HAL
open science

Contribution à la lutte contre les maladies du bois de la vigne, en particulier l'esca

Cyril Jousse

To cite this version:

Cyril Jousse. Contribution à la lutte contre les maladies du bois de la vigne, en particulier l'esca. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Poitiers, 2006. Français. NNT : . tel-00185265

HAL Id: tel-00185265

https://theses.hal.science/tel-00185265v1

Submitted on 6 Nov 2007

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.

THÈSE

pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École Doctorale : Ingénierie Chimique, Biologique et Géologie
Discipline : Interface Chimie - Biologie ; Systèmes Moléculaires à Visée Thérapeutique

présentée par :

Cyril Jousse

Contribution à la lutte contre les maladies du bois de la vigne, en particulier l'esca

Directeurs de thèse :
G. Bashiardes et J.-L. Bonnemain

soutenue le **18 décembre 2006** devant la Commission d'Examen

JURY :

Membres :

MM.	**E. Komor**	Professeur, Université de Bayreuth (Allemagne)	***rapporteur***
	P. Simier	Professeur, Université de Nantes	***rapporteur***
	P. Larignon	Docteur de l'Université de Bordeaux II, ITV Nîmes	***examinateur***
	G. Bashiardes	Professeur, Université de Poitiers	***examinateur***
	J.-L. Bonnemain	Professeur Émérite, Université de Poitiers	***examinateur***
	J.-F. Chollet	Chargé de Recherche, CNRS de Poitiers	***examinateur***

« Étudiez comme si vous deviez vivre toujours ; vivez comme si vous deviez mourir demain »

Isidore de Séville (530-636)

Dédicace

Ce travail est l'aboutissement d'une longue route universitaire parsemée d'embûches mais aussi de victoires ; principalement sur moi-même et, malheureusement, aussi sur d'autres. Je souhaite donc rendre hommage à toutes les personnes, de la plus vile à la plus admirable, qui ont contribué à ce que je suis devenu ainsi qu'à ce que j'ai produit.

Remerciements

C'est toujours un moment délicat que celui de l'écriture de ce petit paragraphe. Car comment exprimer avec exactitude toute la gratitude que l'on éprouve envers chacun des intervenants ayant, de près ou de loin, pris part à ce projet ? Je tiens donc, auparavant, à exprimer mes profondes excuses à toutes celles et ceux que je n'aurais pas cités, par manque de clairvoyance (parfois) et de mémoire (souvent).

En tout premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement nos partenaires financiers puisque c'est grâce à eux que tout a pu commencer. Mon premier entretien téléphonique positif avec Inter-Rhône, après des mois de recherche infructueuse, ainsi que mon premier contrat de travail faisant de moi un salarié de l'ITV sont des souvenirs toujours bien présents. Ma profonde reconnaissance va donc vers vous tous :

C. Riou, directeur technique, mon interlocuteur "décisif" d'Inter-Rhône ; J.-M. Bideault et J.-P. Van Ruyskensvelde, son successeur, directeurs général de l'ITV ; J.-L. Berger et T. Coulon, son successeur, directeurs technique et coordinateurs du projet ; M. Leguay, directeur technique, notre sémillant interlocuteur pour VINIFLHOR (auparavant ONIVINS) ; D. Moncomble, directeur technique, et sa représentante M.-L. Panon, notre ravissante interlocutrice pour le CIVC.

En second lieu, je souhaiterais remercier mon encadrement scientifique avec lequel j'ai pu interagir de multiples manières et grâce auquel j'ai eu des expériences très enrichissantes. L'association, dès le DEA, d'un encadrant "hors norme" et d'un étudiant "atypique" furent les ingrédients initiaux de cette réussite. Je tiens donc à remercier chaleureusement :

J.-L. Bonnemain, professeur émérite (UMR 6161) et membre de l'Académie des Sciences, pour avoir tout donné pour ce projet qu'il qualifiait lui-même de "casse-gueule", le préférant même à une retraite bien méritée sous le soleil d'Ibiza ; G. Bashiardes, professeur (UMR 6514), peu accoutumé à ce type de sujet très orienté "biologie" et qui a su, avec justesse, déléguer certaines de ses prérogatives pour le bien de ce projet ; J.-F. Chollet, chargé de recherche (UMR 6514), pour avoir suppléé avec brio M. Bashiardes et dont la grande disponibilité, l'ouverture d'esprit et les connaissances techniques approfondies m'ont été indispensables.

P. Larignon (ITV), coordinateur du groupe "maladies du bois de la vigne", dont la disponibilité et la connaissance approfondie du sujet m'ont été maintes fois profitables.

Je remercie aussi chaleureusement mes deux courageux rapporteurs, les professeurs E. Komor (Université de Bayreuth) & P. Simier (Université de Nantes), qui ont eu la bonté de me consacrer un peu de leur temps que je pense précieux.

Ensuite, je souhaiterais remercier l'ensemble des personnels scientifiques et techniques qui ont contribué, directement ou indirectement, à ce projet pour qu'il évolue jusqu'à sa forme finale.

Au sein de l'UMR 6161, dirigée par S. Delrot puis par R. Lemoine ; l'équipe "Céleri" (Rémi, Laurence, Julien, Benoit) pour leur accueil, leur aide secourable, dans une ambiance toujours conviviale ; l'équipe "Stérols" avec l'ancienne garde de Beausite (Pierrette, Gabriel, Mireille, Jean-Michel, superviseur de stagiaire, Janine) et la nouvelle (les Thierrys, Mathieu, Carole puis Jenny, sauveteuse de stagiaire) pour leur accueil et leurs bons conseils ; les équipes "Vigne" & "SAR", pour nos discussions impromptues, leurs conseils et leur aide ponctuelle mais précieuse ; le "personnel commun" (Magali, Noël, Bruno) pour ces petits "riens" qui représentent parfois beaucoup.

Au sein de l'UMR 6514, dirigée par J.-P. Gesson puis par A. Amblès ; l'équipe "Bashi" (Joelle, Francis, Jacques, Bernard puis Fred) pour leur accueil, leur soutien et leurs conseils avisés ; l'équipe "Géochimie" (principalement Claude et Laurent, M. MS) pour nos discussions et leur aide précieuses ; l'équipe "G-L" (notamment Martine et Isa, Ms RMN).

Merci au personnel du SIMIS (Emile et Gisèle) pour leur accueil toujours très chaleureux, ainsi qu'à B. Parinet pour les analyses d'eau.

Merci à M. Guinet, directeur de l'ED ICBG en 2003, pour son soutien.

Je n'oublie pas que la recherche n'est rien sans le petit monde "d'à côté", fourmis laborieuses qui permettent "aux autres" d'exister. Un grand merci donc à :

M. le directeur de la Faculté des Sciences du Sport pour m'avoir autorisé à "squatter" durant trois ans l'esplanade du bâtiment oméga à des fins de recherche ;

M. le directeur de la MSHS pour nous autoriser à faire la présentation d'aujourd'hui dans ce cadre magnifique ;

Geneviève & Sylvie, les pin-up du GON, Claudine de l'Annexe, mais aussi Christine (ITV Nîmes) & Georgette (ITV Paris) pour leur disponibilité, leur accueil toujours aimable et leur patience envers mon cas désespéré ;

H. Tomlinson, *our "accurate" english teacher and reviewer* ;

Christophe, Jean-Luc (cascadeur dans le civil) et leurs collègues des services techniques, ainsi que ceux du service des espaces verts ; Didier, Valérie et Sarah, personnel d'accueil et d'entretien.

Enfin mes pensées vont aussi (et surtout) vers celles et ceux qui ont partagé mon quotidien, celui de la masse laborieuse et productive des doctorants et stagiaires :

Merci à Mélinda, Thomas, Audrey, Angélique & Claire, stagiaires qui ont sacrifié du temps (et de l'argent) pour gagner en expérience en participant à notre aventure.

Merci à tout les (ex-) doctorants des deux laboratoires, des associations ADBEP & Atlas, pour leur amitié et leur gentillesse. Bon courage à tous pour la suite de vos carrières respectives.

Pour la rédaction de ce manuscrit ainsi que pour la présentation d'aujourd'hui, je voudrais remercier tout particulièrement : J.-F. Chollet & J.-L. Bonnemain, véritables coauteurs, mais aussi M. Faucher, J. Laduranty, F. Barbot, S. Rivet, R. Lemoine, D. Pichereau, M. Lachat, pour leurs remarques pertinentes et les corrections.

Historique

Historique

1 - Introduction : Alice and the Red Queen, such a fast sort of country

(…) Alice looked round her in great surprise. "Why, I do believe we've been under this tree all the time ! Everything's just as it was !"
" Of course it is, " said the Queen : "what would you have it ?"
" Well, in our country, " said Alice, still panting a little, "you'd generally get to somewhere else – if you ran very fast for a long time, as we've been doing."
"A slow sort of country !" said the Queen. "Now, here, you see, it takes all the running you can do, to keep in the same place. If you want to get somewhere else, you must run at least twice as fast as that !"

Alice Through the Looking Glass, and What Alice Found There (L. Carroll, 1872).

Notre écosystème, pas celui qui nous appartient mais celui dans lequel nous avons été, nous sommes et nous serons, est l'endroit où nous évoluons. C'est la résultante d'un ensemble d'éléments, biotiques (auxquels nous appartenons) et abiotiques, ainsi que d'événements (auxquels nous faisons face). Il ne serait pas aisé de décrire l'ensemble des événements liant l'ensemble des éléments de cet écosystème (cela n'est d'ailleurs pas notre propos). Néanmoins, ce monde est ainsi fait que l'on pourrait presque résumer l'ensemble des phénomènes du vivant par ce postulat, issu du conte de Lewis Carroll (1832-1898). Cette analogie proposée, en biologie évolutionniste, par Leigh Van Valen (1973) met en évidence la nécessaire course aux armements entre les espèces. En effet, depuis l'émergence des premières entités vivantes de la soupe primitive (des ARN autoréplicateurs selon François Jacob) jusqu'à leurs lointains descendants (dont nous faisons partie), la vie n'eut de cesse d'évoluer. Cette évolution s'est opérée par le biais d'une multitude d'interactions. L'individu sensible se retrouve confronté irrémédiablement à son environnement. Il perçoit les conditions environnementales de son microcosme (solides, liquides, gaz et énergies). Il impose sa présence et subit celle des autres individus, ceux de la même espèce mais aussi d'autres espèces. Tout cet ensemble complexe concourt à générer de l'évolution au sein des espèces (au détriment des individus selon Claude Combes, 2003).

Nombre d'études réalisées à l'heure actuelle prennent en compte un petit nombre d'éléments (souvent deux). Bien souvent celles-ci se cantonnent à élucider quelques événements qui les lient. Ce manuscrit retrace lui aussi une histoire, un fragment d'évolution

dont les différents éléments (protagonistes) et événements sont présentés ci-après avant d'entrer dans le vif du sujet. Le syndrome de l'esca (Fig. 1) est le résultat d'une interaction

Figure 1. Symptômes d'esca sur le feuillage (à gauche) et à l'intérieur du cep (ici en coupe transversale, à droite).

entre la vigne et un cortège de champignons considérés phytopathogènes. Installée depuis fort longtemps, cette maladie est d'abord passée inaperçue devant des considérations plus évidentes et/ou pressantes pour l'époque. Avec l'évolution de la viticulture, elle est devenue l'une des préoccupations des exploitants. Jusqu'alors endigué grâce aux traitements à base d'arsenic, ce syndrome refait surface à la faveur de l'interdiction de la seule arme à notre disposition. Aujourd'hui, les recherches ont repris malgré l'ampleur de la tâche, dans un contexte morose qui étreint le monde de la vigne. Il s'agit à la fois de comprendre les mécanismes intimes de l'interaction entre la vigne et ses agresseurs, d'évaluer le devenir épidémiologique du vignoble suite à l'arrêt des traitements et d'envisager des moyens de lutte prophylactiques, préventifs et curatifs. Notre travail se situe à ce niveau. Il fait suite à une collaboration à l'interface chimie organique - biologie végétale, dans le prolongement d'études antérieures sur l'eutypiose et sur la mobilité des molécules xénobiotiques au sein de la plante.

2 - Un pas de deux

2.1 - Des symbioses

Entre deux éléments biotiques, deux organismes vivants, un grand nombre d'événements peuvent survenir. Ils sont en relation les uns avec les autres, nous parlerons alors d'interactions. En 1879, Heinrich Anton de Bary (naturaliste allemand, 1831-1888 ; cité par M-A Selosse, 2000) introduit une nouvelle notion, la symbiose. Symbiosis, du grec syn (avec) et bios (vie), traduit l'association durable entre deux éléments biotiques d'origines systématiques différentes. Ce sens, encore conservé chez les Anglo-Saxons, est basé sur un constat morpho-anatomique. Ainsi, cette association peut s'avérer bénéfique pour l'un, les deux ou alors aucun des deux partenaires, ou symbiontes (Tableau 1). Si ceux-ci sont anta-

A	B	Type de symbiose	Durée de la symbiose	
			Longue	Brève
+	+	mutualisme	symbiose *sensu stricto*	coopération transitoire
+	-	parasitisme ou prédation	parasites biotrophes	parasites nécrotrophes et prédateurs
+	0	commensalisme		
0	-	amensalisme		
0	0	neutralisme		
-	-	antagonisme		

Tableau 1. Les différents types de symbiose, au sens large, entre deux partenaires A & B. Pour chacun des protagonistes, l'association peut être favorable (+), défavorable (-) ou sans effet (o). La durée de l'association détermine aussi le type de symbiose et son devenir (association durant la majorité de leur cycle de vie : longue ; sinon brève) (d'après Selosse, 2000).

gonistes (luttant l'un contre l'autre), amensaux (relation défavorable pour l'un) ou neutres (ce type de relation est assez difficile à évaluer) alors aucun des symbiontes n'en retire avantage. Le parasitisme apporte un effet positif à l'un des symbiontes au détriment de l'autre. Lorsque les deux éléments ont un effet bénéfique sur l'autre on parle alors de mutualisme. Bien souvent l'un des deux partenaires assure la protection, l'autre s'abrite ou se cache. On voit rapidement les deux facettes du même événement, un début d'entente ou de lutte. Ainsi, celui qui assure l'accueil est appelé l'hôte. Celui qui est le moins évident, le plus caché, est nommé suivant la nature de sa relation avec l'hôte. L'hôte et son symbionte (ou symbiote) partagent un espace spatio-temporel commun. Le sens de « symbiose » a évolué en France pour y ajouter une dimension physiologique. Ainsi, de deux organismes différents coexistant durablement, nous avons adjoint la nécessité d'un bénéfice mutuel, rapprochant cette notion de celle appelée mutualisme (Tableau 1).

Deux symbiontes (au sens large), deux partenaires, peuvent donc interagir de multiples manières. L'une d'elles nous intéresse plus particulièrement : le parasitisme. L'hôte n'est pas un symbionte obligatoire ; il a pourtant un impact positif sur son partenaire mais la réciproque n'est pas vraie. J. Pavillard (botaniste montpelliérain de la première moitié du XXe siècle) mentionne déjà l'importance de ce qu'il appelle "l'antibiose", arguant que la concurrence est le moteur de l'évolution de la biocénose végétale, vers la stabilisation ou la déchéance (Boullard, 1990 ; p. 311). Il peut s'agir d'une concurrence assurant l'hégémonie d'une espèce sur d'autres vis-à-vis d'un même espace spatio-temporel, d'un prélèvement

(parasite ou prédateur), d'une profonde altération (virus, bactéries) ou d'une intoxication (parasite nécrotrophe, allélopathie) de la matière vivante aboutissant à l'inhibition de croissance ou la mort de l'hôte, ou encore à la dépendance intime de deux symbiontes (hôte – parasite ; coévolution). B. Boullard estime que la symbiose *sensu stricto* est à équidistance entre le parasitisme mortel et le parasitisme vaincu. Il existe deux facettes d'un même comportement : la biotrophie qui assure un échange de métabolites entre partenaires vivants et la nécrotrophie qui permet d'obtenir des nutriments par lyse cellulaire du partenaire. Ainsi, se distingue la dualité symbiose – parasitisme. En France, l'antagonisme entre antibiose et symbiose s'appuie sur cinq postulats : l'hégémonie d'une espèce sur une niche trophique empêchant le développement d'autres espèces ; le prélèvement intensif de matière organique vivante sur l'hôte ; la profonde altération morphologique de l'hôte sous l'influence de son partenaire ; la mort ou la réduction de croissance par empoisonnement de l'hôte ; l'inextricable dépendance du parasite vis-à-vis de son hôte (une chimère).

Deux types de parasitisme peuvent être distingués : l'un est dit obligatoire, le parasite biotrophe s'alimente sur des cellules vivantes et ne tue pas son hôte immédiatement. Il s'agit bien souvent d'une association très spécifique. L'autre est dit facultatif, le parasite nécrotrophe tue son hôte (notamment grâce à l'emploi d'un arsenal de toxines) puis continue de vivre en saprophyte sur les tissus en décomposition. Parfois, la limite entre biotrophe et nécrotrophe est bien mince. On parle alors d'hémibiotrophie.

2.2 - Les champignons, premiers pathogènes de l'Histoire des Sciences

Dans cette affaire, faisons connaissance avec nos protagonistes. L'hôte est la vigne cultivée, *Vitis vinifera* L. (Vitaceae, Rosidae) qui est une liane arborescente originaire d'Asie occidentale où elle fut domestiquée. Sa culture gagne ensuite l'ensemble du bassin méditerranéen, avec l'expansion hellénique puis romaine. Dans les contrées qui constitueront la France, la viticulture s'implante d'abord à Massilia. Ensuite, elle se répand à travers toute la Gaule romaine. Le Moyen Âge voit l'influence de la viticulture renforcée (sous impulsions religieuse et monarchique). Puis, vient l'exportation au nouveau monde : Amériques, Afrique, Océanie. Au début de ce nouveau siècle, elle représente près de huit millions d'hectares à travers le monde. Aujourd'hui, la France est le premier producteur mondial de vin mais elle est talonnée par d'autres pays capables d'une concurrence sérieuse (États-Unis, Australie et Afrique du Sud parmi d'autres).

Les autres protagonistes, parasites, sont fongiques. Les végétaux supérieurs sont soumis à des pressions environnementales sur l'ensemble de leur organisme, de la graine à la plante adulte, du système racinaire à l'ensemble des structures aériennes. Parmi ces pressions, les champignons ont une large part de responsabilité. On parle principalement des mycorhizes et des mycoses. Les mycoses (du grec mykés, champignon) sont les maladies provoquées par certains champignons (pathogènes) aux dépens de plantes ou d'animaux. A titre d'exemple, on peut citer le mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A.

Curtis) Berl. & De Toni) découvert en 1878 et celui de la pomme de terre (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) découvert en 1850. Depuis, ces agents pathogènes du groupe des Oomycètes ont été retirés des Eumycètes (vrais champignons) pour être intégrés aux Chromista. Pour B. Boullard, le mode de pénétration du champignon a permis un classement (Boullard, 1990; p. 101). On distingue donc ceux qui pénètrent dans la plante entre les cellules et développent des suçoirs (biotrophes), ceux qui vont de cellule en cellule en dégradant les parois (nécrotrophes), enfin ceux qui profitent d'un orifice naturel ou d'une blessure pour atteindre les cellules (opportunistes). Pour de nombreuses mycoses, on observe une synergie entre pathogènes, en action de concert ou successivement dans un ordre déterminé. On parle alors de complexe infectieux (champignons seuls ou champignons et bactéries).

Dans tous les cas, un "dialogue" s'installe entre le champignon et la plante (Fig. 2). Une "biologie du dialogue" se met en place. Des mécanismes moléculaires et cellulaires communs à d'autres évènements se traduisent par des conséquences anatomiques et physiologiques orientées (Lipka et Panstruga, 2005). Au niveau cellulaire, à l'interface mycé-

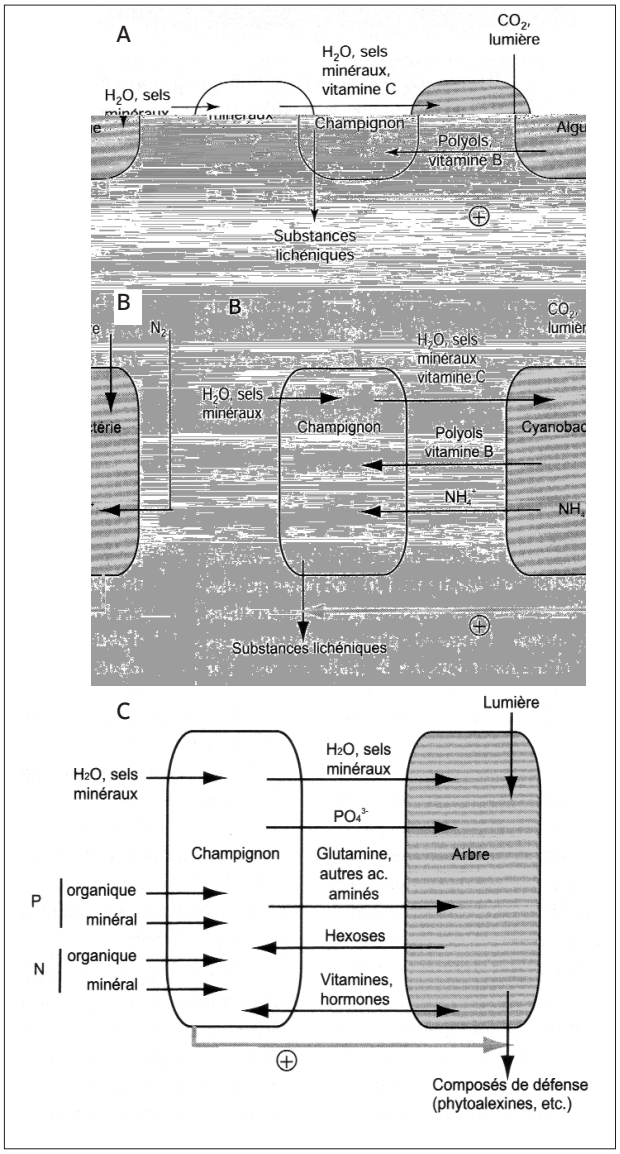


Figure 2. Les échanges entre partenaires. Lorsqu'un champignon s'associe avec un organisme photosynthétique, une biologie de l'échange se met en place. Des similitudes sont observables entre tous les cas. S'ils sont mutualistes, chaque partenaire fournit à l'autre des éléments dont il a besoin (eau, sels minéraux, vitamines, composés carbonés, etc.; association lichénique avec une algue (A) ou une cyanobactérie (B), mycorhize avec un arbre (C). Par ailleurs, en cas de parasitisme, ils "échangent" des enzymes lytiques et des composés toxiques. Le parasite prélève sur son hôte les éléments dont il a besoin (eau, sels minéraux, composés carbonés, etc.). +, stimulation de la synthèse des substances ciblées (Selosse, 2000).

lium - plante, différentes réactions enzymatiques permettent la formation d'éliciteurs, inducteurs des réactions de défense chez la plante. L'observation macroscopique peut révéler la formation d'une « pourriture » sur le site de la confrontation. Selon B. Boullard, l'action du champignon sur la plante peut être connue en analysant la nécrose, sa texture, sa forme et sa couleur. Une pourriture molle révèle une dégradation des composés pectiques et une disjonction du parenchyme. Elle est sèche si le phénomène est localisé et lent. Fibreuse, elle est obtenue par lignolyse et sporadiquement par cellulolyse. Si la pourriture est cubique, la cellulolyse s'est effectuée seule. Si elle est alvéolaire, cellulolyse et lignolyse ont agi sur des plages en îlots. Une coloration blanche est un signe de lignolyse alors que la cellulolyse offre une teinte rouge - brun.

L'esca, maladie cryptogamique vasculaire de la vigne, récemment trouvée aussi chez *Actinidia deliciosa* (le kiwi) (Lecomte, 2003), est un cas particulier de relation plante - champignon pathogène. En effet, on parle plutôt de "syndrome esca". Cela est dû à la présence non d'une espèce isolée mais d'un groupe de pathogènes fongiques qui prennent place dans le bois, au sein du cep. Comme nous le détaillerons plus loin, les champignons fondateurs de cette relation appartiennent, le plus souvent, aux espèces suivantes : *Eutypa lata* (aussi impliqué dans une autre maladie de la vigne appelée eutypiose), *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeomoniella chlamydospora*. Ces parasites appartenaient auparavant au règne des végétaux, classés parmi les Thallophytes. À l'heure actuelle les Champignons (Eumycètes) sont répertoriés dans un règne particulier, regroupant des organismes dont l'évolution a conduit à une perte de leur capacité photosynthétique. Parmi l'ensemble des symbiontes répertoriés, les champignons représentent une part importante. Leur évolution vers l'hétérotrophie en fait des partenaires de choix pour tout organisme producteur d'énergie (animaux et végétaux).

2.3 - Les interactions plante - champignon

2.3.1 - Généralités

Les maladies vasculaires sont anciennes, accompagnant vraisemblablement l'histoire des plantes supérieures. Le processus infectieux est bien rodé, chaque élément parasite ayant une place bien définie. Mais que se passe-t-il au moment où une spore se dépose sur la plaie de taille ? Quels processus métaboliques permettent la germination et le développement mycélien ? Quelles défenses de la plante et parades du champignon sont utilisées alors que ce dernier va se tapir à l'intérieur du cep ? Une fois au sein du bois, chaque champignon adopte un comportement qui lui est propre. Qu'en est-il de l'hôte ? Les nécroses observées sont-elles la simple expression pathogénique du parasite ou présentent-elles le reflet d'un combat entre les tissus de l'hôte et ceux du champignon ? Un certain nombre de questions reste pour le moment en suspens concernant ces maladies du bois. Les plus pressantes, peut-être, concernent l'interaction entre l'hôte et ses pathogènes. Les cycles biolo-

giques des différents protagonistes sont plus ou moins parsemés de zones d'ombre. Nombreuses sont les études en cours afin de lever le voile sur ces mystérieuses et macabres interactions. Quels types de parasites sont-ils ? Ce sont bien sûr des « champignons vrais » (*Fungorum regnum perfecti Fungi*, des Eumycètes : Ascomycètes ou Basidiomycètes). Mais, quels comportements adoptent-ils au contact des cellules végétales ? Trois grands types d'interactions plante - champignon sont connus : la symbiose (*sensu stricto*), le parasitisme et le saprophytisme. Certains auteurs suggèrent d'ailleurs qu'il s'agit des trois événements possibles pour une même rencontre et que tout dépend de la balance génétique et métabolique qui s'installe entre les partenaires. D'autres de rajouter qu'en fait nous avons affaire à une infinité d'interactions, toutes plus ou moins proches d'un de ces trois jalons posés par commodité.

Pour les parasites, trois classes de comportements peuvent être distinguées. Les parasites biotrophes sont les plus proches des symbiontes. Ce sont des espèces fongiques qui croissent et se reproduisent au sein d'organismes vivants. Ils colonisent leur hôte et investissent les zones intercellulaires. Au contact des cellules, ils développent une interface (parfois appelé haustorium)entre membranes fongique et végétale . Ainsi, ils réacheminent les nutriments de la plante pour leur alimentation propre. L'hôte est amputé d'une partie de sa ressource mais reste vivant. Le parasite biotrophe est dit obligatoire quand sa survie dépend uniquement de l'hôte. Un tel parasite ne peut être cultivé sur milieu artificiel. Les parasites nécrotrophes ont un comportement diamétralement opposé. Ils ont obligation de tuer les cellules végétales rencontrées afin d'en retirer les nutriments dont ils ont besoin pour se développer et se reproduire. Ce mode de colonisation finit inconditionnellement par la mort de l'hôte (d'où la nécessité, pour ce parasite, de se disséminer avant épuisement de la ressource). Ces deux modes de vie du parasite sont bien sûr des cas limites. Il existe donc tout un monde entre eux. Le parasite biotrophe qui vit aux dépens d'un hôte mais qui, au moins à un moment de son cycle infectieux, induit directement la mort cellulaire et en retire profit, est qualifié d'hémibiotrophe.

Prenons l'exemple de la germination d'une spore de *E. lata* ou de *Phaeomoniella chlamydospora* au niveau d'une plaie sur un sarment de vigne. Le champignon a un besoin urgent d'énergie pour développer un filament ou un cordon mycélien qui gagnera les profondeurs du cep. Il semble cohérent de penser que lors de cette phase, le champignon gagne le système vasculaire, véritable autoroute vers le cep en période hivernale (sauf si la taille est faite en période de sève montante). Aucune nécrose n'a encore été observée pour cette phase de l'infection. Par la suite, des nécroses se forment au sein du cep. Elles concernent des éléments morts du bois mais aussi des structures vivantes. Ceci s'observe dans l'aubier (bois fonctionnel), avec ses éléments de vaisseaux, ses cellules associées aux vaisseaux, ses fibres et son parenchyme mais aussi, dans certains cas (*E. lata*), le cambium et le phloème. Si le parasite se limite à progresser au sein des zones non-fonctionnelles du bois (bois de cœur), il est considéré comme un nécrotrophe saprophyte (vivant au détriment d'une matière morte qu'il n'a pas tuée). C'est peut-être le cas de *Fomitiporia mediterranea*. S'il pro-

gresse dans les structures vivantes et tue les cellules pour ensuite s'en repaître, alors c'est un authentique nécrotrophe. Cela semble être le cas des pionniers de l'esca et de l'agent de l'eutypiose (*E. lata*). En outre, un débat a lieu au sujet de *Phaeomoniella chlamydospora*. Peut-il se développer, à lui seul, entrainant son hôte à sa perte ? ou bien doit-il obligatoirement se faire aider d'un comparse (*P. aleophilum*, *E. lata*, *F. mediterranea*, etc.) ? Certaines études tendent à montrer qu'il peut agir seul pour former des nécroses dans le bois (Gaforio *et al.*, 2005). Mais, d'une manière générale, **l'esca demeure le résultat d'une combinaison d'infections.**

Ces champignons phytopathogènes responsables de l'esca peuvent donc être classés dans les hémibiotrophes (sauf *F. mediterranea*). Observons néanmoins les grandes étapes chronologiques d'une interaction plante - champignon en nous focalisant sur la cellule pour extrapoler ensuite, via le tissu, à la plante entière.

2.3.2 - De la reconnaissance à la réponse hypersensible et la résistance systémique acquise

2.3.2.1 - La reconnaissance

La grande majorité des auteurs ont abordé cette étape de reconnaissance en étudiant des parasites foliaires. En effet, ce sont souvent les cellules de la feuille qui sont le siège de cette attaque de pathogènes. Une cellule fongique arrive donc au contact d'une cellule végétale. À ce moment crucial, plusieurs options s'offrent à celles-ci. La relation qui s'instaure peut être de type « non-hôte », comparable à l'incompatibilité pollen - pistil d'espèces différentes ; elle reste fugace et ne perdure donc pas. Dans le cas qui nous intéresse, la relation est dite « hôte ». Si la plante reconnaît efficacement le non-soi, elle déclenchera rapidement et intensément des systèmes de défense. Le pathogène sera neutralisé par les défenses de l'hôte. On parle alors d'une interaction incompatible (Fig. 3). Dans le cas contraire (interaction compatible) le pathogène peut se développer au sein de l'hôte et induire la maladie. Les interactions ont un fondement génétique à l'origine de la notion de spécificité d'hôte. En ce qui concerne l'esca, la plante ne reconnaît pas, mal, ou trop tard, le pathogène. Il s'agit donc d'une interaction compatible qui va se traduire par l'affaiblissement puis la mort de l'hôte.

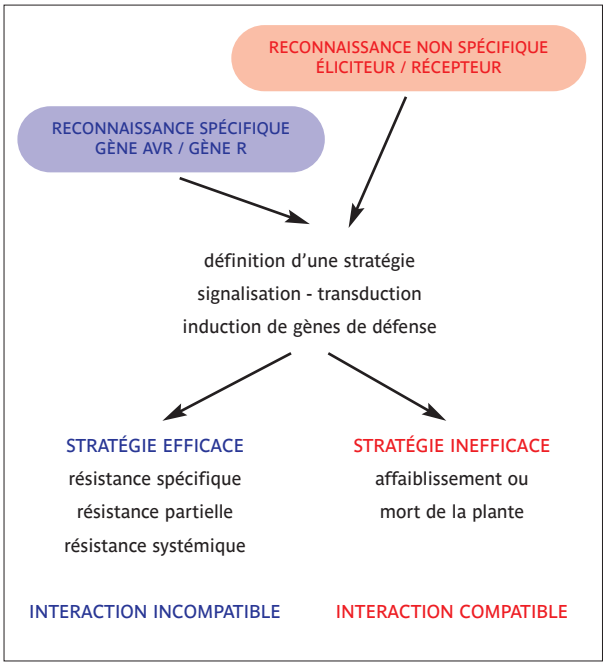


Figure 3. L'interaction plante - pathogène dans la relation hôte. Plusieurs étapes jalonnent cette association : reconnaissance, signalisation - transduction du signal, induction des défenses et résistance. (Duhoux et Nicole, 2004).

La reconnaissance se fait par le biais de molécules constitutives aux deux protagonistes (polysaccharides, lipides, (glyco-) peptides). Celles-ci sont aspécifiques, aussi appelées éliciteurs généraux. La nature de ces molécules dépend du type de tissu auquel appartient cette cellule, et de son activité métabolique (jeune, senescente, etc.). Elles sont issues du métabolisme secondaire de la plante (éliciteurs endogènes issus principalement de l'attaque de la paroi végétale par des enzymes fongiques) et du champignon (éliciteurs exogènes : enzymes, phytotoxines, acide arachidonique et jasmonique, glucanes, etc. voir Fig. 4).

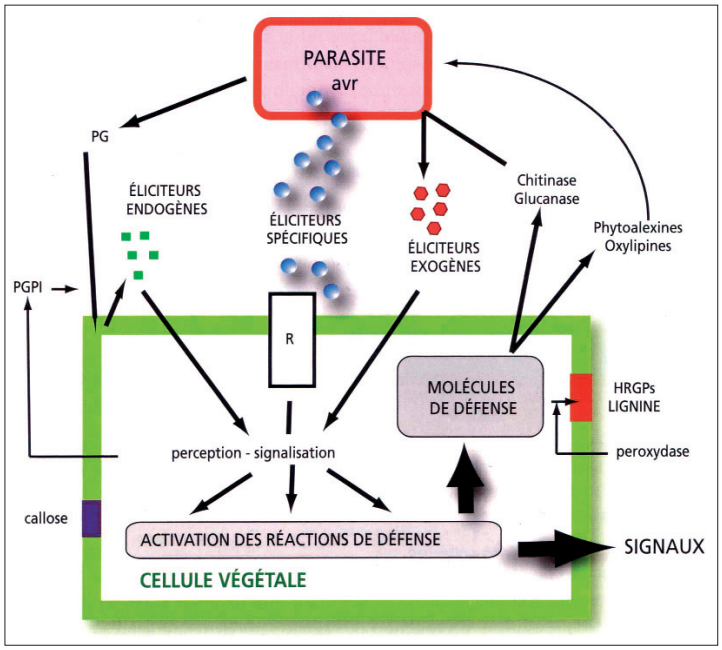


Figure 4. La reconnaissance, clé de voûte de la réponse de la plante. Elle fait appel à plusieurs types d'éliciteurs. Les éliciteurs endogènes sont issus du métabolisme secondaire de la plante avec ou sans action d'enzymes fongiques (PG, polygalacturonases) pouvant être inhibées (PGPI, inhibiteurs de polygalacturonases). Les éliciteurs exogènes sont d'origine fongique, avec ou sans attaque enzymatique par la plante (chitinase, glucanase). Ces deux groupes d'éliciteurs sont des éliciteurs généraux. Les éliciteurs spécifiques (de l'agent pathogène et de son hôte) sont les produits de gènes avr qui interagissent, directement ou indirectement, sur les produits des gènes R de la plante. La signalisation qui s'ensuit permet l'activation des réactions de défense et la propagation du message d'alerte (Duhoux et Nicole, 2004 ; pour un schéma plus complet : http://www.scri.sari.ac.uk/TiPP/PPS/drastic/cell2.pdf).

La reconnaissance s'appuie aussi sur des éliciteurs spécifiques. Ce sont des produits des gènes de résistance R (cellule végétale) et d'avirulence Avr (cellule fongique) qui mènent à cette importante phase de reconnaissance. Des produits du génome fongique agissent directement ou indirectement sur des produits du gène R de la plante. Il existe différents modèles d'interaction entre les produits des gènes Avr et R : modèle récepteur - ligand, modèle co-récepteur, modèle protéolyse dépendant et modèle de garde. Dans de nombreux cas, c'est ce dernier modèle qui semble le plus adapté (Glazebrook, 2005). En plus des gènes Avr, certains pathogènes peuvent présenter d'autres gènes, Hrp pour les bactéries ou INF1 chez *Phytophthora infestans*, dont les produits sont impliqués dans la réponse hypersensible (HR en anglais) de la plante.

Toutes ces interactions éliciteurs - récepteurs membranaires ou intracellulaires sont à l'origine de diverses cascades de signalisation (Fig. 5).

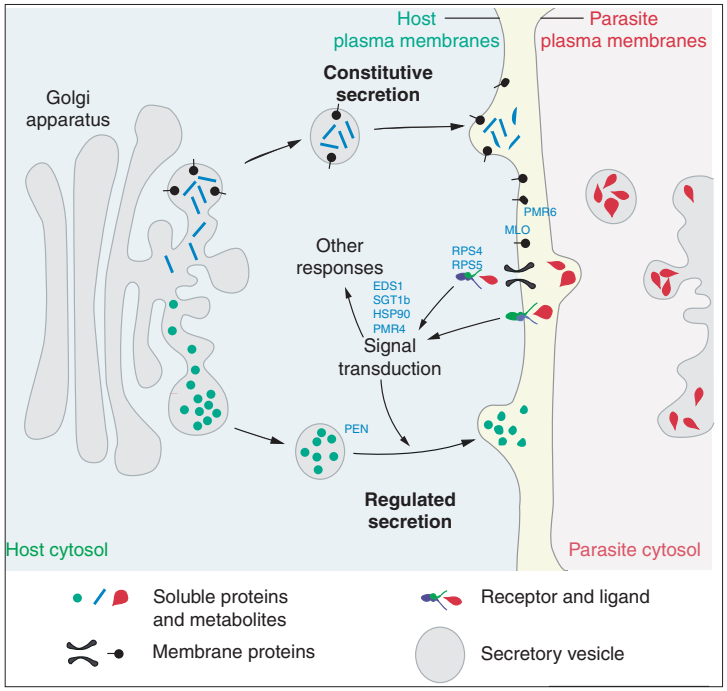


Figure 5. La reconnaissance et le début de la signalisation. Le pathogène sécrète des molécules (notamment protéiques, enzymes ou ligands) qui vont interagir avec des récepteurs membranaires ou intracellulaires de la cellule hôte. Dans cette cellule, le trafic utilisant le réseau golgien assure l'acheminement des protéines vers la membrane plasmique. Ce seront des protéines membranaires (p. ex. PMR6, une pectate lyase végétale essentielle au développement de l'oïdium ; MLO, protéine de liaison plasmalemmique pour la résistance non-hôte à *Magnaporthe grisea* chez l'orge) ou de surface (solubles dans l'apoplaste). Des protéines du cytoplasme assurent aussi la reconnaissance de composés ayant traversé le plasmalemme (p. ex. RPS4 & 5, protéines de reconnaissance contre des pathovars de *Pseudomonas*, pour la résistance non-hôte chez *Arabidopsis thaliana*). L'ensemble de ces interactions est répercuté par transduction de signaux (à l'aide de régulateurs de défense comme EDS1, SGT1b, HSP70 & 90, cytoplasmiques) ce qui permet la mise en place une réponse de défense (PEN, une protéine de type synthaxine, participe à la sécrétion de substances antimicrobiennes chez l'orge et chez *A. thaliana* contre un agent d'oïdium *Blumeria graminis*). L'équilibre instable induit par les premières interactions protéiques détermine le devenir de cette rencontre (relation hôte ou non-hôte) (Holub et Cooper, 2004).

2.3.2.2 - La signalisation

Dès que l'attaque est perçue, une polarisation de la cellule végétale est visible : le cytosquelette est réorienté vers le site d'infection (Schmelzer, 2002 ; *Phytophtora infestans* sur *Solanum tuberosum*). Un faisceau radial de filaments d'actine et de microtubules accompagne le déplacement du cytoplasme qui se condense dans la zone de contact avec le pathogène (Takemoto et Hardham, 2004 ; *Erysiphe graminis* sur *Hordeum vulgare*). Le noyau aussi suit le mouvement et prend place non loin de la zone de contact. Les produits des gènes de défense seront rapidement sur site.

Les événements précoces de signalisation se traduisent par des flux d'ions transmembranaires (avec comme conséquence une modification de la différence de potentiel transmembranaire et du pH local) : entrée de Ca^{2+} et de H^+ dans le cytosol et sortie de K^+ et de Cl^-. Le calcium est l'un des messagers intracellulaires par excellence, son action portant notamment sur des protéines kinases (cascades des MAP kinases vers les réactions de défense et la mort cellulaire), des oxydases et la phospholipase D. L'influx de H^+ a lieu sous le contrôle d'une protéine 14.3.3 appartenant à une famille impliquée à divers niveaux dans le processus de mort cellulaire. Ces flux ioniques s'accompagnent d'un stress oxydatif. Des formes réactives de l'oxygène, essentiellement l'oxygène singulet, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène mais aussi l'oxyde nitrique s'accumulent (Duhoux et Nicole, 2004 ;

Delledonne, 2005) (Fig. 6). Ce choc oxydatif ou bouffée oxydative manifeste une activité antimicrobienne mais aussi une toxicité pour la cellule végétale (peroxydation des lipides

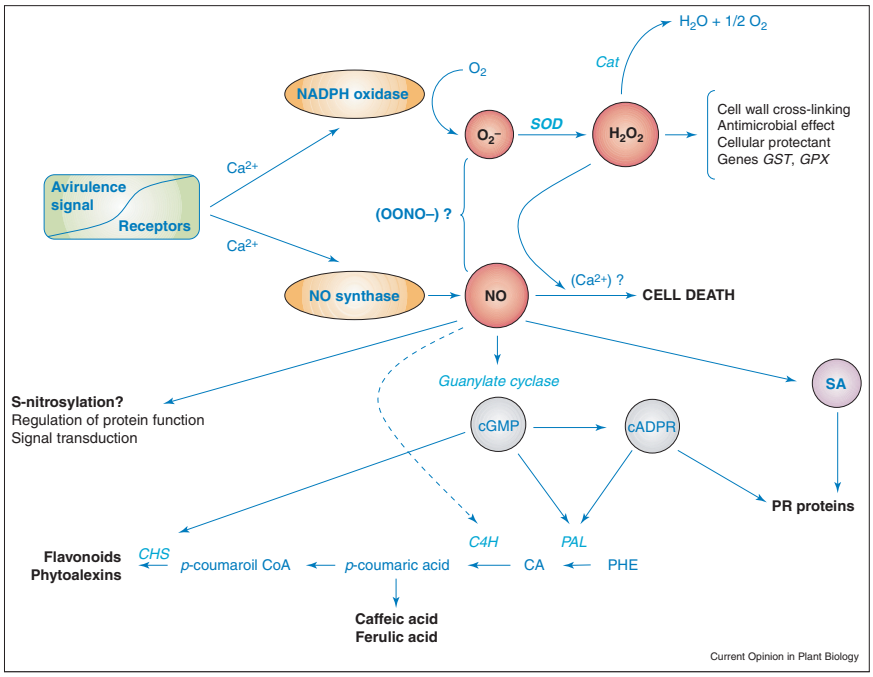


Figure 6. L'oxyde nitrique est une molécule signal impliquée dans la réponse hypersensible. Cependant, elle est aussi utile à de nombreux autres phénomènes liés à la résistance de la plante face à un pathogène, synthèse des protéines PR (pathogenesis-related), des flavonoïdes et des phytoalexines. CA, acide cinnamique ; Ca^{2+}, influx de calcium ; cADPR, ADP ribose cyclique ; Cat, catalase, EC 1.11.1.6 ; C4H, cinnamate 4-hydrolase, EC 1.14.13.11 ; CHS, chalcone synthase, EC 2.3.1.74 ; cGMP, guanosine monophosphate cyclique ; NADPH oxydase, EC 1.6.99.6 ; NO synthase, oxyde nitrique synthase, EC 1.14.13.39 ; ONOO-, peroxyde nitrique ; PAL, phénylalanine ammonia lyase, EC 4.3.1.5 ; PHE, phénylalanine ; PR, pathogenesis-related proteins ; SA, acide salicylique ; SOD, superoxyde dismutase, EC 1.15.1.1 (Delledonne, 2005).

membranaires par exemple). Il s'avère nécessaire à la liaison des protéines extracellulaires aux autres constituants de la paroi ainsi qu'à l'activation de gènes de défense. Ce phénomène, plus ou moins précoce selon les pathogènes, peut aboutir à la réponse hypersensible, mais diverses cascades permettent la mise en place d'autres mécanismes de résistance. L'autre événement important est l'implication d'hormones de stress.

