaque étape de purification, chacune des fractions obtenues est dialysée contre de l'eau puis ajustée au volume initial ( $C \times 10$ ) ; 2 ml sont alors ajoutés à 18 ml d'eau ( $C \times 1$ ), filtrés sur Millipore (0,22 µm) et conservés en tubes stériles à 4 °C. Pour le test biologique on dépose dans un borel 1 ml de chaque extrait dilué dans 9 ml d'eau ( $C \times \frac{1}{10}$ ) et une feuille de tabac (var. « Samsun » ou « Xanthi »), fraîchement coupée, est pesée (Po) puis mise à tremper par son pétiole dans les 10 ml d'extrait. Après 24 et 42 h ( $\pm 3$  h) d'incubation à l'étuve (24 °C, obscurité), on note les symptômes de flétrissement et la feuille, essuyée, est de nouveau pesée (P24 et P42) ; la variation de poids (P) est exprimée par le rapport  $\frac{\text{Po} - \text{P24}}{\text{Po}} \times 100$  et l'échelle de toxicité est établie comme suit :

$\Delta P$	+ 15 à 0	- 0,1 à - 5	- 5,1 à - 10	- 10,1 à - 30	- 30,1 à - 65
Toxicité	0	$\epsilon$	+	++	+++

### E. Essais de thermostabilité et de sensibilité à la pronase

Des fractions de 20 ml du filtrat de culture dilué au 1/10 sont ajustées à pH 4, 6, 8 ou 10 (avec HCl ou NaOH) ; chacune est alors divisée en 2 parties aliquotes dont l'une est autoclavée (120 °C, 30 mn), ou soumise 30 mn à ébullition au bain-marie ; la toxicité des filtrats de culture ainsi traités est appréciée par le test biologique « feuille de tabac » (§ IID).

La sensibilité à la pronase est testée en ajoutant au filtrat de culture ( $C \times 10$ ) de l'enzyme (pronase E, 70 000 PUK/g - MERCK) dissoute en tampon phosphate de Na (pH 7,3) : le mélange final (filtrat de culture à concentration 1, pronase 1 mg/ml) est stérilisé par filtration à 0,22  $\mu$ m, incubé 16 h à 37 °C, puis dilué au 1/10 et au 1/50 pour effectuer le test biologique ; un extrait témoin tampon-pronase permet de vérifier l'absence de toxicité de l'enzyme sur feuille de tabac.

Tous ces tests, effectués sur le filtrat de culture brut, ont été repris sur la fraction purifiée CII (§ IIIA).

### F. Méthodes analytiques

L'analyse des hexoses totaux est effectuée selon la méthode à l'anthrone sulfurique de DREYWOOD modifiée par SHIELDS & BURNETT (1960), celle du phosphore selon LOWRY *et al.* (1954) et celle des protéines selon LOWRY *et al.* (1951). L'analyse des oses neutres est effectuée par chromatographie gazeuse des acétates d'alditols (SAWARDEKER *et al.*, 1965) : les fractions GI et GII sont hydrolysées par HCl 0,1 N à 100 °C pendant 48 h. Les hydrolysats sont neutralisés par l'Amberlite IRA-410 traitée par une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>. Les oses neutres présents dans les hydrolysats sont réduits par le borohydrure de sodium, acétylés par l'anhydride acétique en présence de pyridine puis chromatographiés en phase gazeuse sur colonne d'ECNSS-M en présence d'acétates d'alditols témoins.

Les acides aminés hydrosolubles sont libérés après hydrolyse de la fraction GII avec HCl 6 N à 110 °C pendant 16 h. Leur analyse est effectuée par chromatographie sur échangeur d'ions selon la méthode de PIEZ & MORRIS (1960).

## III. RÉSULTATS OBTENUS

### A. Schéma de purification et isolement de la fraction toxique GII

Après dialyse d'un volume déterminé du filtrat de culture concentré 10 fois ( $C \times 10$ ) contre de l'eau distillée, l'intérieur du boudin de dialyse ( $\Delta$ I) est ramené au volume initial par évaporation sous vide. L'addition de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> permet, après centrifugation, la séparation d'un surnageant (S50) et d'un culot (C50).