L'acide jasmonique est un signal précoce (Fig. 7). Certains pathogènes produisent des jasmonates, mais ceux-ci sont aussi issus du catabolisme de lipides membranaires de la cellule végétale (Fig. 8) (Howe et Schilmiller, 2002). L'acide jasmonique peut être conjugué

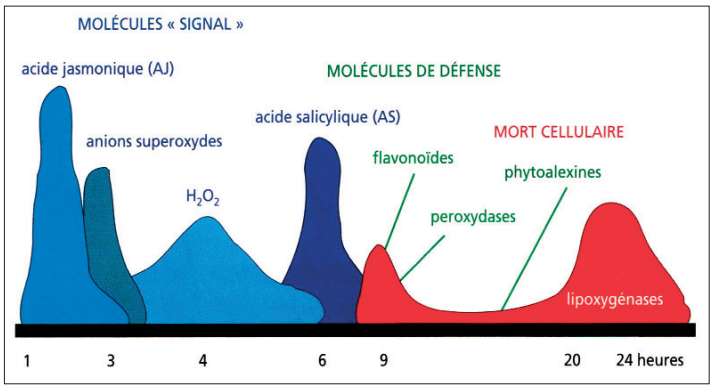


Figure 7. Suite d'événements intervenant lors de l'infection du cotonnier par *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Les molécules de signalisation se succèdent avec un synchronisme et une intensité particuliers (débutant ici par un pic d'acide jasmonique et s'achevant par celui de l'acide salicylique). Elles précèdent la mise en place d'une réponse de défense adaptée (avec des molécules spécifiques, flavonoïdes, peroxydases et phytoalexines [Harborne, 1999]). Dans ce cas, la réponse employée est la réponse hypersensible (RH, avec l'implication de lipoxygénases), au bout de vingt-quatre heures d'infection (Duhoux et Nicole, 2004).

à différents acides aminés, notamment l'isoleucine, pour donner ce qui semble être la forme active de l'élément signal (Ile-JA). Seul ou avec l'éthylène, il induit de nombreux facteurs de transcription (via un complexe central de régulation SCF^{COI1}) qui agissent sur des gènes de défense. Quelques-uns de ces gènes sont impliqués dans la résistance aux pathogènes nécrotrophes (Glazebrook, 2005). De plus l'acide jasmonique est un messager systémique qui assure la transmission de l'information à l'ensemble de la plante. Ajoutons que chez les Solanacées, en réponse à un stress tel qu'une attaque d'insecte herbivore, la systémine, première phytohormone hormone peptidique identifiée chez les plantes (Ryan, 2000), assure le transfert à courte distance de l'information vers un récepteur membranaire (SR160). Ce dernier active la cascade de réactions conduisant à la synthèse d'acide jasmonique phloème mobile (Fig. 9) (Schilmiller et Howe, 2005). L'éthylène, dont la production peut être précoce, est perçu par des récepteurs spécifiques (ETR) agissant sur la levée de l'inhibition sur une cascade protéique (EINs) à destination de facteurs de transcription (EIN3 et EIL1) pour des gènes de défense et de croissance cellulaire (Fig. 10) (Guo et Ecker, 2004).

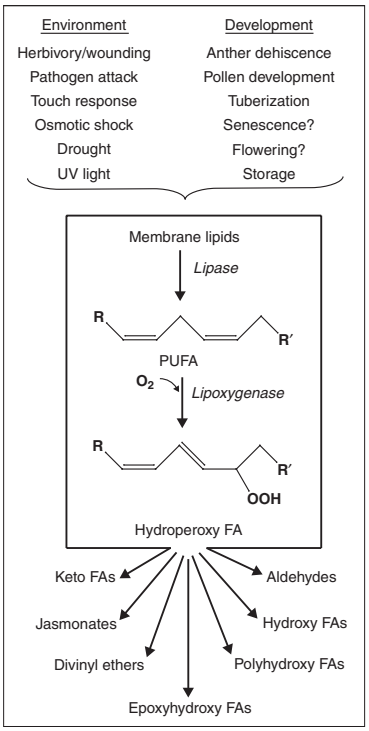


Figure 8. Les facteurs de stress, biotiques et abiotiques, et de développement induisent la biosynthèse d'oxylipines dont les jasmonates. Des acides gras polyinsaturés (PUFA) dérivent de lipides membranaires suite à l'action d'une lipase (EC 3.1.1.3). L'addition d'oxygène par une lipoxygénase (9 ou 13-LOX; EC 1.13.11.12) engendre des hydroperoxyacides gras (9 ou 13-HPOT pour l'acide linolénique) dont le devenir dépend de la voie de biosynthèse suivie (voie de la 13-LOX pour les jasmonates) (Howe et Schilmiller, 2002).

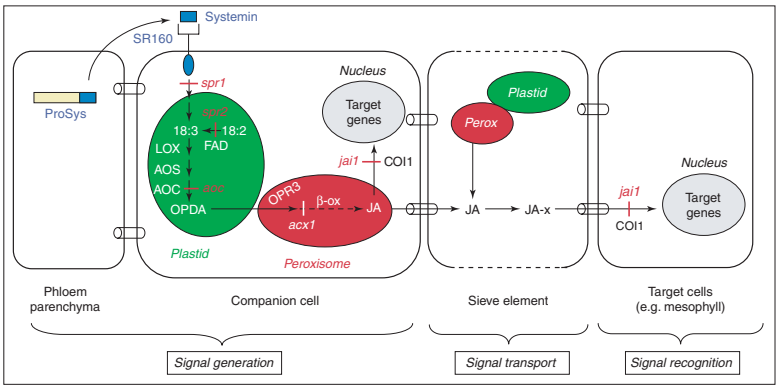


Figure 9. Chez la tomate, l'acide jasmonique est un signal phloème - mobile dont la synthèse est sous la dépendance de la systémine (un peptide signal) et de son récepteur membranaire (SR160). Au sein du faisceau cribro-vasculaire de la feuille, l'acide jasmonique est synthétisé dans la cellule compagne puis gagne le tube criblé via les plasmodesmes. C'est sous une forme acide ou conjuguée (à une autre molécule) qu'il joue pleinement son rôle de messager systémique au sein des cellules cibles (action sur les gènes cibles). AOC, allène oxyde cyclase, EC 5.3.99.6; AOS, allène oxyde synthase, EC 4.2.1.92; COI1, protéine F-box; FAD, désaturase d'acide gras, EC 1.14.19.-; JA, acide jasmonique; JA-x, forme covalente de l'acide jasmonique; LOX, lipoxygénase, EC 1.13.11.12; OPDA, acide 12-oxophytodiènoïque; OPR3, 12-oxophytodiènoate réductase 3, EC 1.3.1.42; ProSys, prosystémine (Schilmiller et Howe, 2005).

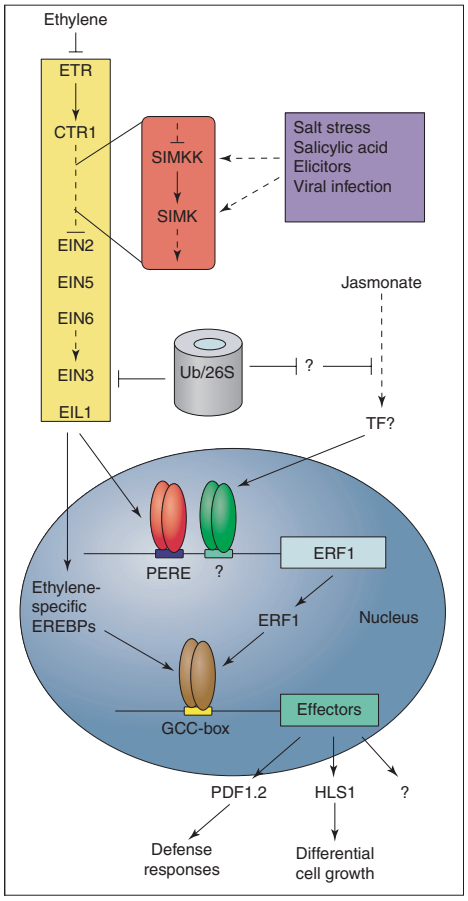
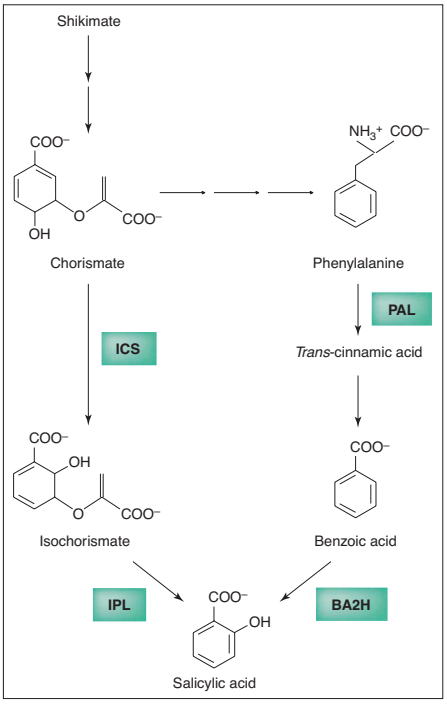


Figure 10. L'éthylène lève l'inhibition sur une voie métabolique (cascade protéique de facteurs de régulation, EIN, de transcription, EIN/L, EREBP dont ERF1, et d'éléments de réponse, PERE, PDF1.2 & HLS1) impliquée dans la défense et la croissance cellulaire. La partie en jaune est uniquement soumise au signal éthylène, les autres parties de la voie de signalisation sont aussi en relation avec d'autres stimuli. Ainsi, l'acide salicylique agit sur la voie SIMKK/SIMK, l'acide jasmonique interagit sur la régulation d'un gène impliqué dans la réponse à l'éthylène, ERF1. CTR1, réponse triple constitutive 1 ; EIL, protéine de type EIN3 ; EIN & EIR, éléments sensibles à l'éthylène ; (P)ERE(BP), (protéine de liaison à un) élément de réponse à l'éthylène (primaire) ; ERF, facteur de réponse à l'éthylène ; ETR, récepteur de l'éthylène ; HLS, élément impliqué dans la sensibilité de la crosse apicale ; PFD, défensine de plante ; SIMK(K), MAPkinase (kinase) inductible par un stress salin (Guo et Ecker, 2004).

L'acide salicylique (AS ou SA) est aussi un messager important (Macheix *et al.*, 2005). Il est impliqué dans la défense locale mais aussi dans la résistance systémique acquise. La synthèse d'acide salicylique se fait par la voie des shikimate-phénylpropanoïdes, grâce à la phénylalanine ammonia lyase (EC 4.3.1.5) et une hydroxylase de l'acide benzoïque (Fig. 11). Selon certains auteurs cette voie de biosynthèse est celle associée à la mort cellu-

Figure 11. La biosynthèse de l'acide salicylique, chez les plantes, pourrait emprunter une voie alternative. Habituellement, comme chez le tabac, l'acide salicylique est obtenu à partir de la phénylalanine via l'acide benzoïque. La phenylalanine ammonia lyase (PAL) catalyse la formation d'acide trans-cinnamique, cette voie assure aussi la biosynthèse des flavonoïdes, des lignines ainsi que d'esters d'hydroxycinnamates. Une acide benzoïque-2-hydroxylase (BA2H) peut permettre d'obtenir l'acide salicylique à partir d'acide benzoïque. La voie du shikimate peut aussi produire de l'acide salicylique grâce au pool de chorismate chloroplastique. Une isochorismate synthase putative (ICS codée par SID2 chez *A. thaliana*) pourrait œuvrer dans le chloroplaste pour obtenir de l'isochorismate. En considérant le modèle bactérien, une isochorismate pyruvate lyase pourrait le convertir ensuite en acide salicylique. (Wildermuth *et al.*, 2001 ; Shah, 2003).



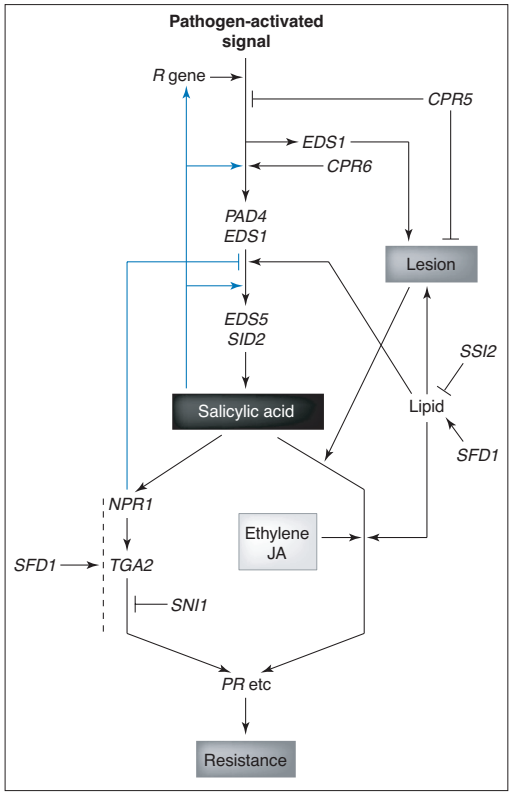
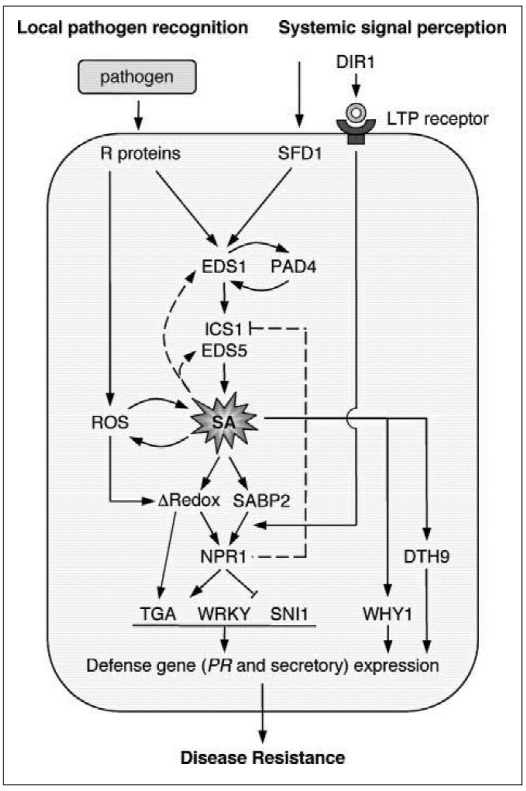


Figure 12. L'acide salicylique, et son réseau de signalisation (ici chez *A. thaliana*), permet la biosynthèse de protéines PR, actrices principales de la résistance chez les plantes. Il faut souligner le rôle prépondérant de EDS1. Il est impliqué dans le développement de la réponse hypersensible (HR) et dans la voie métabolique aboutissant à l'accumulation d'acide salicylique. SDF1 génère un signal lipidique qui active le réseau à différents niveaux (la HR mais aussi en amont et en aval de la synthèse d'acide salicylique notamment sur la voie dépendante de NPR1). L'activation des protéines PR se fait par deux voies complémentaires, l'une passant par NPR1 pour activer le gène PR-1, l'autre nécessite une HR, et semble activée par l'éthylène et l'acide jasmonique, en plus du signal acide salicylique. CPR, Expresseurs constitutifs de gènes PR ; EDS, élément sensible à l'infection ; JA, acide jasmonique ; PAD, élément lié à la synthèse des phytoalexines ; PR, protéines liées à la pathogénie ; R, gène de résistance ; SFD, élément agissant sur la FAD (cf. Fig. 9) ; SID, élément d'induction de l'acide salicylique ; SSI, élément agissant sur la sensibilité à l'acide salicylique ; TGA, protéine de liaison à l'ADN (codon TGA) (Shah, 2003).

laire (réponse hypersensible ; Fig. 12) (Shah, 2003). La voie du chorismate permet aussi de produire de l'acide salicylique, au niveau des plastes, avec l'isochorismate synthase (EC 5.4.4.2) et l'isochorismate pyruvate lyase (EC 4.99.-.-). Cette voie serait plus spécialement sollicitée durant le développement de la résistance systémique acquise (RSA ou SAR en anglais). La RSA permet une protection durable contre un large spectre de pathogènes par une action à la fois locale et systémique (Fig. 13) (Durrant et Dong, 2004). Le premier mes-

Figure 13. L'acide salicylique est la pierre angulaire d'une séquence d'événements aboutissant à l'induction de gènes de défense. Le déclenchement de cette séquence peut être obtenu par la reconnaissance d'un pathogène (messager local) ou par une autre cellule attaquée (signal systémique). EDS1 est un passage obligé avant d'atteindre l'acide salicylique. Ce dernier induit une activation génique selon deux voies complémentaires, l'une étant contrôlée par NPR1. On peut noter l'action d'une protéine de type LTP, DIR1, sur l'induction de cette voie NPR1 dépendante. La question d'un signal systémique, de nature lipidique, est examinée. DTH9 & WHY1, éléments indépendants inducteurs de la RSA ; LTP, protéine de transfert de lipide ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; SABP2, protéine de liaison à l'acide salicylique ; SNI1, élément pour l'induction des gènes PR en l'absence de NPR1 ; WRKY, superfamille de facteurs de transcription à motifs à doigts de zinc (Durrant et Dong, 2004).



sager systémique n'est pas l'acide salicylique et n'a pas été encore identifié. Ce messager agit en aval et induit l'augmentation de la concentration en acide salicylique dans les feuilles matures et le phloème. Des résultats récents suscitent l'hypothèse d'une molécule lipidique (Moldano *et al.*, 2002). Le gène DIR1 semble être à l'origine d'un messager systémique phloémien. Les protéines DIR1 ont une homologie structurale avec les LTP (pour « lipid transfer protein »), une famille multigénique impliquée dans le métabolisme des lipides. Une protéine se liant à l'acide salicylique, SABP2, présente une activité lipase qui est activée par celui-ci. Sa position dans la RSA n'est cependant pas encore bien établie. SFD1 code pour une protéine impliquée dans la synthèse glycérolipidique. Elle joue aussi un rôle non précisé dans la RSA. Bien que n'étant pas le signal initial, l'acide salicylique reste un élément central de la RSA. L'acide salicylique est retrouvé (sous cette forme libre ou conjugué en méthyl-salicylate, volatile, ou encore en ß-glucosyl-salicylate) dans l'ensemble de la plante (Fig. 14) (Durner *et al.*, 1997). De nombreuses boucles retour sont associées à cette molé-

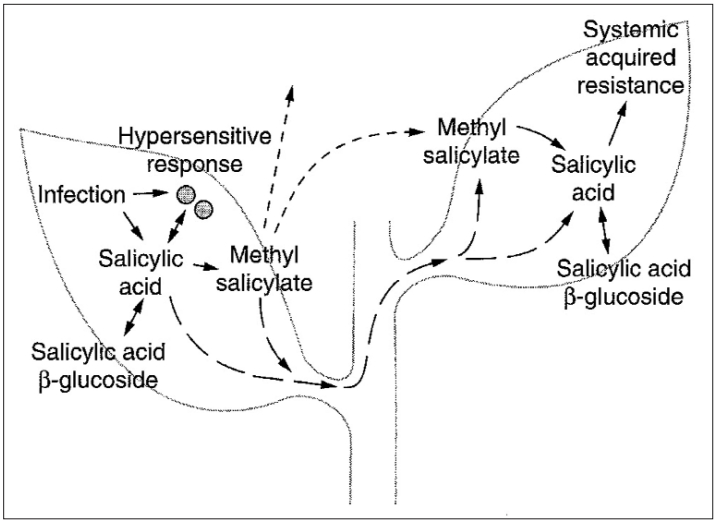


Figure 14. L'acide salicylique est un messager local et systémique de la réponse à une infection par un pathogène. L'infection d'une plante résistante conduit à la réponse hypersensible, une nécrose limitant le pathogène dans son développement. Autour du site d'infection, une batterie de défenses est induite. Des protéines PR, peroxydases, phytoalexines et enzymes pour le renforcement des parois sont synthétisées dans les cellules avoisinantes. Certains gènes sont activés à distance et sont impliqués dans la SAR. L'acide salicylique est nécessaire à cette réponse, localement et à distance. Lors de son accumulation, il peut être stocké sous forme conjuguée (acide ß-glucoside salicylique). On retrouve aussi le méthyl-salicylate qui peut agir à distance sous forme gaz comme signal de défense. À température ambiante, sous forme liquide, il peut migrer dans la plante (comme l'acide) via le système vasculaire (Durner *et al.*, 1997).

cule (Shah, 2003). L'application d'acide salicylique induit l'expression des gènes de résistance R, permet l'accumulation de formes actives de l'oxygène et promeut la réponse hypersensible. Une cascade protéique, avec NPR1, fait suite à l'acide salicylique et agit sur des facteurs de transcription (TGA). Ces derniers jouent sur l'expression des PR protéines ainsi que des protéines de sécrétion dans tous les tissus. NPR1 est aussi impliqué dans un autre phénomène de résistance appelé « résistance systémique induite » (RSI, ISR en anglais).

En fait, toutes ces voies de signalisation s'interconnectent et s'autorégulent via des événements d'activation ou de répression formant un vaste réseau en constant réarrangement au gré des signaux reçus (signaux locaux et systémiques). D'autres phytohormones agissent aussi au sein de ce réseau de signaux. Il s'agit d'auxines et de l'acide abscissique

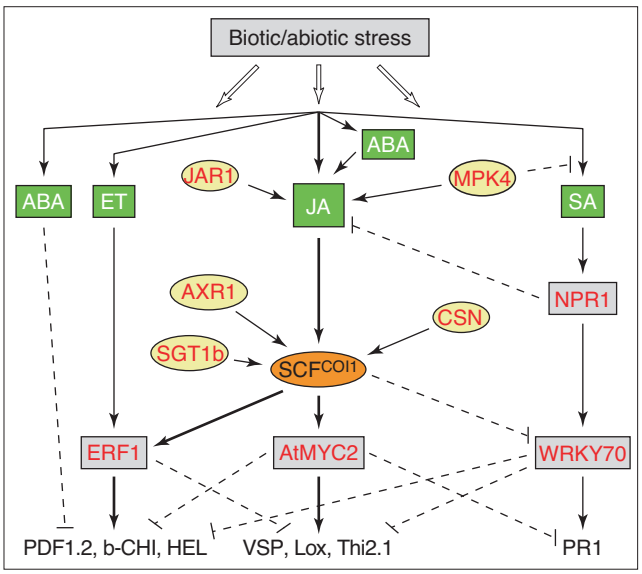


Figure 15. Les voies de signalisation sont interconnectées et influencées par l'acide abscissique (ABA). Chaque voie favorise l'activation de gènes de défense particuliers et agit, souvent par répression, sur les autres voies. L'ABA fait de même en favorisant la voie de l'acide jasmonique (JA) et réprimant les gènes induits par la voie de l'éthylène (ET). Ce réseau de régulation assure à la plante une réponse adaptée aux différents stimuli (biotiques ou abiotiques). JAR, amino-jasmonate synthétase ; SCF^{COI1}, complexe ubiquitine ligase comprenant COI1 ; AXR, CSN & SSGT1b, gènes de la voie ubiquitine-protéasome (Lorenzo et Solano, 2005).

(ABA ; Fig. 15) (Lorenzo et Solano, 2005). Ce dernier à une action positive sur l'acide jasmonique mais réprime les facteurs de transcription induits par l'acide jasmonique et l'éthylène. Tous deux agissent aussi, via des récepteurs membranaires, sur des GTPases (puis sur des phospholipases C et D pour l'ABA) aboutissant à des protéines kinases. Un cas, parmi de nombreux autres, est la répression par NPR1 de la voie de l'acide jasmonique (Fig. 16) (Pieterse et Van Loon, 2004) favorisant les éléments de réponse à une infection au détriment des éléments de réponse à une blessure. Néanmoins, la voie de l'acide jasmonique peut en retour agir sur le facteur WRKY, autre facteur de transcription de la voie de l'acide salicylique.

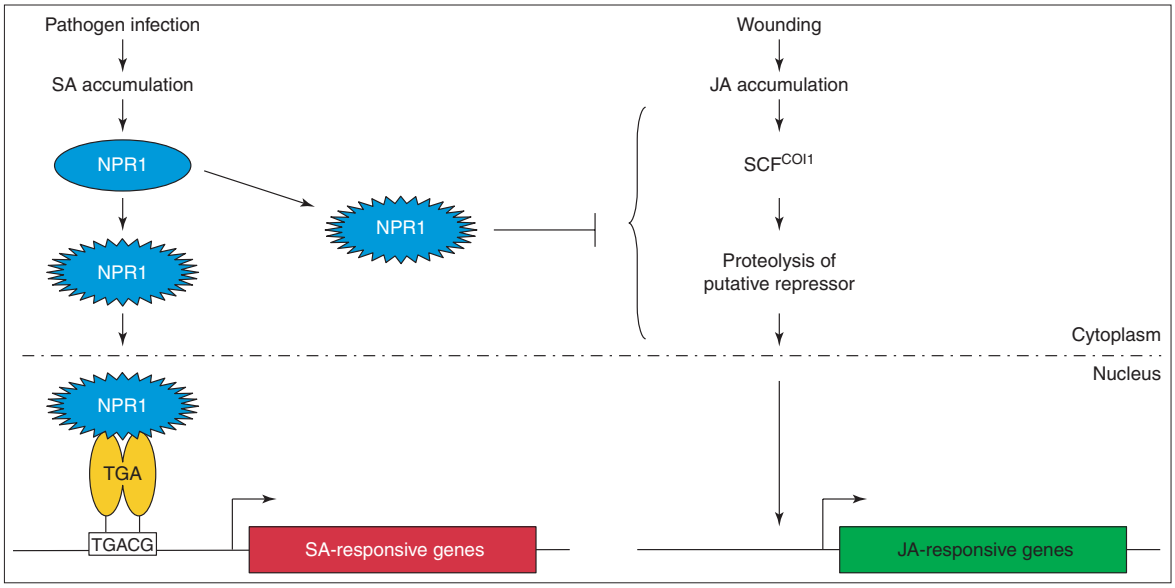


Figure 16. NPR1, l'agent double de la voie de signalisation de l'acide salicylique dans les processus de défense. Il pourrait agir sous forme activée (réduction de ponts disulfure), à la fois par activation des gènes de la voie de l'acide salicylique (induite par une infection) et par répression cytoplasmique de la voie de l'acide jasmonique (induite par une blessure) (Pieterse et Van Loon, 2004).

2.3.3 - La mort cellulaire

Il s'agit d'un événement fréquent chez les plantes au cours de leur développement. On parle alors de mort cellulaire programmée (van Doorn et Woltering, 2005). Elle peut être de trois types. L'apoptose, mécanisme répandu chez les animaux, est l'objet d'un débat en ce qui concerne les plantes. L'autophagie permet d'éviter une mort cellulaire ou de recycler les constituants cellulaires avant que la mort ne survienne (Seay *et al.*, 2006). Enfin, un processus non-lysosomal correspond à une autolyse, notamment réalisée par inhibition des principales voies de biosynthèse et désorganisation des membranes. Cette dernière catégorie pourrait englober les cas d'interaction plante - pathogène, pour lesquels on emploie le terme de « réponse hypersensible ». Le mot « hypersensible » est employé pour la première fois par le phytopathologiste américain Elvin Charles Stakman (1885-1979) en 1915. Il caractérise une mort rapide des cellules végétales en relation avec une limitation de la croissance du pathogène. Elle se traduit par une tache nécrotique brune dont la taille est variable, une ou plusieurs cellules, et s'étend à partir du site d'infection. La réponse hypersensible est induite par l'interaction des produits des gènes R et avr, relayés par des éliciteurs spécifiques. Les formes actives de l'oxygène ainsi que l'acide salicylique sont aussi impliqués, tout comme certains éliciteurs généraux (Heath, 2000).

Les premières observations faites sur la rouille du blé (*Puccinia graminis tritici*) par R.F. Allen en 1923 mettent en évidence une modification de la forme du noyau et parfois la disparition de la vacuole centrale. Néanmoins, la comparaison avec l'apoptose bien connue chez les animaux ne semble pas envisageable (Heath, 2000). Dans les premiers temps les courants cytoplasmiques cessent, ce qui ramène le noyau loin de la zone d'entrée du pathogène. Le cytosquelette est altéré, la vacuole et les mitochondries se désorganisent. L'ADN est dénaturé et formera des granules. La membrane plasmique perd son hémiperméabilité et se contracte. La cellule devient marron et autofluorescente, sans doute sous l'effet des composés phénoliques excrétés par les cellules voisines. Comme pour toutes les morts cellulaires programmées, les cystéines protéases ont un rôle prépondérant.

Cette réponse hypersensible, associée à un environnement antimicrobien, est considérée comme un moyen de lutte efficace contre les pathogènes biotrophes. Plusieurs stratégies permettent à certains parasites d'échapper à la déroute. Pour les pathogènes biotrophes il faut empêcher la mort cellulaire ainsi que la mise en place des défenses chez les cellules vivantes. Des hypothèses fondées sur des glucanes « suppresseurs de mort » chez *Phytophthora spp.* et des peptides « suppresseurs de réponses de défense » chez *Mycosphaerella pinodes* (non biotrophe) sont des éléments en faveur de l'existence de mécanismes de résistance chez les pathogènes biotrophes. Pour les parasites nécrotrophes, l'aubaine est trop belle! La réponse mort programmée permet la croissance du pathogène (Greenberg et Yao, 2004). La production de toxines et d'enzymes hydrolytiques, couplée à une croissance rapide, permet d'anesthésier ou de tuer la cellule avant la réponse hypersensible (Heath, 2000). Les phytotoxines permettent la réalisation d'une mort cellulaire programmée particulière. Celle-ci se caractérise par une chute du potentiel transmembra-

naire mitochondrial, une fragmentation de l'ADN et du noyau, mais les membranes plasmique et tonoplastique restent apparemment intactes. La plante, en formant un « no man's land» assez étendu, contre le parasite biotrophe mais doit en limiter la progression pour freiner le parasite nécrotrophe. Limitant ainsi la tache nécrotique de la réponse hypersensible, elle instaure un mécanisme contraire pour favoriser la survie cellulaire. L'autophagie serait donc initiée par un signal anti-hypersensibilité pour contrer le signal de mort programmée partant du site d'infection et gagnant les cellules adjacentes, de proche en proche (Seay *et al.*, 2006).

Dans le cas où la réponse hypersensible n'est pas stoppée et/ou propagée par des toxines, l'ensemble de la plante subira alors des dommages irréversibles. L'altération des fonctions trophiques (photosynthèse, nutrition minérale et hydrique) condamne l'organisme à plus ou moins brève échéance. Le pathogène est aussi condamné à rechercher un nouvel hôte quand les nutriments issus du précédent seront épuisés.

2.3.4 - L'organisation de la résistance dans le bois

Chez les espèces ligneuses, ces phénomènes de résistance se retrouvent dans le bois. C'est le compartimentage (Shigo, 1984; Rioux, 2004). Le compartimentage est la mise en place de barrières anatomiques qui limitent les dommages causés par le pathogène. Il est peut-être plutôt initié par l'embolie des tissus consécutivement à la prolifération fongique que par l'attaque elle-même (Rioux, 2000). Pour expliquer ces phénomènes, le modèle CODIT (Compartmentalization Of Decay In Trees) a été élaboré par A.L. Shigo & H.G. Marx en 1977. Selon celui-ci, il existe quatre barrières mises en place au sein du bois limitant la prolifération du pathogène (Fig. 17):

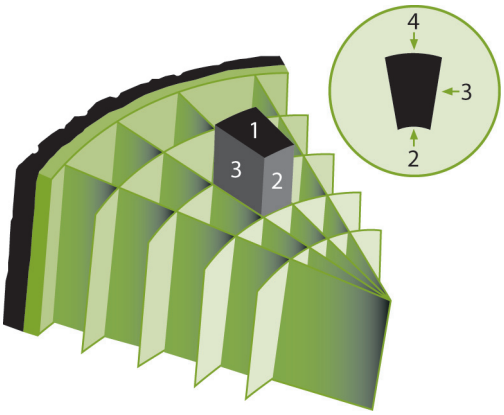


Figure 17. Le compartimentage chez les espèces ligneuses selon le modèle CODIT. Le développement de la nécrose est limité par un mécanisme de défense. Un modèle de ce dernier (élaboré par Shigo et Marx en 1977) met en évidence plusieurs composantes, barrières ou murs. Le mur 1 consiste à obturer les éléments conducteurs du bois. Le mur 2 est associé aux épaisses parois du bois final de chaque cerne annuel. Le mur 3, discontinu, est obtenu par la présence de rayons ligneux transversaux. Le mur 4 est mis en place à la suite de l'infection (bois de réaction) et correspond à une bande de cellules contenant souvent des composés antibiotiques et résistants aux micro-organismes (le cambium, couche de cellules métaboliquement très actives, peut constituer un rempart de type 4) (Rioux, 2004).

Barrrière 1, occlusion d'un (des) élément(s) de vaisseau par des thylles (évaginations de cellules parenchymateuses associées aux vaisseaux) ou par des gommes (ou gels) à base de pectines (sécrétés par les cellules parenchymateuses, mais aussi par les thylles); (Rioux *et al.*, 1998).

Barrière 2, épaississements pariétaux des dernières cellules de chaque cerne de croissance (bois d'hiver).

Barrière 3, rayons ligneux transversaux (unisériés ou plurisériés) formant une barrière discontinue. L'orientation à 90° et la plus faible communication avec les éléments longitudinaux morts du bois peuvent expliquer en partie l'efficacité de cette barrière.

Barrière 4, bande de cellules (variable en taille) contenant souvent des composés antimicrobiens. Elle est mise en place juste après infection et sépare le bois sain du bois infecté. Elle est initiée par le cambium. C'est la barrière la plus efficace et la plus durable.

L'ensemble de ces barrières contient des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005). Leurs parois sont fortement imprégnées de lignine et de subérine. Le cytoplasme des cellules qui demeurent vivantes contient de grandes quantités de phénols. Un autre rôle supposé est la formation de zones stratégiques isolées (sensibles aux pressions mécaniques) permettant l'accumulation de phytoalexines sans nuire aux zones saines. Le résultat est aussi la limitation de la diffusion de nutriments vers le pathogène et de toxines et/ou enzymes fongiques vers les zones saines. Les cellules associées aux vaisseaux (CAV) sont un des éléments importants du tissu xylémien. Elles sont très impliquées dans les réactions de défense. Elles subissent une réorganisation fonctionnelle avec amplification de l'appareil de transfert suite à des épaississements localisés de la paroi. La polarisation des flux se traduit par une augmentation de l'excrétion de gommes et de phytoalexines vers les éléments de vaisseaux (Fleurat-Lessard *et al.*, 2000). L'apposition de couches protectrices et la formation de thylles sont aussi le signe d'une réorganisation structurale.

La résistance physique est rarement systémique. Le renforcement des parois, de même que la réponse hypersensible (cf. ci-après), ne s'étend qu'à une zone restreinte et proche du site de l'attaque. Il existe cependant des cas où ces réactions s'observent à longue distance. C'est le cas de l'eutypiose pour laquelle il y a des modifications pariétales dans les tissus xylémiens au niveau des sarments de l'année bien que ceux-ci ne soient pas infectés (*Ibid.*).

3 - Le microbe, la plante… et l'humain

Qui dit "vigne cultivée" dit cultivateur. Depuis l'avènement du cultivateur, et la fin du chasseur – cueilleur, au début du Néolithique (il y a 10000 ans env.), jusqu'au chef d'entreprise moderne (soucieux de la déprise agricole et du prix du baril de pétrole), de l'eau a coulé sous les ponts. Néanmoins, le troisième partenaire reste le même, *Homo sapiens*, l'Homme moderne.

3.1 - La phytopathologie, une science d'héritages

Avec toute pratique culturale, tournée vers le rendement et aujourd'hui la rentabilité, l'agriculteur doit faire face aux aléas environnementaux, climat et maladies. L'agriculture a d'ailleurs généré des conditions propices au développement des maladies par l'ensemencement ou l'implantation, de manière répétée, d'une même espèce, d'une

même variété (et aujourd'hui, parfois, d'un même clone) sur des surfaces toujours plus étendues. Cet appauvrissement génétique a permis aux ravageurs de devenir des compétiteurs très bien adaptés. Pour cette raison, les grandes civilisations ont pu appréhender leurs conséquences sur les plantes cultivées (Théophraste et Pline l'Ancien ; cités par Corbaz, 1990). Cependant, les causes exactes leur sont restées inconnues, devant la prédominance des croyances religieuses ou magiques. Chez les Incas, les grains de maïs étaient triés afin d'en semer les plus beaux. Chez les Romains, le trempage (dans du vin ou de l'urine) et l'enrobage (dans du tourteau d'olives) étaient déjà en vigueur pour lutter contre les maladies des céréales (Orlob, 1971).

Le Moyen Âge est une période difficile à cerner pour les historiens des Sciences. Celle-ci est soigneusement évitée dans le domaine de la phytopathologie sauf peut-être par Karl Braun en 1933 (Orlob, 1971). La phytopathologie de l'époque se limite à décrire les divergences avec les plantes en bonne santé (hormis les dommages causés par les animaux). Le concept de spécificité des maladies (notamment pour les plantes) est absent de la pensée médiévale. La relation cause - symptômes n'est pas faite. D'autant plus que les considérations principales concernent plutôt les dégâts dus au climat, aux insectes et autres désordres naturels. De plus les conditions de culture sont pauvres. Peu d'engrais, une croissance limitée, une maturation inopportune et une stérilité des semences sont le lot quotidien des paysans. Cette époque est donc considérée comme statique pour l'avancée de la phytopathologie. À ce sujet, on peut identifier plusieurs périodes comme toutes les autres périodes de l'Histoire (Fig. 18) (Orlob, 1971).

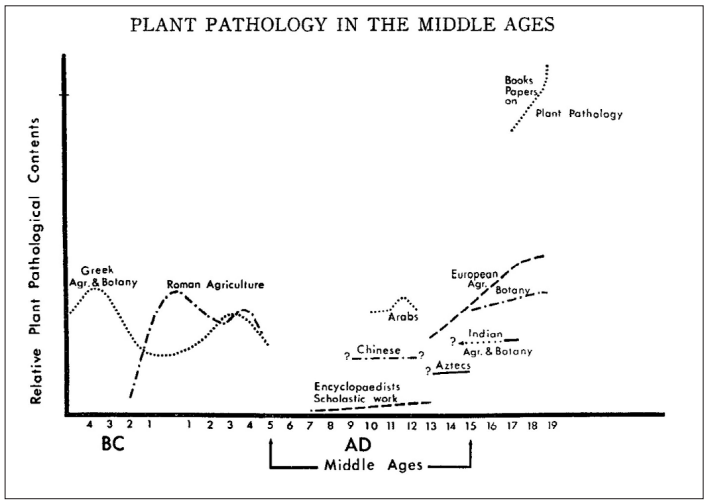


Figure 18. Le développement de la phytopathologie au cours des grandes époques, de l'antiquité à l'aube du XXe siècle. Il s'agit des contributions trouvées dans la littérature au cours d'une ère ou dans une civilisation. Ces contributions abordent des faits marquants (découverte de maladies, symptomatologie, diagnostic, causalité, contrôle, etc.). Les points d'interrogation indiquent une incertitude pour la datation (BC, avant JC ; AD, après JC) (Orlob, 1971).

Suite au déclin de Rome, le christianisme a la main mise sur tous ses « enfants », notamment les vilains et les serfs, seuls acteurs de la vie agricole. De 400 à 1000 après JC ce sont donc les «Âges Sombres» puis du XIe au XIIIe siècle, le renouveau de l'agriculture avec «les grands défrichements». Après la fin de l'Empire Romain unifié (395 ; mort de Théodose 1e) on trouve plutôt des reprises de textes plus anciens. Selon les auteurs antiques (p. ex. Théophraste, 370-287 avant JC), les symptômes observés sont le résultat d'une perturbation du cycle normal de la vie causée par des éléments internes ou externes. Peu de conseils concernant la lutte sont proposés. Durant le Moyen âge, les interprétations clima-

tiques ou célestes, basées sur des considérations religieuses (la volonté de Dieu), superstitieuses (l'esprit du maïs chez les Incas) ou anthropocentristes ont cours dans toutes les civilisations (Orlob, 1971 ; Semal et Lepoivre, 2003). La lutte contre les nuisibles fait plus souvent appel à la tradition qu'à des techniques mûrement réfléchies (celles-ci resteront employées jusqu'au XIXe siècle). Les maladies des plantes ne sont pas abordées dans les livres de théologie excepté l'ergotisme dans les livres de prière. Ce « mal des ardents » sévit sur les populations nourries de pain à base de seigle. Son parasite, *Claviceps purpurea*, libère de nombreux alcaloïdes toxiques et autres substances hallucinogènes (première description en 1582). L'influence de l'Église sur les connaissances dans le domaine de la phytopathologie permet uniquement la conservation des savoirs antiques. Ceux qui ont pu s'y soustraire n'ont pas été au contact de la nature (des « naturalistes de salon »). Les seigneurs sont plus intéressés par les affaires politiques et militaires. Les régisseurs ne tiennent pas de correspondances. Les paysans, illettrés, sont évidemment plus préoccupés par les conséquences des guerres, des épidémies, du gel et des insectes.

Geoponica est un traité d'agriculture Byzantine datant de 650 après JC environ et réédité aux environs de 950 sous le nom de l'empereur byzantin Constantin VII. Il reprend les observations de Palladius (De Re rustica, 350 env.) et de Pline l'Ancien (23 à 79 ; Naturalis Historia), acteurs essentiels de l'intérêt que les Romains et les Grecs ont porté à l'agriculture et à l'histoire naturelle en général. Cet ouvrage reprend aussi des savoirs ruraux mais propose peu de moyens de lutte. Viennent ensuite les naturalistes ironiquement dits de salon (« armchair naturalists » pour Orlob, 1971), plus écrivains que batteurs de campagne. On peut ainsi mentionner Isidore de Séville (530 env. - 636) qui fait « entrer la culture antique dans l'étroite cellule du Moyen âge » et Raban Maur (776-856), très inspiré par son prédécesseur mais récusant la modernité, « mère de dépravation intellectuelle ». Tous deux sont hommes d'église. C'est d'ailleurs le clergé et les ordres monastiques qui détiennent le savoir en sciences botaniques. Celui-ci reste pauvre en ce qui concerne la phytopathologie, à quelques exceptions prés. Il s'agit de Basile le Grand, archevêque de Césarée (329-379) qui écrivit sur une maladie des céréales (le charbon), mais aussi Hildegarde de Bingen (1098-1179) qui tenta l'élaboration d'un système liant les pathologies végétales à des facteurs cosmiques et surtout réalisa les premières illustrations de plantes atteintes. Albert le Grand (1193/1206-1280), dont le traité (*De animalibus*) sont basés sur les travaux de Palladius, tente d'expliquer les dysfonctionnements des plantes par des déficits fonctionnels. Il aborde aussi le contrôle des pathogènes. Cependant, chez ces auteurs, on trouve des descriptions de maladies (dépérissement, peste, rouille, mildiou ou charbon) plutôt que des noms spécifiques.