Ce culot, dissous, dialysé et ramené à la concentration ( $C \times 10$ ) en tampon Tris 10 mM, est alors déposé sur colonne de D.E.A.E. cellulose ; l'élution par les divers tampons permet de séparer un pic non retenu (DI) et 2 pics (DII et DIII) fixés sur la colonne

(fig. 1) ; aucun pic n'apparaît lors d'une élution ultérieure par tampon Tris + 2 M NaCl (non représenté sur fig. 1). La fraction non retenue sur la colonne, éluee par le tampon Tris 10 mM et renfermant le pic DI, est d'abord dialysée contre de l'eau, ramenée à la concentration initiale ( $C \times 10$ ) par évaporation sous vide puis dialysée pendant 24 h contre du tampon acétate de Na 10 mM pH 5. Cet échantillon, déposé sur colonne C.M. cellulose et élué par divers tampons, montre un pic non retenu (CI) et un 2<sup>e</sup> pic (CII) élué par le tampon acétate de Na + 0,5 M NaCl (fig. 2) ;

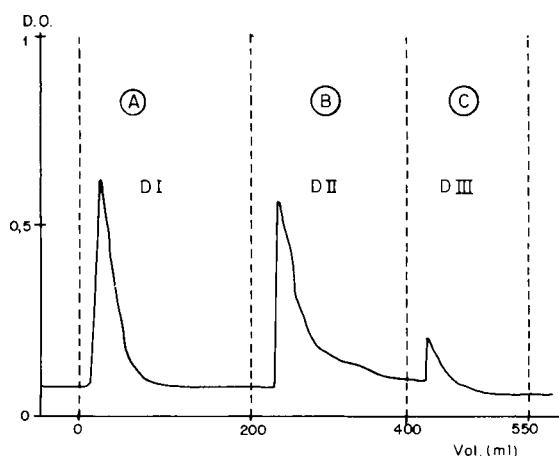


Figure 1

Fractionnement sur colonne D.E.A.E. cellulose de 14 ml d'un culot sulfate d'ammonium ( $C_{50}$  à  $C \times 10$ ) ; éluptions par tampon Tris 10 mM pH 8 (A), tampon Tris + 0,25 M NaCl (B) et tampon Tris + 1 M NaCl (C). Pics d'absorption (DI, DII, DIII) à 280 nm (Isco UA6, sensibilité : 0,2).

Separation of different fractions from an ammonium-sulfate pellet by D.E.A.E. Cellulose column ; elutions with Tris 10 mM pH 8 buffer (A) and same buffer with 0.25 M NaCl (B) and 1 M NaCl (C). Absorbance of different peaks (DI, DII, DIII) read at 280 nm (Isco UA6, Sensitivity : 0.2).

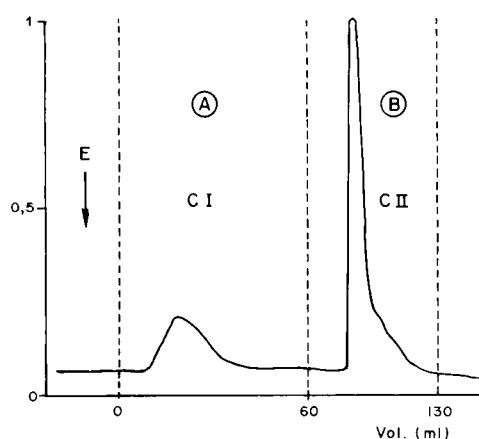


Figure 2

Fractionnement sur colonne C.M.C. de 12 ml d'une fraction non retenue sur D.E.A.E. cellulose et renfermant le pic DI à  $C \times 10$  ; éluptions par tampon acétate de Na 10 mM pH 5 (A) et tampon acétate de Na + 0,5 M NaCl (B). Pics d'absorption à 280 nm (Isco UA6, sensibilité : 0,1).

Separation of non-bound-fraction from D.E.A.E. cellulose (with peak DI) with carboxy-methyl-cellulose column and elution with sodium acetate 10 mM pH 5 buffer alone (A) and with 0.5 M NaCl (B). Absorbance : 280 nm (Isco UA6, Sensitivity : 0.1).

aucun pic n'apparaît lors de l'élution ultérieure avec le tampon acétate de Na + 1 M NaCl.

Enfin, la fraction retenue sur C.M. cellulose (renfermant le pic CII), après dialyse contre de l'eau distillée et réajustement à la concentration ( $C \times 10$ ), montre un maximum d'absorption à 274 nm (fig. 3) ; passée, en chromatographie d'exclusion (Sephadex G50), cette même fraction montre un 1<sup>er</sup> pic sortant au volume d'exclusion de la colonne (GI) et un 2<sup>e</sup> pic plus important (GII) retardé sur la colonne (fig. 4). Le composé principal (GII) est ensuite dessalé par passages successifs sur colonnes de Sephadex G25 puis G10.

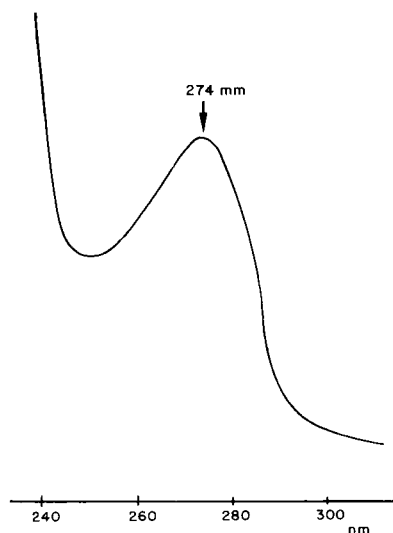


Figure 3  
Spectre d'absorption de la fraction renfermant le pic CII ( $C \times 10$ ).  
Absorption spectrum of the CII fraction from C.M.C. column.

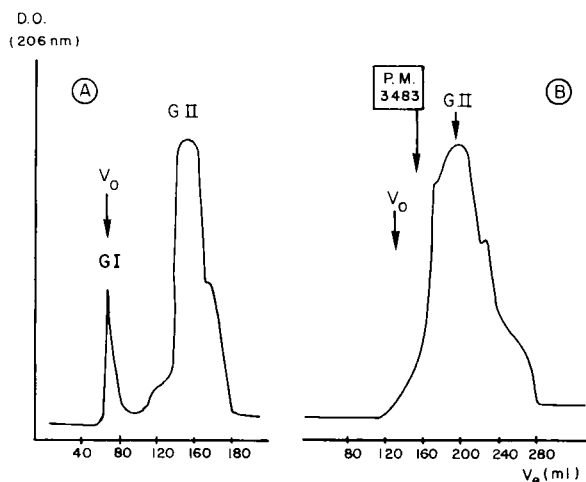


Figure 4  
Profils d'élution (206 nm) des chromatographies en perméation sur gel de la fraction CII sur colonne Sephadex G50 (A) et de la fraction GII sur colonne Sephadex G25 (B).  
Elution patterns (206 nm) by exclusion chromatography : CII fraction with Sephadex G50 column (A) and GII fraction with Sephadex G25 column (B).

## B. Tests biologiques de toxicité sur feuilles détachées de tabac

On observe (tabl. 1) que la toxicité du filtrat de culture brut (FC) est non dialysable (fraction  $\Delta I$ ), précipitée par 50 p. 100 de sulfate d'ammonium (culot C50), non retenue sur la colonne de D.E.A.E. cellulose (pic DI) mais retenue sur celle de C.M. cellulose (CII) et sur la colonne G50 (fraction GII). Les notations après 24 h de trempage sont complétées par celles de 42 h ( $\pm 3$  h) dans tous les cas où il apparaît une variation entre les

TABLEAU 1

Toxicité obtenue sur feuilles détachées de tabac (« Xanthi » ou « Samsun ») après 24 h de trempage dans les diverses fractions de purification des filtrats de culture FC n° 3 et FC n° 5 (A et P) ; dilutions au 1/10 y compris pour le filtrat de culture brut (FC) et le milieu de culture témoin non ensemencé (MC).

Detached tobacco leaves (var. 'Xanthi' or 'Samsun') put in different purified fractions (dilution : 1/10) of culture filtrates (FC n° 3, 5A, 5P) and toxicity after 24 h.

Purification	Etapas	Dialyse		SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		D.E.A.E.			C.M.C.		G50		Témoins		
		Fractions	$\Delta E$	$\Delta I$	S50	C50	DI	DII	DIII	CI	CII	GI	GII	FC	MC
FC n° 3	Xanthi	0	++	0 (++)	+++	$\epsilon$ (+++)	0	0	0	++	(NT)	(NT)	++	0	0
	Samsun	0	++	0 (++)	++	+++	$\epsilon$ (++)	0	0	+++	0	+++	++	0	0
FC n° 5 (A)	Xanthi	0	$\epsilon$ (+++)	0	+	$\epsilon$ (+++)	0	0	0	++	(NT)	(NT)	++		
	Samsun	0	+++	$\epsilon$ (++)	+++	++	0	0	0	+++	0	+++	++		
FC n° 5 (P)	Xanthi	0	+++	0 (++)	+++	+++	0 (++)	0	0	+++	(NT)	(NT)	+++	0	0
	Samsun										0	+++			

(++) = Toxicité après 42 h ( $\pm 3$  h). (NT) = non testé.