À la mort de Charlemagne (814), l'empire carolingien ne cesse de se morceller à partir du traité de Verdun (843) pour laisser, à la mort de Philippe Auguste (1223), une Europe chrétienne divisée (Capétiens et Plantagenêts entre autres). Elle est aussi coupée de ses voisins de l'est, le royaume de Bourgogne (Vallée du Rhône et Alpes) et surtout l'Empire Romain Germanique (Europe de l'Est et Balkans). C'est pourtant de l'est que vient le

renouveau, sans doute aidé par les flux commerciaux vers l'orient transitant par l'Italie du Nord. Aux XIIe et XIIIe siècles, on redécouvre les anciennes pratiques et connaissances des auteurs antiques notamment grâce aux penseurs de langue arabe et les sciences et techniques commencent à se développer. On peut notamment citer Vincent de Beauvais (1190-1264) et son Speculum Majus, grande encyclopédie des connaissances du Moyen âge et notamment Speculum Naturale, 32 livres sur l'histoire naturelle. Pietro de' Crescenzi (1233-1320/1321) réalise aussi un superbe travail, basé sur l'œuvre de Palladius. Son *Ruralia Commoda* est rédigé en plusieurs langues avec de nombreuses recommandations générales sur les maladies des plantes. Il traite aussi de viticulture et d'œnologie. Durant les siècles suivants, éditeurs et traducteurs lui feront de nombreux compléments. Gottfried von Franken (vers 1350) a écrit un traité d'arboriculture, Pelzbuch, basé sur de nombreuses sources anciennes et contemporaines. Conrad de Megenberg (1309-1374; Das Buch der Natur) écrivit sur l'histoire naturelle avec un chapitre détaillé sur les phénomènes météorologiques et sur les maladies des plantes (notamment une description du mildiou et de la rouille) en relation avec les cieux et le climat (rejoignant les auteurs anciens, grecs et romains). Les descriptions restent cependant très restreintes au regard de celles concernant les maladies humaines.

Les nations qui s'engagent dans les échanges commerciaux et la conquête maritime, peuvent accéder à des cultures et des savoirs jusqu'alors insoupçonnés. En Amérique centrale, le frère Bernardino de Sahagùn (1500 env. - 1590) produit une prodigieuse encyclopédie de la culture Aztèque, le *Codice florentino*, dans lequel il évoque deux maladies fongiques du maïs causant des famines, le charbon et la pourriture de l'épi. Les contrées de l'est ont une avancée comparable aux cultures de l'ouest. Ces civilisations ont une approche utilisant les concepts et la terminologie médicale. On y retrouve souvent la scarification et des pratiques de chirurgie. La Chine (Dynastie des Song et des Yuan, 960-1368), lors des années peu pluvieuses, doit faire face aux famines. L'Inde (avec la dynastie des Gupta du IVe et Ve siècle puis le mélange des civilisations hindoue et musulmane jusqu'au XVe siècle) regorge de recettes originales et sophistiquées basées sur une interprétation pseudo-médicale des maladies. Après la naissance de l'islam, en Arabie au VIIe siècle, les incursions en Perse et en Espagne ont influencé la phytopathologie médiévale. Ibn al-Awwam de Séville (mort vers 1185) auteur de Kitab al-filaha, le livre d'agriculture, décrit de nombreuses perturbations (maladies et désordres) des arbres fruitiers et de la vigne. Il préconise de nombreux remèdes (vin, cendres, vinaigre, tourteau d'olive) ainsi que des méthodes prophylactiques (la scarification pour expurger la mauvaise sève). Ibn al-Bassal (XIIe siècle) parle des germes du mal qui atteignent les arbres. Ces civilisations sont plus précises dans leur description des maladies, les Aztèques parlent de la pourriture de l'épi de maïs et Ibn al-Awwam de la cloque de feuille du pêcher. Les Aztèques portent une attention particulière dans l'interaction des plantes avec leur environnement, dans la conjonction avec le climat, le sol et les nuisibles. Les Chinois ont une bonne compréhension du parasitisme, le champignon étant le pensionnaire et l'arbre le propriétaire ou l'hôte. Les mesures prophy-

lactiques et curatives sont recommandées mais pas clairement explicitées. Un même traitement est souvent appliqué à plusieurs affections. Les notions de sympathie et d'antipathie, les références animistes et les sacrifices (notamment humains chez les Aztèques) sont monnaie courante.

Malgré tout, la phytopathologie commence à prendre une nouvelle ascension à la fin du XVIIIe siècle. Elle ne repose plus uniquement sur les savoirs antiques mais sur des observations et des recherches faites dans la nature. Un retour à l'état de nature ? À l'aube du XXe siècle les études mécanistiques prévalent sur la compréhension des interactions plante - pathogène. De nombreuses découvertes ont contribué, directement ou indirectement, à l'avancée de cette science et des applications pour le contrôle des maladies. Rappelons simplement rappeler la découverte de la structure en double hélice de l'ADN qui a valu à F.-H.-C. Crick (1916-2004), J.-D. Watson (1928-) et M.-H.-F. Wilkins (1916-2004) le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1962. Elle a servi de tremplin à la génétique moderne au même titre que les travaux de Grégor Mendel (1822-1884), son père fondateur. Ainsi les études en phytopathologie sont passées de la physiologie et la biochimie à la génétique moléculaire et au clonage. Maintenant ce sont ces domaines qui tiennent le haut du pavé et, comme le souligne N.-T. Keen (2000), l'orage gronde sur cette science. À nous d'en rester conscient.

3.2 - La phytopharmacie, le tout chimique ?

La phytopathologie, science étudiant les maladies des plantes, est relativement récente. La thèse de la génération spontanée est restée bien ancrée dans les mœurs jusqu'au XVIIIe siècle. Mais, la science gagne timidement du terrain pour élargir le champ des connaissances, aidée en cela par des révolutions techniques. En 1665, une observation microscopique de la rouille du rosier, par Hooke, donne lieu à une représentation assez réaliste du site d'infection (Semal et Lepoivre, 2003). En 1729, Micheli met en évidence la contamination par des spores aériennes. En 1775 Mathieu Tillet réalise les premières expérimentations en champ sur la carie du blé (Corbaz, 1990). Au XVIIIe siècle, les traitements sont à base de chaux et de saumure. En élucidant la carie de céréales (champignon parasite exogène), Prévost établit les bases de la phytopathologie moderne (1807 ; cité par Semal et Lepoivre, 2003). En 1845 une grande famine pousse les Irlandais à l'exil. De Bary publie la première monographie de pathologie végétale en 1853 et confirmera l'identité de l'agent fongique du mildiou de la pomme de terre (*Phytophtora infestans*) en 1888. En 1878, le feu bactérien des Rosacées est élucidé par Burril (Semal et Lepoivre, 2003). En 1885, Millardet met au point la bouillie bordelaise. Soufre et cuivre entrent dans les principaux produits de lutte contre les maladies des plantes au cours du XIXe siècle. Fin XIXe et début du XXe siècle les premières revues scientifiques spécialisées voient le jour (de « Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten » en 1891 jusqu'à « Review of Plant Pathology » en 1922, et « Annual Review of Phytopathology » en 1963) (Corbaz, 1990). Les premiers pesticides de synthèse sont commercialisés dans les années 1940. En 1968, le premier congrès international de

pathologie végétale est organisé. Les maladies prennent de l'ampleur avec l'évolution de l'Agriculture moderne, des transports et la spirale des traitements phytosanitaires (phénomènes de résistance). Un accroissement des rendements des surfaces agricoles est observé, cette amélioration de productivité est imputable à divers paramètres (Fourche, 2004) : la sélection variétale et clonale, l'évolution des techniques et des technologies et enfin la généralisation de l'usage des intrants. Ces derniers sont les engrais, les amendements (pour l'amélioration des propriétés physiques et chimiques du sol), les produits phytosanitaires, les activateurs et retardateurs de croissance, apportés aux terres et aux cultures.

Les civilisations ont appréhendé très tôt les atteintes faites aux cultures. Par la suite, certains exploitants se sont essayés à la lutte contre les ravageurs, las de subir de conséquentes déperditions à chaque récolte (jusqu'à trois fois plus de semences que la quantité nécessaire). Après les méthodes « manuelles » d'élimination des indésirables (prélèvement des insectes, désherbage, lessivage et élimination des parties ou plantes infectées) et de prévention (obstacles, appâts empoisonnés), les premières méthodes de lutte chimique ont vu le jour au milieu du XIXe siècle avec des traitements à base de minéraux. C'est dans les années 1840 que le soufre permet le contrôle du mildiou de la vigne. Puis vinrent les autres composés, hautement toxiques, comme les arséniates et les cyanures. Les premiers extraits végétaux ont aussi attiré l'attention (p. ex. nicotine, pyrèthre, etc.) notamment pour lutter contre le phylloxera (1870 ; mais ce sera un échec); il ne sera éradiqué qu'après les années 1880, avec l'utilisation de porte-greffes américains résistants au puceron responsable de la maladie. Au cours du XXe siècle, les technologies permettent une évolution des méthodes physiques de lutte (désherbage électrique ou électromagnétique, collecte d'insecte par système pneumatique).

En 1882, la célèbre bouillie bordelaise (mélange de chaux et de sulfate de cuivre) est accidentellement découverte pour lutter contre les mildious de la vigne et de la pomme de terre. Les premiers produits phytosanitaires de synthèse sont apparus dans les années 1940, avec l'espoir d'une éradication des agents pathogènes. Ce sont essentiellement des composés organiques, les insecticides en première place. Ils contribuent et profitent de l'essor des firmes phytosanitaires spécialisées et des outils d'application spécifiquement développés. Par ailleurs, la mondialisation émergente engendre des flux de transport, surtout commerciaux, générant une propagation importante de divers pathogènes. Dans un premier temps, la profusion de substances phytosanitaires de synthèse laisse augurer l'espoir d'une annihilation des ravageurs (milieu du XXe siècle). L'exemple flagrant reste celui du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane, organochloré aujourd'hui interdit en France), synthétisé dés 1874 par Othmar Zeidler (pharmacien autrichien) et dont les propriétés insecticides ne seront mises au jour qu'en 1940 par un chimiste suisse, Paul Hermann Müller (ce qui lui valut le prix Nobel de physiologie et médecine en 1948 ; Ordish, 2006). L'avènement d'autres composés organochlorés et organophosphorés renforce cette impression. Les premières molécules systémiques voient le jour. Après les insecticides et les herbicides, quelques produits antifongiques (notamment des carbamates) trouvent un marché porteur.

Peu après, devant les succès relatifs apportés par ces molécules, un débat s'engage sur leurs effets sur l'Homme et l'environnement (R. Carson, 1962 ; cité par Ordish, 2006 & Coleno, 1989). En effet, cette profusion de nouvelles matières actives a permis l'essor de l'agriculture moderne et productiviste. Ainsi, directement et indirectement, celle-ci a permis d'assurer la sauvegarde ou la survie de millions de personnes au sortir de la deuxième guerre mondiale. Néanmoins, apparaît rapidement le revers de cette glorieuse médaille. L'absorption des molécules par les tissus et les muqueuses est à l'origine d'empoisonnements. L'accumulation des produits phytosanitaires tout au long des chaînes trophiques et la rémanence dans les sols conduisent à une modification de l'environnement et augmentent le risque de contamination pour l'Homme. Enfin, les usages répétés sur les cultures conduisent irrémédiablement à la sélection de pathogènes résistants. La spirale infernale se déroule alors, avec l'augmentation des doses pour une efficacité toujours plus faible. Ainsi les biocénoses s'en trouvent modifiées irrémédiablement. Rachel Carson, biologiste américaine, publie en 1962 « Silent Spring » et amorce ainsi un important virage stratégique dans la lutte contre les nuisibles. On passe ainsi, dans la deuxième moitié du XXe siècle, du tout chimique à une esquisse de lutte intégrée et raisonnée. Le nombre de produits à commercialiser diminue perceptiblement, avec un choix délibéré pour des molécules à plus faible rémanence (années 1970). Conséquemment, le nombre de firmes phytopharmaceutiques diminue aussi. Peu à peu, des stratégies alternatives au tout chimique voient le jour dans le domaine expérimental. La vision défendue à partir de ce moment n'est plus l'éradication mais la restriction de la pression pathogénique à un niveau « culturalement » et commercialement acceptables. En 2003, on estime que 2,5 millions de tonnes de pesticides sont utilisés annuellement sur notre planète. De plus, la part qui agit véritablement sur les pathogènes est évaluée à moins de 0,3 % de la quantité épandue. Pourtant, quelques auteurs persistent à répéter (p. ex. Boullard, 1990) que cette lutte passe par la conservation de la biocénose afin de profiter pleinement de ses influences bénéfiques (antagonisme avec les pathogènes). Un enrichissement artificiel de cette biocénose peut aussi être une solution plus « propre ». Ainsi, se maintient et s'affirme la notion de « lutte intégrée » utilisant la prophylaxie de concert avec les luttes biologique et chimique.

Le nouveau créneau de la recherche à l'aube du XXIe siècle est l'utilisation de la génétique et la production d'OGM / PGM (Organismes ou Plantes Génétiquement Modifié(e)s). L'utilisation d'auxiliaires de culture (notamment des antagonistes aux pathogènes) permet de limiter le taux d'agression (Bonnemain et Chollet, 2003). Des molécules plus spécifiques alliées à un matériel d'administration plus performant, permettent un meilleur ciblage des processus curatifs (Coleno, 1989). Des directives européennes réglementent l'usage des produits phytosanitaires et recommandent les bonnes pratiques (EPPO, 2002). Il s'agit de l'homologation du produit commercial et de la fixation du mode d'utilisation. Il faut noter l'arrivée récente sur le marché de produits stimulateurs des défenses naturelles (SDN ; p. ex. Aziz *et al.*, 2003). Pour ces derniers, la législation concernant les produits de synthèse n'est pas des plus adaptées. Après la science, la politique ?

3.3 - Les fongicides et leur cible

Les interactions plante-champignon sont multiples et anciennes. Les premiers agents pathogènes identifiés ont été des champignons (Rapilly, 2001). On estime qu'entre 10 et 30 % (selon le type de culture) des dégâts causés aux cultures sont imputables aux maladies fongiques. Ils se traduisent par une diminution du rendement et une modification qualitative de la production (p. ex. le taux en laccases dans les jus de raisins, activité enzymatique attribuée à *B. cinerea*). Les fongicides représentent 30 % du chiffre d'affaire mondial (25 milliards d'euros) réalisé pour l'ensemble des pesticides (Leroux, 2005). Chaque molécule active doit tenir compte de plusieurs facteurs afin de faire pleinement son office. Elle doit être active sur le champignon ciblé et, dans le cadre d'une lutte raisonnée, se contenter de cette seule espèce (voire un groupe d'espèces). Ainsi se profile une réflexion sur l'efficacité du produit face à son impact environnemental. Selon P. Leroux (2005), la lutte chimique contre les protistes et protozoaires fongiformes est encore difficile.

Bien souvent, les matières actives sont classées en fonction de la (ou des) cible(s) moléculaires démontrées ou supposées : fongicides affectant les processus respiratoires, les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols, les antimicrotubules, les autres molécules à cible directe et les stimulateurs des défenses des plantes. Ces molécules peuvent aussi être classées en fonction de leur nature chimique, souvent en relation avec leur activité. Enfin, le degré de mobilité de la préparation commerciale peut être pris en compte. Voici une revue des molécules agissant, directement ou indirectement, sur les champignons phytopathogènes. On trouve dans la littérature de nombreuses manières de classer les molécules. La plus répandue reste néanmoins celle différenciant le mode d'action (connu ou supposé) du principe actif. Je suivrai en cela le découpage proposé par le FRAC (Fungicide Resistance Action Committee, « Comité d'Action sur la Résistance aux Fongicides »). Ces données, résumées sur la figure 19, sont aussi tirées des travaux de P. Leroux et de son équipe

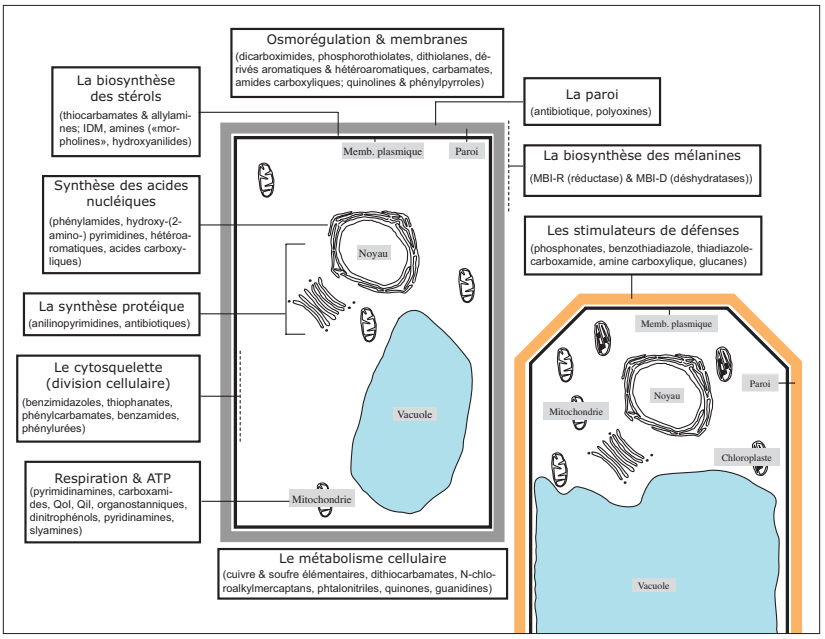


Figure 19. Les grandes familles de molécules pour la lutte contre les champignons phytopathogènes, classées selon leur mode d'action. La cellule fongique est celle à paroi grise, la cellule végétale est à paroi orange.

(Gullino *et al.*, 2000; Leroux, 1980 et 2005; Leroux *et al.*, 2002) ainsi que de Y. Uesugi (1998).

3.3.1 - Classe A: Molécules agissant sur la synthèse des acides nucléiques

Elles se répartissent en quatre groupes.

• *Le plus important d'entre eux concerne les phénylamides*, inhibiteurs de l'ARN polymérase I (EC 2.7.7.6). Cette enzyme prend part à la synthèse des ARN ribosomiaux (ARNr). On a donc ici un lien à la fois avec la synthèse des acides nucléiques et avec celle des protéines. Les premières molécules sont apparues à la suite des recherches menées sur les herbicides du groupe des chloroacétanilides, dans les années 1970.

Trois familles chimiques sont représentées ici:

- les acylalanines: bénalaxyl (CAS 71626-11-4), furalaxyl (CAS 57646-30-7), métalaxyl (CAS 57837-19-1) et méfénoxam (= métalaxyl-M; CAS 70630-17-0),
- une oxazolidinone: oxadixyl (CAS 77732-09-3)
- et une butyrolactone: ofurace (CAS 58810-48-3).

Ce sont des molécules systémiques apoplastiques utilisées contre les Oomycètes. Des résistances sont apparues notamment sur les mildious, avec une diminution de l'affinité du composé avec la cible chez *Phytophtora infestans*.

• *Viennent ensuite les hydroxy (2-amino-)pyrimidines* ayant une action sur l'adénosine désaminase (EC 3.5.4.4) qui hydrolyse l'adénosine en inosine avec élimination d'ammoniaque. Un seul groupe chimique est représenté, avec trois pyrimidines: bupirimate (CAS 41483-43-6), diméthirimol (CAS 5221-53-4) et éthirimol (CAS 23947-60-6). Un risque de résistance est connu chez les mildious.

• *Le troisième groupe concerne des hétéroaromatiques* dont la cible proposée est la synthèse d'ADN et ARN. Deux groupes chimiques sont représentés:

- un isoxazole: hyméxazole (CAS 10004-44-1),
- une isothiazolone: octhilinone (CAS 26530-20-1).

Aucun cas de résistance à ces deux molécules n'a été signalé.

• *Enfin le quatrième groupe se restreint à un acide carboxylique* agissant sur la gyrase de l'ADN (ADN topoisomérase II; EC 5.99.1.3). Il s'agit de l'acide oxolinique (CAS 14698-29-4). Ce composé est plutôt connu pour son activité bactéricide. Une résistance a été mise en évidence chez des bactéries du genre *Pseudomonas* et *Erwinia spp.*.

3.3.2 - Classe B: Molécules agissant sur la mitose et la division cellulaire, dont la cible est l'assemblage de la ß-tubuline.

Elles se répartissent en quatre groupes.

• *Le groupe principal est celui des méthyl benzimidazole carbamates (MBC)*. À la fin des années 1960, ils ont été les premiers fongicides systémiques apoplastiques curatifs. Deux familles chimiques font partie des MBC:

- les benzimidazoles: bénomyl (CAS 17804-35-2), carbendazime (CAS 10605-21-7), fubéridazole (CAS 3878-19-1) et thiabendazole (CAS 148-79-8),

- les thiophanates : thiophanate (CAS 23564-06-9) et méthyl-thiophanate (CAS 23564-05-8).

La liaison avec la ß-tubuline est obtenue chez les Ascomycètes et Basidiomycètes. Elle est beaucoup plus faible sur les Oomycètes et sur certains Deutéromycètes. La résistance est bien connue chez de nombreuses espèces (mutations Y200F et E198K, V, G ou A). On observe donc une résistance croisée positive au sein de ce groupe. Avec les N-phénylcarbamates, il existe une résistance croisée positive avec la mutation en position 200 et négative avec celle en position 198.

• *Le deuxième groupe est celui des N-phénylcarbamates.* Le diéthofencarbe (CAS 87130-20-9) est souvent utilisé en association avec le carbendazime. Cependant, cette stratégie a été contrée par une résistance croisée positive chez *Botrytis cinerea*.

• *Dans le troisième groupe, les benzamides,* nous avons des analogues d'un herbicide développé depuis longtemps, le propyzamide. Il s'agit de la zarilamide (CAS 84527-51-5), non développé pour des raisons toxicologiques, et la zoxamide (CAS 156052-68-5) utilisée contre les mildious de la vigne et de la pomme de terre. Son action est surtout préventive (liaison covalente à la tubuline). Le risque d'apparition de résistance est peu élevé mais il est préférable d'effectuer les traitements en association avec un fongicide multi-site.

• *Le dernier groupe présente une action similaire à celle des benzimidazoles* et parfois une résistance croisée négative avec ceux-ci. La cible se situe donc au niveau des microtubules, mais rien n'indique qu'il s'agit aussi des ß-tubulines. Une seule molécule appartient à ce groupe de phénylurées, le pencycuron (CAS 66063-05-6). Il est non systémique et spécifique de *Rhizoctonia solani*.

3.3.3 - Classe C : Molécules agissant sur la respiration (Fig. 20 A & B)

La chaîne respiratoire mitochondriale des champignons permet la formation d'ATP après une cascade métabolique orchestrée par cinq complexes enzymatiques (Joseph-Horne *et al.*, 2001). Les inhibiteurs pour chacun des complexes sont répartis en sept groupes et sous-groupes.

• *Les inhibiteurs (supposés) du complexe I* sont du groupe chimique des pyrimidinamines. Il s'agit du diflumétorim (CAS 130339-07-0) pour lequel aucune résistance n'est connue. En 1997, il est commercialisé pour les plantes ornementales, dont les *Chrysanthemum* et les roses.

• *Les inhibiteurs du complexe II* sont plus nombreux. Ils font partie du groupe des carboxamides, du groupe chimique des cis-crotonanilides. Les premières molécules ont été mises au point dans les années soixante : carboxine (CAS 5234-68-4) et oxycarboxine (CAS 5259-88-1) sont des molécules systémiques apoplastiques. Les plus récents sont : bénodanil (CAS 15310-01-7), fenfuram (CAS 24691-80-3), flutolanil (CAS 66332-96-5), furametpyr (CAS 123572-88-3), mépronil (CAS 55814-41-0), penthiopyrad (CAS 183675-82-3), thifluzamide (CAS 130000-40-7) et boscalid (CAS 188425-85-6) qui est le dernier né. Le complexe II intervient à la fois dans la chaîne respiratoire et aussi dans le cycle de Krebs (du citrate)

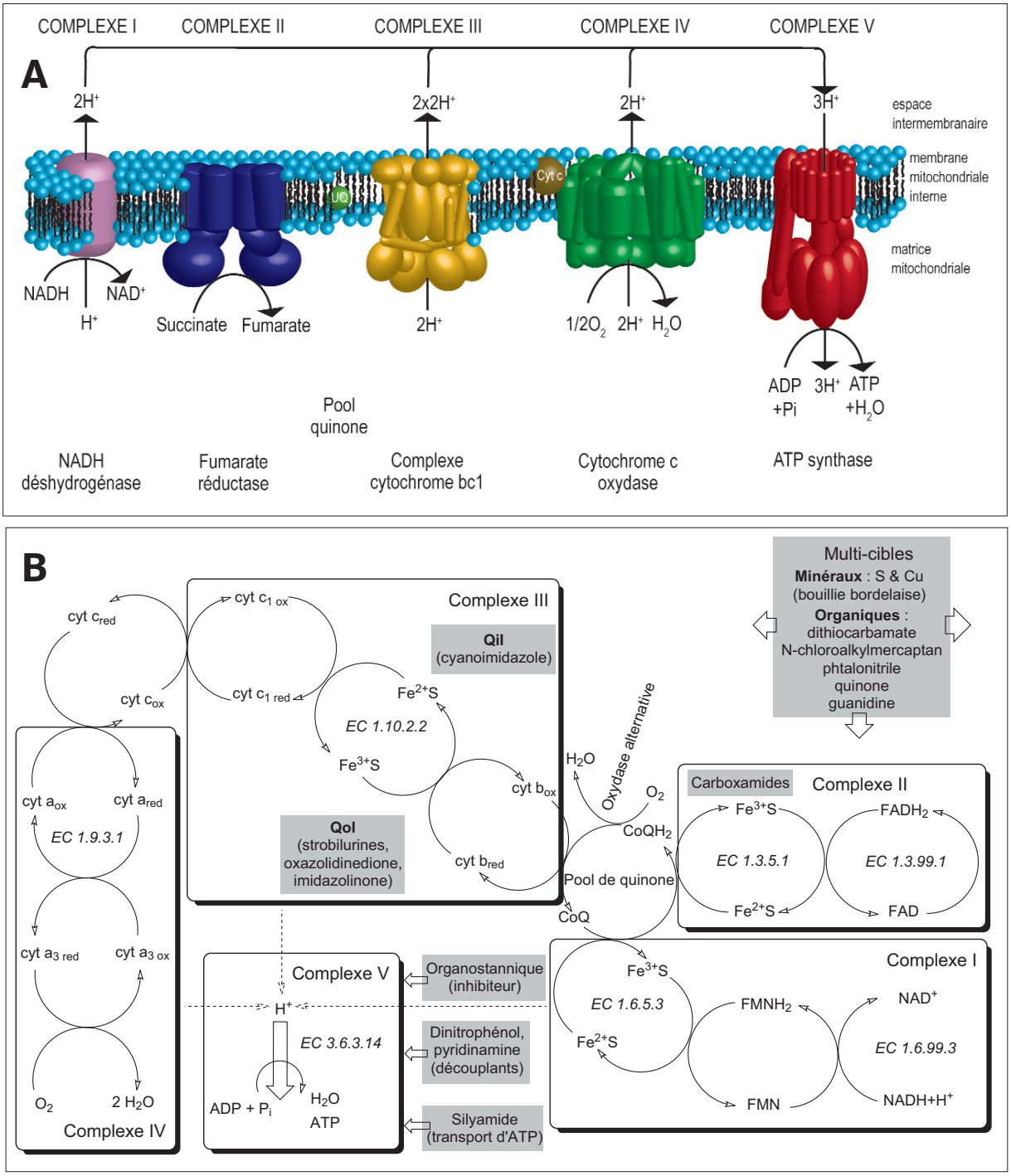


Figure 20. Les molécules antifongiques agissant sur les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Modélisation des complexes (I à V) de transport des électrons (A ; Rocher, 2004) et cibles des molécules sur la chaîne enzymatique (B ; d'après Leroux, 2005). Enzymes concernées : EC 1.3.5.1 : succinate deshydrogénase, EC 1.3.99.1 : succinate deshydrogénase (composante de EC 1.3.5.1), EC 1.6.5.3 : NADH deshydrogénase, EC 1.6.99.3 : NADH deshydrogénase (composante de EC 1.6.5.3), EC 1.9.3.1 : cytochrome c oxydase, EC 1.10.2.2 : ubiquinol-cytochrome c réductase, EC 3.6.3.14 : ATP synthase.

(Fig. 21). L'activité enzymatique correspond à une fumarate réductase (ou succinate deshydrogénase). Cet ensemble est constitué en deux unités de quatre protéines. Une flavoprotéine et une protéine fer-soufre sont toutes deux matricielles. La première lie le succinate, l'autre assure la liaison au pool des quinones. Deux autres protéines assurent l'ancrage du

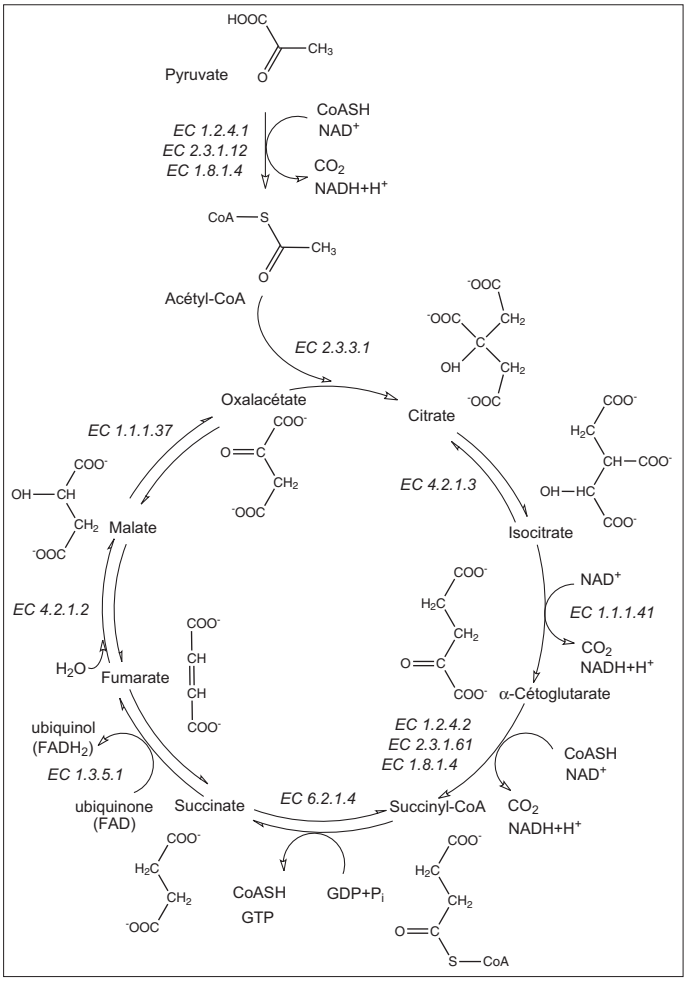


Figure 21. Le cycle de Krebs (ou cycle du citrate). À noter l'activité succinate deshydrogénase qui est aussi impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale (EC 1.3.5.1). Enzymes concernées : EC 1.1.1.37 : malate deshydrogénase, EC 1.1.1.41 : isocitrate deshydrogénase, EC 1.2.4.1 : pyruvate deshydrogénase, EC 1.2.4.2 : α-cétoglutarate deshydrogénase, EC 1.3.5.1 : succinate deshydrogénase, EC 1.8.1.4 : dihydrolipoamide deshydrogénase, EC 2.3.1.12 : dihydrolipoamide S-acétyltransférase, EC 2.3.1.61 : dihydrolipoamide S-succinyltransférase, EC 2.3.3.1 : citrate synthase, EC 4.2.1.2 : fumarase, EC 4.2.1.3 : aconitase, EC 6.2.1.4 : succinyl-CoA synthétase.

complexe à la membrane interne. Ces inhibiteurs bloquent le transfert des électrons vers le coenzyme Q en s'intercalant entre la protéine fer-soufre et l'une des protéines d'ancrage. Leur action s'exerce sur les Basidiomycètes, charbons pour la carboxine, rouilles pour l'oxycarboxine et rhizoctones pour le mépronil et le flutolanil. Il s'étend à des Ascomycètes et Deutéromycètes dans le cas du boscalid. Quelques cas de résistance sont connus (p. ex. mutation H257L ou Y chez le maïs). Il est conseillé d'adapter les traitements pour les pathogènes à risque.

• *Les inhibiteurs du complexe III* (cytochrome bc1), qui est un homodimère dont chaque monomère est constitué de neuf sous-unités protéiques, sont majoritairement des strobilurines. Certaines sous-unités sont situées à la surface matricielle de la membrane interne de la mitochondrie. Il s'agit de COR1, QCR2 et QCR7 qui entourent le site interne (Qi) du cytochrome b. Une autre partie est transmembranaire, avec le cytochrome b (COB), QCR 8, QCR 9 ainsi que les structures d'ancrage de RIP1 et CYT1. Enfin une dernière partie est sur la face intermembranaire de la membrane interne. Il s'agit du cytochrome c1 (CYT1), de la protéine fer-soufre (protéine Rieske, RIP1) et de QCR6 entourant le site externe (Qo) du cytochrome b. Les inhibiteurs du complexe III sont répartis en deux groupes suivant le site d'action.

Dans un premier sous-groupe on retrouve sept familles chimiques :

- des méthoxyacrylates : azoxystrobine (CAS 131860-33-8 ; Affourtit *et al.*, 2000), enestrobine et picoxystrobine (CAS 117428-22-5),
- un méthoxycarbamate : pyraclostrobine (CAS 175013-18-0),
- deux oxyiminoacétates : krésoxim-méthyl (CAS 143390-89-0) et trifloxystrobine (CAS 141517-21-7),
- des oxyiminoacétamides : dimoxystrobine (CAS 149961-52-4), métominostrobine (CAS 133408-50-1) et orysastrobine (CAS 248593-16-0),
- une oxazolidinedione : famoxadone (CAS 131807-57-3),
- une dihydrodioxazine : fluoxastrobine (CAS 361377-29-9),
- et une imidazolinone : fénamidone (CAS 161326-34-7).

Hormis la famoxadone et la fénamidone, ce sont toutes des strobilurines. Dans les années 1960, des chercheurs tchèques ont découvert de nouvelles substances naturelles issues de champignons lignicoles forestiers (*Strobilurus spp.*). Suite à leur découverte, des chercheurs allemands ont mis à jour leur mode d'action, dans les années 1970. Ainsi est née cette nouvelle famille de fongicides polyvalents. Leur photolabilité et leur volatilité n'ont pas permis leur utilisation industrielle et ceci a nécessité la conception d'analogues de synthèse.

Ces molécules sont appelées des QoI (inhibiteurs du site externe Qo). Leur site d'action se situe sur le cytochrome b mais elles se cantonnent à la face intermembranaire. Il s'agit donc de l'inhibition de l'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone.

Toutes les strobilurines sont translaminaires. Certaines sont systémiques apoplastiques, d'autres sont redistribuées en phase vapeur. Les strobilurines sont polyvalentes, elles agissent sur des Ascomycètes, Basidiomycètes et Oomycètes. Elles peuvent être utilisées à des doses dix fois plus faibles que le sont les autres molécules dites « multi-sites ». Quant à la famoxadone et la fénamidone, leur meilleure performance s'observe sur les mildious. Toutes les molécules de ce groupe sont utilisées préventivement et possèdent une longue persistance d'action. Malgré cela, des phénomènes de résistance acquise gagnent de plus en plus de pathogènes (majoritairement dus à une mutation G143A, parfois T127I ou F129L). Affourtit *et al.* (2000) ont aussi mis en évidence une voie alternative assurant la résistance aux antifongiques.

Le second sous-groupe ne comporte actuellement qu'une famille chimique, celle des cyanoimidazoles. L'antimycine A fut utilisée mais abandonnée devant son manque de sélectivité. Une seule molécule est maintenant disponible, la cyazofamide (CAS 120116-88-3). Cette molécule est inhibitrice du cytochrome b mais agit sur la face matricielle de la membrane interne de la mitochondrie (ou QiI), à la différence des strobilurines qui sont des QoI. Il se forme une liaison covalente entre le site réducteur (de l'ubiquinol en ubiquinone) du cytochrome et la fonction sulfonamide de la cyazofamide. L'efficacité de cette QiI est meilleure que celle des QoI contre les mildious (Oomycètes). Aucun phénomène de résistance n'a été détecté sauf sur quelques organismes modèles (*in vitro*). Cette molécule reste

active sur les souches résistantes aux QoI. Néanmoins, il est conseillé de prendre des mesures conservatoires afin de limiter les risques d'apparition de résistance.

Les trois groupes suivants sont constitués de molécules agissant au niveau de la production d'ATP (synthèse et transport).

• *Le premier groupe est constitué de découplants de la phosporylation oxydative.* Ils sont répartis en trois familles chimiques distinctes :

- deux dinitrophenylcrotonates : binapacryl (CAS 485-31-4) et dinocap (CAS 39300-45-3),
- une 2,6-dinitroaniline : fluzinam (CAS 79622-59-6),
- et une pyrimidinone-hydrazone : férimzone (CAS 89269-64-7).

Les découplants sont des protonophores, c'est-à-dire qu'ils rendent les membranes mitochondriales perméables aux protons (permettant leur libre circulation et annulant ainsi le gradient nécessaire à l'ATP synthase). Les dinitrophénols, dont certains servent d'herbicides, sont des esters lipophiles piégés par la cuticule des plantes. Ils pénètrent dans les cellules fongiques où ils subissent une hydrolyse libérant la fonction phénol, responsable de l'effet découplant. Ils sont utilisés contre les oïdiums. Le fluazinam est utilisé contre des Ascomycètes et Oomycètes (il est rapidement détoxifié par le glutathion chez les vertébrés, d'où sa faible toxicité). Aucune résistance n'est apparue contre les dinitrophénols et la férimzone, sauf au Japon sur *Botrytis cinerea* en 2000.

• *Le second groupe est composé d'inhibiteurs de la phosphorylation oxydative*, des organostanniques, les triphénylétains (seule famille chimique) : fentine-acétate, fentine-chlorure et fentine-hydroxyde. La cible présumée est le facteur Fo de l'ATP (résistance croisée avec l'oligomycine). Ces fongicides de surface sont actifs sur des Ascomycètes et des Oomycètes, mais manquent de sélectivité. Quelques cas de résistance sont connus (cercosporiose de la betterave).

• *Le dernier groupe est composé d'une seule molécule, une thiophènecarboxamide,* le silthiofam. C'est une silylamide, analogue des carboxamides. Uniquement efficace sur *Gaueumannomyces graminis* var. tritici, avec toutefois quelques isolats résistants. Son action porte sur le transfert de l'ATP vers le cytoplasme.

3.3.4 - Classe D : Molécules agissant sur la synthèse des acides aminés et les protéines

Pour celles-ci, il convient aussi de distinguer plusieurs groupes.

• *Le premier groupe est composé d'inhibiteurs de la méthionine.* Ce groupe est composé de trois anilinopyrimidines introduites dans les années 1990 : cyprodinil (CAS 121552-61-2), mépanipyrim (CAS 110235-47-7) et pyriméthanil (CAS 53112-28-0). Leur efficacité est réduite en présence d'acides aminés. Leur cible pourrait être la cystathionine ß-lyase. Pourtant sa séquence reste la même chez les souches sensibles et résistantes au fongicide et

des études enzymatiques n'ont pas confirmé cette hypothèse. On suppose aussi leur implication dans les processus infectieux, par inhibition de la sécrétion d'enzymes (protéases, lipases, cutinases, cellulases et même laccases pour *B. cinerea*). Les anilinopyrimidines sont efficaces sur les Ascomycètes, notamment la pourriture grise, la tavelure et le piétin-verse, de façon préventive et parfois légèrement curative. Le développement de la résistance est bien connu chez *B. cinerea* et sporadiquement chez *Venturia*. Sa prise en compte est recommandée dans les programmes de lutte.

Les autres groupes sont constitués d'antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique.

• *Le second groupe est celui d'un acide énopyranuronique*, avec pour unique représentant la blasticidine S (CAS 2079-00-7). Elle inhibe la synthèse protéique avec un risque de résistance moyen nécessitant une prise en compte du risque de résistance.

• *Le troisième groupe compte un hexopyranosyl*. Il s'agit de la kasugamycine (CAS 6980-18-3). La résistance à ce produit est bien connue et doit être prise en compte dans les stratégies de lutte.

• *Le quatrième groupe se limite à un glucopyranosyl*, la streptomycine (CAS 57-92-1).

• *Le dernier groupe est uniquement composé d'une tétracycline*, l'oxytetracycline (CAS 79-57-2).

Les molécules des deux derniers groupes présentent une activité bactéricide. Le développement de résistances à ces dernières est bien connu ; c'est un risque élevé qui nécessite une prise en compte dans la stratégie de lutte.

3.3.5 - Classe E : Molécules agissant sur la transduction des signaux

Elles se limitent à deux groupes.

• *Le premier groupe est supposé agir sur les protéines G* dans les voies précoces de signalisation. Seule une quinoline est impliquée, le quinoxyfen (CAS 124495-18-7). La résistance est bien connue, nécessitant là encore sa prise en compte dans les stratégies de lutte.

• *Le second groupe appartient aux phénylpyrroles*, fongicides apparus dans les années 1990 (Gullino *et al.*, 2000). Ce sont des analogues de la pyrrolnitrine, un métabolite secondaire de nombreuses espèces de *Pseudomonas* (Lee *et al.*, 2003). Deux éléments sont utilisés pour le traitement des graines, le fenpiclonil (CAS 74738-17-3) et le fludioxonil (CAS 131341-86-1). Ce dernier est aussi employé en application foliaire (seul ou en association avec du cyprodinil). Leur action se situe au niveau d'une protéine kinase dans la transduction du signal osmotique. Irmler *et al.* (2006) proposent une cible, la protéine PK-III dans la voie liée au gène OS-2 chez *Neurospora crassa*. Kojima *et al.* (2006) pencheraient pour Hik1 dans une voie liée au gène Hog1 chez *Cryptococcus neoformans* (parasite humain). Cela permet une action sur la germination des spores, la croissance des tubes germinatifs ainsi que sur celle du mycélium (Rosslenbroich et Stuebler, 2000). La résistance est connue, sporadique, avec une résistance croisée positive entre phénylpyrroles et dicarboximides (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2004). Elle a aussi permis de mettre en exergue des bémols quant à

leur cible métabolique. En effet, certaines mutations semblent sans effet sur leur activité. D'autre part, l'étude de souches résistantes ne montre pas d'altération de leur sensibilité aux variations de pression osmotique (Leroux, 2005).

3.3.6 - Classe F : Cinq groupes de molécules agissant sur la synthèse des lipides et des membranes

Ces cinq groupes constituent un vaste ensemble.

• *Le premier groupe est constitué de dicarboximides :* chlozonilate (CAS 84332-86-5), iprodione (CAS 36734-19-7), procymidone (CAS 32809-16-8) et vinclozolin (CAS 50471-44-8). Ils ont été mis au point dans les années 1970. Leur cible semble être un enzyme responsable de la peroxydation des lipides, la NADH cytochrome c réductase. Ces molécules sont particulièrement actives sur la pourriture grise. Une résistance croisée positive entre les membres de ce groupe est observée. La résistance est bien connue pour quelques espèces fongiques et surtout pour *Botrytis cinerea*. Plusieurs mutations ont été trouvées sur une histidine kinase OS-1 (Daf 1), surtout I365S. Il est recommandé de suivre une stratégie de lutte en prenant en compte un fort risque de résistance.

• *Le second groupe comprend deux familles chimiques :*

- des phosphorothiolates : edifenphos (CAS 17109-49-8), iprobenfos (IBP ; CAS 26087-47-8) et pyrazophos (CAS 13457-18-6),
- un dithiolane : isoprothiolane (CAS 50512-35-1).

Ces composés agissent sur la biosynthèse des phospholipides. Leur cible est une méthyltransférase. Des phénomènes de résistance sont connus chez quelques espèces fongiques bien définies ; dans ces cas, il est recommandé d'adapter ses stratégies de lutte.

• *Le troisième groupe comprend la grande famille des dérivés aromatiques* (chlorophényles et nitroalanines) et hétéroaromatiques.