2 notations. Cela permet de constater que des toxicités parfois faibles après 24 h (cas pour  $\Delta I$  ou  $DI$ ) sont indiscutablement très fortes après 42 h, mais aussi qu'une certaine toxicité apparaît tardivement, dans le cas par exemple des surnageants (S50) ; cela tend à prouver que l'essentiel de l'activité est présente dans le culot (C50), mais qu'une toxicité résiduelle reste dans le surnageant (S50).

### C. Analyses des fractions GI et GII

Les différentes analyses effectuées lors d'une chromatographie de la fraction CII sur Sephadex G50 montrent (tabl. 2) que la fraction GI, dépourvue de protéines, ne contient que des oses, tandis que la fraction GII ne contient que des composés aminés. L'analyse des oses neutres présents dans la fraction GI, effectuée par chromatographie gazeuse des acétates d'alditols, indique la présence du glucose et du mannose.

La fraction GII ne contient pas d'oses neutres — acides ou aminés — pas de glycérol, pas d'inositol, pas de phosphore ; par hydrolyse chlorhydrique, elle est scindée en une fraction hydrosoluble renfermant les acides

aminés suivants : lysine, thréonine, sérine, proline, alanine, valine et leucine et une fraction liposoluble extraite par le chloroforme.

### D. Sensibilité du filtrat de culture à la température et à la pronase

On constate (tabl. 3) que la toxicité du filtrat de culture, identique aux 4 valeurs de pH éprouvées, demeure, après autoclavage, aux pH acides (4 et 6), mais disparaît pour les pH alcalins (8 et 10) ; ces résultats de thermostabilité sont similaires à ceux obtenus par CSINOS & HENDRIX (1977c) et par PLICH & RUDNICKI (1979). On peut noter par contre que 30 mn d'ébullition n'entraînent qu'une faible diminution de l'action toxique, résultat peut-être à rapprocher de celui de GRANITI (1969). Enfin, les résultats obtenus avec la fraction purifiée (CII) sont identiques à ceux obtenus avec le filtrat de culture.

Le tableau 4 montre, par ailleurs, que le filtrat de culture et, de manière encore plus nette, la fraction (CII) sont sensibles à l'action de la pronase puisque les mélanges incubés en présence de tampon et de pronase (T + P) voient leur activité toxique fortement diminuée, voire totalement supprimée.

TABLEAU 2

Résultats des analyses effectuées sur les fractions GI et GII.  
Analysis of GI and GII fractions.

	Phosphore (700 nm)	Oses totaux (620 nm)	Protéines (750 nm)	NH <sub>2</sub> libres (420 nm)
GI	traces	+	-	-
GI	-	-	+	+

## IV. DISCUSSION

Si l'on compare nos résultats avec ceux de divers auteurs ayant isolé et quelquefois purifié des substances toxiques à partir de filtrats de culture de *Phytophthora* on peut faire certaines remarques :

1) Bien qu'utilisant un milieu de culture différent de celui de CSINOS & HENDRIX (1977a, b) et une souche

TABLEAU 3

Influence du pH, avec ou sans traitement thermique, sur la toxicité du filtrat de culture et de la fraction purifiée CII (feuilles détachées de tabac, dilution au 1/10, trempage durant 24 et 42 h).

Effect of pH and temperature on toxicity of culture filtrate or purified fraction CII (detached tobacco leaves, dilution 1/10).

	Température pH	Aucun traitement				Autoclave 120 °C				100 °C	
		4	6	8	10	4	6	8	10	6	8
Filtrat	24 h	++	+++	+++	+++	+++	+	0	0	++	++
	42 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	+++	+++
Fraction CII	24 h	++	++	++	+++	++	ε	0	0	++	+
	42 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	0	+++	+++

TABLEAU 4

Toxicité (feuille de tabac) du filtrat de culture et de la fraction purifiée CII après incubation avec le mélange tampon + pronase (T + P).  
Toxicity of culture filtrate and purified fraction CII after incubation with buffer and pronase (T + P).

	Filtrat culture (FC)						Fraction CII					
	FC + H <sub>2</sub> O		FC + (T + P)		H <sub>2</sub> O + (T + P)		CII + H <sub>2</sub> O		CII + (T + P)		H <sub>2</sub> O + (T + P)	
	1/10	1/50	1/10	1/50	1/10	1/50	1/10	1/50	1/10	1/50	1/10	1/50
Toxicité 24 h	++	++	+	0	0	0	++	ε	0	0	0	0
Après 42 h	+++	+++	++	0	0	0	+++	++	0	0	0	0

de *P. cryptogea* isolée de gerbéra, nous avons confirmé l'essentiel de leurs conclusions : le filtrat de culture est fortement toxique vis-à-vis de feuilles détachées de tabac (var. « *Xanthi* » ou « *Samsun* ») et la toxicité est thermostable à pH acide, thermolabile à pH alcalin.

2) A partir d'un filtrat de culture de *P. citrophthora* (Sm. & Sm.) Leon. et après précipitation par l'acétone, BREIMAN & BARASH (1981) séparent 2 composés phytotoxiques à l'égard de la tomate et du citrus ; l'un est une macromolécule non dialysable de P.M. supérieur à 30 000 (sans doute voisine de la substance toxique de PLICH & RUDNICKI), l'autre est une petite molécule dialysable de P.M. inférieur à 1 800, comprenant 75 p. 100 de sucres et 25 p. 100 de peptides, thermostable.

Ce dernier, en dehors de sa thermostabilité, semble donc différent de la substance toxique caractérisée ici de nature essentiellement peptidique.

3) Après purification d'un filtrat de culture de *P. cactorum* (Leb. & Cohn) Schroet., PLICH & RUDNICKI (1979) obtiennent une fraction hydrophile, non dialysable, thermostable à pH acide, retardée sur colonne G75 et présentant un pic d'absorption à 280 nm ; testée sur bouture de tomate et sur jeune pousse de pommier, cette substance est phytotoxique. Or, lorsqu'on cultive *P. cryptogea* sur le milieu n° 5 de PLICH & RUDNICKI (1979), on obtient un filtrat toxique vis-à-vis du tabac, mais aussi à l'égard de bouture de tomate (pour CSINOS & HENDRIX (1977c), les extraits mycéliens de *P. cryptogea* sont inactifs sur tomate). Il paraîtrait donc intéressant de préciser si les 2 espèces de *Phytophthora* sont susceptibles de produire, à l'égard du tabac, des substances toxiques différentes ou identiques mais à concentration variable suivant l'espèce.

4) Enfin, WOODWARD *et al.* (1980) cultivent 3 espèces de *Phytophthora* (*P. cinnamomi* Rands., *P. cryptogea* et *P. nicotianae* Van Breda de H.) sur un milieu très voisin de celui de PLICH (glucose-asparagine, mais dépourvu d'extrait de levure) et testent la phytotoxicité des fractions obtenues après purification du filtrat de culture vis-à-vis de jeunes semis d'eucalyptus. Avec *P. cinnamomi*, après dialyse du filtrat, précipitation à l'éthanol, chromatographie sur D.E.A.E. cellulose (du précipité obtenu) et chromatographie sur C.M. cellulose (de la fraction non liée sur D.E.A.E.), WOODWARD *et al.* constatent que c'est la fraction **non liée** sur C.M. cellulose, de nature **polysaccharidique**, qui se montre toxique vis-à-vis de l'eucalyptus ; des composés phytotoxiques de même nature sont également isolés par ces auteurs à partir des filtrats de culture de *P. cryptogea* et *P. nicotianae*. Or, nous avons montré avec *P. cryptogea*, qu'après une précipitation au sulfate d'ammonium, nous obtenons une fraction **liée** sur C.M. cellulose, de nature essentiellement **peptidique** et toxique sur tabac. On peut faire dès lors 2 hypothèses : ou bien la production d'une substance de nature peptidique, présente seulement chez *P. cryptogea*, différencie cette espèce de *P. cinnamomi* ou bien les 2 espèces sont susceptibles de produire à la fois substance polysaccharidique toxique vis-à-vis de l'eucalyptus et substance peptidique toxique sur tabac, la « cible » plante-hôte faisant alors la différence entre ces 2 types de molécules toxiques.