- les aromatiques : biphényl (CAS 92-52-4), chloroneb (CAS 2675-77-6), dicloran (CAS 99-30-9), quintozène (PCNB ; CAS 82-68-8), tecnazène (TCNB ; CAS 117-18-0) et tolclofos-méthyle (CAS 57018-04-9),
- un hétéroaromatique du groupe chimique des 1,2,4-thiadiazoles, l'étridiazole (CAS 2593-15-9).

Leur action présumée se localise à la peroxydation des lipides. La résistance est observée chez quelques espèces. Un schéma complexe de résistances croisées peut intervenir du fait des spectres d'activité différents entre ces molécules.

• *Le quatrième groupe est celui des carbamates :* iodocarbe (CAS 55406-53-6), propamocarbe (CAS 24579-73-5) et prothiocarbe (CAS 19622-08-3). Leur effet supposé est une altération de la perméabilité membranaire des cellules par action sur les acides gras.

• *Le dernier groupe est constitué d'amides carboxyliques.* Trois familles chimiques sont représentées :

- deux amides cinnamiques : diméthomorphe (CAS 110488-70-5) et flumorphe (CAS 211867-47-9),

- deux valinamides carbamates : benthiavalicarbe (CAS 413615-35-7) et iprovalicarbe (CAS 140923-17-7),

- un amide mandélique : mandipropamide (CAS 374726-62-2).

Leur action supposée cible la synthèse des phospholipides et la formation de la paroi.

3.3.7 - Classe G : Molécules agissant sur la biosynthèse des stérols (Fig. 22) dans les membranes (IBS)

La plupart des Oomycètes ne synthétisent pas de stérols (dont l'ergostérol des champignons). Ils ne sont donc pas une cible pour ce type de lutte. Il s'agit d'une classe particulièrement importante divisée en quatre groupes distincts.

• *Le premier groupe, le plus important, est occupé par les IDM* (inhibiteurs de la 14α-déméthylase, IBS de classe I). Il comprend cinq familles chimiques, suivant le type d'hétérocycle azoté porté.

- une pipérazine : triforine (CAS 26644-46-2),

- une pyridine : pyrifénox (CAS 88283-41-4),

- deux pyrimidines : fénarimol (CAS 60168-88-9) et nuarimol (CAS 63284-71-9),

- cinq imidazoles : imazalil (CAS 35554-44-0), oxpoconazole (CAS 134074-64-9), pefurazoate (CAS 101903-30-4), prochloraz (CAS 67747-09-5) et triflumizole (CAS 99387-89-0),

- enfin le sous-groupe le plus important, les triazoles (Fig. 23).

Apparus dans les années 1970, ils sont très utilisés en agriculture mais aussi en médecine. Leur cible métabolique est un enzyme de la voie de biosynthèse des stérols apporté par voie microsomale, la 14α-déméthylase associée à un cytochrome P450 avec lequel les IDM forment un complexe liant un atome d'azote de l'IDM à un fer hémique du cytochrome. Il se forme aussi des interactions entre la molécule fongicide et le site de fixation du substrat sur l'apoprotéine. Ces molécules sont pénétrantes ou systémiques apoplastiques, avec un bon effet curatif. Leur large spectre d'activité en fait de bons éléments de protection des céréales pour l'ensemble des maladies fongiques. La résistance se développe progressivement (déterminisme polygénique) et de manière inégale en fonction de la molécule et de la maladie. Des mutations sont apparues sur le gène, Y136F, chez les oïdiums (Y136H chez *Candida albicans* commensal du tube digestif, pathogène opportuniste) ou du promoteur induisant sa surexpression chez *Verticilium inaequalis* et *Penicillium digitatum*. Des transporteurs ABC permettent aussi à des souches d'excréter activement les molécules et ainsi de les éliminer. Généralement, une résistance croisée positive est observée entre les molécules IDM actives sur les mêmes espèces. Par contre, cela ne s'est pas encore observé entre IDM et des molécules d'autres classes d'IBS. Le cytochrome P450 étant relativement ubiquiste, leur activité fongicide s'accompagne parfois d'une phytotoxicité

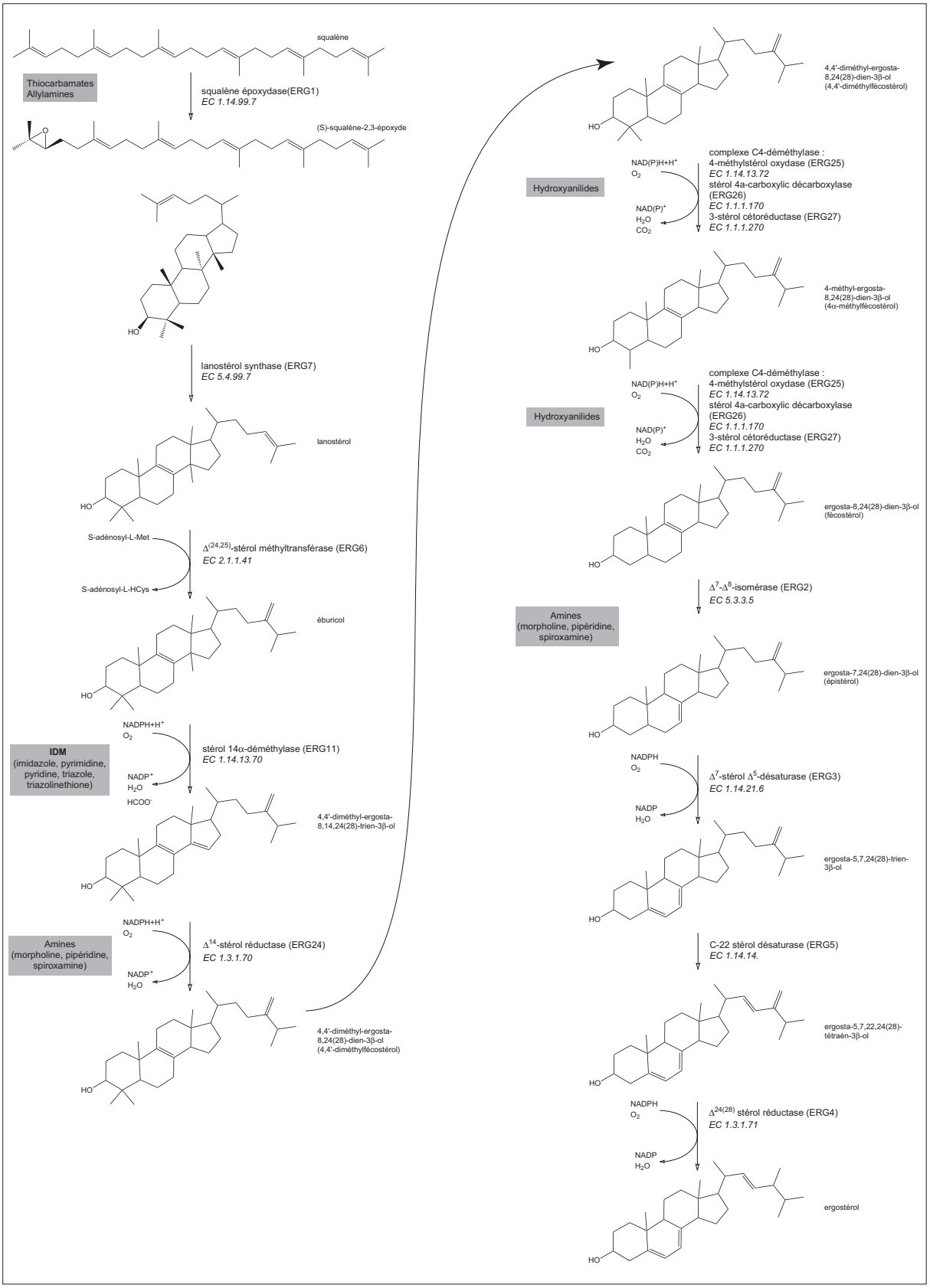


Figure 22. La biosynthèse des stérols chez les champignons. Cette voie métabolique est la cible de nombreuses molécules antifongiques, classées en deux groupes, inhibiteurs de la 14α-déméthylase (EC 1.14.13.70 ; IDM) et non-IDM. Les familles de molécules sont indiquées en gris, en vis-à-vis de leur cible (d'après Leroux, 2005).

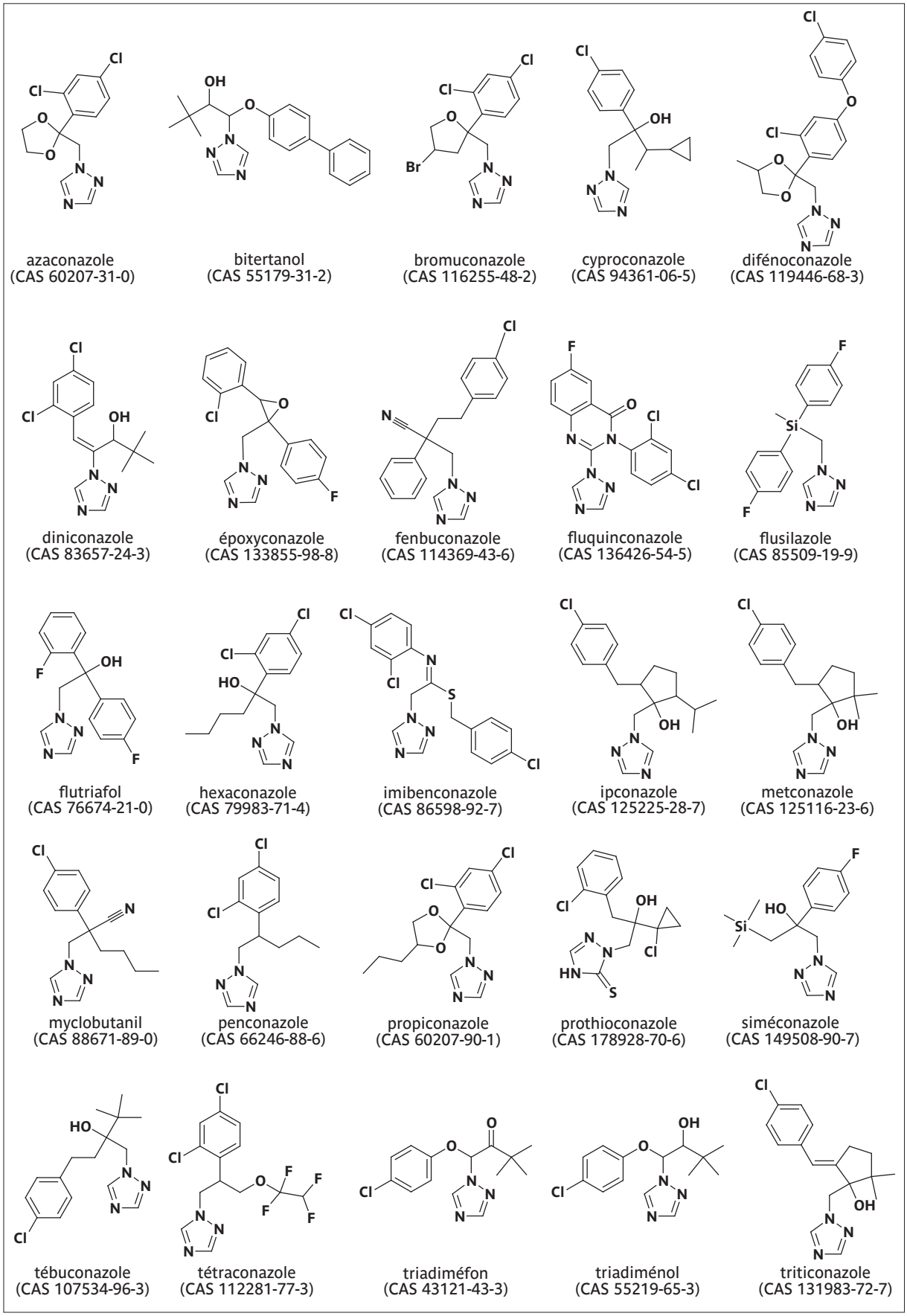


Figure 23. Fongicides de la famille des triazoles.

due à l'inhibition de la kaurène oxydase (à cytochrome, pour la synthèse des gibbérellines). Ainsi, des analogues sont utilisés comme régulateurs de croissance.

• *Le second groupe, moins important (IBS de classe II)*, est constitué d'amines réparties en trois familles chimiques :

- des morpholines : aldimorphe (CAS 91315-15-0), dodémorphe (CAS 1593-77-7), fenpropimorphe (CAS 67564-91-4) et tridémorphe (CAS 81412-43-3),
- deux pipéridines : fenpropidine (CAS 67306-00-7) et pipéraline (CAS 3478-94-2),
- une spirocétalamine (amine non cyclique) : spiroxamine (CAS 118134-30-8).

Les deux cibles de ces molécules sont la 14-α-réductase (surtout pour le tridémorphe) et la Δ8-7-isomérase (surtout pour le fenpropimorphe, la fenpropidine et la spiroxamine) avec lesquelles un proton assure une attaque électrophile d'un carbone nucléophile du substrat pour former un stérol à carbocation. Ces fongicides à amine sont protonés aux pH biologiques. Ils sont ainsi considérés comme des analogues des composés stéroliques. Leur activité est similaire à celle des IDM sur les céréales mais plus spécifiques des oïdiums. Leur phytotoxicité pour les Dicotylédones a restreint leur utilisation (sauf pour la spiroxamine, utilisée à la fois sur vigne et céréales). Une diminution de la sensibilité pour ces molécules chez l'oïdium du blé a été observée. Habituellement une résistance croisée positive s'observe entre les membres de ce groupe mais pas avec ceux des autres classes d'IBS.

• *Le troisième groupe est celui des hydroxyanilides (IBS de classe III)* avec un seul représentant, le fenhexamide (CAS 126833-17-8). Commercialisé en 2000, il assure l'inhibition de la 3-cétoréductase (qui fait partie du complexe de la C4-déméthylation des stérols), affectant ainsi l'élongation des filaments germinatifs et des hyphes mycéliennes, efficace seulement sur *Botrytis cinerea* et quelques espèces voisines (*Monilinia spp.* et *Sclerotinia spp.*). Son action est préventive. Des diminutions de sensibilité ont été détectées au champ mais sont correctement maîtrisées.

• *Le dernier groupe (IBS de classe IV)* est constitué de deux familles chimiques :

- des thiocarbamates : pyributicarbe (CAS 88678-67-5), tolnaftate (CAS 2398-96-1) et tolciclate (CAS 50838-36-3),
- deux allylamines : naftifine (CAS 65472-88-0) et terbinafine (CAS 91161-71-6).

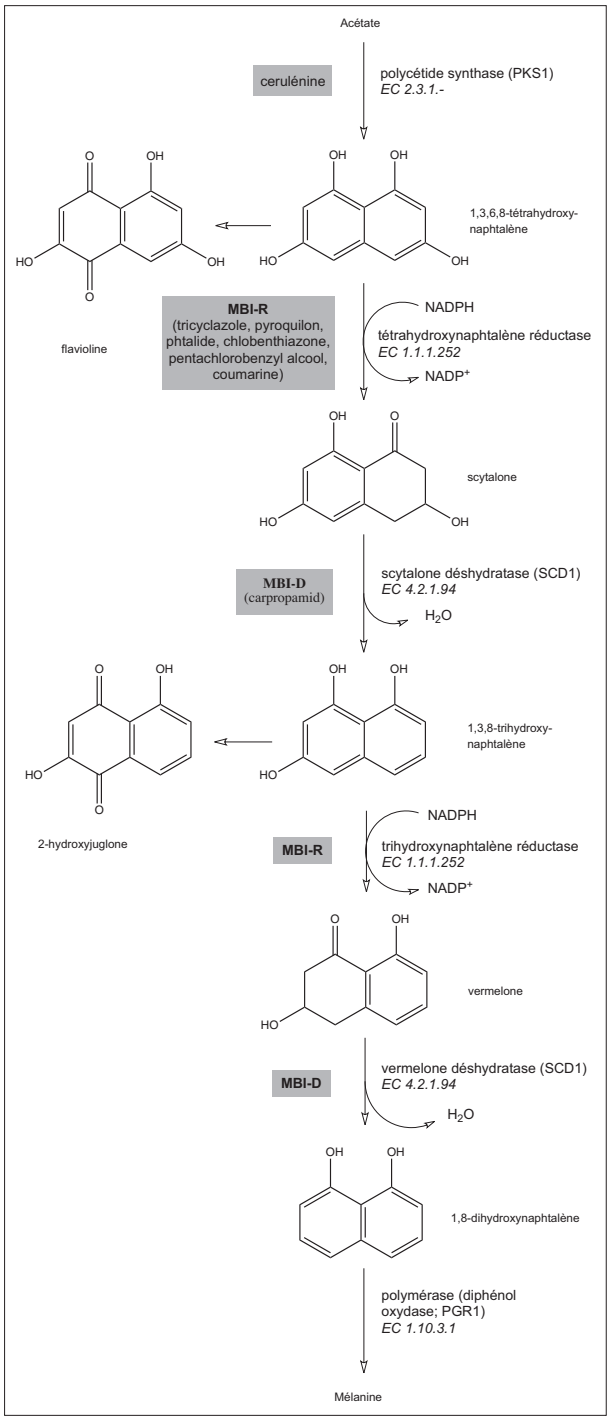
Principalement utilisés dans le domaine médical, les thiocarbamates peuvent aussi avoir un effet herbicide (pyritubicarbe). Ce sont des inhibiteurs de la squalène époxydase. Sur les espèces fongiques, ils sont non compétitifs à faible dose (agissent sur les Mammifères à forte dose). Le pyritubicarbe est seulement utilisé sur le riz au Japon.

3.3.8 - Classe H : Molécules agissant sur la synthèse des glucanes

• *Le premier groupe est constitué d'un antibiotique glucopyranosyl.* Le seul élément de ce groupe est la validamycine (CAS 37248-47-8). Ses cibles seraient une tréhalase et la voie de biosynthèse de l'inositol. Il n'existe pas de résistance connue pour ce composé.

• *Le second groupe se limite à une polyoxine* (groupe chimique des nucléosides peptidyl pyrimidine ; CAS 11113-80-7). La polyoxine est le seul membre de ce groupe. Elle agit sur la chitine synthase. Des phénomènes de résistance sont connus, il est recommandé d'assurer une stratégie de lutte appropriée.

3.3.9 - Classe I : Molécules agissant sur la synthèse de mélanine dans la paroi (MBI) (Fig. 24)



Il existe deux groupes en fonction du site d'action. Il ne s'agit pas d'inhibiteurs de croissance mais leur action conduit à un changement de pigmentation de la colonie fongique. On parle alors d'une action anti-pénétrante pour les espèces possédant un appressorium, structure nécessaire à l'infestation des cellules épidermiques de la plante hôte. Ils sont utilisés principalement sur *Pyricularia oryzae* et *Colletotrichum spp.*.

• *Le premier regroupe les MBI-R* (à réductase), avec trois familles chimiques :

- une isobenzofurazone : phthalide (CAS 27355-22-2),
- une pyrroloquinolinone : pyroquilon (CAS 57369-32-1),
- et un triazolobenzothiazole : tricyclazole (CAS 41814-78-2).

Les premiers MBI-R sont apparus dans les années 1970. Leur cible est une réductase. Ils sont systémiques apoplastiques et utilisés contre la pyriculariose du riz. Aucun cas de résistance n'a encore été signalé.

Figure 24. La biosynthèse des mélanines chez les champignons. Deux grandes familles de composés antifongiques sont impliquées dans l'inhibition de cette voie métabolique. MBI-R agissent sur une réductase, MBI-D sur une déshydratase.

• *Le deuxième groupe est celui des MBI-D* (à déshydratase), appartenant aussi à trois familles chimiques :

- une cyclopropanecarboxamide : carpropamide (CAS 104030-54-8),
- une carboxamide : diclocymet (CAS 139920-32-4),
- et une propionamide : fenoxanil (CAS 115852-48-7).

Leur cible est une déshydratase. Certains sont systémiques apoplastiques. Aussi utilisées contre la maladie du riz, ces molécules ont l'inconvénient d'avoir rapidement provoqué des phénomènes de résistance liés à une mutation de la scytalone déshydratase (V75M).

3.3.10 - Classe M. : molécules à action multi-sites

Les plus anciennes sont des produits minéraux, inorganiques, à base de cuivre (p. ex. acétate de cuivre, CAS 142-71-2, dans la bouillie bordelaise) et de soufre (CAS 7704-34-9). Les premiers sont efficaces sur les mildious mais aussi sur des Ascomycètes et des bactéries. Les seconds sont utilisés sur les oïdiums. Les risques environnementaux tendent à remettre en question l'utilisation des compositions à base de cuivre.

Après la deuxième guerre mondiale, l'avènement de la chimie organique de synthèse apporte de nouvelles familles de composés à action multi-sites. Ils opèrent sur des Oomycètes et des Eumycètes :

- Les dithiocarbamates : ferbame (CAS 14484-64-1), thirame (CAS 137-26-8), zirame (CAS 137-30-4) ; et des complexes polymériques : mancozèbe (CAS 8018-01-7), manèbe (CAS 12427-38-2), métirame (CAS 9006-42-2), propinèbe (CAS 12071-83-9) et zinèbe (12122-67-7).

- Les phthalamides : captane (CAS 133-06-2), captafol (CAS 2425-06-1) et folpel (CAS 133-07-3).

- Les sulfamides : dichlofluanid (CAS 1085-98-9) et tolylfluanide (CAS 731-27-1).

- Un chloronitrile (phthalonitrile), le chlorothalonil (CAS 1897-45-6).

- Des guanidines : doguadine ou dodine (CAS 2439-10-3), guazatine (CAS 108173-90-6) et iminoctadine (CAS 13516-27-3). Un cas de résistance pour la doguadine a été observé chez *Venturia inaequalis* suggérant ainsi qu'il ne s'agit pas d'un fongicide multi-site.

- Une quinone (anthraquinone) : dithianon (CAS 3347-22-6).

- Une triazine : anilazine (CAS 101-05-3).

3.3.11 - Classe P : les inducteurs des défenses des plantes (aussi appelés SDN).

• *Le premier groupe est celui des benzothiadiazoles (BTH),* avec l'acibenzolar-S-méthyl (CAS 135158-54-2). Cet analogue de l'acide salicylique et son métabolite acide sont sans doute véhiculés dans toute la plante via les systèmes conducteurs de sèves. Ils stimulent les réactions de défense impliquées dans les résistances systémiques et locales. Leur longue persistance d'action, associée à leur mobilité, permet une protection durable dans le temps, même chez les organes en développement. Néanmoins, leur efficacité est insuffisante lors d'attaques importantes ou de traitement trop tardif. Leur utilisation sur des mutants

d'*Arabidopsis thaliana* (nim1) non inductibles par l'acide salicylique conduit à penser que ces molécules agissent sur les mêmes voies de signalisation. Ils semblent peu exposés à la résistance devant le large panel de substances antimicrobiennes qui interviennent à leur suite. Ces molécules peuvent, en revanche, induire des effets indésirables sur les récoltes, tant sur le plan quantitatif que qualitatif.

• *Le second groupe est représenté par un benzisothiazole* : probénazole (CAS 27605-76-1). Dans la plante, il est converti en saccharine et en N-glycopyranosyl saccharine, ces deux métabolites n'ayant aucun effet direct sur le pathogène. Cependant, ceux-ci stimulent les réactions de défense chez le riz (production de phytoalexines et de lignines). C'est pour cette raison qu'il est considéré comme antifongique et antibactérien. Très utilisé contre la pyriculariose du riz au Japon depuis environ 20 ans, il est aussi actif sur *Xanthomonas oryzae*. Aucun mode de résistance n'est connu (même remarque que ci-dessus).

• *Le troisième groupe est celui d'une thiadiazole-carboxamide* : tiadinil (CAS 223580-51-6).

3.3.12 - Classe U : Molécules dont le mode d'action est discuté ou inconnu

Il convient de citer les phosphonates avec un éthylphosphonate, le fosétyl-Al (CAS 39148-24-8), et son métabolite l'acide phosphoreux (CAS 13598-36-2). On a d'abord pensé que le fosétyl-Al induisait directement les défenses de la plante. En fait, cette molécule stimule le métabolisme fongique en simulant une carence en phosphates. Le résultat est une plus grande synthèse d'éliciteurs fongiques susceptibles de stimuler les défenses naturelles de la plante hôte. Utilisé surtout sur les Oomycètes, il est aussi actif sur des Ascomycètes et des bactéries. Mentionnons aussi le cymoxanil (CAS 57966-95-7), un cyanoacétamide-oxime ; le téclofthalam (CAS 76280-91-6), un acide phthalamique utilisé aussi comme bactéricide ; le triazoxide (CAS 72459-58-6), du groupe des benzotriazines ; le flusulfamide (CAS 106917-52-6), un benzène-sulfonamide ; le diclomézine (CAS 62865-36-5), un pyridazinone ; un thiocarbamate, le méthasulfocarb (CAS 66952-49-6) ; un thiazole-carboxamide, l'éthaboxam (CAS 162650-77-3) ; le cyflufénamide (CAS 180409-60-3) ; le proquinazide (CAS 189278-12-4), une quinazolinone ; la métrafénone (CAS 220899-03-6), une benzophénone ; la fluopicolide (CAS 239110-15-7), une benzamide.

3.3.13 - Classe NC : molécules fongicides non classées

Cette classe est constituée par les huiles minérales et organiques ainsi que le bicarbonate de potassium.

4 - Pleins feux sur l'Amadou

4.1 - Connaître ses ennemis

Voici un état des lieux des connaissances obtenues sur les maladies du bois chez la vigne. L'accent sera mis sur l'esca (Fig. 25) mais nous ferons quelques incursions en direction de ces deux « cousines », l'eutypiose et le « black dead arm » (ou BDA). Ces maladies cryptogamiques vasculaires se développent au sein des ceps de vigne. Elles forment de profondes nécroses dans le bois et développent des symptômes caractéristiques sur les parties herbacées. Dans les trois cas, la relation hôte - parasite aboutit à la mort du cep à plus ou moins brève échéance.

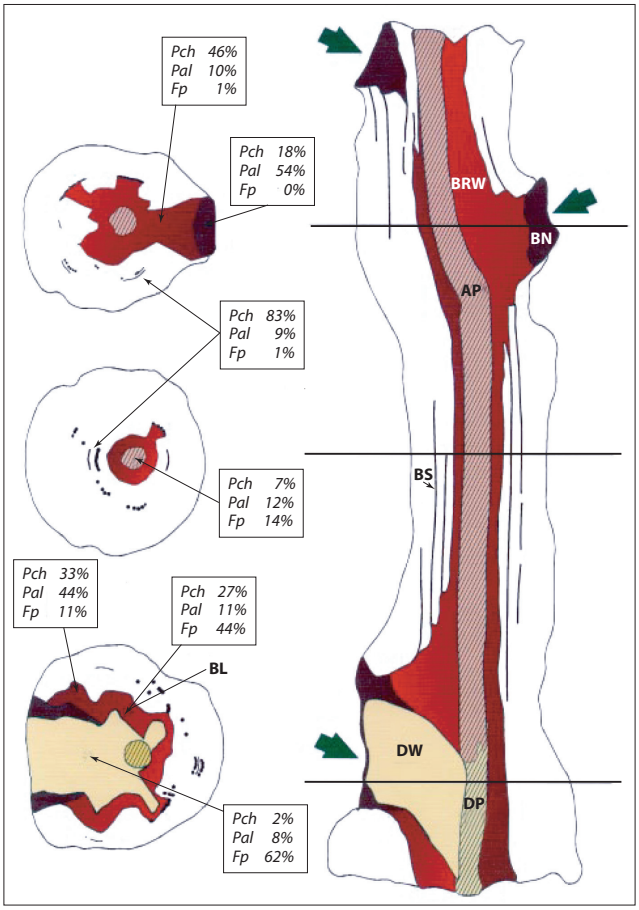


Figure 25. Schéma d'un cep de vigne atteint par l'esca en coupe longitudinale médiane et trois sections transversales à différents niveaux du cep. L'occurrence de trois espèces fongiques est exprimée en pourcentage des isolations. Pch, *Phaemoniella chlamydospora* ; Pal, *Phaeoacremonium aleophilum* ; Fp, *Fomitiporia punctata* (= *F. mediterranea*). On peut noter la prévalence de Fp dans les nécroses tendres et claires centrales. Il disparaît à mesure que l'on s'approche du bois sain. Pch & Pal sont alors dominants dans du bois brun-rouge et dans des bandes noires, autour de la moelle ou de la nécrose centrale tendre et claire. Les flèches vertes montrent les plaies de taille. BN, nécrose brune ; BRW, bois rouge-brun ; AP, moelle altérée ; BS, bandes brunes-noires (points noirs en section transversale) ; DP, moelle détruite ; BL, bordure noire autour de la nécrose claire et tendre ; DW, nécrose claire et tendre (bois complètement détruit) (d'après Mugnai *et al.*, 1999).

Tous les auteurs s'accordent à penser que l'apparition de ces maladies remonte à des temps très anciens. On peut donc supposer qu'elles auraient pris pied à l'époque de la Rome Antique, avec l'essor de la viticulture, et suivi son développement sur tout le bassin Méditerranéen. Les premières descriptions de l'esca dateraient du XIIe (Ibn al-Awam en Espagne, cité par Mugnai *et al.*, 1999) et XIIIe siècles (Pietro de'Crescenzi en Italie, cité par Mugnai *et al.*, 1999). Une description précise de l'eutypiose est faite en 1823. Henri Marès (1820-1901) décrit l'apoplexie de la vigne dans son « Livre de la Ferme » (1864 ; cité par Larignon, 2004). La nature de cette affection n'est pas comprise avant la fin du XIXe siècle. Désignée sous le nom de folletage par Pierre Viala (1859-1936) en 1887, son origine fon-

gique est reconnue par Louis Ravaz (1863-1937) en 1898 (cités par Larignon, 2004). Le genre *Eutypa* (Diatrypales, Ascomycota) est défini par Louis-René Etienne Tulasne (1815-1885) et Charles Tulasne (1816-1884) en 1863 (cité par Lecomte, 2003). Le terme « esca » (origine latine d'un mot signifiant « aliment » ou « appât » mais en référence aux fructifications des champignons du bois, notamment du genre *Fomes* qui signifie quant à lui « amadou ») est officialisé en 1922 par P. Viala et désigne une apoplexie du cep avec formation de profondes nécroses donnant au bois une texture « en amadou » (pourriture blanche, lignolyse du bois). D'autres symptômes sont identifiés par la suite (1923-1926) comme le rabougrissement des rameaux (plutôt dû à l'eutypiose) et une marbrure des feuilles (commune à l'esca et au BDA). En 1912, l'Italien Lionello Petri (1875-1946) reproduit quelques symptômes internes de l'esca avec des espèces alors inconnues (Mugnai *et al.*, 1999). Deux d'entre elles appartiennent au genre *Cephalosporium* et une au genre *Acremonium*. C'est en 1926 que P. Viala met en évidence la présence de deux Basidiomycètes qu'il suppose responsables de la maladie, *Stereum hirsutum* et *Phellinus (Fomes) ignarius*. Suite à des expériences *in vitro* sur la croissance de *S. hirsutum*, il préconise l'emploi de composés arsenicaux comme méthode de lutte. C'est en Australie (1933) qu'est fait la première mention d'une maladie de l'abricotier, le « gummosis », imputable à un champignon du genre *Eutypa* (découvert en 1900 et rattaché alors au genre *Cytosporina* ; Lardner, 2003). En 1938, B.-D. Adams décrit les symptômes de l'eutypiose sur l'abricotier (*Prunus armeniaca* ; Courby, 1997). En 1947, les faits sont bien établis, malgré quelques imprécisions. Ainsi, Robert Lemesle, maître de conférence à l'Université de Poitiers, enseigne que l'esca présente deux types d'attaques, l'une lente et l'autre apoplectique. Il donne le mode de contamination par les plaies de taille. Il préconise la « formule de Gauthier » et une autre solution d'arsénite de sodium en traitement préventif d'hiver. En 1956, M.-V. Carter montre que la structure anamorphe *Cytosporina* appartient à une autre espèce du nom de *Eutypa armeniacae* Hansford & Carter (Lardner, 2003). Il a sans doute fallu l'essor du commerce international, pendant et après la période des deux Guerres Mondiales, pour retrouver ces maladies sur d'autres continents. L'esca est observé en Californie dés les années 1920 (Feliciano *et al.*, 2004). L'eutypiose est décrite en Nouvelle-Zélande dans les années 1950 puis dans de nombreux pays en Europe, Afrique et Amériques par la suite. C'est en 1957 que les premiers travaux californiens sur l'esca débutent avec William B. Hewitt (Professeur Émérite, Université de Californie, Davis) et en 1959 que la relation est faite entre différents symptômes observés en plein champ (nécroses vasculaires et éruptions corticales) et la même maladie par Luigi Chiarappa (Mugnai *et al.*, 1999). Ces travaux portent sur *Cephalosporium sp.* et *Phellinus ignarius*. Suite à l'arrêt progressif des traitements à base d'arsénite notamment en Europe (l'interdiction de l'arsénite de sodium intervient au Royaume Unis en 1961 ; en France, l'interdiction de l'arséniate de plomb est déclarée en 1971, l'ajout d'un répulsif pour le gibier dans la formulation de l'arsénite de soude est imposé en 1981) après la publication des études concernant les effets fœtotoxique et tératogène (Ferm et Carpenter, 1968 ; Hood et Bishop, 1972 ; cités par Ferm, 1977), les travaux de recherche

reprennent dans les années 1980 (Courby, 1997). Une équipe bordelaise, avec B. Dubos et Philippe Larignon (1987), relance la recherche sur les maladies du bois, dont l'esca (Mugnai *et al.*, 1999). Un effort particulier est porté sur la connaissance des champignons impliqués et leurs rôles respectifs (Larignon et Dubos, 1997). Le remplacement de l'arsénite par des traitements fongicides moins performants en Allemagne, Italie et Grèce encourage ce regain d'intérêt (Mugnai *et al.*, 1999). En 2001, c'est au tour de la France d'interdire l'arsénite de soude. Les maladies du bois sont devenues une préoccupation mondiale (Afrique, Amériques, Europe et Océanie). Elles regroupent des chercheurs de tous les horizons (généticiens, mycologues, physiologistes et phytopathologistes, entre autres) autour d'une structure commune l'ICGTD (pour « International Council of Grapevine Trunk Diseases ») sous la tutelle de la Société Internationale de Pathologie Végétale (ISPP). En l'état actuel de nos connaissances, voici les différents agents qui sont à l'origine des maladies du bois chez la vigne cultivée (*Vitis vinifera*).

• *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.-J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W. Gams (Ascomycètes, Ascomycota) (Fig. 26).

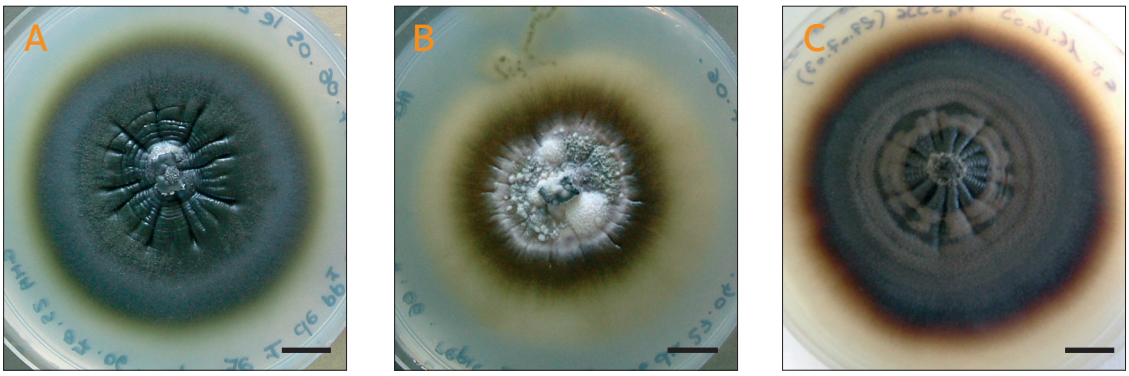


Figure 26. *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W. Gams. Aspects de colonies cultivées sur milieu malt-agar (A, B, C). Échelle : 1 cm.

L. Petri (1912) rattache certaines espèces responsables de symptômes typiques de l'esca aux genres *Cephalosporium* et *Acremonium*. L. Chiarappa (1959) réussit lui aussi à isoler des espèces du genre *Cephalosporium* sur des vignes atteintes d'esca. Elles provoquent une décoloration du bois. En 1974, une nouvelle espèce fongique est isolée chez un patient de l'Hôpital Universitaire de Standford (Californie ; Crous *et al.*, 1996). Il s'agit de *Phialophora parasitica* Ajello, Georg & C.-J.-K. Wang. Sa similitude avec les isolats obtenus sur *Vitis* est remarquée. Ces résultats sont confortés par les travaux de D.-L. Hawksworth et son équipe (1976 ; cité par Crous et Gams, 2000). Ils associent *Ph. parasitica* avec de nombreux champignons du bois, mais notent quelques différences morphologiques avec les champignons trouvés par L. Chiarappa (1959). Puis des tests sont réalisés sur des isolats sud-africains (Ferreira *et al.* ; cités par Larignon *et al.*, 2000). Ceux-ci provoquent une décoloration du bois et un colmatage des vaisseaux du xylème induits par les champignons. Des observations morphologiques conduisent ensuite les chercheurs à séparer clairement ces

isolats du genre *Phialophora* pour les rapprocher du genre *Acremonium*. C'est en 1996 qu'un nouveau genre, *Phaeoacremonium*, est créé sur la base des observations morphologiques et des données moléculaires (Yan *et al.*, 1995 ; cité par Crous et Gams, 2000). Des études phylogénétiques (Dupont *et al.*, 1998 ; cité par Larignon *et al.*, 2000) établissent définitivement une séparation entre *Phialophora* (Herpotrichiellaceae) et *Phaeoacremonium* (Magnaportaceae). La relation phylogénétique de *Phaeoacremonium chlamydosporum* est plus importante avec *Phialophora verrucosa* qu'avec d'autres espèces du même genre *Phaeoacremonium*. Une étude génétique réalisée sur des ADN ribosomiaux et la ß-tubuline ainsi que les observations morphologiques attestent de cette différence (Laloui, 1998). Ainsi, un nouveau genre est introduit pour tenir compte de ces différences : *Phaeomoniella* Crous & W. Gams, gen. nov.. Cet élément anamorphe (ou mitosporique, asexué) appartient aux Herpotrichiellaceae. La structure téléomorphe (méïosporique, sexuée) n'est pas encore identifiée. Néanmoins, l'observation d'une structure synanamorphe rapproche cette espèce du genre *Phoma*. Le mycélium est branchu avec des hyphes divisées par des septa. La paroi des hyphes est brune-verte alors que les septa sont plus sombres. La structure s'éclaircit autour des cellules conidiogènes, solitaires et terminales. Sur milieu de culture (PDA pour potato dextrose agar ou malt-agar), les colonies forment un tapis gris/noir-olive. La croissance radiale est de 5-6 mm en huit jours à 25 °C (température optimale ; croissance possible entre 15 et 30 °C). La germination des conidies peut intervenir de 5 à 40 °C, avec un optimum à 25 °C (Whiteman *et al.*, 2004). *Vitis vinifera* et *Actinia sinensis* sont les seuls hôtes connus. Son aire de distribution est très étendue : Afrique du Sud, Argentine, Australie, Chili, États-Unis d'Amérique, Europe, Nouvelle-Zélande.

Ce champignon est l'un des pionniers du syndrome esca. Il est probablement responsable de la forme « lente » de l'esca (Larignon, 2005). Il pénètre par les plaies de taille lors de périodes douces et pluvieuses (l'hiver principalement). La spore au contact d'une plaie germe, et le mycélium gagne la base du cep. Le champignon se développe dans le cep, au niveau des vaisseaux du bois. Sur du bois artificiellement infecté, le champignon progresse dans l'apoplaste puis colonise les cellules du parenchyme paratrachéal. Le champignon poursuit aussi sa croissance dans la lumière des vaisseaux (Cottral *et al.*, 2004). Sur une coupe transversale, des nécroses punctiformes caractéristiques sont observées (ou des stries noires en coupe longitudinale). Il est retrouvé dans la nécrose centrale brune et dure (prénécrose), dans les tissus autour de la pourriture blanche en amadou et au niveau des ponctuations noires en périphérie des nécroses. Il ne progresse pas (ou que peu) latéralement dans le bois. Le bagage enzymatique qu'il libère est surtout composé d'éléments cellulolytiques comme l'endo-1,4-ß-glucanase et la ß-glucosidase ainsi qu'une forte proportion d'amylases. La migration de propagules par le courant de sève brute est envisagée (Edwards *et al.*, 2004).

Les éléments disséminateurs (pycnides contenant de nombreuses pycnidiospores) sont invisibles à l'œil nu. Ils sont localisés sur les plaies de taille âgées, sous l'écorce ou à l'air libre. Les spores sont à dissémination aérienne, en hiver mais aussi lors de la période

végétative. On peut en trouver à la surface de tous les organes et notamment les sarments. La question d'une phase épiphyte se pose. Une étude du sol en Afrique du Sud montre qu'il est fréquemment trouvé dans la terre, avec *Cylindrocarpon spp.* (Damm *et al.*, 2005).

• *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.-J. Wingf. & Mugnai (Fig. 27).

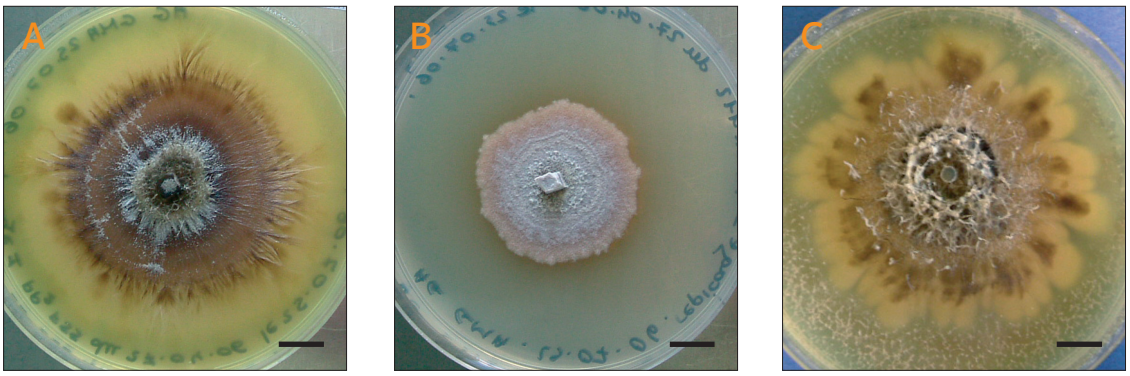


Figure 27. *Phaeoacremonium aloephilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai. Aspects de colonies cultivées sur milieu malt-agar (A, B, C). Échelle : 1 cm.

Suite à la création de ce nouveau genre en 1996, six espèces rejoignent *Phaeacremonium*. Parmi elles, quatre sont obtenues d'isolats réalisés sur du bois de vigne (*Vitis spp.*) : *Pm. chlamydosporum, Pm. aleophilum, Pm. angustius* et *Pm. inflatipes*. Les études moléculaires réalisées sur l'ADN ribosomique (ITS1, ITS2 et 5,8S) par J. Dupont et al. (1998 ; cité par Larignon *et al.*, 2000) ont permis d'établir une divergence entre les espèces de ce genre. En effet, *Pm. chlamydosporum* se trouve être plus proche des Chaetothyriales (Herpotrichiellaceae) dont certains anamorphes appartiennent au genre *Phialophora*, alors que les autres espèces sont plus proches des Magnaporthaceae. De plus, les études réalisées sur *Pa. chlamydospora* et *Pm. aleophilum* montrent une plus grande variabilité génétique sur ce dernier. Tégli (2001 ; cité par Pascoe *et al.*, 2004 ; Mostert *et al.*, 2004) en conclut que sa reproduction contribue à son essor génétique. Après de nombreux isolements sur ceps infectés, un téléomorphe (forme sexuée) est obtenu (Pascoe et al., 2004) : *Togninia minima* (Tul. & C. Tul.) Berl. (Calosphaeriaceae, Calosphaeriales, Ascomycètes, Ascomycota). Les ascomes, noirs et sphériques, sont prolongés par une pointe effilée. Souvent l'ensemble des pointes s'incurve dans la même direction, peut-être sous une influence phototropique. Sur milieu de culture (PDA ou malt-agar) la colonie est de couleur miel, avec un mycélium aérien grisonnant. Un pigment jaune diffuse dans le milieu de culture lors de la croissance. La croissance radiale varie de 3,5 à 15,5 mm en quinze jours, selon les souches, à 30 °C (température optimale). Il peut se développer dans une gamme de températures allant de 10 à 35 °C ; les spores peuvent germer entre 5 et 35 °C. Actuellement, 22 espèces font partie du genre *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M.-J. Wingf.. Ces espèces ont divers hôtes et elles peuvent être pathogènes pour l'Homme (*Pm. inflatipes*, *Pm. parasiticum* et *Pm. rubrigerum*) mais la plupart sont retrouvées sur des végétaux, dont la vigne. La répartition géographique

de *Pm. aleophilum* est très étendue (Afrique du Sud, Argentine, Australie, États-Unis d'Amérique, Europe).

Ce champignon est l'un des pionniers du syndrome esca. À partir de la moelle, il forme une nécrose brune-rose qui rejoint ensuite *Pa. chlamydospora* pour former la nécrose centrale brune et dure (prénécrose). Ce champignon a donc la capacité de progresser de cerne en cerne et suivant le courant de sève brute (Edwards *et al.*, 2004). Son bagage enzymatique est constitué d'enzymes cellulolytiques tels que l'endo-1,4-ß-glucanase et ß-glucosidase, mais aussi avec une forte activité amylase.

Les voies de pénétration du champignon ne sont pas connues (les plaies de tailles hivernales ne semblent pas constituer un point d'entrée). L'absence de sporée aérienne (révélée lors des tests de piégeage de spores) durant l'hiver permet de supposer qu'il agit selon un autre mode d'inoculation (Larignon, comm. pers.). La période propice à la contamination semble se situer pendant la période végétative, après celle des pleurs (*Ibid.*). Le mycélium est retrouvé sur le tronc et les bras excoriés. Des chercheurs californiens ont, en outre, trouvé *Pheoacremonium spp.* sur les racines, les feuilles et les grappes de vigne, ainsi que dans le sol (Eskalen *et al.*, 2004).

• *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. (Diatrypaceae, Xylariales, Sordariomycetidae, Ascomycètes, Ascomycota) (Fig. 28).

Avec plus de 150 espèces connues, le genre *Eutypa* Tul. & C. Tul. est répandu dans toutes les parties du monde. L'espèce *E. lata* compte huit variétés clairement identifiées. À l'heure actuelle, on sait que ce champignon colonise plus de soixante genres de végétaux différents, dont la vigne (*Vitis spp.*) et le kiwi (*Actinidia deliciosa*; Lecomte, 2003). On ignore, en revanche, s'il se comporte toujours comme un pathogène. Il est initialement trouvé sur l'abricotier, ce qui lui vaut le nom d'*Eutypa armeniacae*. La parenté entre *E. armeniacae* et *E. lata* est établie en 1985 (Lardner, 2003) et son anamorphe est finalement attribuée à l'espèce *Libertella blepharis* A.L.

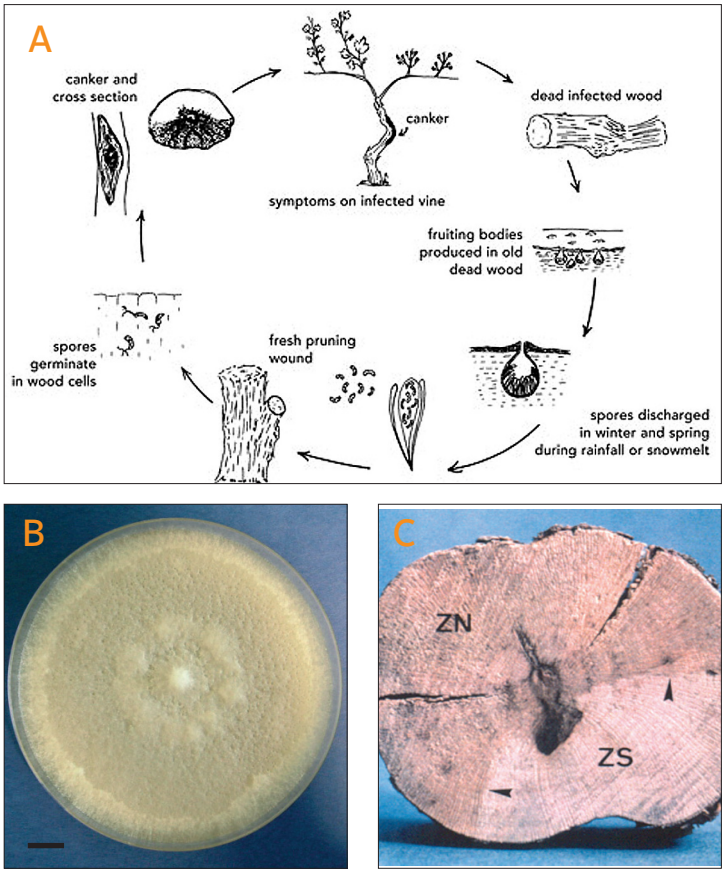


Figure 28. *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul.. (A), cycle biologique. (B), aspect de la colonie cultivée sur milieu malt-agar; échelle: 1 cm. (C), symptômes typiques sur le bois (ZN, zone de nécrose; ZS, zone saine).

Sm. (Diatrypaceae, Xylariales, Sordariomycetidae, Ascomycètes, Ascomycota ; plutôt qu'à *Cytosporina sp.*). Sur milieu de culture (PDA ou malt-agar), le mycélium forme un tapis duveteux régulier, à croissance rapide. La température optimale de croissance est de 25 °C.

Cette espèce est déjà redoutée par les viticulteurs pour une maladie mieux connue que l'esca, l'eutypiose. En effet, ce champignon est responsable à lui seul d'une atteinte vasculaire des ceps. Ainsi, il se développe à partir des plaies de taille. Sa pénétration dans la plaie dépend des conditions climatiques. La présence d'eau sur la plaie facilite la pénétration de la spore (sans doute aidé par une force d'imbibition ou de capillarité ; Larignon, comm. pers.). Le mycélium colonise la base du cep et forme une nécrose sectorielle brune et dure bien visible en coupe transversale, caractéristique de l'eutypiose. S'il est seul, le champignon envahit tout le bois. Les symptômes extérieurs sont caractéristiques : raccourcissement des entre-noeuds, rameaux nanisés, feuilles de petite taille, chétives et chlorotiques, inflorescences et infrutescences érigées avec coulure et millerandage. Cependant le champignon peut s'associer aux espèces impliquées dans le syndrome de l'esca. Dans ce cas, les symptômes de l'esca se surajoutent à ceux de l'eutypiose. *Eutypa lata* fait donc partie d'une phase pionnière de l'esca, bien qu'il ne soit pas indispensable au développement de ce syndrome.

• *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. (Hymenochaetaceae, Hymenochaetales, Basidiomycètes, Basidiomycota) (Fig. 29).

Figure 29. *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch.. Symptômes typiques sur le bois.

Depuis la fin des années 1920, on sait qu'une espèce fongique appelée *Phellinus ignarius* est impliquée dans le syndrome esca. Les nécroses sur le bois sont reproduites *in vitro* par Chiarappa en 1959. *Phellinus ignarius* est alors considéré à l'origine de cette maladie du bois en association avec *Stereum hirsutum*. Avec la reprise des recherches sur les maladies vasculaires en France, à la fin des années 1980, on retrouve *Ph. punctatus* (Fr. ex P. Karst.) Pilàt. clairement associé au syndrome esca. Néanmoins, son action semble se faire en second lieu, après l'implantation de *Pm. aleophilum* et *Pa. chlamydospora* et éventuellement de *E. lata*. De plus, il ne semble pas pouvoir se développer dans du bois sain. Après nouvel examen, les isolats de *Ph. ignarius* changent d'espèce, attribués alors à *Ph. punctatus*. Cette espèce est enfin reprise sous la dénomination *Fomitiporia punctata* (Fr.) Murrill. (Hymenochaetaceae, Hymenochaetales, Basidiomycètes, Basidiomycota). Récemment, des isolats européens sont réexaminés pour aboutir de nouveau à une révision de leur nom d'espèce. On parle alors de *F. mediterranea*

M. Fisch. comme étant l'espèce impliquée dans le syndrome esca (Larignon, 2004). Cette nouvelle espèce est morphologiquement semblable à *F. punctata* mais la biologie moléculaire, les comportements reproducteurs et les tests d'appariement des spores montrent qu'il s'agit de deux espèces bien distinctes (Fischer et Kassemeyer, 2004).

C'est un champignon qui achève la mise en place de la forme lente de l'esca. Les fructifications du champignon se développent dans les zones humides des vignes malades et libèrent des spores qui contaminent les plaies de taille. Ce champignon ne s'installe que sur une nécrose brune et dure, bien développée. On peut donc le retrouver sur une nécrose centrale obtenue par le développement des pionniers de l'esca (*Pm. aleophilum* et *Pa. chlamydospora*). Il est également possible de l'isoler à partir des nécroses sectorielles issues de l'action de *E. lata*. Il attaque cette nécrose pour en faire une structure claire et tendre (pourriture blanche, texture « en amadou ») qui reste en position centrale ou pseudo-centrale. Dans le cas où l'un des champignons pionniers est absent, il ne se forme pas de nécrose claire et tendre. *F. mediterranea* reste alors cantonné au cône de cicatrisation. Quelques fois, *Pm. aleophilum* est remplacé par *Phomopsis sp.* (Valsaceae, Diaporthales, Sordariomycetidae, Ascomycètes, Ascomycota). Enfin *F. mediterranea* peut aussi se développer sur les nécroses brunes sectorielles dues au BDA (*Botryosphaeria spp.*). Son bagage enzymatique met en évidence une très forte activité lignolytique (phénol oxydase, laccase et peroxydase) ainsi qu'une bonne activité cellulolytique (principalement endo-1,4-ß-glucanase et ß-glucosidase).

Toutes ces données conduisent à penser qu'il ne s'agit pas d'un pionnier du syndrome esca. Il est d'ailleurs considéré comme un saprophyte plutôt qu'un parasite. Toutefois, une étude sur des vignes argentines montre qu'une inoculation par *Phellinus sp.* uniquement peut conduire au développement de nécroses qui peuvent abriter par la suite *Pm. spp.* & *Pa. chlamydospora* parmi d'autres. Dans ce cas, cette espèce pourrait faire partie de la première « vague d'assaut » sur l'hôte.

• *Botryosphaeria spp.* (Botryophaeriaceae, Dothideales, Dothideomycetidae, Ascomycètes, Ascomycota) (Fig. 30).

Le Black Dead Arm (BDA) est une maladie découverte en Hongrie en 1974 et en Italie en 1978 (Larignon *et al.*, 2001). L'agent pathogène responsable fut appelé respectivement *Botryosphaeria stevensii* Shoem. et *Botryosphaeria obtusa* (Schweim.) Shoem. dans chacun des deux pays. Longtemps confondu avec l'esca, en raison de symptômes foliaires difficilement différenciables, le Black Dead Arm n'a été identifié que récemment en

Figure 30. *Botryosphaeria spp.*.Symptômes typiques sur le bois (A); symptômes foliaires (B).

France (Larignon *et al.*, 2001). Actuellement, le genre *Botryosphaeria* regroupe près de 200 espèces et variétés. Trois espèces ont été identifiées dans le Bordelais. Il s'agit de *B. obtusa*, *B. stevensii* et *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not., celles-ci étant accompagnées d'un cortège d'espèces fongiques, notamment *Trichoderma spp.* en grand nombre. En culture *in vitro* la croissance mycélienne et la germination des spores de *B. obtusa* peut s'effectuer entre 5 et 40 °C. Son optimum de croissance se situe à 30 °C et celui de germination entre 25 et 30 °C. La voie de pénétration du champignon n'est pas identifiée. Sur la plante atteinte, on peut noter de longues bandes brunes situées juste sous l'écorce. Ce type de nécrose représente les défenses mises en place par la plante. La présence du champignon a été mise en évidence au sein de ces bandes. On peut observer une forme « lente » (variable en fonction des cépages) et une forme « sévère » pour cette maladie vasculaire dont les symptômes apparaissent entre mai et juin. Les isolats obtenus sur vignes malades montrent la présence de nombreuses espèces du genre *Botryosphaeria*, et principalement de *B. obtusa*. Certaines souches ont été retrouvées dans d'autres types de nécroses, sectorielles et de couleur brun-gris. Pour *B. stevensii* on connaît une anamorphe, *Diplodia mutila* (Fr.) Mont., et une syntéléomorphe, *Physalospora mutila* N. E. Stevens. Pour *B. obtusa* on suppose une anamorphe, *Sphaeropsis malorum* (Berk.) Berk..

Les spores sont à dissémination aérienne, plus particulièrement pendant la période végétative de la vigne, surtout lors des précipitations et pour des températures supérieures à 10 °C. Des spores sont retrouvées sur tout le cep (tronc et bras) mais aussi sur les sarments laissés à terre.

L'association avec d'autres champignons, p. ex. *Phomopsis viticola* ou *Eutypa lata*, peut amener à penser qu'il s'agit d'un saprophyte ou d'un pathogène secondaire.

4.2 - Du point de vue de la vigne

4.2.1 - Généralités

Sur le cep de vigne, les maladies vasculaires conduisent à des symptômes variables mais que l'on peut regrouper dans deux types différents (Dubos *et al.*, 2004). Les symptômes graduels, pour des formes de maladie relativement lentes, peuvent permettre un diagnostic. Ainsi, peuvent être prises en compte afin d'envisager éventuellement une solution appropriée au type d'infection, la nature et la gravité de la maladie . Les symptômes foudroyants, dits apoplectiques, sont caractérisés par la rapidité d'expression laissant le viticulteur parfois perplexe quant à la nature exacte du phénomène. La particularité de ces affections tient aussi dans la versatilité des symptômes. Ceux-ci peuvent en effet apparaître et disparaître, de manière pour l'instant inexpliquée, au fil des années (Larignon, 2005). Ceci, ajouté à la difficulté d'analyser les symptômes observés, rend d'autant plus ardu le suivi épidémiologique. **Les symptômes observés sur les ceps sont la résultante d'une action d'attaque et d'une action de défense** (Gomez *et al.*, 2004). Le ou les pathogènes

fongiques ont une action de prédation sur l'hôte, puisant leur nourriture dans la décomposition des structures du bois de la vigne. Ce faisant, ils touchent aux tissus conducteurs de sèves vitales à l'alimentation (hydrique, minérale et hydrocarbonée) de la vigne. Ainsi, leur action est à l'origine d'une altération de la solidité et de la viabilité de cette architecture végétale. La vigne présente une action de défense relayée par les cellules associées aux vaisseaux (CAV). La plante attaquée peut activer un certain nombre de barrières pour contrer l'avancée du ou des pathogènes. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle les zones « de combat » (péri-nécrotiques) sont souvent plus dures, plus colorées. C'est donc selon un processus complexe de défense que la plante va :

- colmater des vaisseaux par des thylles et des gommes (Gomez *et al.*, 2004),
- épaissir et imperméabiliser des parois par des dépôts de lignine, subérine et cutine
- ainsi que rendre cet environnement toxique pour l'agresseur par des composés phénoliques (Jeandet *et al.*, 2002 ; Mugnai *et al.*, 2004),

ayant pour effet de restreindre la progression de son ennemi (Courby, 1997). Elle condamne d'elle-même une partie de son système vasculaire (compartimentation, cf. le modèle CODIT). Mais, l'agresseur ne se contente pas de cette attaque de front, physique et localisée. Bien souvent il dispose aussi d'une série d'armes de longue portée : il s'agit d'une série de molécules toxiques issues de son métabolisme secondaire. Elles empruntent le système vasculaire encore viable pour aller semer le trouble dans toutes les autres parties de la plante. On parle alors de molécules systémiques. Leur action est bien visible sur le feuillage, les fleurs et les fruits. Ainsi, les symptômes foliaires seraient le reflet des actions directes (dégradation des tissus conducteurs) et indirectes (toxines fongiques ou substances de type hormonal) du pathogène (Larignon, 2004). C'est dans le cas des formes lentes des maladies que l'on peut le mieux apprécier l'étendue et la progression des dégâts occasionnés par le ou les champignons.

4.2.2 - Les formes graduelles, lentes, des maladies vasculaires (Fig. 31)

C'est durant la période de végétation (photosynthèse et forte circulation des sèves) que les pathogènes sont les plus actifs au sein des ceps. Le reflet des carences dues à l'oblitération des tissus conducteurs et l'impact des phytotoxines sur le fonctionnement cellulaire (Octave *et al.*, 2006 ; Perrin-Cherioux *et al.*, 2004 ; Abou-Mansour *et al.*, 2004a) peuvent s'exprimer sur le feuillage (Mugnai *et al.*, 1999 ; Larignon, 2004). Au printemps, les feuilles peuvent ne pas se développer ou demeurer atrophiées chez un cep atteint d'eutypiose. L'arsenal chimique de *E. lata* est composé de l'eutypine et de ses dérivés (Renaud *et al.* cité par Mahoney *et al.*, 2003 ; Wiechel *et al.*, 2004) mais aussi de substances polypeptidiques (Octave, 2005). Ces symptômes sont restreints à un seul bras ou s'étendent à l'ensemble de la souche. Sur les feuilles bien développées, en pleine période végétative (à partir de Mai-Juin), on peut observer une nécrose progressive des feuilles en passant par des stades différents, identifiés pour chaque maladie.

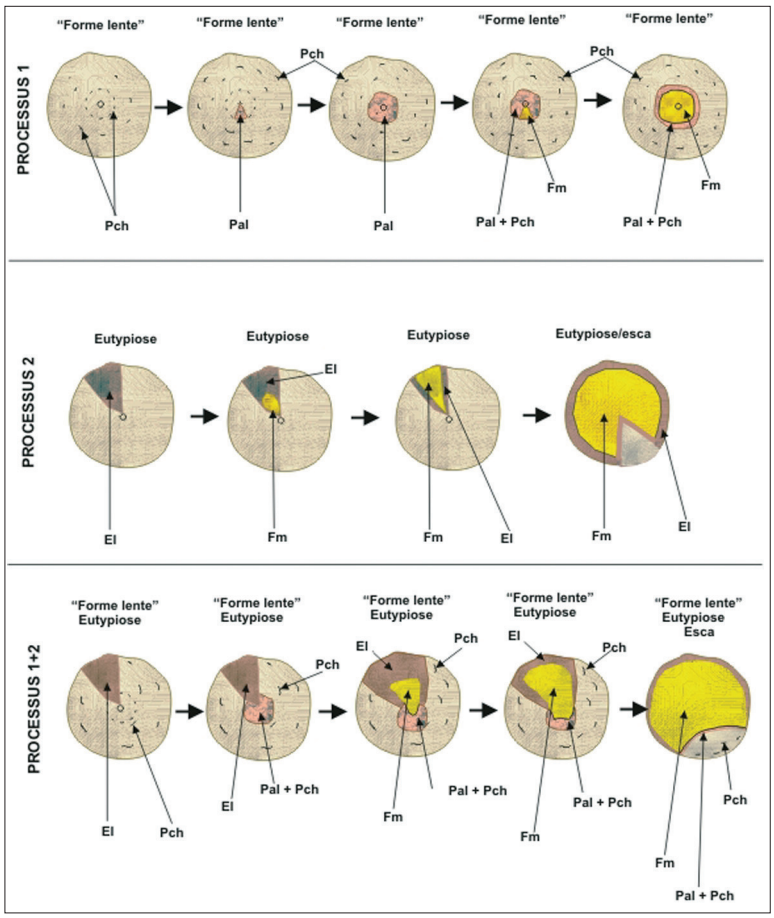


Figure 31. Représentation schématique du processus de la dégradation du bois et relations entre les symptômes foliaires et les nécroses dans les tissus ligneux.

Pch = *Phaeomoniella chlamydospora*, Pal = *Phaeoacremonium aleophilum*, Fm = *Fomitiporia punctata*, El = *Eutypa lata*

À noter la présence d'une microflore accompagnante à chaque étape des différents processus (plus rarement dans les ponctuations noires) menant à la dégradation du bois (Larignon, 2004).

Pour le syndrome de l'esca, une décoloration internervaire (laissant apparaître les pigments photosynthétiques secondaires, xanthophylles et caroténoïdes) forme des îlots jaunâtres et ce, pour tous les cépages à la fin de Juin. Ces îlots grandissent et se rejoignent en larges plages, prenant une teinte rougeâtre chez les cépages noirs. Par la suite, l'ensemble des plages devient nécrotique et se dessèche. On assiste donc à un dégradé de couleurs et d'aspect, de la nervure vers le limbe, du vert (sain) au jaune (chlorotique) puis au marron (nécrotique) chez les cépages blancs. Pour les cépages noirs, la couleur passe du vert (sain) au jaune (chlorotique) puis au rouge (post-chlorotique) pour finir au marron (nécrotique). Ceci aboutit, dans tous les cas, à une disparition progressive des zones chlorophyliennes jusqu'au desséchement complet de la feuille (Dubos *et al.*, 2004). Des études ont été réalisées sur les modifications biochimiques et métaboliques au sein des tissus foliaires (Petit *et al.*, 2005 ; Amalfitano *et al.*, 2005). Si le rôle de molécules phytotoxiques est indéniable dans la mise en place des symptômes foliaires, l'appauvrissement des apports nutritifs au niveau foliaire est également à prendre en compte. Les substances fongiques identifiées pour l'instant sont le sterehirsutinal et ses dérivés dûs à *Stereum hirsutum* (Dubin *et al.*, 2000) et des naphtalénones de *Pm. aleophilum* et *Pa. chlamydospora* (Abou-Mansour *et al.*, 2004b).

Pour le BDA, il y a également des nécroses internervaires sur des feuilles matures. C'est ce qui a longtemps laissé cette maladie dans la confidentialité au profit de l'Esca. Néanmoins, il existe quelques différences. La progression des symptômes reste sur le même principe mais intervient plus tôt, à la fin de mai. Sur la base d'îlots chlorotiques, rouges vineux chez les cépages noirs et jaune orangé chez les cépages blancs, se forment de larges

plages internervaires. Ces dernières se nécrosent et s'élargissent. Sur une feuille très atteinte on passe directement, de la nervure vers le limbe, du vert (sain) au marron (nécrotique) chez les cépages blancs et avec une transition rouge vineux (foncé) chez les cépages noirs. Il n'y a pas de liseré jaunâtre comme dans le cas de l'esca. Les phytotoxines impliquées sont des pullulanes et des pentacétides (même voie de synthèse que les stérols).

Les inflorescences de la vigne sont des structures discrètes. Il n'est pas toujours aisé de repérer un quelconque changement morphologique. La plupart du temps, on préfère évaluer les dégâts sur l'infrutescence, la grappe, considérant aspect, homogénéité et allure des grains. Dans le cas de l'eutypiose, l'inflorescence arbore un port érigé et présente de la coulure (stérilité des fleurs). Cela se traduit par une grappe de piètre aspect, tordue. Les grains sont de petite taille et inégaux. On observe aussi de nombreux manques aux endroits des fleurs stériles : c'est le millerandage. En ce qui concerne l'esca, un retard de maturation des baies est observé mais aussi un flétrissement et dessèchement de toute la grappe avec l'évolution de la maladie. Il en va de même pour le BDA, avec un dessèchement de l'inflorescence ou de l'infrutescence dans les cas les plus sévères.

Sur le cep nous avons à la fois le point d'entrée du pathogène, la brèche mais aussi la zone d'implantation du ou des champignons ainsi que la zone de combat entre pathogène et hôte. Enfin, nous avons la zone de sortie, de dissémination pour le pathogène. Bien que cela ne soit pas avéré dans le cas du BDA, les plaies sur le tronc et les bras (dont les plaies de taille) constituent la voie d'entrée principale des pathogènes. Même si aucun symptôme n'est perceptible au sein du feuillage, la réalisation de coupes dans un cep permet éventuellement la visualisation de nécroses dues au développement des pathogènes. Chaque espèce fongique produit un arsenal enzymatique particulier. Il lui permet de dégrader certains constituants du bois en molécules plus simples et utilisables pour son propre métabolisme. Cet arsenal peut être estimé en observant la nature des nécroses. Des études biochimiques permettent par la suite de confirmer et d'affiner les premières estimations. Mais il faut garder à l'esprit que toute nécrose est en fait le résultat concomitant de l'action dévastatrice du pathogène et de celle préservatrice de l'hôte. La « zone d'occupation » est souvent bordée par les premières lignes de défense de l'hôte.

Dans le cas de l'eutypiose, nous sommes en présence d'une nécrose sectorielle brune et dure. Cette morphologie prouve qu'*E. lata* progresse relativement facilement vers l'écorce mais rencontre des difficultés à franchir les rayons ligneux. Par contre, ce pathogène colonise sans peine les différents cernes de la moelle jusqu'à l'écorce. Le cambium et le phloème ne semblent pas échapper à son avancée. La coloration brune est le signe d'une activité cellulolytique importante. La dureté de la nécrose indique que le bois n'a pas perdu la solidité conférée par ses épaisses parois lignifiées (souvent renforcées pour la défense). Comme nous venons de le mentionner, les rayons ligneux transversaux constituent un obstacle à la progression de *E. lata*. Leur orientation et leur composition chimique peuvent expliquer ce phénomène. Les rayons ayant une hauteur limitée, ils constituent une barrière discontinue qui ne fait que retarder la progression du champignon (modèle CODIT,

mur 3 ; Rioux, 2004). Une étude ultra-structurale a montré que les cellules associées aux vaisseaux (qui sont des cellules de rayons modifiées et des cellules de parenchyme ligneux vertical modifiées) modifient leur comportement sous l'impulsion de peptides et d'autres molécules (eutypine) fongiques. Cela se traduit notamment par un épaississement de la paroi jouxtant l'élément de vaisseau, surtout au niveau des ponctuations (protubérances pariétales et dépôts de lignine) ainsi que par une synthèse accrue de tannins (Rudelle, 1997 ; Fleurat-Lessart *et al.*, 2000). Les études biochimiques effectuées sur *E. lata* montrent des activités cellulase et xylanase (pour dégrader les hémicelluloses) importantes au contact du bois annuel mais beaucoup plus faibles dans le bois de cœur. Dans ce dernier, ce sont les activités protéase et chitinase qui prédominent, en corrélation avec une importante croissance mycélienne (Schmidt *et al.*, 1999). Une autre étude montre une faible activité lignine peroxydase (H_2O_2 dépendante ; del Rio *et al.*, 2004).

Avec le syndrome esca, nous pouvons observer différentes nécroses sur une coupe transversale. Dans un premier temps, il s'agit de taches punctiformes noires disséminées dans différents cernes du bois. Elles sont dues à *Pa. chlamydospora*. Sa présence à l'intérieur des cellules du parenchyme xylémien provoque la formation de thylles dans les éléments de vaisseaux adjacents. Il se forme des zones de réaction étendues bien au-delà de la zone de croissance du champignon (Cottral *et al.*, 2004). Ces ponctuations indiquent que le champignon possède une activité cellulolytique. Ainsi, il se limite à des structures en îlots ou alvéolaires (un petit groupe de vaisseaux). Cependant, son comportement change avec l'arrivée du deuxième champignon pionnier de l'Esca. *Pm. aleophilum* s'installe par la suite en formant une nécrose centrale brune-rose, à partir de la moelle. Ce champignon progresse vers l'écorce et se mélange avec *Pa. chlamydospora* au fur et à mesure des rencontres successives de ponctuations noires. *Pm. aloephilum* semble beaucoup mieux armé contre la plante car il progresse plus facilement et rapidement. La coloration de la nécrose suggère une activité cellulolytique importante. Sa dureté prouve que le bois conserve sa solidité (parois lignifiées). Lorsque la nécrose brune-rose est bien développée, elle contient les deux champignons sans distinctions apparentes. L'équipement enzymatique des deux pionniers de l'esca diffère peu (Mugnai *et al.*, 1999) : tous deux une activité cellulolytique (endo-1,4-ß-glucanase et ß-glucosidase) et surtout une activité amylase importante. En revanche, contrairement à *Pa. chlamydospora*, *Pm. aleophilum* possède une action lignolytique grâce à des activités lignine peroxydase et laccase importantes mais son activité manganèse peroxydase est plus faible (del Rio *et al.,* 2004). Une deuxième nécrose prend place à la suite de celle brun rose et la dégrade. Il s'agit d'une nécrose claire et tendre, due à l'action de *F. mediterranea*. Elle ne semble donc limitée qu'à l'avancée de la nécrose précédente. La décoloration obtenue suggère une activité lignolytique. L'étude enzymatique met en évidence que cette espèce possède effectivement ce type d'activité (phénol oxydase, laccase et peroydase) doublée d'une activité cellulolytique (endo-1,4-ß-glucanase et ß-glucosidase ; exo-cellobiohydrolase faible). Malgré son bagage enzymatique il ne semble pas, contrairement aux

champignons pionniers, pouvoir s'installer sur un bois sain. Une action destructrice préalable est nécessaire à son implantation.

L'étude du Black Dead Arm est récente, et donc il y a peu d'informations dans la littérature, au regard des autres maladies cryptogamiques. Comme nous l'avons déjà mentionné, le champignon (*Botryosphaeria spp.*) se loge sous l'écorce et forme une nécrose en bande brune d'un à deux centimètres de large et quelques millimètres de profondeur (Auger *et al.,* 2005). Cette nécrose est délimitée vers l'intérieur par une bordure jaune orangé, sur quelques millimètres en profondeur, dans laquelle les vaisseaux sont colmatés (Larignon *et al.,* 2001). Quelques questions restent encore à éclaircir. Si la nécrose est véritablement sous l'écorce, peut-il s'agir d'une nécrose phloémienne ? Si tel est le cas et si le cambium reste fonctionnel, ce dernier constituerait une barrière quasi infranchissable (cf. modèle CODIT). La zone jaunâtre dans le bois serait simplement la réaction de la plante à cette attaque. Cela expliquerait pourquoi la nécrose reste cantonnée à cette bande superficielle, enchâssée entre écorce et cambium, contrainte dans son développement à aller vers le haut et surtout vers le bas en suivant le courant de sève élaborée. Dans le cas où il s'agit effectivement d'une nécrose uniquement vasculaire (xylémienne), alors elle se restreint à la partie annuelle du bois sans aller en profondeur dans le bois pérenne (où la coloration traduit du bois de réaction). De telles constatations sont d'importance car elles sous-tendent des activités enzymatiques particulières. Nul besoin de lignolyse. Les réserves sont à disposition, en abondance au sein du phloème.

4.2.3 - Les formes foudroyantes ou apoplexies

Une partie ou l'ensemble du cep se dessèche en une courte période. Bien souvent cela se produit lors de conditions climatiques déjà défavorables pour l'homéostasie de la vigne (p. ex. stress hydrique dû à une période chaude et sèche ; Larignon, 2004). Un dessèchement des feuilles et des rameaux puis la chute des feuilles sont observés. De la même manière, les fleurs et les fruits se dessèchent. Bien souvent la rafle reste sur le cep. L'observation du cep en coupe transversale montre une nécrose ayant obturé la quasi totalité du système vasculaire. Les parties herbacées, feuilles et zones en croissance, ne sont plus alimentées en eau. Cela se produit sur un seul bras, plusieurs bras ou le cep entier. Ce déficit brusque ne laisse pas le temps aux autres symptômes de la maladie de s'exprimer. Ces symptômes sont similaires à ceux observés pour d'autres maladies liées à une limitation (folletage) ou une interruption (pourridié) de la circulation d'eau (Dubos *et al.,* 2004). Lors de l'apoplexie, comme dans le cas de la forme lente, une nécrose centrale claire et tendre (due à *F. mediterranea*) occupe pratiquement tout le diamètre du cep. Elle est bordée d'une structure brun noir et dure (avec *Pm. aleophilum* et *Pa. chlamydospora*). Parfois on observe quelques ponctuations noires (dues à *Pa. chlamydospora*) lorsqu'il existe encore une zone de bois fonctionnelle. C'est un cas d'apoplexie typique, ou esca au sens strict. La nécrose centrale claire et tendre peut aussi s'ajouter à une nécrose sectorielle bien développée, caractéristique de *E. lata*. On retrouve donc ici une forme sévère de l'eutypiose doublée d'esca.

On connaît aussi des cas sévères de BDA, où un rameau se dessèche totalement et les feuilles tombent (celles de la base du rameau en premier). Elle semble due à une zone de réaction étendue au bois pérenne, de couleur jaune orangé, ou à une nécrose sectorielle brune ou noire (présence de *E. lata* ?).

4.2.4 - Des molécules fongicides peuvent-elles atteindre les champignons pathogènes vasculaires ?

Les pathogènes vasculaires situés dans le bois ou le phloème, ou encore dans les deux tissus, sont hors d'atteinte des fongicides commerciaux présentés précédemment (cf. § 3.3) car ces derniers n'ont pas les propriétés de systémie requises. La systémie est l'aptitude d'une molécule à se déplacer dans la plante pour atteindre sa cible. Dans ce cas le produit circule dans l'appareil conducteur de la plante. Cela suppose qu'il est capable de franchir relativement aisément la membrane plasmique (MP), soit par diffusion à travers la bicouche lipidique ou par diffusion autorisée par un canal, soit par diffusion facilitée, soit encore par translocation secondaire énergisée par le gradient électrochimique de protons entretenu par l'ATPase-H^+ de la MP (Fig. 32).

• *Les systèmes conducteurs de sève*

Le phloème et le xylème sont constitués de plusieurs types cellulaires ayant une ou plusieurs fonctions précises et offrant des homologies fonctionnelles : élément criblé (EC) (transport longitudinal de la sève élaborée), cellule compagne (CC ; transport latéral), cellule du parenchyme axial (stockage), cellule du parenchyme radial ou élément de rayon libérien (stockage et transport radial), éventuellement fibres (soutien) pour le phloème ; élément de vaisseau (EV) (transport longitudinal de la sève brute), cellule associée au vaisseau (CAV ; transport latéral), cellule du parenchyme ligneux axial (stockage des réserves), cellule du parenchyme radial ou élément de rayon ligneux (stockage de réserves et transport radial) et fibres (soutien) pour le bois (Fig. 33 A). Il existe bien sûr des différences entre les deux tissus, entre autres la structure des parois et les relations entre les cellules conductrices et les cellules associées. Ainsi, l'élément criblé et la cellule compagne sont

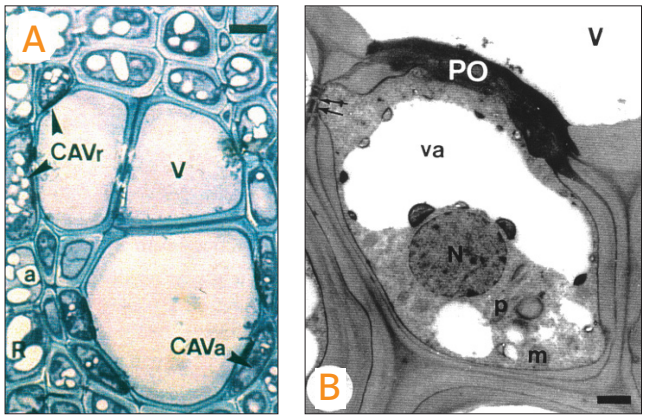


Figure 33. Structure du bois de vigne. (A) Les principaux éléments constitutifs. Divers types cellulaires : parenchyme présentant des grains d'amidon (a) ; CAVa, cellule associée au vaisseau dérivée du parenchyme ligneux axial ; CAVr, cellule associée au vaisseau dérivée du parenchyme ligneux radial ; R, rayon ligneux ; V, vaisseau. (B) Détail d'une cellule associée au vaisseau. Noter l'absence de plasmodesmes au niveau de la large ponctuation (PO) située à l'interface avec l'élément de vaisseau (V). En revanche des plasmodesmes (flèches en haut à gauche) permettent des relations symplastiques avec les cellules vivantes voisines. m, mitochondrie ; n, noyau ; p, plaste ; va, vacuole (Rudelle, 1997).

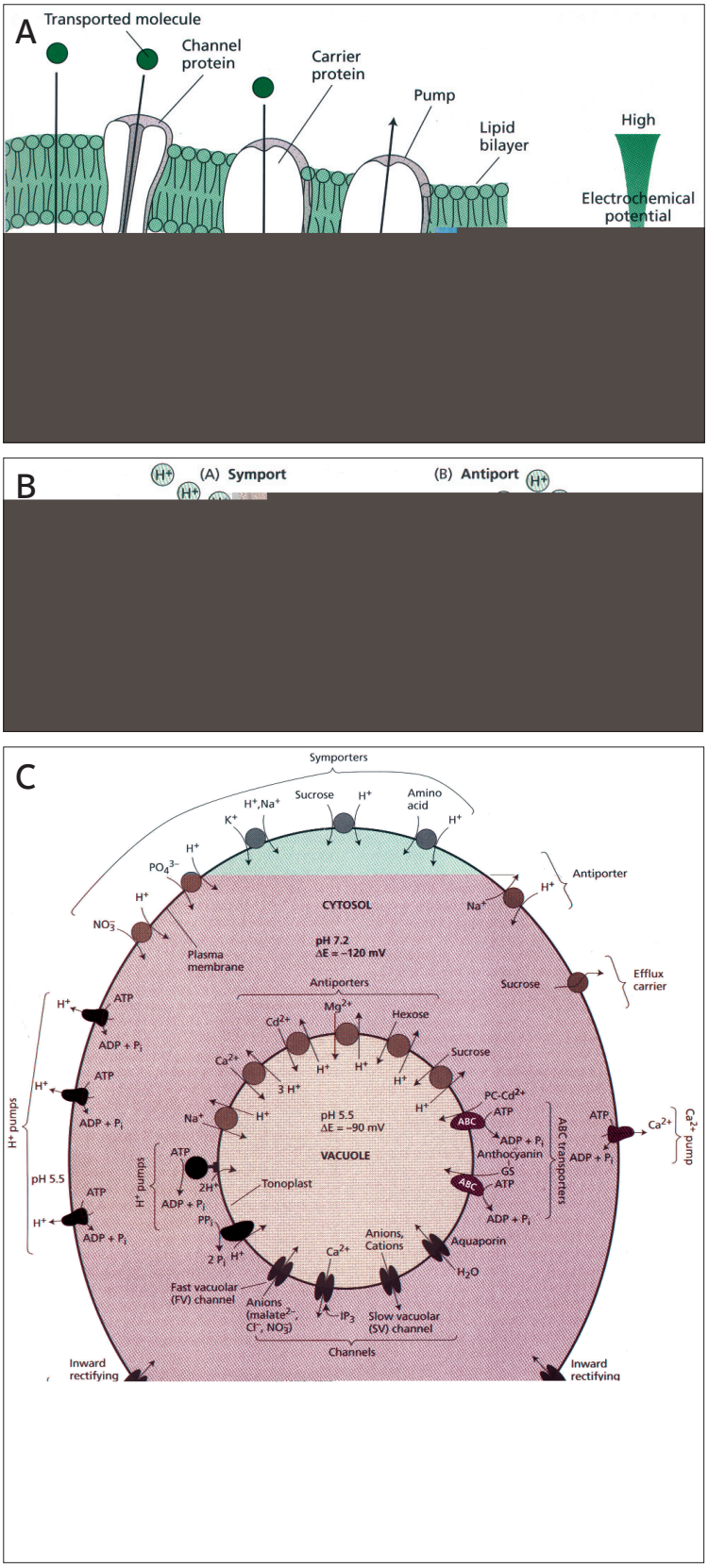


Figure 32. Les transports cellulaires au sein d'une cellule végétale. (A) Le transport passif utilisant le gradient électrochimique permet la migration des molécules (diffusion simple à travers la bicouche lipidique ou par un canal, ou encore diffusion facilitée par un transporteur). Le transport actif primaire, lié en général à l'hydrolyse de l'ATP, assure le déplacement d'ions ou de molécules dans le sens contraire à leur gradient électrochimique ; on parle alors de pompe. (B) Le gradient électrochimique de protons généré par les ATPases-H^+ est utilisé pour "énergiser" des translocateurs secondaires. Si les protons et le substrat A sont transportés dans le même sens on parle de symport. S'ils le sont dans des sens opposés, il s'agit d'un antiport. (C) Vue d'ensemble des processus de transport en vigueur au niveau du plasmalemme (entre apoplaste et cytoplasme) et du tonoplaste (entre cytoplasme et suc vacuolaire). On retrouve des canaux (en noir, vers le bas), des pompes (en vert, à gauche et à droite) et des transporteurs (symports, antiports et uniports vers le haut) régissant les échanges entre les différents compartiments (Taiz et Zeiger, 1998).

reliés par des plasmodesmes branchus alors qu'il n'y a pas de relations symplastiques entre l'élément de vaisseau et la CAV (Fig. 33 B).

L'ATPase pompe à proton de la MP est assez fortement exprimée dans les CAV (Fromard *et al.*, 1995). Elle permet, au niveau du système racinaire, l'accumulation de divers solutés dans ce type cellulaire et, de ce fait, leur largage dans les vaisseaux. Ce méca-

nisme, pressenti depuis quelques décennies, est à l'origine de la poussée racinaire permettant l'ascension de la sève vasculaire. Un second mécanisme également connu depuis longtemps est l'appel foliaire généré par la transpiration (Fig. 34).

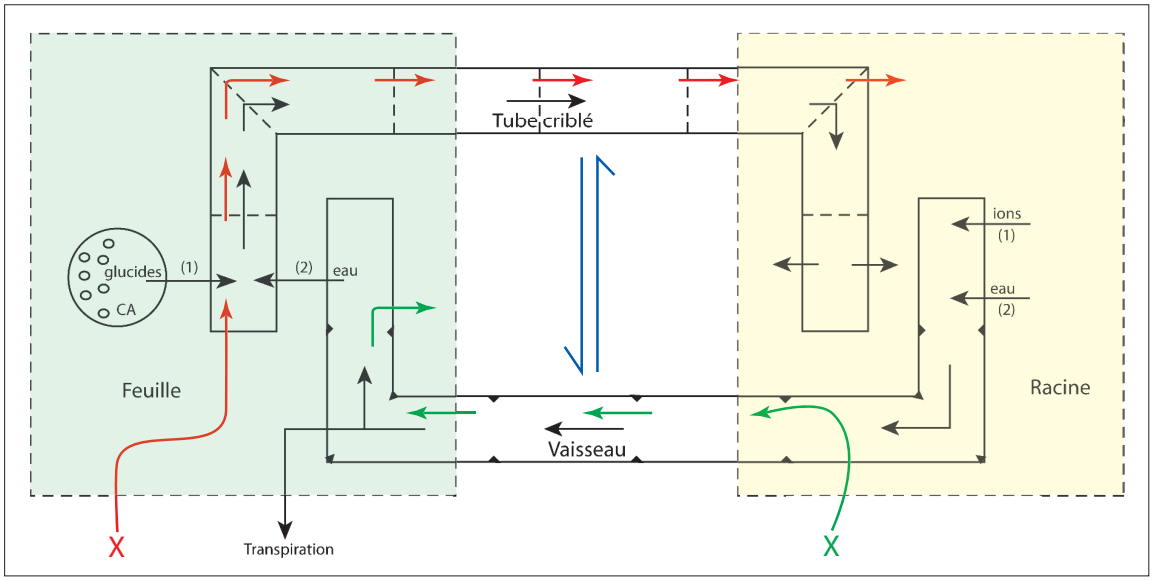


Figure 34. Schématisation de la circulation des sèves chez le végétal (Bonnemain, 1975) et les différents types de systémie concernant les xénobiontes (X). ⟶ systémie vasculaire ou apoplastique ; ⟶ systémie phloémienne ou symplastique ; ⟶ échanges entre le phloème et le xylème permettant l'ambimobilité. CA : cellule assimilatrice.