D'un point de vue plus général, on peut faire 2 types de remarques concernant ces substances phytotoxiques mises en évidence dans le cas des *Phytophthora*. La 1<sup>re</sup> concerne la valeur que l'on peut attribuer à la **nature** de ces substances diverses mises en évidence et plus ou moins purifiées à partir de cultures du champignon *in vitro*. Il faut noter, en effet, une grande variabilité dans les techniques de culture utilisées par les divers auteurs : milieux de culture différents, durée et conditions d'incubation variables (température, lumière, culture stationnaire ou agitée) et trop souvent précisées de manière incomplète. Or, il est évident que ces facteurs ont une influence sur la qualité et la quantité des produits du métabolisme : c'est le cas par exemple de la production des  $\beta$ -glucanes produits *in vitro* par *P. cinnamomi* qui est fonction de la durée d'incubation, du taux de calcium apporté au milieu et des variations de pH en cours de culture (FREAN, 1982). Par ailleurs, les plantes ou parties de plantes utilisées pour tester ces substances phytotoxiques sont généralement très diverses : la bouture de tomate est souvent retenue (GRANITI, 1969 ; KEEN *et al.*, 1975 ; PLICH & RUDNICKI, 1979 ; BREIMAN & BARASH, 1981 ; KANNAIYAN & SUBBA, 1981), mais les autres plantes utilisées sont très variables (*Persea*, cacao, soja, *Eucalyptus*, pommier, *Citrus*, *Cajanus*, *Nicotiana tabacum*) et ceci ne facilite pas la comparaison des résultats. En ce qui concerne les réactions de phytotoxicité obtenues avec *P. cryptogea* vis-à-vis du tabac, un point paraît intéressant : c'est qu'il semble, jusqu'à présent, exister un bon parallélisme entre la toxicité du filtrat de culture (et de sa fraction purifiée) sur feuille détachée ou sur plant entier et les réactions de nécroses foliaires à distance obtenues par l'inoculation du champignon **vivant** au tabac.