L'ATPase pompe à proton de la MP est fortement exprimée dans le phloème, en particulier dans les CC (Bouché-Pillon *et al.*, 1994), et plus particulièrement lorsqu'il s'agit d'espèces à chargement apoplastique (Fig. 35 B). Dans ce cas, le complexe CC - EC capte de manière très efficace les solutés (dont les produits de la photosynthèse) présents dans la paroi, c'est-à-dire dans le compartiment apoplastique. Chez les espèces à chargement symplastique, les produits de la photosynthèse transitent par les plasmodesmes du parenchyme assimilateur au complexe CC - EC (Fig. 35 A). Dans ce cas, le rôle de l'ATPase-H^+ de la

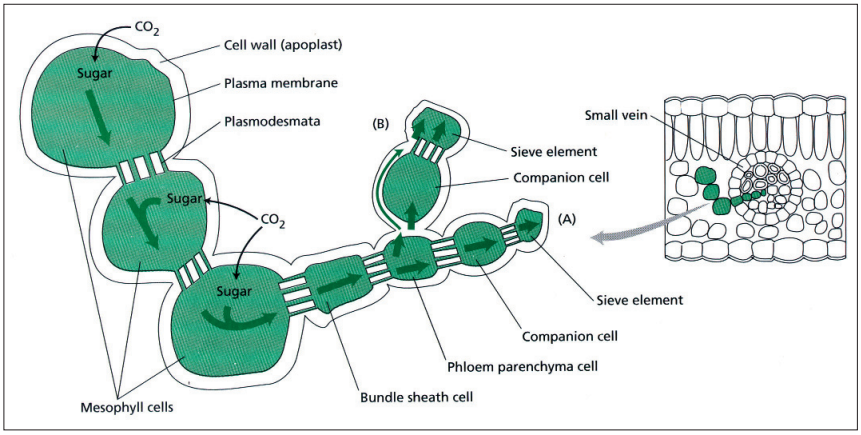


Figure 35. Le chargement des photoassimilats dans les tubes criblés. Les produits de la photosynthèse migrent préférentiellement de cellule en cellule, par les plasmodesmes, jusqu'aux cellules de parenchyme libérien. Ils peuvent poursuivre leur cheminement par les plasmodesmes (voie symplastique) jusqu'à l'élément criblé (A). Ils peuvent aussi, chez diverses espèces végétales, passer dans la paroi du phloème (compartiment apoplastique phloémien) et être ensuite chargés activement par le complexe cellule compagne - élément criblé à partir de ce compartiment (voie apoplastique ; B) (Taiz et Zeiger, 1998).

MP est d'énergiser le recyclage vers le symplaste des solutés largués dans le compartiment apoplastique foliaire.

Le mécanisme d'absorption des nutriments par les tissus foliaires et plus particulièrement par le complexe CC - EC est un symport (ou cotransport) avec H^+ (Fig. 36) (Giaquinta, 1977 ; Komor *et al.*, 1977 ; Malek et Baker, 1977 ; Delrot et Bonnemain, 1978, 1981). Cette translocation secondaire tend à dissiper le gradient électrochimique de protons créé et entretenu par l'ATPase pompe à proton fortement exprimé au niveau de ce complexe comme nous l'avons déjà indiqué. De nombreuses molécules organiques s'accumulent ainsi dans le tube criblé, notamment les sucres et les acides aminés synthétisés par la plante. Ce mécanisme, suite à l'influx d'eau qui en résulte, est à l'origine d'un transport de sève élaborée par la pression de turgescence (Fig. 34, Fig. 36) selon l'idée développée dès 1932 par Münch. La seconde conséquence de la forte activité ATPase-H^+ de la membrane plasmique du complexe conducteur est l'entretien d'un gradient de pH élevé. En effet, le pH de la sève élaborée est proche de 7,5 ou de 8,0 alors que le pH de la paroi de ce complexe est supposé être de l'ordre de 5,0. Un tel gradient permet le piégeage d'acides faibles endogènes dans la sève libérienne suite à leur dissociation dans ce compartiment légèrement alcalin (Fig. 36). Il peut permettre par la même occasion le piégeage d'herbicides porteurs d'une fonction acide carboxylique (Delrot et Bonnemain, 1991). Dans ce cas, les produits se déplacent à longue distance et sont par conséquent systémiques.

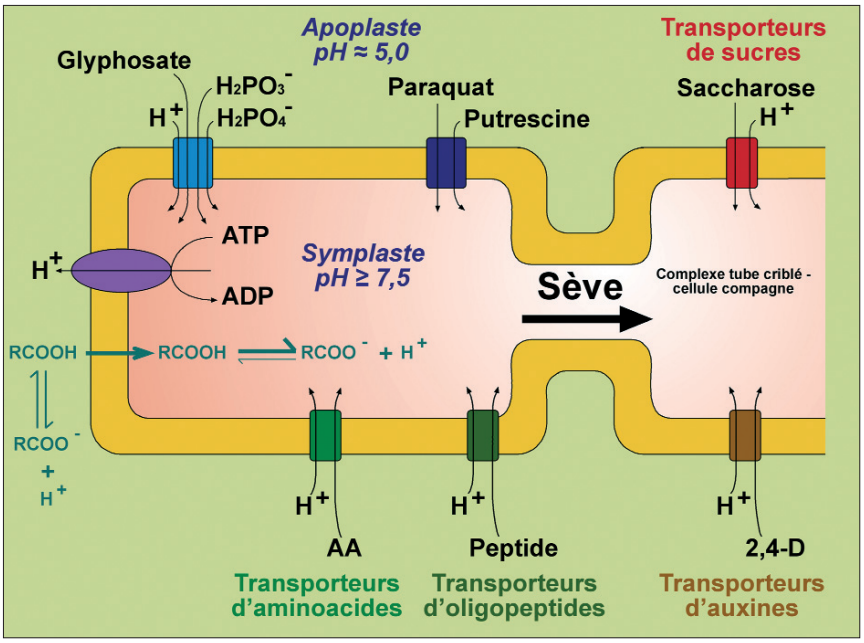


Figure 36. Mécanismes du transport de nutriments à travers la membrane plasmique du complexe tube criblé-cellule compagne et de quelques xénobiontes (RCOOH est une molécule acide endogène ou un herbicide acide).

• *Les différents types de systémies*

Il est classique de distinguer deux types fondamentaux de systémie. Dans le cas de la systémie xylémienne (ou apoplastique) la molécule pénètre dans la plante après application sur le sol ou enrobage de la graine. Ensuite, elle est véhiculée par les parties aériennes par la poussée racinaire ou le courant de transpiration (Fig. 34). S'il s'agit de produits assez strictement apoplastiques, ceux-ci pénètrent très peu dans les organes (fruits,

graines) récoltés pour l'alimentation animale ou humaine. Les principaux inconvénients sont liés au mode d'application : faible absorption, lessivage, pollution du sol et des eaux. Plusieurs fongicides présentés précédemment (§ 3.3) présentent une systémie xylémienne plus ou moins évidente.

Dans le cas de la systémie phloémienne (ou symplastique), les produits pulvérisés sur le feuillage se dirigent vers les zones en voie de croissance ou de stockage, les racines par exemple (Fig. 34). Cette propriété a été particulièrement prise en compte pour la mise au point de divers herbicides (Delrot et Bonnemain, 1991). Elle peut être aussi intéressante pour lutter contre les parasites et les pathogènes racinaires, les insectes suceurs de sève ainsi que les pathogènes vasculaires (Edgington, 1981 ; Hsu *et al.*, 1995). Mais dans ce cas, il convient d'être particulièrement vigilant au sujet des périodes de traitement, puisque les produits nantis de cette propriété s'accumulent dans les organes collectés pour l'alimentation.

Du fait des échanges entre le phloème et le xylème lors du transport à longue distance (déjà montré pour des composés endogènes ; Kehr *et al.*, 2005) - ces échanges étant assurés principalement par les rayons au niveau des structures secondaires - les produits à systémie phloémienne peuvent être repris en partie par le courant de sève vasculaire, ce qui assure une large redistribution au sein de la plante. En fait, la plupart de ces produits sont ambimobiles (Fig. 34).

La systémie est dans divers cas une propriété avantageuse, d'une part parce que les produits sont à l'abri des lessivages et de l'action de la lumière du fait qu'ils ont pénétré dans les tissus et, d'autre part, parce que les produits sont aptes à se déplacer vers une cible normalement peu ou non accessible.

5 - Nos objectifs

À l'heure actuelle de nombreuses études sont en cours pour lever les zones d'ombre sur ces maladies vasculaires, principalement l'esca (identification et rôle des intervenants, identification des toxines fongiques sécrétées et des conditions environnementales nécessaires à l'interaction).

Les chercheurs travaillent aussi sur des moyens de lutte préventive, curative et génétique (vignes génétiquement modifiées). En terme de prévention, il est souhaitable d'améliorer les conditions de greffe et de culture en pépinière (désinfection des outils, traitement à l'eau chaude des greffons). Au champ, des mesures prophylactiques sont recommandées. La gestion du stock de bois mort (réservoir potentiel d'inocula) est un des centres de préoccupation. Des études ont montré qu'une protection des plaies de taille avait un impact positif sur l'infection, mais cela reste une technique coûteuse. À l'heure actuelle aucune méthode de lutte financièrement viable n'est adoptée en France.

Les recherches actuelles (cf. 5 th IWGTD, Davis, 11-15 September 2006) portent sur des souches fongiques antagonistes (notamment du genre *Trichoderma*) et sur l'utilisation d'une méthode d'injection (Landers, 1993) de molécules antifongiques directement dans le cep (initié en 1976 par Hoenderken pour IMAG, Hollande). On peut cependant noter les recherches émergentes sur le chitosane (polysaccharide isolé de crustacés marins) (S. Bautista-Baños *et al.*, 2006), le méthyl-jasmonate (Me-JA) et l'acide salicylique (SA ; inducteurs des défenses naturelles) ainsi que le bore (agent fertilisant).

Pour notre part, nous avons pris en considération les caractères très particuliers du syndrome esca résultant de l'attaque d'un complexe de plusieurs espèces de champignons pathogènes. Nous avons donc proposé, dans la suite des travaux entamés au laboratoire,

i. d'examiner s'il était possible d'envisager une stratégie de lutte chimique, le fongicide étant appliqué selon le procédé le plus pratique pour le viticulteur, la pulvérisation foliaire. Les difficultés sont évidentes : incertitudes sur la sensibilité aux fongicides des différentes espèces du complexe esca ; le pari très incertain de synthétiser des fongicides à systémie phloémienne. Cette dernière démarche s'est soldée dans le passé par des échecs (c'est-à-dire perte de l'activité biologique, systémie phloémienne insuffisante) (Edgington, 1981 ; Smith *et al.*, 1995). Toutefois, la synthèse au laboratoire d'un produit phloème mobile (F 30) ayant une activité contre *Eutypa lata* comparable au produit de départ (le fenpiclonil) (Rocher, 2004) nous a incité à poursuivre dans cette voie.

ii. d'explorer parallèlement, compte tenu du caractère spéculatif de la première démarche, la piste des activateurs des réactions de défense en apportant (toujours par voie foliaire) un signal chimique permettant à la plante de réagir efficacement et par elle-même contre une attaque de pathogène. Cette orientation prolonge également le travail de thèse de F. Rocher (2004).

Bibliographie

E. Abou-Mansour, L. Bovet, J. Polier, E. Martinoia, R. Tabacchi (2004a) Identification and partial characterisation of toxins from *Fomitiporia mediterranea* the rotting agent of esca disease. Phytopathologia Mediterranea **43**, 148

E. Abou-Mansour, E. Couché, R. Tabacchi (2004b) Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms ? Phytopathologia Mediterranea **43**, 75-82

C. Affourtit, S.P. Heaney, A.L. Moore (2000) Mitochondrial electron transfer in the wheat pathogenic fungus *Septoria tritici* : on the role of alternative respiratory enzymes in fungicide resistance. Biochimica et Biophysica Acta **1459**, 291-298

C. Amalfitano, V. Cozzolino, D. Agrelli, V. Di Meo, L. Mugnai, A. Evidente, G. Surico (2005) Preliminary studies on micro and macro elements in esca diseased leaves of *Vitis vinifera* cv. Cardinal. 4th International Workshop on Grapevine Trunk Disease, « Esca and Grapevine declines », 56

J. Auger, M. Esterio, G. Ricke, I. Pérez (2005) Black dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. 4th International Workshop on Grapevine Trunk Disease, « Esca and Grapevine declines », 33

A. Aziz, B. Poinssot, X. Daire, M. Adrian, A. Bézier, B. Lambert, J.-M. Joubert, A. Pugin (2003) Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. Molecular Plant-Microbe Interactions **16**, 1118-1128

S. Bautista-Baños, A.N. Hernández-Lauzardo, M.G. Velázquez-del Valle, M. Hernández-López, E. Ait Barka, E. Bosquez-Molina, C.L. Wilson (2006) Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection **25**, 108-118

J.-L. Bonnemain (1975) Transport et distribution des produits de la photosynthèse. *In* Photosynthèse et Production Végétale, C. Costes Ed., Gauthiers-Villars, Paris, pp 147–170.

J.-L. Bonnemain, J.-F. Chollet (2003) L'arsenal phytosanitaire face aux ennemis des plantes. Considérations générales. Comptes Rendus Biologies **326**, 1-7

S. Bouché-Pillon, J.-C. Fromont, R. Serrano, J.-L. Bonnemain (1994) Immunolocalization of the plasma membrane H^+-ATPase in minor veins of *Vicia faba* in relation to phloem unloading. Plant Physiology **125**, 1813-1820

B. Boullard (1990) Guerre et paix dans le règne végétal. Eds Marketing, Paris

A. Coleno (1989) Protection des plantes. Évolution, adaptation. Propositions pour les cultures vivrières tropicales. *In* Plantes vivrières tropicales, AUPELF-URE Ed., John Libbey Eurotext, Paris, pp 91-101

C. Combes (2003) L'art d'être parasite. Les associations du vivant. Eds Marketing, Paris

R. Corbaz (1990) Principes de Phytopathologie. Eds Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne

E. Cottral, I.G. Pascoe, J. Edwards, G. Jaudzems, P.A. Taylor (2004) Host-pathogen interaction of *Phaeomoniella chlamydospora*, causal organism of Petri disease, in grapevine tissue. Phytopathologia Mediterranea **43**, 150

D. Courby (1997) L'eutypiose et l'esca : état des connaissances. Effet de la conduite du vignoble. Stratégie de lutte. Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Agronomie Approfondie. Viticulture - Oenologie. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier

P.W. Crous, W. Gams (2000) *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. Phytopathologia Mediterranea **39**, 112-118

P.W. Crous, W. Gams, M.-J. Wingfield, P.S. van Wyk (1996) *Phaeoacremonium gen. nov.* associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. Mycologia **88**, 786-796

U. Damm, E. Retief, P.H. Fourie (2005) Molecular detection of grapevine trunk disease pathogens in nursery and vineyard soils in South Africa. 4th International Workshop on Grapevine Trunk Disease, « Esca and Grapevine declines », 41

M. Delledonne (2005) NO news is a good news for plants. Current Opinion in Plant Biology **8**, 390-396

S. Delrot, J.-L. Bonnemain (1978) Étude du mécanisme de l'accumulation des produits de la photosynthèse dans les nervures. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris. Sciences de la Vie / Life Sciences **287**, 125-130

S. Delrot, J.-L. Bonnemain (1981) Involvment of protons as a substrate for the sucrose carrier during phloem loading in *Vicia faba* leaves. Plant Physiology **67**, 560-564

S. Delrot, J.-L. Bonnemain (1991) Le transport à longue distance des herbicides dans la plante. *In* Les herbicides, mode d'action et principes d'utilisation, R. Scalla Ed., INRA, Paris, pp 51-77

G.M. Dubin, A. Fkyerat, R. Tabacchi (2000) Acetylenic aromatic compounds from *Stereum hirsutum*. Phytochemistry **53**, 571-574

B. Dubos, P. Larignon, P. Lecomte, C. Magnien, M.-L. Panon, O. Grand, E. Laveau, M. Leguay (2004) Les maladies du bois en viticulture. Plaquette ITV-France

W.G. van Doorn, E.J. Woltering (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. TRENDS in Plant Science **10**, 117-122

E. Duhoux, M. Nicole (2004) Biologie végétale : associations et interactions chez les plantes. Eds Dunod, Paris

J. Durner, J. Shah, D.F. Klessig (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. TRENDS in Plant Science **2**, 266-274

W.E. Durrant, X. Dong (2004) Systemic Acquired Resistance. Annual Review in Phytopathology **42**, 185-209

L.V. Edgington (1981), Structural requirements of systemic fungicides. Annual Review in Phytopathology **19**, 107–124

J. Edwards, I.G. Pascoe, S. Salib, N. Laukart (2004) *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* can spread into grapevine canes from trunks of infected mother vines. Phytopathologia Mediterranea **43**, 154-155

A. Eskalen, S. Rooney Latham, A.J. Feliciano, W.D. Gubler (2004) Epiphytic occurence of esca and Petri disease pathogens on grapevine tissues. Phytopathologia Mediterranea **43**, 154

EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization (2002) Good plant protection practice. Grapevine. EPPO Bulletin **32**, 371-392

A.J. Feliciano, A. Eskalen, W.D. Gubler (2004) Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* in California. Phytopathologia Mediterranea **43**, 66-69

V.H. Ferm (1977) Arsenic as a Teratogenic Agent. Environmental Health Perspectives **19**, 215-217

P. Fleurat-Lessard, M. Harche-Kaid, M. Faucher, J.-L. Bonnemain (2000) La cellule associée aux vaisseaux (CAV), unité de contrôle des flux de nutriments et des réactions de défense. *In* L'arbre 2000 The Tree, actes du 4e colloque sur l'arbre. Eds Isabelle Quentin, Montréal, pp 122-127

M. Fischer, H.-H. Kassemeyer (2004) *Fomitiporia mediterranea*, a new basidiomycete species associated with esca of grapevine in Europe : biology, ecology, and distribution. Phytopathologia Mediterranea **43**, 144

R. Fourche (2004) Contribution à l'histoire de la protection phytosanitaire dans l'agriculture française, 1880-1970. Thèse de doctorat, Université Lumière-Lyon 2

L. Fromard, V. Babin, P. Fleurat-Lessard, J.-C. Fromont, R. Serrano, J.-L. Bonnemain (1995) Control of vascular sap pH by the vessel-associated cells in woody species. Plant Physiology **108**, 913-918

Fungicide Resistance Action Committee (2005) FRAC code list 2 : Fungicides sorted by modes of action. Publication électronique : http://www.frac.info/frac/publication/

L. Gaforio, E. Aparicio, G. Hernaiz, M.L. Tello (2005) Differential virulence effects of single and dual inoculations of *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* and *Pm. inflatipes* on young grapevines. 4th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. « Esca and Grapevine declines ». 50

R.T. Giaquinta (1977) Possible role of pH gradient and membrane ATPase in the loading of sucrose into the sieve tubes. Nature **267**, 369-370

J. Glazebrook (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. Annual Review of Phytopathology **43**, 205-227

P. Gomez, A. Baidez, M.D. Fuster, A. Ortuño, J.A. del Rio, V. Frias (2004) Microscopic study of the trunk diseases symptoms in grapevine. Phytopathologia Mediterranea **43**, 149

J.T. Greenberg, N. Yao (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cellular Microbiology **6**, 201-211

M.L. Gullino, P. Leroux, C.M. Smith (2000) Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. Crop Protection **19**, 1-11

H. Guo, J.R. Ecker (2004) The ethylene signaling pathway : new insights. Current Opinion in Plant Biology **7**, 40-49

J.B. Harborne (1999) The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. Biochemical Systematics and Ecology **27**, 335-367

M.C. Heath (2000) Hypersensitive response-related death. Plant Molecular Biology **44**, 321-334

E.B. Holub, A. Cooper (2004) Matrix, reinvention in plants : how genetics is unveiling secrets of non-host disease resistance. TRENDS in Plant Science **9**, 211-214

G.A. Howe, A.L. Schilmiller (2002) Oxylipin metabolism in response to stress. Current Opinion in Plant Biology **5**, 230-236

F.C. Hsu, K. Sun, D.A. Kleier, M.J. Fielding (1995), Phloem mobility of xenobiotics VI. A phloem-mobile pronematicide based on oxamyl exhibiting root-specific activation in transgenic tobacco. Pesticide Science **44**, 9–19

B. Iacomi-Vasilescu, H. Avenot, N. Bataillé-Simoneau, E. Laurent, M. Guénard, P. Simoneau (2004) *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. Crop Protection **23**, 481-488

S. Irmler, H. Rogniaux, D. Hess, C. Pillonel (2006) Induction of OS-2 phosphorylation in *Neurospora crassa* by treatment with phenylpyrrole fungicides and osmotic stress. Pesticide Biochemistry and Physiology **84**, 25-37

P. Jeandet, A.-C. Douillet-Breuil, R. Bessis, S. Debord, M. Sbaghi, M. Adrian (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**, 2731-2741

T. Joseph-Horne, D.W. Hollomon, P.M. Wood (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. Biochimica et Biophysica Acta **1504**, 179-195

N.T. Keen (2000) A Century of Plant Pathology: A Retrospective View on Understanding Host-Parasite Interactions. Annual Review of Phytopathology **38**, 31-48

J. Kehr, A. Buhtz, P. Giavalisco (2005) Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*. BMC Plant Biology **5**, 1-13

K. Kojima, Y.-S. Bahn, J. Heitman (2006) Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. Microbiology **152**, 591-604

E. Komor, M. Rotter, W. Tanner (1977) A proton-cotransport system in a higher plant: sucrose transport in *Ricinus communis*. Plant Science Letters **9**, 153-162

W. Laloui (1998) Contribution à l'identification des champignons pionniers dans la maladie de l'esca - Systématique du genre *Phaeoacremonium*. Thèse de Doctorat, Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris

A.J. Landers (1993) Direct injection sprayers - a method of reducing environmental pollution. A.N.P.P. - B.C.P.C. Second International Symposium on Pesticides ApplicationTechniques, Strasbourg, 22nd - 24th September 1993, 305-312

R. Lardner (2003) Early diagnosis and detection of eutypa dieback of grapevines. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy, University of Adelaide

P. Larignon (2004) Réflexions sur l'esca. Phytoma - La Défense des Végétaux **576**, 28-31

P. Larignon (2005) Les maladies de dépérissement: leur symptomatologie et les éléments de biologie des champignons. *In* Les maladies du bois en viticulture (Matinée d'information du 21 mars 2005 à Bourgueil) pp 1-4

P. Larignon, B. Dubos (1997) Fungi associated with esca disease in grapevine. European Journal of Plant Pathology **103**, 147-157

P. Larignon, J. Dupont, B. Dubos (2000) L'esca de la vigne. Quelques éléments sur la biologie de deux agents associés: *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeomoniella chlamydospora*. Phytoma - La Défense des Végétaux **52**, 30-35

P. Larignon, R. Fulchic, L. Cere, B. Dubos (2001) Observation on black dead arm in French vineyards. Phytopathologia Mediterranea **40**, Supplement, S336-S342

P. Lecomte (2003) *Eutypa lata* peut-il également infecter l'actinidia ? Phytoma - La Défense des Végétaux **558**, 36-37

J.Y. Lee, S.S. Moon, B.K. Hwang (2003) Isolation and Antifungal and Antioomycete Activities of Aerugine Produced by *Pseudomonas fluorescens* Strain MM-B16. Applied and Environmental Microbiology **69**, 2023-2031

R. Lemesle (1947) Cours de phytopathologie (1re partie). Centre d'enseignement supérieur et de recherche de chimie agricole et biologique, pp 28-33

P. Leroux (1980) Les fongicides. Perspectives Agricoles **41**, 22-38

P. Leroux (2005) Modes d'action et sélectivité des fongicides à usage agricole. *In* Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, Eds Lavoisier, Paris, pp 45-71

P. Leroux, R. Delorme, P. Gaillardon (2002) Évolution des produits phytosanitaires à usages agricoles. II-Les fongicides. Phytoma - La Défense des Végétaux **545**, 8-15

V. Lipka, R. Panstruga (2005) Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. Current Opinion in Plant Biology **8**, 625-631

O. Lorenzo, R. Solano (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. Current Opinion in Plant Biology **8**, 532-540

J.-J. Macheix, A. Fleuriet, C. Jay-Allemand (2005) Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Eds Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne

N. Mahoney, R. Lardner, R.J. Molyneux, E.S. Scott, L.R. Smith, T.K. Schoch (2003) Phenolic and heterocyclic metabolite profiles of the grapevine pathogen *Eutypa lata*. Phytochemistry **64**, 475-484

F. Malek, D.A. Baker (1977) Proton cotransport of sugars in phloem loading. Planta **135**, 297-299

A.M. Moldano, P. Doerner, R.A. Dixon, C.J. Lamb, R.K. Cameron (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. Nature **419**, 399-403

L. Mostert, P.W.C. Crous, J.Z. Groenewald, W. Gams, R. Summerbell (2004) Teleomorph associations and genetic diversity occuring in *Phaeoacremonium*. Phytopathologia Mediterranea **43**, 144

L. Mugnai, A. Graniti, G. Surico (1999) Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking : Two Old and Elusive Diseases of Grapevines. Plant Disease **83**, 404-418

L. Mugnai, C. Amalfitano, A. Arrigo, M. Pasi, G. Surico, A. Evidente (2004) Production of stress metabolites in vine tissue cultures inoculated with *Phaeomoniella chlamydospora*. Phytopathologia Mediterranea **43**, 149

S. Octave (2005) Eutypiose de la vigne : caractérisation et effets physiologiques de composés protéiques toxiques excrétés par le champignon pathogène *Eutypa lata* : application à l'élaboration d'un test de diagnostic de la maladie. Thèse de Doctorat de l'Université de Poitiers

S. Octave, B.-E. Amborabé, P. Fleurat-Lessard, T. Bergès, G. Roblin (2006) Modifications of plant cell activities by polypeptides secreted by *Eutypa lata*, a vineyard fungal pathogen. Physiologia Plantarum **128**, 103-115

G. Ordish (2006) History of agriculture. *In* Encyclopaedia Britannica. Publication électronique : http://www.britannica.com/eb/article-10714

G.B. Orlob (1971) History of Plant Pathology in the Middle Ages. Annual Review of Phytopathology **9**, 7-20

I.G. Pascoe, J. Edwards, J.H. Cunnington, E.H. Cottral (2004) Detection of the Togninia teleomorph of *Phaeoacremonium aleophilum* in Australia. Phytopathologia Mediterranea **43**, 51-58

S. Perrin-Cherioux, E. Abou-Mansour, R. Tabacchi (2004) Synthesis and activity of grape wood phytotoxins and related compounds. Phytopathologia Mediterranea **43**, 83-86

A.N. Petit, M. Boulay, F. Baillieul, C. Clément, F. Fontaine (2005) Consequences of esca on carbohydrate physiology in French vineyards. 4th International Workshop on Grapevine Trunk Disease, « Esca and Grapevine declines », 45

C.M.J. Pieterse, L.C. Van Loon (2004) NPR1 : the spider in the web of induced resistance signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology **7**, 456-464

F. Rapilly (2001) Champignons des plantes : les premiers agents pathogènes reconnus dans l'histoire des sciences. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Sciences de la vie / Life Sciences **324**, 893-898

J.A. del Rio, P. Gomez, A. Baidez, M.D. Fuster, A. Ortuño, V. Frias (2004) Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. Phytopathologia Mediterranea **43**, 87-94

D. Rioux (2000) Compartimentalization as a Defense Mechanism in Trees. *In* L'arbre 2000 The Tree, actes du 4e colloque sur l'arbre. Eds Isabelle Quentin, Montréal, pp 301-306

D. Rioux (2004) The natural defences of trees against injury and disease. *In* Branching out, publication du Service canadien des forêts - Centre de foresterie des Laurentides, **16**

D. Rioux, M. Nicole, M. Simard, G.B. Ouelette (1998) Immunocytochemical Evidence that Secretion of Pectin Occurs During Gel (Gum) and Tylosis Formation in Trees. Phytopathology **88**, 494-505

F. Rocher (2004) Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense. Thèse de doctorat de l'Université de Poitiers

H.-J. Rosslenbroich, D. Stuebler (2000) *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Protection **19**, 557-561

J. Rudelle (1997) Étude de l'eutypiose de la vigne : aspects structuraux et phytosanitaires. Thèse de Doctorat de l'Université de Poitiers

C.-A. Ryan (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes, Biochimica et Biophysica Acta **1477**, 112–121.

A.L. Schilmiller, G.A. Howe (2005) Systemic signaling in the wound response. Current Opinion in Plant Biology **8**, 369-377

E. Schmelzer (2002) Cell polarization, a crucial process in fungal defence. TRENDS in Plant Science **7**, 411-415

C.S. Schmidt, G.A. Wolf, D. Lorenz (1999) Production of extracellular hydrolytic enzymes by the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz **106**, 1-11

M. Seay, S. Patel, S.P. Dinesh-Kumar (2006) Autophagy and plant innate immunity. Cellular Microbiology **8**, 899-906

M.-A. Selosse (2000) La symbiose. Structures et fonctions, rôle écologique et évolutif. Eds Vuibert, Paris

J. Semal, P. Lepoivre (2003) Les maladies des plantes : concepts généraux. *In* Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte, dir. P. Lepoivre. Eds De Boeck, Bruxelles, pp 9-21

J. Shah (2003) The salicylic acid loop in plant defense. Current Opinion in Plant Biology **6**, 365-371

A.L. Shigo (1984) Compartmentalization : a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. Annual Review of Phytopathology **22**, 189-214

P.H. Smith, K. Chamberlain, J.M. Sugars, R.H. Bromilow (1995) Fungicidal activity of N-(2-cyano-2-methoximinoacetyl)-amino acids and their derivatives. Pesticide Science **44**, 219–224

L. Taiz, E. Zeiger (1998) Plant Physiology (2nd Ed.). Eds Sinauer Associates Inc., Sunderland

D. Takemoto, A.R. Hardham (2004) The Cytoskeleton as a Regulator and Target of Biotic Interactions in Plants. Plant Physiology **136**, 3864-3876

Y. Uesugi (1998) Fungicide Classes: Chemistry, Uses and Mode of Action. *In* Fungicidal Activity. Chemical and Biological Approaches to Plant Protection (Agrochemicals and Plant Protection series). D. Hutson & J. Miyamoto Ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp 23-56

L. Van Valen (1973) A new evolutionary law. Evolutionary Theory **1**, 1-30

S.A. Whiteman, A. Stewart, M.C. Trought, M.V. Jaspers (2004) Cultural requirements of *Phaeomoniella chlamydospora*. Phytopathologia Mediterranea **43**, 156

T.J. Wiechel, M.L. Creaser, F.M. Cole, T.J. Wicks (2004) Secondary metabolites produced by southern Australian isolates of *Eutypa lata*. Phytopathologia Mediterranea **43**, 149-150

M.C. Wildermuth, J. Dewdney, G. Wu, F.M. Ausubel (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature **414**, 562-571

Matériel & Méthodes

Matériel et Méthodes

1 - L'expérimentation sur le vivant

1.1 - Les champignons pionniers de l'esca : activité biologique de molécules d'intérêt et infection de boutures de vigne

1.1.1 - Les souches fongiques

Les expériences ont été réalisées à partir de trois espèces :

- *Eutypa lata* (EL), souche EL2A4.
- *Phaeoacremonium aleophilum* (PA), souches PP2F55, PA-LR 96 et PA-LR112.
- *Phaeomoniella chlamydospora* (PC), souches PP1S936, PC-LR 41, PC-LR 43 et PC-LR 47.

Hormis *E. lata*, qui est utilisé au laboratoire, toutes les autres souches ont été fournies par P. Larignon (ITV-Nîmes) et J-P Péros (INRA Montpellier).

Les souches sont conservées en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre sur un milieu malt-agar additionné de chloramphénicol, pour éviter toute prolifération bactérienne. Deux souches parmi les plus utilisées (PP1S936 et PP2F55) ont été stockées sous forme de suspensions de spores à -80 °C dans un milieu glycérolé (à 10 % v/v).

1.1.2 - La culture *in vitro* (F. Rocher, 2004)

Toutes les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire horizontal. Les surfaces de travail sont désinfectées à l'éthanol (70 % ou 95 %). Le consommable est stérile, à usage unique (récipients de culture, pointes de pipette, etc.). Ustensiles et verrerie sont stérilisés par autoclave (120 °C, 20 minutes) ou préalablement flambés après immersion dans l'éthanol 95 %. Le milieu de culture est de type malt-agar : 20 $g.l^{-1}$ d'agar, 0,25 $g.l^{-1}$ de chloramphénicol et 15 $g.l^{-1}$ de malt en solution dans de l'eau désionisée (système de filtration par osmose inverse Elga Labwater). À froid, le mélange est insoluble ; il devient parfaitement soluble lors de sa stérilisation par autoclave (120 °C, 20 minutes). Le prélèvement du mycélium cultivé sur milieu malt-agar est effectué, selon les besoins, à l'aide d'un emporte-pièce (3 mm de diamètre intérieur) ou d'une pointe lancéolée. Les suspensions de spores sont prélevées à l'aide d'une micropipette à pointe stérile. Les cultures sont conservées à 25 °C dans un incubateur (type KB, Binder). Chaque souche fongique est repiquée régulièrement en boîte de Pétri, sur un milieu malt-agar. La culture des souches est réalisée dans des boîtes de Pétri (BP) aseptiques de 90 mm de diamètre (63,6 cm^2) et 14,2 mm de haut (soit 90,3 ml) ou des plaques de culture cellulaire à six puits de 34,8 mm

de diamètre, 9,5 cm^2 de surface de culture soit 16,8 ml de volume intérieur pour chaque puits.

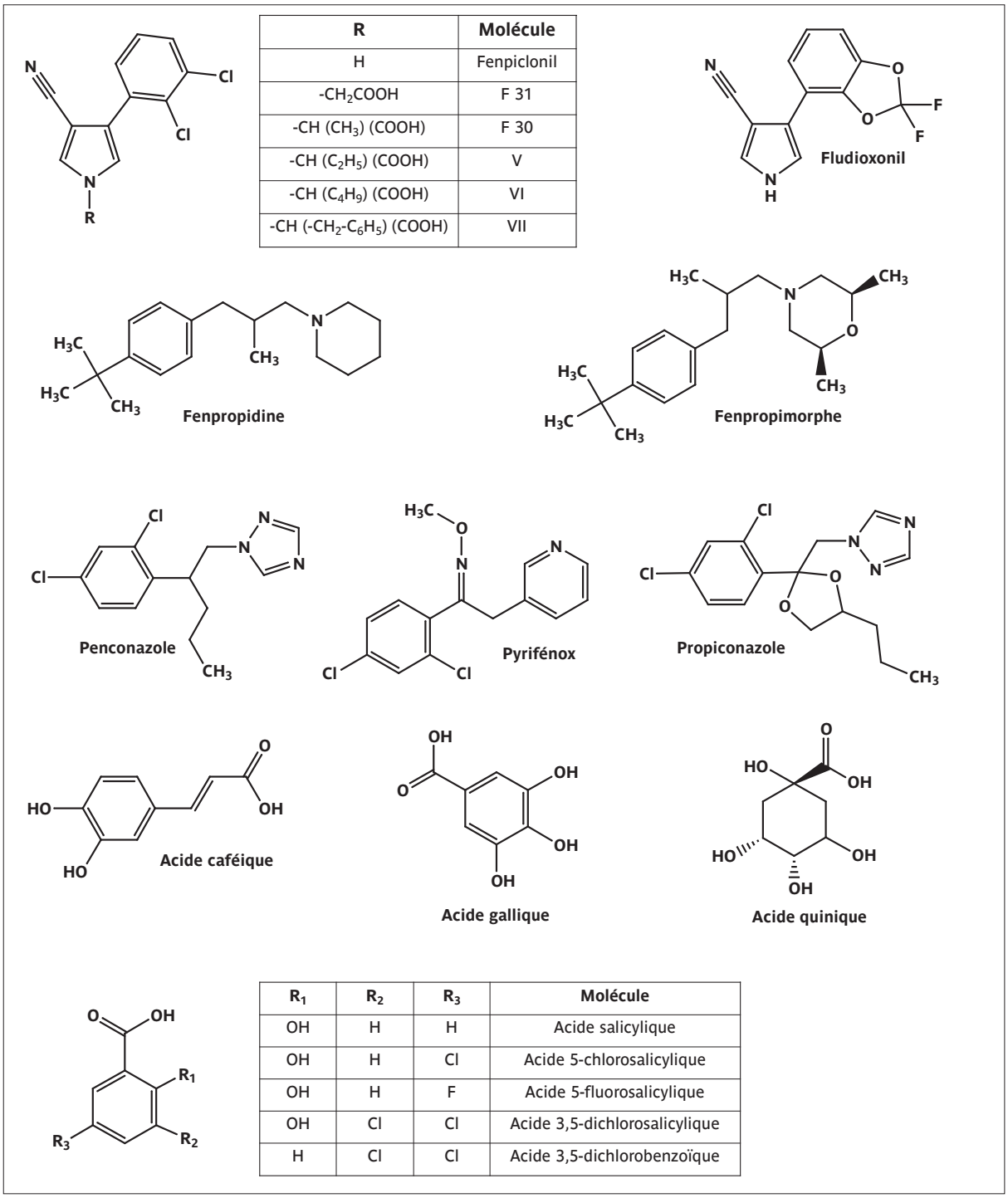
1.1.3 - Les tests d'activité biologique

• *Activité antifongique de molécules d'intérêt*

Il s'agit d'observer le comportement d'une souche fongique (croissance et aspect de la colonie) au contact d'un milieu malt-agar en fonction de la concentration d'une molécule xénobiotique, et ceci en fonction de la concentration en cette dernière. Des fongicides commerciaux (fenpiclonil, fenpropidine, fenpropimorphe, fludioxonil, penconazole, propiconazole, pyrifénox ; Fig. 37) et certains des dérivés du fenpiclonil synthétisés au laboratoire (F30, F31, CJ2, CJ6, CJ17 ; Fig. 37) ont été utilisés à 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM et 0,1 µM. Pour les molécules naturelles (les acides caféique, gallique et quinique ; Fig. 37) nous avons restreint la gamme des concentrations à 1 mM, 100 µM et 10 µM. Pour chaque concentration, trois répétitions sont faites. Les tests sont effectués dans des plaques de culture cellulaire à six puits (P6P). Le milieu malt-agar, stérilisé par autoclave, est réparti dans des béchers (préalablement autoclavés) sous agitation et chauffage doux. L'addition de la molécule d'intérêt se fait extemporanément, lorsque le milieu refroidit mais avant qu'il ne commence à prendre en masse (≈ 60 °C). Lorsque le milieu paraît homogène, il est coulé dans chaque puits. Il apporte un support, de l'eau et des éléments nutritifs en quantités suffisantes pour la durée de l'expérience. Chaque puits reçoit environ 7 ml de milieu pour laisser à la colonie la possibilité de se développer dans les trois dimensions de l'espace. Les P6P sont laissées ouvertes sous la hotte, le temps nécessaire au refroidissement et à la solidification du milieu. Elles sont refermées hermétiquement pour éviter toute contamination. Tous les implants mycéliens (trois millimètres de diamètre) sont découpés dans une même zone homogène de la colonie mère (cultivée en BP). Bien souvent une partie du milieu de culture est prélevée avec le fragment mycélien pour dépôt. Afin d'assurer une contamination équivalente dans tous les puits, il est nécessaire de s'assurer que la surface mycélienne soit au contact du nouveau milieu (contenant la molécule d'intérêt) et non le fragment de milieu accompagnant l'inoculum. Un seul implant de la souche choisie est déposé au centre de chaque puits. Une fois réalisé l'ensemble des inoculations, les plaques de culture sont fermées hermétiquement par un film de paraffine avant de quitter la zone stérile. Elles sont stockées à 25 °C.

• *Activité d'un champignon antagoniste*

Nous avons observé l'interaction entre les pionniers de l'esca et une souche fongique de l'espèce *Pseudozyma flocculosa* fournie par l'entreprise Géniflore. Les tests sont réalisés en BP contenant du milieu malt-agar. Deux implants sont déposés en vis-à-vis, sur une même ligne passant par le centre de la boîte et à un centimètre du bord. L'un des implants appartient à l'espèce *P. flocculosa*, l'autre à l'une des espèces pionnières de l'esca (PA ou PC). D'autre part, nous avons testé l'action de molécules issues de *Pseudozyma flocculosa* sur des



R	Molécule
H	Fenpiclonil
$-CH_2COOH$	F 31
$-CH\ (CH_3)\ (COOH)$	F 30
$-CH\ (C_2H_5)\ (COOH)$	V
$-CH\ (C_4H_9)\ (COOH)$	VI
$-CH\ (-CH_2-C_6H_5)\ (COOH)$	VII

R_1	R_2	R_3	Molécule
OH	H	H	Acide salicylique
OH	H	Cl	Acide 5-chlorosalicylique
OH	H	F	Acide 5-fluorosalicylique
OH	Cl	Cl	Acide 3,5-dichlorosalicylique
H	Cl	Cl	Acide 3,5-dichlorobenzoïque

Figure 37. Molécules de synthèse et composés naturels utilisés au cours de cette étude.

souches de pionniers de l'esca (PA & PC). L'extrait d'un milieu de culture liquide de *P. flocculosa* ou une solution de flocculosine (un de ses métabolites déjà utilisé comme antifongique) est incorporé au milieu malt-agar coulé dans une P6P. Un implant d'une souche de PA ou de PC est ensuite déposé au centre de la boîte. Le suivi de la croissance et l'aspect des colonies sont identiques à ceux réalisés pour les tests d'activité antifongique.

• *Observation de la croissance mycélienne*

Nous avons choisi de mesurer la croissance diamétrale de la colonie. Pour évaluer au mieux cette variable, nous avons effectué deux mesures de son diamètre en prenant un angle de 90° entre les deux. La moyenne des deux valeurs est alors plus représentative de la croissance diamétrale de la colonie. Pour les champignons à croissance rapide (*E. lata*, EL), une mesure est effectuée tous les jours aux mêmes heures. Pour les champignons à croissance lente (*Pm. aleophilum*, PA, et surtout *Pa. chlamydospora*, PC) les mesures sont effectuées une ou deux fois par semaine. Des courbes de croissance sont établies en réalisant la moyenne des trois notations (c.-à-d. des moyennes de deux mesures diamétrales relevées sur trois puits) pour la même condition de culture. Lorsque cela est nécessaire, une description succincte de l'aspect morphologique de la colonie est ajoutée.

1.1.4 - L'inoculation de boutures de vigne

Des implants mycéliens de trois millimètres de diamètre ont été découpés et insérés dans des boutures de vigne à deux yeux (cf. 1.3.2.). Les souches sélectionnées pour les boutures en pot sont: EL2A4, PP1S936 et PP2F55. Cinq modalités différentes d'infection sont réalisées (lot témoin, lots contaminés par EL, PA, PC et PA+PC). Pour les boutures cultivées en milieu hydroponique, trois souches ont été retenues: EL2A4, PC-LR 43 et PA-LR 96. Six modalités différentes sont alors réalisées (lot témoin, lots contaminés par EL, PA, PC, PA+PC, PA+PC+EL).

1.2 - Les plantules de ricin: Tests de phytotoxicité et de systémie

1.2.1 - Les plantules de ricin *Ricinus communis* L. cv. Sanguineus

Les graines de ricin (Ball Ducrettet) sont sélectionnées, par vérification visuelle de l'intégrité des téguments de la graine et en exerçant une pression sur ces derniers. Les graines creuses dont l'albumen et/ou la plantule peuvent être endommagés, limitant donc les chances de développement, sont éliminées. Elles sont ensuite disposées entre deux couches de coton hydrophile imbibé d'eau. Ce pool de graines est placé 24 heures en chambre de culture thermostatée, à l'abri de la lumière. Après cette phase d'imbibition, les graines sont disposées dans des pots emplis de vermiculite exfoliée (une graine par pot), de 0,5 à 1 cm de la surface de la vermiculite afin de limiter la lumière incidente. Les pots sont logés par groupe de 18 dans des bacs de culture. Chaque bac est installé dans une mini-serre d'acclimatation. Les miniserres sont stockées en chambre de culture thermostatée, avec une scotopériode de 10 heures (25 à 27 °C; humidité relative (HR): 50 % environ) et une photopériode de 14 heures (28 à 30 °C; HR: 70 % environ). L'arrosage s'effectue au pied des pots avec de l'eau du réseau urbain. Cela assure une bonne hydratation de la vermiculite et une humidité relative importante tout en limitant la prolifération des algues dans les miniserres et les pots.

Au bout de 6 jours, la plantule (au sens de jeune plante) de ricin a développé un système racinaire fonctionnel, qui déborde souvent du fond du pot. Le système aérien se compose alors d'un hypocotyle courbé en crosse de teinte rose et de deux cotylédons encore enveloppés dans leur albumen. Ce dernier se fissurera par la suite, assurant aux cotylédons un accès à la lumière, leur permettant ainsi de devenir alors peu à peu chlorophylliens.

Lors des premiers jours de développement de la plante, un important système d'échange se met en place entre les cotylédons et l'albumen. Les cotylédons, non photosynthétiques, possèdent une assise épidermique spécialisée dans le transfert des nutriments solubles issus de l'hydrolyse des réserves de l'albumen. À un stade plus avancé, lorsque l'albumen se fissure, les cotylédons deviennent plus coriaces. Les parois s'épaississent et la cuticule se développe. Après leur extirpation des restes de l'albumen, la plantule devient alors véritablement autotrophe.

Il est donc nécessaire d'effectuer les tests de systémie sur plantule au stade de développement précis pour lequel l'absorption des réserves cotylédonnaires sera optimale : cuticule perméable, forte capacité d'absorption des cellules épidermiques.

1.2.2 - Le logiciel ACD/Log D

La société canadienne Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs) a élaboré un logiciel prédictif, ACD/Log D, concernant l'hydrophobie des molécules ionisables au contact d'une interface octanol - eau, modèle du milieu biologique. En effet, une molécule en solution se présente sous la forme d'un « mélange de différentes formes ioniques » dont la nature exacte est fonction du pH (Fig. 38). Dans le cas d'une interface hydrophile - lipophile, chaque forme ionique est caractérisée par sa constante de partition P entre les deux phases et par l'ensemble de ses constantes d'ionisation K dans chacune des deux phases. Le

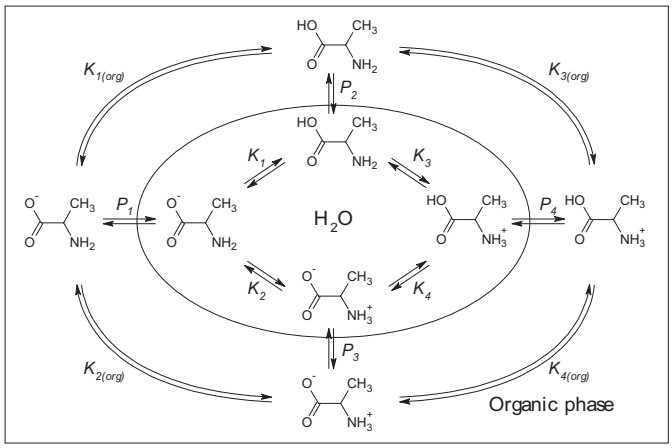


Figure 38 : Comportement de l'alanine à l'interface entre une phase aqueuse (au centre) et une phase organique (à la périphérie). Quatre formes de la même molécule sont représentées dans chacune des deux phases. La répartition entre les différentes formes au sein d'une même phase est fonction de la constante d'ionisation K entre chacunes d'elles et elle est dépendante du pH de la solution. La répartition de chaque espèce chimique entre les deux phases est fonction de son coefficient de partage P. C'est une subtile combinaison de répartitions qui détermine le log D de la molécule, en fonction du pH de la solution. L'algorithme employé pour ce coefficient de distribution est :

$$LogD = \log\left(\frac{\sum a_i^{org}}{\sum a_i^{H2O}}\right) \quad \text{avec} \quad a_i^{H_2O} = a_j^{H_2O} \times K_i \times H^+ \quad a_i^{org} = a_i^{H_2O} \times P_i$$

Les a_i (ou a_j) sont les concentrations de l'espèce *i* (ou *j*) dans la phase considérée, sachant que $a_i = a_i^{H_2O} + a_i^{org}$ et P_i son coefficient de partition entre les deux phases (ACD, 2005).

coefficient de distribution octanol-eau Log D est obtenu grâce à des algorithmes complexes de calcul. Il apporte une description précise des équilibres entre les formes ioniques aux différents pH. Le logiciel permet aussi de calculer le pKa (constante d'acidité) des formes en présence ainsi que le log K_{ow} (coefficient de partition octanol/eau pour une molécule globalement neutre). Avec le pKa et le Log K_{ow} de notre composé, il nous est possible d'évaluer sa mobilité selon les deux modèles prédictifs de Kleier et Bromilow (cf. Fig. 39).

1.2.3 - Les modèles de prédiction de la mobilité des molécules xénobiotiques

R.H. Bromilow et ses collaborateurs, ainsi que D.A. Kleier, ont mis au point des modèles permettant d'estimer la mobilité de molécules xénobiotiques au sein de la plante. En se basant sur le coefficient de répartition d'une molécule globalement neutre entre deux phases octanol et eau, ils modélisent le comportement de ladite molécule au sein d'un milieu biologique. Le coefficient de répartition K_{ow} permet d'évaluer la perméabilité, fonction également des propriétés ioniques de la molécule (pKa) et des propriétés de la membrane (Grayson et Kleier, 1990). Le modèle de Kleier permet d'évaluer l'accumulation (log Cf) d'une molécule dans la sève phloémienne en fonction du pKa de la molécule et de son Log K_{ow} (Fig. 39A). Ainsi, il existe un optimum de perméabilité nécessaire à la mobilité phloémienne (Kleier, 1995). Plus le pKa de la molécule diminue et plus cet optimum augmente. Pour des composés non acides, l'optimum est obtenu pour un log $K_{ow} \approx 1$. Pour un acide (pKa ≈ 4) cet optimum, pour la forme non dissociée de l'acide, est obtenu pour un log $K_{ow} \approx 2$. Les molécules non acides doivent être solubles dans l'eau pour être transportés à longue distance alors que les composés acides doivent être lipophiles. Les optima de pKa et de log K_{ow} sont dépendants de la plante (longueur, vitesse du flux de sève, nature des membranes des tubes criblés, ainsi que la différence de pH apo-symplasmique). Ainsi, un composé non acide et lipophile sera d'autant mieux transporté que la plante sera petite et avec un flux de sève rapide. L'avantage d'un composé acide diminue avec la différence de pH apo-symplasmique (cf. mécanisme de piégeage d'acide). Kleier suggère d'utiliser une molécule faiblement lipophile et/ou acide afin d'obtenir un transport phloémien efficace (Kleier, 1994). Mais, il remarque aussi que la modification de la molécule occasionne une perte d'activité ou une impossibilité de franchir la cuticule. Il suggère donc une stratégie de propesticide améliorant transitoirement la lipophilie pour le passage de la cuticule, ou encore une insertion de gène (PGM) assurant la métabolisation du propesticide en pesticide actif de manière tissu-dépendante.

Le modèle de Kleier varie donc en fonction du type tissulaire visé (Hsu et Kleier, 1990). Un grand écart de pH apo-symplasmique augmente la translocation phloémienne des acides. L'ajout d'un groupement acide, comme nous l'avons fait sur le fenpiclonil, tend à jouer favorablement sur les prédictions de mobilité et même en absence d'une différence de pH. D.A. Kleier rappelle enfin que la distribution d'un composé au sein des tissus végétaux dépend de nombreux facteurs, en plus de celui de la mobilité phloémienne. On peut citer la métabolisation du composé (Sandermann, 1992), les variations de chargement et

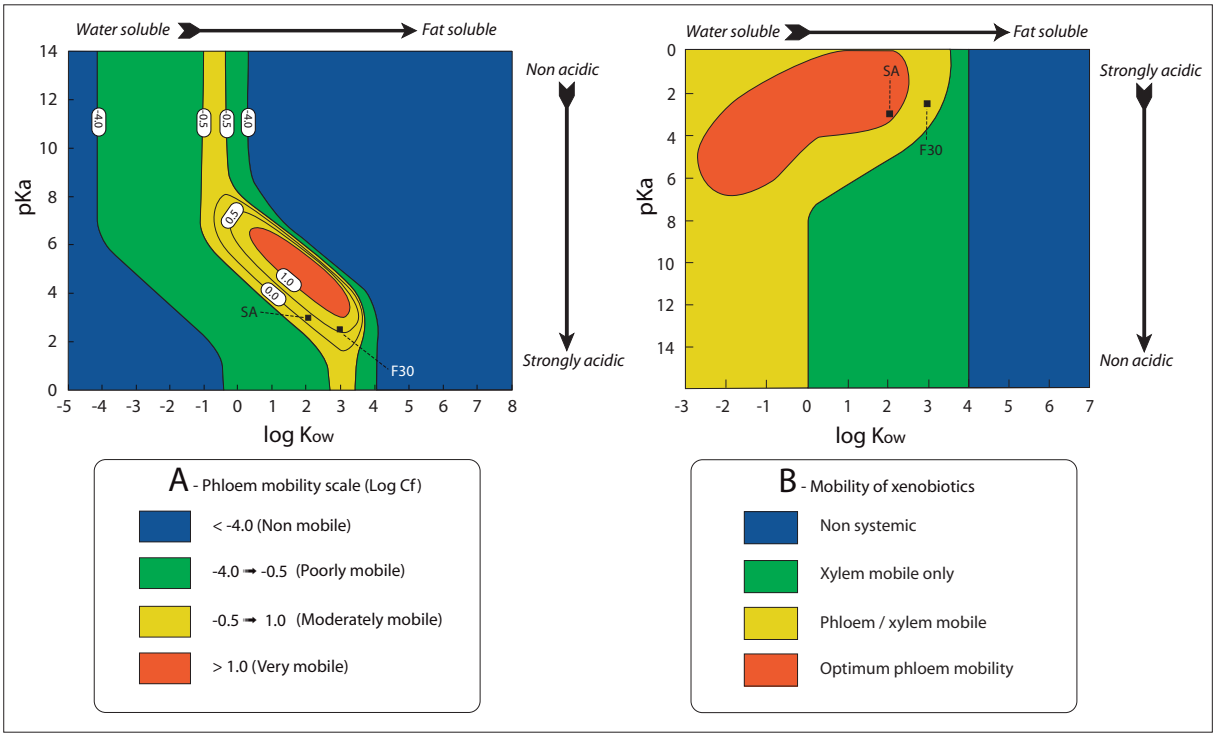


Figure 39. Le modèle de Kleier (A) présente un graphe à trois dimensions pour la prédiction de la mobilité phloémienne (log Cf). Le pKa et le log K_{ow} permettent une localisation bidimensionnelle sur le schéma en fonction de l'acidité et de la lipophilie d'une molécule donnée. L'utilisation des courbes de niveau (troisième dimension) permet de supputer sur la mobilité phloémienne du composé. Le modèle présenté est utilisable pour des plantes de petite taille uniquement (Hsu et Kleier, 1990 ; Kleier, 1994 ; Hsu *et al.*, 1995).
Le modèle empirique de Bromilow (B) présente un découpage en quatre plages distinctes. Chacune de ces plages fait référence à un type de mobilité (non-systémique, xylème mobile, phloème et xylème mobile, phloème mobile). Comme pour le modèle de Kleier, il faut croiser les données concernant l'acidité (pKa) et la lipophilie (log K_{ow}) d'une molécule pour déterminer sa mobilité supposée (Bromilow *et al.*, 1991).

déchargement du phloème, l'accumulation et la compartimentation dans les tissus sources, l'effet du composé sur les systèmes vasculaires (xylème & phloème), les fluctuations journalières des flux des sèves et la variation de la taille des éléments conducteurs dans les différentes parties de la plante.

R.H. Bromilow (chef de projet chez Rothamsted Research) et son équipe ont plus particulièrement étudié les acides faibles et leur transport dans la sève phloémienne de ricin et d'orge (Rigitano *et al.*, 1987). Ils remarquent, comme Kleier, que le transport est meilleur à mesure que le pH de la solution d'incubation diminue. Alors que certains acides sont chargés grâce au mécanisme de piégeage d'acide sans aide d'un quelconque transporteur, la question de la distance de transport reste en suspens. Ils distinguent des acides faibles peu mobiles de l'hydrazide maléique, qui est beaucoup plus phloème mobile, et le flamprop, un bon composé xylème mobile. Le modèle de Bromilow (Fig. 39B) a été établi sur des études de mobilité chez *Ricinus communis*. De la même manière que D.A. Kleier, il met en relation le pKa avec le log K_{ow} de molécules non ionisées ou acides. Ainsi, il détermine des plages pour les importances relatives des différents types de systémies. Quel que

soit le pKa du composé, si son log K_{ow} dépasse 4, alors il ne sera jamais mobile. En deçà, il sera potentiellement uniquement xylème mobile, d'autant plus si son pKa est élevé. Si le log K_{ow} est négatif et/ou si le pKa est faible (inférieur à huit), alors on peut supposer un composé ambimobile. Au sein de cette troisième plage, R.H. Bromilow donne, par ailleurs avec réserves, une zone de mobilité phloémienne optimale. Ayre *et al.* (2003) ont évalué les potentialités de transport de composés naturels dans le phloème. Ils mettent aussi en évidence des différences de transport dues à leurs aptitudes à traverser librement les membranes (galactinol), à utiliser des transporteurs (saccharose) et à migrer au travers les plasmodesmes pour être véhiculé par les tubes criblés jusqu'aux cellules puits (octopine, saccharose et stachyose).

1.2.4 - Évaluation de la phytotoxicité des dérivés du fenpiclonil

Les études électrophysiologiques ont été réalisées sur hypocotyle de plantule de *R. communis* (travail de DEA). Les tissus de ricin sont immergés dans un milieu contenant un dérivé du fenpiclonil (F30 ou F31) à 0,25 mM. À l'aide d'une micro-électrode, nous mesurons la différence de potentiel (d.d.p.) transmembranaire sur une cellule parenchymateuse. Nous avons ainsi suivi l'évolution de la d.d.p. transmembranaire au cours du temps dans les tissus témoins et dans les tissus mis en présence de F30 ou F31.

1.2.5 - Les collectes de sèves

Ces tests sont basés sur les travaux de E. Komor et ses collaborateurs (Kallarackal et Komor, 1989; Kallarackal *et al.*, 1989; Schobert et Komor, 1989).

• *Préparation des solutions*

Une solution initiale est préparée avec de l'eau désionisée. Elle contient des sels ($CaCl_2$ 0,5 mM, $MgCl_2$ 0,25 mM) et un tampon (20 mM) adapté au pH désiré. Des expériences antérieures menées au laboratoire ont montré que le tampon citrate - phosphate, utilisé habituellement à pH 4,5 et 5, avait un effet défavorable sur les tissus cotylédonaires probablement suite à une chélation du Ca^{2+}par les ions citrate. En conséquence, nous avons utilisé deux molécules tampon ne présentant pas cet inconvénient pour l'ensemble des pH testés. Il s'agit du MES (acide 4-morpholinoéthanesulfonique, CAS 4432-31-9) et de l'HEPES (acide 2-[4- (2-hydroxyéthyl-1-pipérazine]éthane sulfonique, CAS 7365-45-9). Le pKa du MES est de 5,96 (à 37 °C), ce qui offre un pouvoir tampon pour une zone pH allant de 5,5 à 6,5. L'HEPES présente un pKa de 7,31 (à 37 °C), donnant ainsi un pouvoir tampon allant de 6,8 à 8,2, mais aussi un second pKa, de 3,15 ± 0,7. C'est la raison pour laquelle l'HEPES est utilisé pour la solution au pH le plus acide (4,5).

La solution initiale servira, pour partie, de solution de rinçage des cotylédons et, pour l'autre partie, à la réalisation de la solution d'incubation. La molécule d'intérêt (dérivé du fenpiclonil, acide salicylique (froid ou radiomarqué) ou l'un de ses dérivés halogénés, carboxyfluorescéine) est préalablement solubilisée dans de l'éthanol avant le passage en

solution aqueuse. La solution finale d'incubation contient moins de 2 % (v/v) d'éthanol. Le pH de toutes les solutions tamponnées est ajusté par ajout de quelques gouttes de solution de NaOH ou de HCl. Elles sont ensuite réparties dans des récipients gradués et amenées à température ambiante dans la chambre de culture des plantules de ricin.

• *Préparation des plantules en vue de la collecte des sèves*

Les plantules âgées de six jours sont sélectionnées afin de constituer des lots aussi homogènes que possible. Chaque plantule est débarrassée de son albumen à l'aide de pinces et d'un scalpel (Fig. 40). Les cotylédons sont d'abord installés dans un bécher de 10 ml. La solution de rinçage est ajoutée afin d'immerger la quasi-totalité de la surface cotylédonaire. C'est la phase d'acclimatation (15 à 20 minutes). Après élimination de cette solution, une solution d'incubation de même volume est ajoutée. Il s'agit de la phase d'incubation. Au bout d'un temps déterminé, l'hypocotyle est sectionné au niveau de la courbure de la crosse à l'aide d'une lame de rasoir. Il est maintenu hors de la solution par une pâte adhésive le liant au bord du bécher. À cette occasion, la solution d'incubation est renouvelée. Commence alors la phase d'exsudation et de collecte.

• *Récolte de sève élaborée*

La section est naturellement positionnée de manière à recueillir aisément cette sève. Une fois les plantules sectionnées, la phase de collecte de la sève exportée par les cotylédons commence et celle-ci peut durer jusqu'à 5 heures. La collecte a lieu dans un caisson transparent dans lequel règne une atmosphère saturée en humidité pour limiter l'évaporation des exsudats. Les exsudats phloémiens sont récoltés à l'aide d'une micropipette et placés dans des microtubes d'analyse aseptiques de 200 µl. Les faibles volumes de sève phloémienne collectés peuvent obliger à grouper les exsudats de plusieurs plantules pour des temps de collecte les plus courts. Le détail du protocole (incubation et durée des collectes) est décrit dans le chapitre « Résultats ».

• *Récolte de sève brute*

Dans ce cas, la collecte a lieu depuis la partie de l'hypocotyle se prolongeant par le système racinaire. Suite à la section de l'hypocotyle, les tissus (dont le xylème) ne sont plus alimentés par le phloème. La phase de collecte sera donc de courte durée. Les exsudats xylémiens sont récoltés à l'aide d'une micropipette et placés dans des microtubes d'analyse aseptiques de 200 µl. Au préalable, afin d'éviter une contamination par la sève phloémienne de cette partie de l'hypocotyle, la section est traitée pendant une minute par $CaCl_2$ 1 M afin d'obturer les tubes criblés du phloème selon la méthode de Antognoni *et al.* (1998). Nous nous sommes proposé de vérifier la fiabilité de ce protocole en utilisant un composé spécifiquement transporté dans la phloème, la carboxyfluorescéine (CAS 72088-94-9) (Oparka, 1991). Le détail du protocole (incubation et durée des collectes) est fourni dans le chapitre « Résultats ».

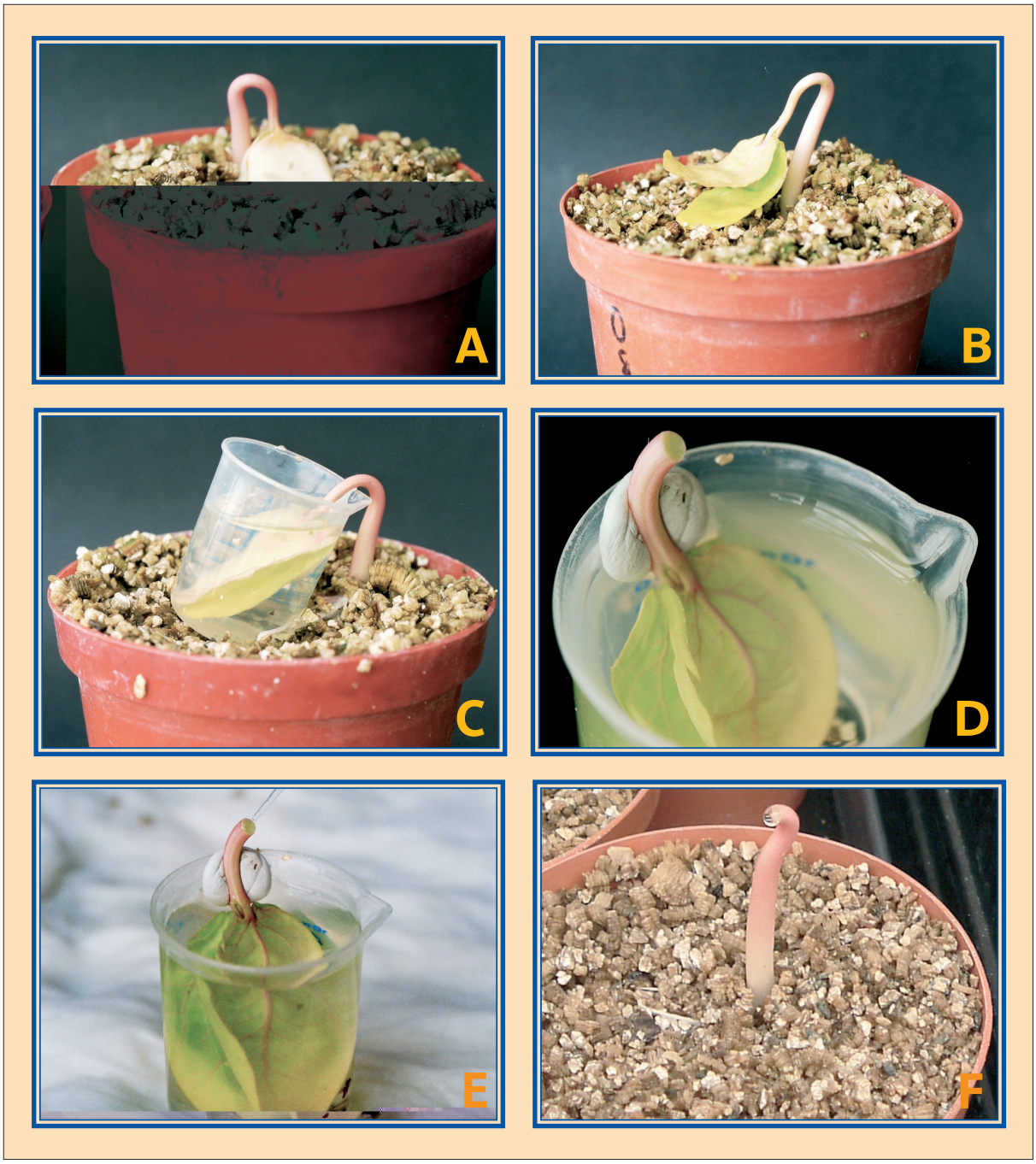


Figure 40. Les différentes étapes du test de mobilité de molécules xénobiotiques chez le modèle ricin (*R. communis* L.). A, plantule âgée de six jours présentant un hypocotyle courbé en crosse et des cotylédons prisonniers de leur albumen ; B, cotylédons débarrassés de l'albumen ; C, cotylédons immergés dans une solution d'incubation ; D, hypocotyle est sectionnée au niveau de la crosse (courbure de l'hypocotyle), une pâte adhésive maintient la section de l'hypocotyle accessible et hors de la solution ; E, prélèvement de la sève libérienne qui perle de la section de l'hypocotyle ; F, goutte de sève brute exsudant de la section de l'hypocotyle en relation avec le système racinaire (d'après Delétage-Grandon, 2000).

1.2.6 - Préparation et analyse des échantillons

Les échantillons de sèves sont analysés en HPLC ou conservés à - 80 °C, en attendant leur analyse (cf. ci-après, § 2.2). Dans quelques cas, toutes les parties de la plante sont conservées à - 80 °C après rinçage à l'eau et séchage sur papier absorbant. Leur réduction

en poudre, au mortier dans de l'azote liquide, permet de réaliser une extraction par l'éthanol. On peut alors analyser par CCM les éléments extraits dont les molécules d'intérêt.

1.3 - Inoculation et traitement de boutures de vigne

1.3.1 - Les boutures de vigne *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon

Elles sont obtenues à partir de sarments aoûtés issus de la taille hivernale. Les sarments sont conservés en chambre froide et à l'obscurité. À l'aide d'un sécateur, un premier découpage de chaque sarment permet d'éliminer l'ancienne section et la partie apicale, trop fine. Les éventuelles ramifications secondaires et les vrilles sont également éliminées. Ensuite, le sarment est sectionné afin d'isoler des boutures à deux nœuds (ou boutures à deux yeux) (Fig. 41). La section supérieure est colmatée par de la paraffine liquide ou en film dans le cas où une infection serait réalisée ultérieurement. La bouture est ensuite installée sur un support de culture.

Figure 41. Une bouture à deux yeux (A) est installée sur un support de culture (sur laine de roche (B) ou en pot (C)). La section apicale est couverte de paraffine pour limiter déshydratation et contamination (cf. Fig. 44).

Des boutures en pot sont plantées dans un mélange de terre et de terreau. Leur arrosage est assuré par un tuyau poreux alimenté sur le réseau urbain d'eau courante. Leur développement a été suivi pendant presque trois ans. Aucune taille intentionnelle n'a été réalisée.

Des boutures en culture hydroponique sont installées sur des cubes de laine de roche (7,5 x 7,5 x 6,5 cm). Elles sont ensuite judicieusement disposées sur une table à

marée. Une solution nutritive à base d'engrais soluble Scotts (Peter professionnal, 20-20-20 General Purpose™) est placée dans un bac de rétention situé sous les tables et baigne les cubes une fois par jour pendant 20 minutes puis se retire (c'est une marée). Un circuit de tuyaux alimenté par une pompe immergée (1000 $l.h^{-1}$) assure l'acheminement de la solution jusqu'à la table ainsi que son retour vers le bac. La solution est entièrement renouvelée chaque mois. Un complément en eau est assuré entre-temps afin de conserver une concentration stable en éléments nutritifs et une dilution notable des éventuels contaminants ou toxiques (exsudats racinaires, déchets cellulaires, algues et mousses). Algues et mousses se développent au contact de la laine de roche. Le bac est recouvert d'une bâche noire afin d'éviter cette prolifération. Les dépôts de sels qui apparaissent sur les parois du bac sont éliminés lors du remplacement de la solution nutritive. Lorsque les racines sont à l'étroit et dépassent nettement des cubes, ces derniers sont déposés sur un nouveau pain de laine de roche (100 x 15 x 7,5 cm). Ceci permet aux racines de continuer à coloniser un substrat. Plusieurs cubes reposent sur le même pain. Les systèmes racinaires des boutures se côtoient et souvent s'entremêlent. L'axe en croissance est taillé au-dessus d'un mètre, de manière à laisser une dizaine de feuilles pour les traitements foliaires.

1.3.2 - Analyse du transport et de la compartimentation d'un dérivé du fenpiclonil

• *Traitement des boutures*

Un certain nombre de boutures, en culture hydroponique, ont été traitées par une solution contenant un dérivé du fenpiclonil (F30) à différentes concentrations (1 mM, 2 mM et 5 mM). Dans le but d'améliorer la solubilité du principe actif et d'optimiser sa pénétration dans les tissus foliaires, une formulation a été utilisée.

Pour les deux premiers tests, la matière active a été formulée comme suit :

- Kaolin	67 %
- Matière active	20 %
- Lignine sulfonate de sodium	5 %
- Silice 35-70 µm	5 %
- Lauryl sulfate de sodium	3 %

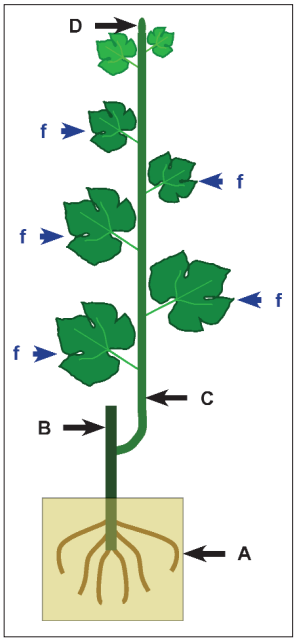


Figure 42. La bouture initiale (B) a développé un système racinaire (A) et un rameau feuillé (C). Les feuilles matures (f) sont badigeonnées de solution contenant la ou les molécules d'intérêt. La zone apicale (D) n'est pas traitée (cf. Fig. 43).

Pour tous les tests suivants, un agent mouillant commercial, l'Agral 90 (nonylphénol polyhydroxylé ; Syngenta Agro) a été utilisé à la dose de 0,5 $ml.l^{-1}$.

Le traitement est réalisé sur les feuilles matures de chaque bouture (Fig. 42). Les deux faces des feuilles sont badigeonnées à l'aide d'un pinceau. L'apposition de papier absorbant permet d'empêcher la contamination par la matière active des autres parties de la plante ainsi que du support.

• *Récolte des échantillons de vignes traitées (Fig. 43)*

Pour l'étude du devenir des molécules d'intérêt dans la plante, chaque bouture est divisée en plusieurs parties :

- les racines sont conservées en l'état ;
- le bois de la bouture initiale, obtenu par élimination de l'écorce, du phloème et de la moelle, est réduit en lamelles ;
- le bois des entre-noeuds de la ramification est aussi réduit en lamelles (après élimination des feuilles et de tous les autres tissus) ;
- la partie apicale en voie de croissance, comprenant quelques entre-noeuds (en développement), le bourgeon terminal et les vrilles, sont conservés en l'état.

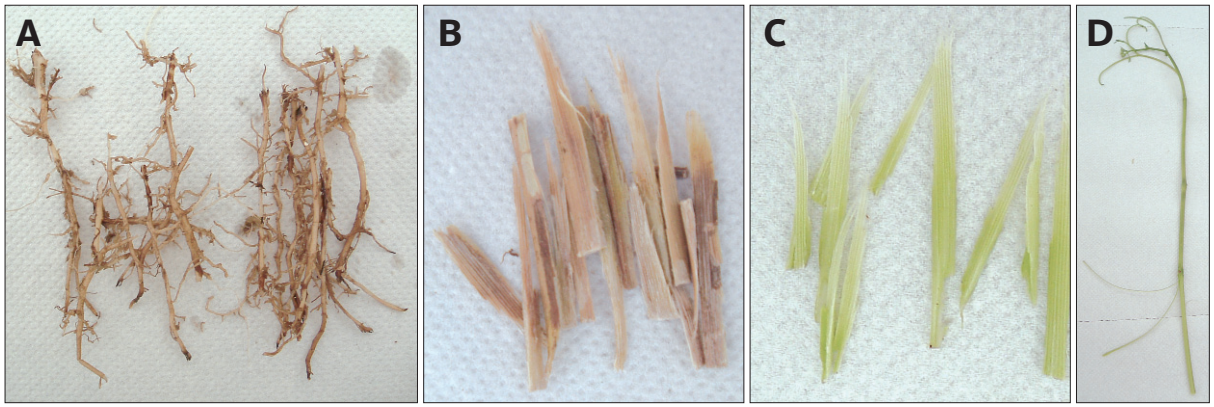


Figure 43. Préparation des différentes parties de la bouture de vigne en vue de la lyophilisation. À, racines ; B, lamelles du bois de la bouture initiale ; C, lamelles du bois du rameau feuillé. D, zone apicale.

Toutes les parties sont pesées (matière fraîche) puis lyophilisées durant quinze jours. Elles sont de nouveau pesées (matière sèche) puis pulvérisées dans un broyeur à palettes. La poudre obtenue du broyage de chaque partie est conservée séparément, dans un flaconnage adapté, à -20 °C. Une quantité définie de poudre, 20 ou 60 mg selon l'échantillon, est prélevée pour en extraire les molécules d'intérêt par 20 ou 60 ml de solvant. L'acétonitrile a été choisi comme solvant d'extraction sur la base d'expériences préalables. L'extrait, après filtration, est évaporé à sec. Le résidu est repris dans 1 ou 3 ml d'un mélange d'HEPES et d'acétonitrile (3/4-1/4) tamponné à pH 7. Enfin, la solution est analysée par chromatographie liquide.

1.3.3 - Inoculation de champignons pathogènes

Un certain nombre de boutures ont été infectées par une ou plusieurs souches fongiques. Sur chaque bouture, la moelle est perforée, par une extrémité, à l'aide d'un foret à bois de cinq millimètres de diamètre préalablement désinfecté à l'éthanol (Fig. 44). L'inoculum est déposé juste au-dessous du nœud inférieur ou juste au-dessus du nœud supérieur suivant la modalité d'infection choisie. L'inoculum est, soit un fragment de mycélium cultivé sur un milieu malt-agar découpé à l'emporte-pièce, soit une suspension de spores (3 à 5000 spores par inoculation). L'inoculation est réalisée juste avant ou après le

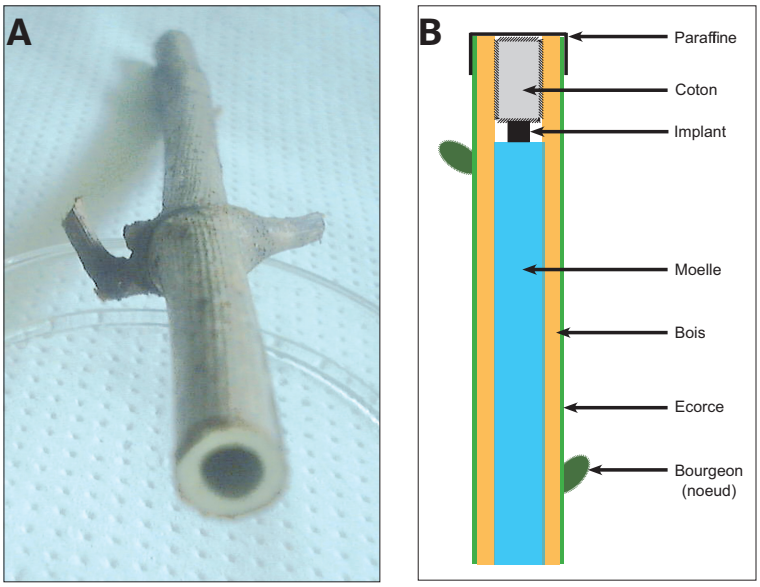


Figure 44. La bouture à deux yeux est évidée de sa moelle, au-dessus du nœud supérieur ou au-dessous du nœud inférieur (A). Le ou les implants mycéliens (ou les suspensions de spores) sont inséré(e)s, l'orifice est comblé par du coton hydrophile et bouché par de la paraffine (B). La bouture est ensuite plantée dans un support de culture (laine de roche ou mélange terreux).

bouturage. Le trou est ensuite comblé par du coton hydrophile. L'orifice est colmaté par de la paraffine liquide (chauffée à 60 °C) qui se solidifie en refroidissant.

1.3.4 - Traitement de boutures infectées

Nous avons sélectionné des vignes cultivées en milieu hydroponique. La procédure de traitement est la même que précédemment (cf. § 1.3.2.). Les molécules utilisées sont F30 (à 5 mM) et l'acide 5-chlorosalicylique (à 1 mM), en mélange avec de l'agral (0,5 ml/L).

1.3.5 - Suivi des infestations

• *Observation de la croissance des boutures*

Pour toutes les boutures, la présence de symptômes foliaires durant la période végétative est notée. Le taux de mortalité et la longueur des trois derniers entre-noeuds durant l'hiver pour les boutures en pot sont relevés.

• *Récolte des échantillons de vignes infectées (traitées ou non)*

Chaque bouture est récoltée séparément. Après avoir noté l'aspect général de la bouture (observation de la ramification et de son feuillage principalement), toutes les parties en contact avec le support sont éliminées ou fortement désinfectées par immersion dans une solution à 2 % (p/v) d'hypochlorite de calcium (pendant une minute) pour limiter toute contamination indésirable. La bouture initiale est écorcée puis sectionnée transversalement et longitudinalement afin d'identifier des nécroses. Les zones nécrotiques sont isolées et brièvement désinfectées par immersion dans une solution à 2 % d'hypochlorite de calcium (quelques secondes) avant la mise en culture. La ramification est aussi découpée. Les deux ou trois premiers entre-noeuds sont conservés. On recherche d'éventuelles nécroses puis on isole des fragments de bois pour la mise en culture après une brève désinfection (cf. ci-dessus). L'ensemble des fragments isolés, nécrotiques ou non, est mis en culture sur milieu malt-agar dans des boîtes de Pétri de 90 cm de diamètre. Les fragments

d'une même zone sont mis en culture dans la même boîte. Une fois le mycélium bien développé, chaque souche est repiquée séparément dans des boîtes de Pétri. L'identification de l'espèce fongique se fait sur le premier ou le deuxième repiquage.

2 - Les techniques d'analyse d'échantillons

2.1 - La chromatographie couche mince (CCM)

La CCM est une technique d'analyse relativement rapide, peu onéreuse et facile d'utilisation. Elle est principalement dédiée à la recherche d'information qualitative, voire semi-quantitative. Elle consiste à faire migrer une phase mobile, mélange de solvants, au travers d'une phase fixe de silice déposée sur un support (verre, aluminium ou polyester). Les plaques chromatographiques utilisées sont en aluminium et portent un gel de silice de 0,20 mm d'épaisseur traité avec un indicateur de fluorescence (silicate de zinc activé au manganèse) réagissant sous UV à 254 nm (Alugram Sil G/UV254, Macherey-Nagel). L'échantillon est déposé en formant un point ou une bande horizontale sur le bas de la plaque. Cette dernière est disposée dans une cuve étanche. L'atmosphère interne est saturée en phase mobile, le bas de la plaque est au contact de la phase mobile, le dépôt au-dessus du niveau du liquide. Par capillarité, le mélange de solvant progresse vers le sommet de la plaque, emportant sur son passage les constituants de l'échantillon. Chaque constituant a une affinité avec la phase stationnaire et phase mobile qui lui est propre. Il sera donc plus ou moins transporté par le flux de phase mobile. La révélation se fait à la fois dans le visible et dans l'UV. À 254 nm, la fluorescence verte est éteinte par les fonctions acides, aromatiques et insaturées.

On considère ainsi le facteur de rétention (Rf) comme le rapport de la distance de migration du front de la phase mobile sur la distance de migration du constituant considéré. La valeur varie entre 0 (migration avec la phase mobile, non retenu) et 1 (n'est pas entraîné par la phase mobile).

La CCM monodimensionnelle a principalement servi à vérifier la pureté de nos produits de synthèse et mettre au point le mélange d'élution pour une chromatographie séparative sur colonne de silice (cf. Résultats). La CCM bidimensionnelle (CCM 2D) a été utilisée afin de montrer la présence de molécule d'intérêt au sein d'extraits végétaux, cette technique permettant d'optimiser la séparation.

2.2 - La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Elle assure une détection et une quantification en routine de molécules d'intérêt au sein d'échantillons.

2.2.1 - Préparation des échantillons

Les sèves phloémiennes et xylémiennes sont analysées directement après récolte ou conservées à - 80 °C. Les sèves sont chargées en solutés, il est donc nécessaire de les diluer avant injection afin d'éviter un colmatage du système (préfiltre, précolonne et colonne). Après une étape de dilution, les échantillons sont introduits dans des tubes d'analyse de 200 µl et placés dans un système automatique d'injection avec passeur d'échantillons. Pour les premières étapes de mise au point d'analyses, nous avons eu recours à l'injection manuelle sur des solutions pures ou des mélanges de composés (p. ex. sève et molécule d'intérêt).

Par ailleurs, des extraits de bouture de vigne sont repris dans un solvant adéquat et placés dans des tubes d'analyse pour passeur automatique. Chaque extrait est injecté au moins trois fois.

2.2.2 - Injection, séparation et détection

Le matériel utilisé est constitué de deux chaînes indépendantes Spectra System (Thermo Electron Corporation) pilotées par ordinateur grâce au logiciel PC1000 sous environnement multi-tâches OS2 Warp 4. Les conditions d'élution et d'acquisition sont ainsi contrôlées et peuvent fluctuer à volonté. Les chromatogrammes sont stockés et peuvent être à nouveau analysés à la demande.

Un dégazeur sous vide (SCM1000) alimente jusqu'à quatre entrées différentes de solvant d'une pompe quaternaire (P4000). Cette dernière peut assurer un mélange isocratique ou un gradient de solvants, mélange variant durant le temps de l'analyse. L'injection des échantillons se fait par le biais d'un passeur d'échantillons automatique (AS3000). L'échantillon est séparé sur une colonne chromatographique Merck monolithique à structure bimodale Chromolith Performance RP-18e (100 x 4,6 mm, macropores 2 mm et mésopores 13 nm) et les constituants sont détectés par un spectromètre UV-VIS à barrette de diodes (UV6000LP ; 190 à 800 nm). Cet appareil nous permet d'enregistrer simultanément plusieurs longueurs d'onde pour une même analyse. On peut ainsi visualiser un spectre tridimensionnel des molécules ($DO = f(\lambda, t)$).

Un dégazeur du même type alimente une autre pompe quaternaire P1000XR. L'injection est manuelle par une valve Rhéodyne. L'échantillon est séparé sur une colonne chromatographique Supelco Discovery RP-Amide C16 (250 x 4,6 mm, diamètre des particules 5 µm). La détection est effectuée dans l'UV ou le visible par un détecteur UV2000 (deux longueurs d'onde simultanées par analyse, de 190 à 800 nm).

La chromatographie haute performance (ou haute pression) permet d'obtenir des analyses d'échantillons en routine, rapides et fiables. La nature de la colonne est en relation avec le type de constituants à séparer. Celles utilisées au laboratoire sont des colonnes à phase inverse, c.-à-d. une silice greffée avec une chaîne carbonée linéaire. Cette phase stationnaire est apolaire, la phase mobile utilisée sera donc polaire (polarité, eau : 10,2 ; acétonitrile : 5,8). Les composés polaires seront élués en premier.

Au cours des premières analyses effectuées par HPLC, nous avons constaté que certaines molécules (xénobiotiques ou naturelles) pouvaient être en partie adsorbées sur les composants métalliques du système d'injection. En conséquence, une modification des conditions d'analyse ainsi que l'utilisation de composants en métaux plus inertes (aiguille en titane) ont été nécessaires.

2.2.3 - Analyses des spectres chromatographiques

Le système informatique PC 1000 permet le pilotage des chaînes mais aussi le retraitement et l'archivage des données. La méthode de détection employée est l'UV. La déviation optique obtenue par le passage d'une molécule, absorbant à la longueur d'onde déterminée, se traduit par un signal électrique (en mV). Le traitement du signal est obtenu par le biais d'un logiciel qui intègre une courbe de réponse, parsemée de pics et de vallées, en fonction du temps. Le chromatogramme ainsi obtenu montre l'ensemble des détections faites sur un seul échantillon, suite à la séparation des constituants de celui-ci par la colonne. Il est essentiel d'analyser finement les chromatogrammes obtenus afin de déceler toute erreur d'interprétation. Pour nous aider dans l'identification des pics obtenus, un module logiciel de PC 1000 (Spectacle) nous permet de visualiser un chromatogramme en 3D, avec un balayage des longueurs d'onde. Ainsi nous pouvons réduire nos risques d'erreur grâce à une comparaison de chromatogrammes 3D. L'un correspond à notre molécule d'intérêt pure et l'autre à l'échantillon analysé. Néanmoins cette étape n'est effectuée que pour des cas particuliers d'identification. Lorsque notre analyse est effectuée en routine, nous ne confirmons plus la nature du pic détecté.

La chromatographie liquide haute performance est une technique d'analyse séparative qualitative mais qui peut aussi permettre de quantifier les composés recherchés. Avec le type d'appareillage dont nous disposons, nous sommes en mesure de réaliser des analyses d'échantillons complexes et d'estimer la concentration contenue dans notre échantillon. Pour ce faire, nous réalisons une gamme de solutions contenant notre molécule d'intérêt à des concentrations croissantes. Cette gamme d'étalons est analysée à l'aide du même appareillage et dans les mêmes conditions d'élution que lors de l'analyse des échantillons. Cette gamme de concentrations nous permet d'obtenir une droite de régression, DO (ou mV) = f (concentration). Une étape de retraitement des données s'ensuit pour les échantillons déjà analysés. Cela nous permet d'obtenir une estimation fiable de la concentration en molécule d'intérêt.