La 2<sup>e</sup> remarque concerne la **fonction** exacte de ces diverses substances phytotoxiques produites *in vitro* dans les relations hôte-parasite. Dans certains cas en effet, ces substances semblent pouvoir être considérées comme l'un des éléments du pouvoir pathogène (« pathotoxine ») lié au champignon parasite dans la combinaison hôte-parasite compatible (GRANITI, 1969 ; PLICH & RUDNICKI, 1979 ; BREIMAN & BARASH, 1981). Dans d'autres cas, au contraire, la relation immédiate entre substances phytotoxiques et pouvoir pathogène paraît plus aléatoire : présence, à la fois chez l'espèce parasite (*P. cinnamomi*) et chez l'espèce non parasite (*P. nicotianae*), d'un composé identique ( $\beta$ -glucane) toxique vis-à-vis de l'eucalyptus (WOODWARD *et al.*, 1981), ou bien mise en évidence chez une espèce parasite déterminée d'une substance phytotoxique également active sur le matériel végétal sensible et résistant à l'espèce parasite (WOODWARD *et al.*, 1981 ; KANNAIYAN & SUBBA, 1981). On peut dès lors se demander si — dans le cas notamment des combinaisons hôte-parasite incompatibles — le parasite n'est pas susceptible de produire diverses substances induisant chez une plante un ensemble de réactions dont les symptômes de « toxicité » ne seraient qu'un aspect particulier et qui viseraient à exclure ou limiter l'invasion de l'agresseur.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Athanassiou Ioanna, Bonnet P., Ricci P.**, 1981. Expression du pouvoir pathogène chez le couple *Phytophthora cryptogea*-Gerbera. *Agronomie*, **1** (6), 495-502.
- Ballio A., Gianini Luciana, Borelli R., Bottalico A., Graniti A.**, 1972. Production of phytotoxins by *Phytophthora nicotianae* B. de Haan var. *parasitica* (Dast.) Waterhouse, 431-432. In R. K. S. Wood *et al.* « *Phytotoxins in Plant Diseases* ». Acad. Press, New York, 530 p.
- Behnke M.**, 1977. Isolation and partial characterization of phytotoxic substances from culture filtrates of the fungus *Phytophthora infestans*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **85** (1), 17-27.
- Breiman Adina, Barash I.**, 1981. Partial characterization of phytotoxic compounds in culture filtrates of *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathol. Z.*, **102**, 1-9.
- Csinos A. S.**, 1979. Stem and foliar response of tobacco inoculated with *Phytophthora* spp. and *Pythium myriotylum*. *Tob. Int.*, **181** (10), 97-99.
- Csinos A., Hendrix J. W.**, 1977a. Nonparasitic stunting of tobacco plants by *Phytophthora cryptogea*. *Can. J. Bot.*, **55**, 26-29.
- Csinos A., Hendrix J. W.**, 1977b. Laminar necrosis, growth inhibition, and death of tobacco plants caused by toxic extracts of *Phytophthora cryptogea*. *Phytopathology*, **67** (4), 434-438.
- Csinos A., Hendrix J. W.**, 1977c. Toxin produced by *Phytophthora cryptogea* active on excised tobacco leaves. *Can. J. Bot.*, **55** (9), 1156-1162.
- Csinos A., Hendrix J. W.**, 1978. *Phytophthora* species producing toxin active on tobacco. *Soil Biol. Biochem.*, **10** (1), 47-51.
- Frean R. T.**, 1982. The production of water-soluble beta-glucans by isolates of *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Phytophthora News*, **10**, 16-17.
- Graniti A.**, 1969. Host-parasite relations in *Citrus* diseases as exemplified by *Phytophthora* gummosis and *Deuterophoma* 'mal secco'. *Proc. 1st Internat. Citrus Symp.*, **3**, 1187-1200.
- Kannaiyan T. N., Raju, Subba Rao B. L.**, 1981. Toxin production by pigeonpea blight fungus (*Phytophthora drechsleri* f. sp. *cajani*) *in vitro*. *Phytophthora News*, **9**, 24.
- Keen N. T., Wang M. C., Bartnicki-Garcia S., Zentmyer G. A.**, 1975. Phytotoxicity of mycolaminarans. Beta 1-3 glucans from *Phytophthora* spp. *Physiol. Plant Pathol.*, **7**, 91-97.
- Lee B. S.**, 1973. The use of toxin for the screening of black pepper for foot rot resistance. *Mardi Research Bull.*, **1** (2), 10-14. (Abstr. in *Rev. Plant Pathol.*, **53**, 1047.)
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.**, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lowry O. H., Roberts N. R., Leiner K. Y., Wu M. L., Farr A. L.**, 1954. The quantitative histochemistry of brain. I. — Chemical methods. *J. Biol. Chem.*, **207**, 1-17.
- Paxton J. D.**, 1972. Toxin production by *Phytophthora megasperma* Drechs. var. *sojae* Hild., 433. In R. K. S. Wood, A. Ballio & A. Graniti : « *Phytotoxins in Plant Diseases* ». Acad. Press, New York, 530 p.
- Piez K. A., Morris L.**, 1960. A modified procedure for the automatic analysis of amino-acids. *Anal. Biochem.*, **1**, 187-201.
- Plich M., Rudnicki R. M.**, 1979. Studies of the toxins of *Phytophthora cactorum* pathogenic to apple trees. I. — Isolation, some of the properties and activities of a toxin produced by the fungus cultured *in vitro*. *Phytopathol. Z.*, **94** (3), 270-278.
- Ronnebeck W.**, 1956. Ein phytotoxisches Princip aus *Phytophthora infestans* de By. *Z. Pflkrankh.*, **63** (7), 385-389. (Abstr. in *Rev. Appl. Mycol.*, **35**, 843.)
- Sawardeker J. J., Sloneker J. H., Jeanes A. R.**, 1965. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **12**, 1602-1604.
- Shields R., Burnett W.**, 1960. Determination of protein-bound carbohydrate in serum by a modified anthrone-method. *Anal. Chem.*, **32**, 885-886.
- Wolf F. T.**, 1953. Toxin production in relation to tobacco black shank disease. *Phytopathology*, **43**, 294 (Abst.).
- Wolf F. T., Wolf F. A.**, 1954. Toxicity as a factor in tobacco black shank. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, **70**, 244-255.
- Woodward J. R., Keane P. J., Stone B. A.**, 1980. Structures and properties of wilt-inducing polysaccharides from *Phytophthora* species. *Physiol. Plant Pathol.*, **16**, 439-454.