Néanmoins, plusieurs limites sont à garder en mémoire. L'échantillon est introduit dans le circuit par le biais d'un système d'injection. Il rejoint donc une phase mobile, constituée d'eau, d'acétonitrile et de TFA, en constante circulation. L'échantillon rejoint l'entrée de la colonne, après être passé par un préfiltre et une précolonne. Ce dispositif permet d'éliminer d'éventuels éléments insolubles ou non élués. Les interactions qui s'opèrent avec la phase fixe (silice greffée) de la colonne et la phase mobile vont permettre une séparation des différents constituants à la sortie de cette dernière. La séparation des échantillons

s'obtient en modifiant le rapport des solvants (Fig. 45). Plus le mélange est polaire, plus la séparation est importante. En revanche, plus la séparation est grande, plus la résolution est pauvre. Il est essentiel d'analyser avec précision les interactions entre notre molécule d'intérêt et les différents éléments de nos phases, mobile et fixe. L'étude de la solubilité de nos molécules a été un préalable nécessaire. La recherche d'une colonne mieux adaptée à nos analyses fait aussi partie de nos priorités.

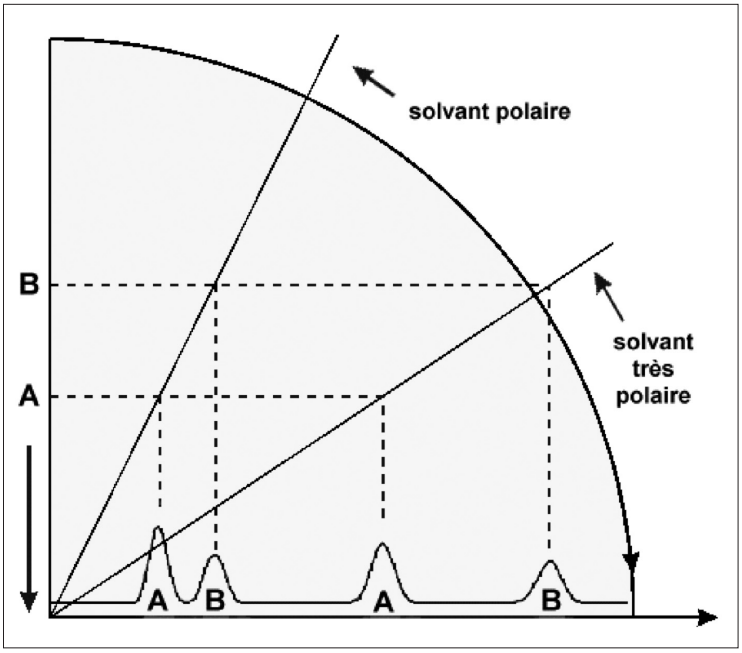


Figure 45. En HPLC, l'utilisation d'une colonne en phase inverse, apolaire, nécessite l'emploi d'une phase mobile (mélange de solvants) polaire. Ainsi, les composés les plus polaires (à plus grande affinité pour la phase mobile) seront élués en premier. Ici le composé A est plus polaire que le composé B. En changeant la polarité de la phase mobile (p. ex. les proportions des solvants), le facteur de rétention est modifié. On peut alors améliorer le pouvoir séparateur de la colonne mais, ce faisant, on modifie aussi la résolution des pics (+/- évasés, modification du nombre de plateaux théoriques) (Dubreuil, 2003).

Tout cet ensemble vieillit. Il est nécessaire d'apporter un soin et une attention constante à l'ensemble de ce matériel. Ainsi les capacités de séparation et de détection vont fluctuer avec l'âge des constituants, filtres et colonnes, lampes. Une maintenance est nécessaire périodiquement.

3 - La synthèse de dérivés du fenpiclonil et du pyrifénox portant une fonction acide carboxylique

En chimie, les protocoles expérimentaux sont associés aux résultats ; c'est la raison pour laquelle la synthèse des dérivés du fenpiclonil et du pyrifénox sera présentée dans la partie « Résultats ». Dans la perspective éventuelle d'une lutte curative ou préventive, nous avons réalisé la synthèse de molécules antifongiques dérivées de molécules commerciales. Ces dernières sont non mobiles dans la plante et nous souhaitons obtenir des dérivés mobiles. Des synthèses ont été réalisées afin d'obtenir trois dérivés du fenpiclonil et un dérivé du pyrifénox, ces dérivés étant tous porteurs d'une fonction acide carboxylique.

Le fenpiclonil est un fongicide de contact de la famille des phénylpyrroles (cf. § 3.3 classe E), avec le fludioxonil. Il est employé en traitement des semences des céréales, protéagineux et pommes de terre. Les atomes de chlore et l'azote de l'hétérocycle passent pour

intervenir majoritairement dans l'activité biologique du produit. Notre stratégie consiste à greffer une fonction acide carboxylique afin de pouvoir bénéficier du phénomène de piégeage d'acide. Pour influer sur sa lipophilie, diverses chaînes carbonées plus ou moins longues sont aussi additionnées. De plus, la modélisation de sa mobilité par le logiciel ACD/Log D nous permet de sélectionner les molécules dont les potentialités de systémie semblent intéressantes.

Le pyrifénox est un fongicide pénétrant de la famille des IBS de classe I (IDM) (cf. § 3.3. classe G). Notre stratégie est identique à celle développée pour le composé précédent. Les atomes de chlore et d'azote sont présumés prépondérants pour l'activité biologique de cette molécule. Nous avons donc choisi de lier la fonction acide carboxylique de manière à affecter le moins possible les relations électroniques de ces atomes. Le pyrifénox est déjà utilisé contre l'oïdium en pulvérisation foliaire. Aidé dans notre décision par le logiciel ACD/Log D, nous n'avons pas jugé nécessaire d'ajouter des fonctions supplémentaires pour modifier encore sa lipophilie.

Afin de valider chaque étape de synthèse, des analyses des produits intermédiaires ont été réalisées par chromatographie et/ou résonance magnétique nucléaire (RMN). Une analyse plus poussée des produits finaux (dérivés du fenpiclonil) a été obtenue par RMN et spectrométrie de masse. Leur purification a parfois nécessité une séparation sur colonne chromatographique de silice. Le mélange éluant utilisé a été mis au point, au préalable, par chromatographie couche mince (CCM).

Bibliographie

ACD, Advanced Chemistry Development (2005) ACD/LogD-Technical Information. Publication électronique: http://www.acdlabs.com/products/phys_chem_lab/logd/tech.html

F. Antognoni, S. Fornalè, C. Grimmer, E. Komor, N. Bagni (1998) Long-distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. Planta **204**, 520-527

B.G. Ayre, F. Keller, R. Turgeon (2003) Symplastic Continuity between Companion Cells and the Translocation Stream: Long-Distance Transport Is Controlled by Retention and Retrieval Mechanisms in the Phloem. Plant Physiology **131**, 1518-1528

R.H. Bromilow, K. Chamberlain, A.A. Evans (1991) Molecular structure and properties of xenobiotics in relation to phloem transocation. *In* Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation, Ed. J.-L. Bonnemain, S. Delrot, W.J. Lucas and J. Dainty, Ouest Editions, Nantes, pp 332-340

C. Delétage-Grandon (2000) Effets de diverses modulations structurales sur les propriétés d'absorption et de transport des xénobiontes. Premières applications aux fongicides. Thèse de Doctorat de l'Université de Poitiers

P. Dubreuil (2003) Répertoire commenté de chimie (*adnotatum repertorium chymiae*). Publication électronique: http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chimie.htm

T.B. Grayson, D.A. Kleier (1990) Phloem Mobility of Xenobiotics. IV. Modelling of Pesticide Movement in Plants. Pesticide Science **30**, 67-79

F.C. Hsu, D.A. Kleier (1990) Phloem Mobility of Xenobiotics. III. Sensitivity of Unified Model to Plant Parameters and Application to Patented Chemical Hybridizing Agents. Weed Science **38**, 315-323

F.C Hsu, K. Sun, D.A. Kleier, M.J. Fielding (1995) Phloem Mobility of Xenobiotics. VI. A Phloem-Mobile Pro-nematicide Based on Oxamyl Exhibiting Root-Specific Activation in Transgenic Tobacco. Pesticide Science **44**, 9-19

J. Kallarackal, E. Komor (1989) Transport of hexoses by the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings. Planta **177**, 336-341

J. Kallarackal, G. Orlich, C. Shobert, E. Komor (1989) Sucrose transport into phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as measured by the analysis of sieve-tube sap. Planta **177**, 327-335

D.A. Kleier (1994) Phloem Mobility of Xenobiotics. V. Structural Requirements for Phloem-Systemic Pesticides. Pesticide Science **42**, 1-11

D.A. Kleier (1995) QSARs from Mathematical Models. Systemic Behavior of Pesticides. *In* Classical and three-dimensional QSAR in agrochemistry, Ed. C. Hansch and T. Fujita, ACS Symposium Series **606**, 98-106

K.J. Oparka (1991) Uptake and compartmentation of fluorescent probes by plant cells. Journal of Experimental Botany **42**, 565-579

R.L.O. Rigitano, R.H. Bromilow, G.G. Briggs, K. Chamberlain (1987) Phloem Translocation of Weak Acids in *Ricinus communis*. Pesticide Science **19**, 113-133

F. Rocher (2004) Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense. Thèse de Doctorat de l'Université de Poitiers

H. Sandermann, Jr (1992) Plant metabolism of xenobiotics. TRENDS in Biochemical Sciences **17**, 82-84

C. Shobert, E. Komor (1989) The differential transport of amino acids into the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as shown by the analysis of sieve-tube sap. Planta **177**, 342-349

Résultats

1 - Hémisynthèse de composés organiques

1.1 - Introduction

Dans la suite des travaux réalisés au laboratoire « Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles », nous avons entrepris la synthèse de dérivés de molécules phytopharmaceutiques.

La pyrrolnitrine (3-chloro-2-nitrophényl)pyrrole est un antibiotique issu du L-tryptophane. Elle est naturellement produite par différentes espèces bactériennes (*Pseudomonas spp.*, *Burkholderia cepacia*, *Myxococcus fulvus*, *Serratia spp.*, *Enterobacter agglomerans*) (Sako *et al.*, 2002). Elle est employée, en médecine, en usage externe pour le traitement d'une mycose du pied et d'autres dermatophytoses (infections de la peau ou des phanères par les dermatophytes : *Trichophyton*, *Microsporum* & *Epidermophyton*). Son activité se situe au niveau de la chaîne mitochondriale de transport des électrons ainsi que de la membrane plasmique. Récemment, il a été trouvé une activité sur les champignons du sol pathogènes pour une grande variété de plantes cultivées, ainsi qu'une activité appréciable contre *Mycobacterium tuberculosis* & *M. avium.*

Sa grande sensibilité à la lumière (λ max : 252 nm) occasionne une perte de son activité antifongique. Dans les années 1990, la société Ciba-Geigy (aujourd'hui Syngenta Agro) a commercialisé deux analogues de la pyrrolnitrine, le fenpiclonil & le fludioxonil. Une nouvelle famille de composés antifongiques est née, les phénylpyrroles (Nyfeler et Ackermann, 1992). Ce sont des molécules moins labiles qui ne sont pas systémiques, mais légèrement pénétrantes. La cuticule est une barrière naturelle des feuilles composée de cutine (polymère d'acides gras hydroxylés), de polysaccharides et de cires (chaînes aliphatiques à fonctions alcool et acide carboxylique, entre autres) (Chamel, 1997). Ces molécules ont la capacité d'être piégées et / ou de traverser cette barrière, pour agir localement sur une infection.

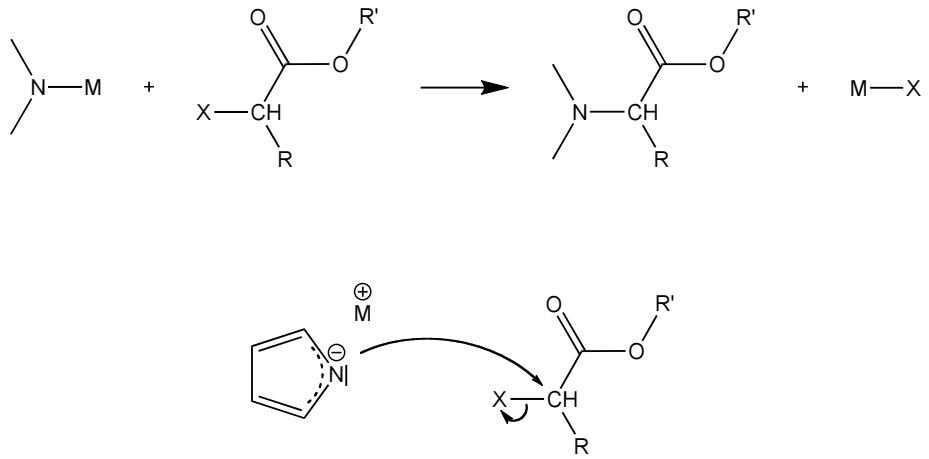
À l'heure actuelle, seul le fludioxonil est encore commercialisé. En viticulture, il est préconisé dans la lutte contre *B. cinerea*, agent de la pourriture grise. La molécule inhibe la germination des spores, l'élongation des tubes germinatifs et la croissance mycélienne. Son devenir a déjà été étudié chez la vigne, principalement lors du passage de la grappe au tonneau (Cabras *et al.*, 1997). Chez les agrumes (*Citrus spp.*), la gestion des résidus et l'apparition des résistances, chez *Penicillium digitatum* et *P. italicum*, sont aussi au centre des préoccupations (Schirra *et al.*, 2005).

Leur mode d'action original (encore non totalement élucidé), leur relative lipophilie en font des candidats intéressants pour notre étude. L'ajout d'une chaîne carbonée portant une fonction acide carboxylique peut permettre d'espérer une compartimentation cytoplasmique de la molécule par le mécanisme de piégeage d'acide. Ainsi, une trentaine de

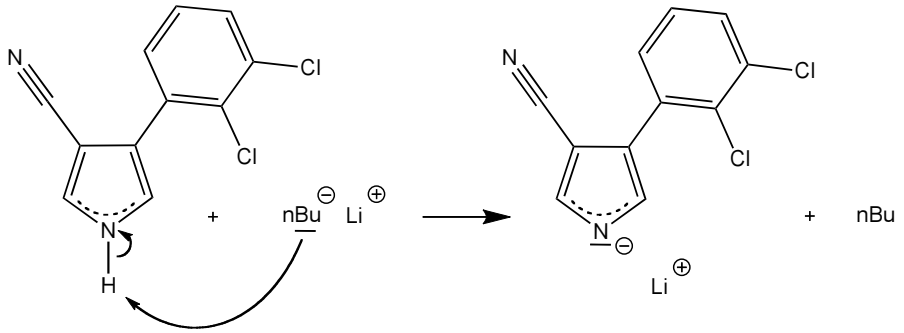
dérivés du fenpiclonil ont été réalisés, différentes positions étant possibles pour le greffage d'une telle chaîne (Delétage-Grandon, 2000).

Les synthèses reposent essentiellement sur la réaction d'un amidure (M = Li, Na) avec un ester α-halogéné. L'azote pyrrolique forme une amine secondaire dont le doublet libre participe à l'aromaticité du noyau pyrrole. L'alkylation de l'anion pyrrolique peut intervenir sur l'azote ou sur le carbone (Guida et Mathre, 1980). L'orientation de la réaction dépend de la nature de la base, de l'agent alkylant ainsi que du solvant employé (polaire ou apolaire).

La deuxième étape consiste à apporter un α-halogénoester (en excès ; X = Br) pour obtenir le produit d'alkylation par substitution nucléophile. L'utilisation d'une fonction triflate (X = OSO_2CF_3) rend l'ester encore plus réactif vis-à-vis de cette substitution.



L'utilisation de *n*-butyllithium dans le THF tend à favoriser la *N*-alkylation, voire à exclure totalement la *C*-alkylation selon les cas (Bonnaud, 1999).



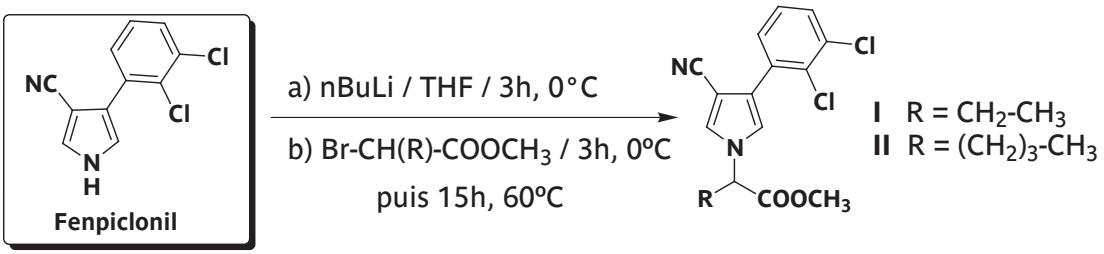
Cela nous permet d'aboutir ainsi à la formation d'un dérivé à fonction ester sur lequel on déprotège la fonction acide carboxylique par simple saponification.

1.2 - Travaux de synthèse

1.2.1 - Dérivés acides du fenpiclonil *N*-substitués (Chollet *et al.*, 2004, 2005)

Pour compléter notre étude des dérivés du fenpiclonil, nous avons réalisé trois synthèses complémentaires sur la base des résultats antérieurs.

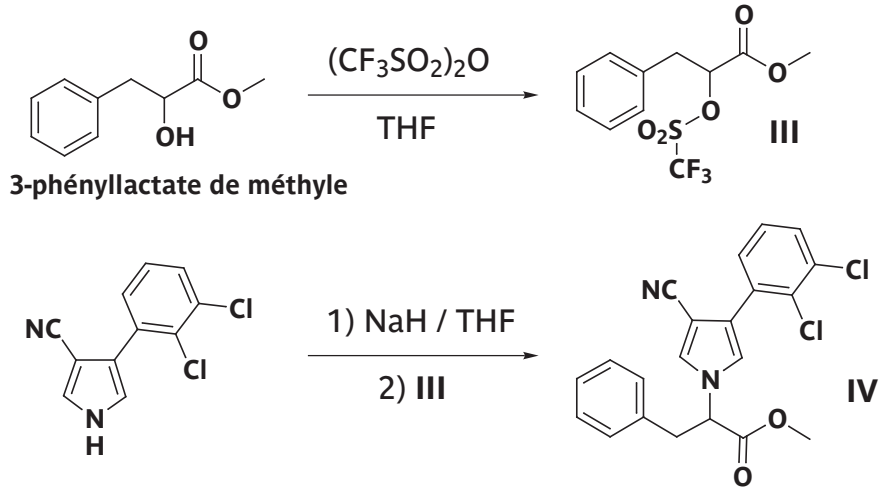
1.2.1.1 - Synthèse du N-(1-methoxycarbonylpropyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)-pyrrole **I** *et du N-(1-methoxycarbonylpentyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole* **II**



Une solution de *n*-butyllithium 1,6 M dans l'hexane (6,6 ml, 10,05 mmol) est ajoutée goutte à goutte à 0 °C à une solution de fenpiclonil (2,37 g, 10 mmol) dans le THF anhydre désoxygéné (30 ml). Le milieu est maintenu sous agitation durant 3 h à 0 °C. Une solution de 2-bromobutyrate de méthyle (pour **I**, 2,71 g; 15 mmol) ou de 2-bromocaproate de méthyle (pour **II**, 4,18 g; 20 mmol) dans le THF anhydre désoxygéné (20 ml) est ensuite ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est ensuite maintenu sous agitation durant 1 h à 0 °C et 15 h à 60 °C (20 h pour **II**). Après refroidissement à 0 °C, le milieu réactionnel est hydrolysé avec de l'eau froide (~ 5 °C) qui est ajoutée goutte à goutte (50 ml). La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3 x 25 ml). Les phases organiques réunies sont lavées à l'eau (20 ml), séchées sur du sulfate de magnésium anhydre et le solvant est évaporé pour donner **I** (2,82 g ; Rdt = 84 %, huile marron) ou **II** (3,39g ; Rdt = 93 %, huile marron). Les composés sont utilisés tels quels pour la suite après vérification de leur pureté par HPLC.

Cette méthode ayant été infructueuse pour l'obtention d'un dérivé à substituant R aromatique, une autre méthode a été mise au point.

1.2.1.2 - Synthèse du N-(1-méthoxycarbonyl-2-phényléthyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole **IV** (Yoshikawa *et al.*, 1999, Au-Yeung *et al.*,2001)



• *Obtention du triflate du 3-phényllactate de méthyle (III)*

Le 3-phényllactate de méthyle (8,55 g; 47,5 mmol) est dissous dans du dichlorométhane (250 ml). Après homogénéisation, on ajoute la pyridine (7,5 ml ; 95 mmol) et on laisse homogénéiser à 0 °C. L'anhydride triflique (10,5 ml; 61,5 mmol) est ensuite ajouté goutte à gouttea 0 °C. Le milieu prend une couleur orange. Après homogénéisation à 0 °C, pendant 10 à 15 min, on hydrolyse en rajoutant de l'eau glacée (150 ml; 2 °C). La phase aqueuse est extraite par l'éther (4 x 50 ml; formation d'un précipité qui va disparaître lors des lavages suivants à l'eau). La phase organique est ensuite lavée successivement par $NaHCO_3$ (2 x 30 ml; solution saturée), H_2O (50 ml), HCl (2 x 30 ml; solution 1 M) et enfin de nouveau H_2O (50 ml). Après séchage sur sulfate de magnésium anhydre et évaporation des solvants, on obtient un liquide huileux marron clair (11,45 g; Rdt = 77,2 %). Le dérivé triflate **III** est utilisé tel quel après vérification de sa pureté par CPG.

• *Obtention de l'ester* **IV**

L'hydrure de sodium (36 mg de NaH à 80% dans l'huile de vaseline soit 1 mmol + 25% d'excès, lavage au pentane anhydre après la pesée) est introduit dans du THF désoxygéné (1 ml). Après refroidissement à 0 °C, une solution de fenpiclonil (237 mg; 1 mmol) dans le THF (3 ml) est ajoutée goutte à goutte à 0 °C. Après la fin de l'addition, l'agitation est maintenue 10 min puis on rajoute goutte à goutte à 0 °C une solution de **III** (330 mg ; 1,05 mmol) dans le THF désoxygéné (5 ml). Le milieu est ensuite maintenu sous agitation à 0 °C durant 1 h puis à température ambiante durant une nuit. Après addition d'eau (10 ml), le milieu est extrait par l'éther (2 x 10 ml). La phase organique est lavée par de l'eau (2 x 10 ml) avant d'être séchée sur sulfate de magnésium anhydre. Après évaporation du solvant, on récupère 0,34 g de produit brut. Ce dernier est purifié par élution sur une colonne de silice (12 g) avec un mélange acétate d'éthyle / pentane (20/80 puis 40/60 puis 80/20 et enfin 100/0). Après évaporation des solvants sous pression réduite (évaporateur rotatif) et à l'aide d'un micro-évaporateur (type kugelrohr) on obtient l'ester **IV** sous forme d'un liquide huileux marron (0,26 g; Rdt = 65 %).

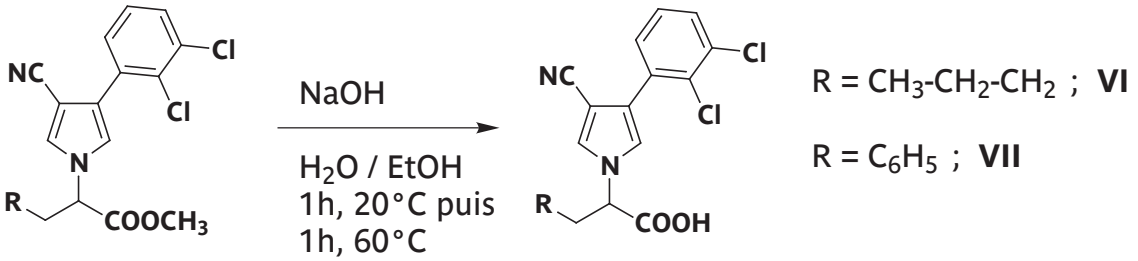
1.2.1.3 - Synthèse du N-(1-carboxypropyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole **V**

(Dean, 1965 ; Mc Murry et Wong, 1972)

Dans une solution de **I** (3,37 g, 10 mmol) au sein de diméthylformamide fraîchement distillé et anhydre (300 ml), on dissout de l'iodure de lithium (9,3 g, 57 mmol) et le milieu est chauffé à reflux pendant 18 h. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est dilué avec de l'eau (300 ml), acidifié avec HCl 2 M et extrait au dichlorométhane (3 x 50 ml). Les phases organiques réunies sont lavées à l'eau (3 x 30 ml) puis séchées

sur sulfate de magnésium anhydre. Les solvants sont évaporés sous pression réduite pour donner l'acide attendu **V** (3,03 g ; Rdt = 94 %, huile marron).

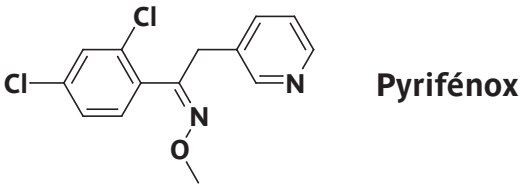
1.2.1.4 - Synthèse du N-(1-carboxypentyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole **VI** *et du N-(1-carboxy-2-phényléthyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole* **VII**
(Gershon *et al.*, 1954)



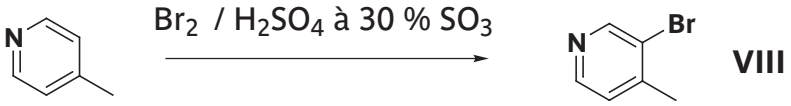
Une solution aqueuse de soude 1,25 M (21 ml) est ajoutée à une solution des esters **II** (3,65 g; 10 mmol) ou **IV** (3,99 g; 10 mmole) dans l'éthanol à 95 % (18 ml). Le mélange est placé sous agitation magnétique durant 1 h à température ambiante puis 1 h supplémentaire à 60 °C. Après refroidissement et dilution avec de l'eau (28 ml), la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 x 40 ml) et acidifiée avec HCl (solution 2 M, pH 1-2). La phase acidifiée est extraite au dichlorométhane (3 x 40 ml). Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium anhydre puis évaporées pour donner **VI** (2,81 g ; Rdt = 80 %, huile marron qui cristallise lentement) ou **VII** (2,08 g ; Rdt = 54 %, cristaux marron clair)

1.2.2. Dérivé du pyrifénox

Devant la bonne activité de cet IDM sur *Pa. chlamydospora*, nous avons voulu réaliser un premier dérivé acide, potentiellement mobile au sein de la plante.



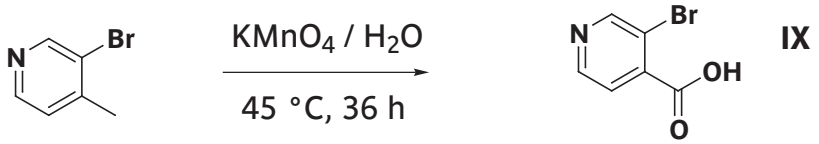
1.2.2.1 - Préparation de la 3-bromo-4-méthylpyridine VIII (Abblard *et al.*, 1972)



L'oléum (30 % SO_3 ; 150 ml) est ajouté, goutte à goutte, à la 4-picoline (23,3 g; 0,25 mole) maintenue à 4-5 °C par un bain «glace-sel». Le brome (20 g soit 6,4 ml env. ; 0,125 mole) est ajouté goutte à goutte à la solution maintenue à 4-5 °C. Après retour à la température ambiante, le milieu est porté à 80 °C. Le chauffage est conservé jusqu'à disparition des vapeurs de brome et reflux de gouttes incolores (soit 3 jours avec environ 8 à 10 h de chauffe par jour). Le milieu est ensuite versé lentement sur glace puis, en refroidissant, on neutralise avec une solution aqueuse de soude (10 M ; 1 l). Un précipité apparaît. Le milieu est extrait à l'éther (3 x 100 ml). Les fractions organiques réunies sont séchées sur sulfate de

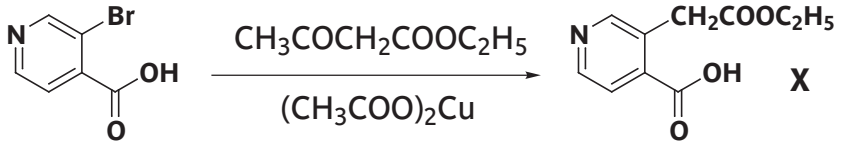
magnésium anhydre. Une masse gélatineuse brunâtre agglomérée au sulfate de magnésium est filtrée sur papier. La verrerie ayant contenu les phases éthérées ainsi que le filtre sont rincés par de l'éther (100 puis 50 ml). Le filtrat est de nouveau séché sur sulfate de magnésium anhydre si nécessaire. Après évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient un liquide jaunâtre. Le produit brut est ensuite distillé sous pression réduite (Eb_{25torr} = 95 °C ; Litt. Eb_{10torr} = 75-76 °C ; 14 g, Rdt = 33 %).

1.2.2.2 - Obtention de la 3-bromo-4-carboxypyridine IX (Dininno *et al.*, 1994 ; Imbert *et al.*, 2003)



Le permanganate de potassium (4,74 g ; 30 mmol) est dissous dans l'eau (120 ml). On ajoute ensuite la 3-bromo-4-méthylpyridine **VIII** (2,58 g ; 15 mmole). Le mélange est agité à 45 °C durant 36 h. Après retour à température ambiante, l'ensemble est filtré sur papier et rincé à l'eau chaude (4 x 10 ml). La solution est concentrée jusqu'à 10 ml environ puis filtrée sur Célite qui est ensuite rincée avec de l'eau chaude (3 x 5 ml). On acidifie avec HCl (solution glacée 2 M ; 30 ml). Le produit attendu précipite puis est filtré. Le filtrat est évaporé en totalité avant de procéder à une recristallisation en plusieurs étapes dans l'eau. Les différentes fractions du produit attendu sont réunies (F. 232 °C ; 1,36 g ; Rdt = 45 %).

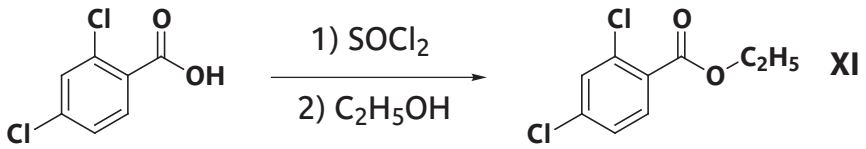
1.2.2.3 - Obtention de l'acide 3-(2-éthoxy-2-oxoéthyl) isonicotinique X (Ames et Dodds, 1972)



Des petites portions de sodium (1,44 g ; 62,6 mmol) sont ajoutées dans de l'éthanol absolu (50 ml). Après refroidissement à température ambiante, on ajoute dans un premier temps l'acétoacétate d'éthyle (4,88 g ; 37,5 mmol) puis dans un second temps un mélange de 3-bromo-4-carboxypyridine **IX** (5,05 g ; 25 mmol) et d'acétate de cuivre (0,2 g). On chauffe ensuite à reflux durant 2 h. Après refroidissement, le milieu est acidifié avec de l'acide acétique (25 ml) puis les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le résidu est repris par 25 ml d'eau puis extrait au chloroforme (3 x 10 ml). Laissé en l'état à 4-5 °C pendant une nuit, un précipité se forme. Celui-ci est filtré sur plaque frittée. Afin d'éliminer le cuivre résiduel, on solubilise les cristaux dans l'acétate d'éthyle bouillant puis on filtre la solution sur papier. Le filtrat est laissé à 4 °C pendant 1 h environ pour obtenir une recristallisation. Après filtration sur plaque frittée, la solution est évaporée de nouveau. Le rési-

du est repris dans un minimum d'acétate d'éthyle bouillant. Après refroidissement à 4 °C les cristaux formés sont de nouveau filtrés. Les différentes recristallisations obtenues sont réunies (1,2 g ; Rdt = 23 %).

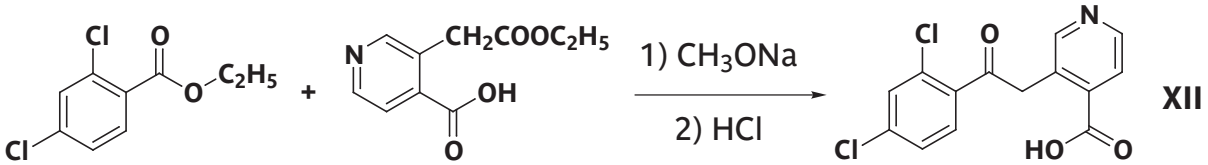
*1.2.2.4 - **Préparation de 2,4-dichlorobenzoate d'éthyle XI*** (Chollet *et al.*, 1997 ; Houlihan *et al.*, 1983)



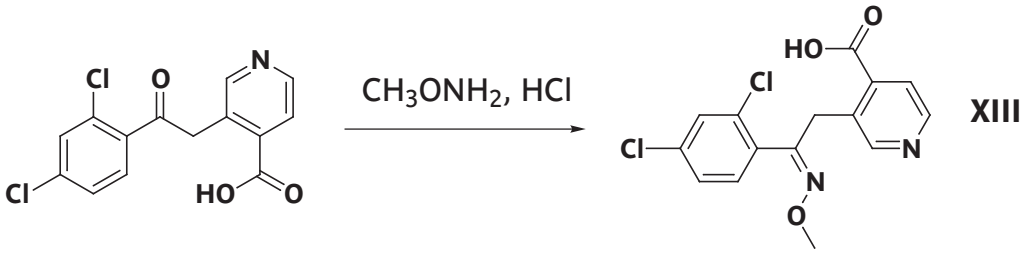
L'acide 2,4-dichlorobenzoïque (3,82 g; 20 mmol) est ajouté au chlorure de thionyle (3,82 g soit 7,25 ml; 100 mmol). La solution est portée à reflux jusqu'à disparition du dégagement gazeux (65-70 °C). L'excès de $SOCl_2$ est éliminé par évaporation sous pression réduite, à l'abri de toute trace d'eau. On évapore successivement 3 x 15 ml de dichlorométhane anhydre pour éliminer les dernières traces de gaz dissous. On obtient alors un liquide jaunâtre. Il s'agit du chlorure de 2,4-dichlorobenzoyle.

À une solution d'éthanoate de sodium (préparée à partir de sodium [0,69 g; 30 mmol]) et d'éthanol absolu, est ajouté avec précaution le chlorure d'acide précédent dilué dans le toluène anhydre (6 ml). On observe la formation d'un précipité dès le début de l'addition. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante durant une nuit. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Après addition de dichlorométhane (20 ml) puis d'eau (8 ml), la phase organique est lavée à l'eau (2 x 10 ml). Elle est ensuite séchée sur sulfate de magnésium anhydre et filtrée. Le solvant est évaporé sous pression réduite. On obtient une huile jaunâtre (3,0 g ; Rdt = 69 %).

*1.2.2.5 - **Obtention de l'acide 3-[2-(2,4-dichlorophényl)-2-oxoéthyl] isonicotinique XII*** (Dorn, 1983)



Plusieurs tentatives pour obtenir le composé **XII** se sont malheureusement soldées par des échecs avec récupération des produits initiaux à chaque fois. Cette étape a donc été limitante et nous n'avons donc pas abouti au composé souhaité **XIII**. Rappelons pour mémoire la dernière étape qui restait ensuite à réaliser :



1.3 - Conclusion

La synthèse de ces trois dérivés du fenpiclonil nous a montré la difficulté de mise en œuvre de ce type de réactions apparemment simples. La chaîne carbonée greffée sur le fenpiclonil influe grandement sur les conditions de synthèse. La réactivité obtenue sur le carbone en alpha de la fonction ester est donc liée à la nature des autres éléments de cette chaîne latérale.

Nos efforts concernant la synthèse d'un dérivé du pyrifénox n'ont malheureusement pas été couronnés de succès. C'est une autre preuve de la gageure que représente la synthèse des dérivés de molécules phytopharmaceutiques.

1.4 - Matériels et analyses structurales

1.4.1 - Matériels

• *Le montage utilisé lors de ces expériences* est composé d'un tricol adapté au volume réactionnel, d'une ampoule à pression égalisée pour l'addition des réactifs, d'un réfrigérant et d'un thermomètre. Dans les cas où le montage doit être confiné (conditions anhydres et / ou désoxygénées), celui-ci est isolé de l'air ambiant et mis sous une pression positive de diazote (N_2) ou muni d'une garde à chlorure de calcium ($CaCl_2$). Selon les besoins, le montage est placé sous agitateur magnétique chauffant ou dans un bain glace-eau (à 0 °C env.).

• *Les chromatographies sur couche mince (CCM)* sont réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice de 0,20 mm d'épaisseur traité avec un indicateur de fluorescence (silicate de zinc activé au manganèse) réagissant sous UV à 254 nm (Alugram Sil G/UV254, Macherey-Nagel). Le mode opératoire est identique à celui décrit page 89 (§ 2.1).

• *La chromatographie sur colonne (CC)* est une technique séparative pour la purification des mélanges post-réactionnels. L'objectif est de purifier le produit attendu de la synthèse avec le moins de perte possible. La CC est réalisée à l'aide d'un gel de silice amorphe synthétique (Matrex ; pores : 60 Å ; granulométrie : 20-45 µm) à raison de 20 g de silice par gramme de mélange à séparer. Cette phase fixe est parcourue par une phase mobile constituée d'un mélange de solvants mis au point grâce à la CCM. Les conditions de séparation sont mentionnées pour chaque produit.

• *La chromatographie en phase gazeuse (CG)* permet d'estimer la pureté des échantillons en solution dans le dichlorométhane. Une colonne capillaire apolaire de 30 m x 0,25 mm est chauffée de 80 à 280 ou 300 °C selon l'appareil utilisé (Varian CP-3800 à colonne DB1 et 3900GC à colonne CP Sil 5CB respectivement). Injecteur et détecteur FID sont chauffés à 300 °C.

• *La chromatographie liquide haute performance (CLHP)* permet d'estimer la pureté des échantillons, notamment ceux dont l'analyse en CG n'est pas possible (thermolabiles). Une phase fixe de silice greffée, en phase inverse, est parcourue par un mélange de solvants assurant la séparation des constituants du mélange (cf. page 89 & suivantes). La détection de ces

derniers se fait dans l'UV. Les conditions particulières d'analyse sont mentionnées pour chaque produit.

• *La spectroscopie infrarouge* permet la localisation des fonctions caractéristiques de la molécule étudiée. Elle est réalisée sur un spectromètre de type Perkin Elmer 1000 FT-IR (résolution 2 cm^{-1}). Le produit, en poudre fine, est analysé par réflexion diffuse dans le bromure de potassium (KBr). Les fréquences exploitables vont de 4000 à 600 cm^{-1}. Les bandes observées sont codifiées comme suit : tF (très forte), F (forte), m (moyenne), f (faible) & tf (très faible).

• *La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)* permet l'identification des atomes d'hydrogène (^{1}H-RMN à 300 MHz) & de carbone (^{13}C-RMN à 75 MHz) de la molécule étudiée. L'appareil utilisé est un spectromètre Bruker Advance DPX 300. Le solvant deutéré utilisé est mentionné pour chaque produit. Il contient une trace de tétraméthylsilane (TMS) pour référence (^{1}H-RMN, ∂ = 0 ppm). Le solvant deutéré sert de référence pour la RMN du ^{13}C (p. ex. CD_3COCD_3, ∂ = 29,84 et 206,26 ppm). Les constantes de couplage J sont exprimées en Hz. L'interprétation des spectres a été réalisée sur la base d'une prédiction par le logiciel ChemDraw Ultra v. 10.0, ainsi qu'à l'aide de deux techniques de RMN : DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfert) et HMQC (Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence for correlating directly bonded ^{1}H-^{13}C nuclei). La multiplicité des signaux observés est codifiée comme suit : s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), dd (doublet de doublet).

• *La spectrométrie de masse (MS)* permet de confirmer la masse moléculaire du produit obtenu ainsi que la nature de la molécule par les fragments libérés lors de l'analyse. L'analyse par CG-SM se fait sur un appareil Trace GC-Automass ThermoFinnigan (quadripôle) en impact électronique (IE) à une énergie de 70 eV. Les échantillons sont en solution dans du dichlorométhane (5 mg/ml env.). L'autre type d'analyse par spectrométrie de masse se fait sur un appareil LCQ (Thermo electron corp.). Le mode d'introduction est l'infusion à 15 µl/min, l'ionisation se fait à pression atmosphérique (electrospray, ESI, ou ionisation chimique, APCI). L'analyseur est de type trappe ionique. Les échantillons sont en solution dans du méthanol (5 mg/L env.). Les pics sont donnés en rapport masse/charge (m/z) et leur intensité en absorbance relative (comparé au pic de base).

1.4.2 - Caractérisation des composés obtenus

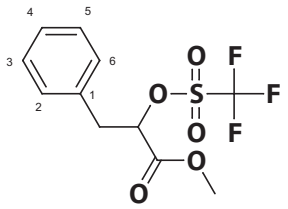
I : *N*-(1-methoxycarbonylpropyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole

• Pureté vérifiée par HPLC : colonne Supelco Discovery RP-amide C16, eau - ACN - TFA (50/50/0,1) à 0,8 $ml.min^{-1}$ détection UV à 218 nm

II : *N*-(1-methoxycarbonylpentyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole

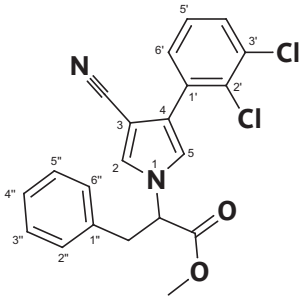
• Pureté vérifiée par HPLC : colonne Supelco Discovery RP-amide C16, eau - ACN - TFA (50/50/0,1) à 0,8 $ml.min^{-1}$ détection UV à 218 nm

III : 3-phényl-2-trifluorométhylsulfonyloxypropanoate de méthyle



• ^{1}H RMN ($CDCl_3$) : 3,17-3,25 (m, 1H, CH_2) ; 3,33-3,39 (m, 1H, CH_2) ; 3,84 (s, 3H, CH_3) ; 5,23-5,27 (m, 1H, CH) ; 7,20-7,38 (m, 5H, C2 à C6)

IV : *N*-(1-méthoxycarbonyl-2-phényléthyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole

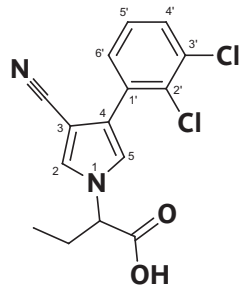


• ^{1}H RMN (CDCl3) : 3,24 (dd, 1H, CH_2, J = 13,98 & 9,74 Hz) ; 3,46 (m, 1H, CH_2, J = 13,98 & 5,3 Hz) ; 3,81 (s, 3H, CH_3) ; 4,78 (dd, 1H, CH, J = 10,04 & 5,1 Hz) ; 6,90 (d, 1H, H5, J = 2,32 Hz) ; 6,98-7,03 (m, 2H, H[x,y]) ; 7,20-7,29 (m, 4H, H2, H4" & H[x,y]) ; 7,22 (t, 1H, H5', J = 7,62 Hz) ; 7,33 (dd, 1H, H4' ou 6', J = 7,72 & 1,66 Hz) ; 7,43 (dd, 1H, H4' ou 6', J = 7,93 & 1,66 Hz)

• ^{13}C RMN ($CDCl_3$) : 39,91 (CH_2) ; 53,13 (OCH_3) ; 64,50 (CH) ; 94,46 (C3) ; 115,53 (CN) ; 121,87 (C5) ; 123,93 (C4) ; 127,25 (Cz) ; 127,69 (Cz) ; 128,03 (Cz) ; 128,67 (C[x,y]), 128,96 (C[x,y]) ; 129,56 (C4' ou 6') ; 129,70 (C4' ou 6') ; 131,45 (C2') ; 133,40 (C3') ; 133,83 (C1') ; 134,88 (C1") ; 169,23 (CO)

Note : [x,y] = 2"-6" ou 3"-5" ; z = 2, 5' ou 4".

V : *N*-(1-carboxypropyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole.



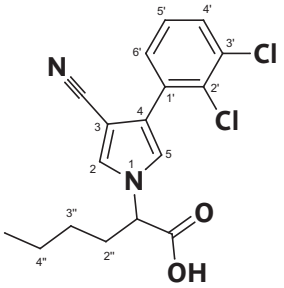
• ^{1}H RMN (CD_3COCD_3) : 0,88 (t, 3H, CH_3, J = 7,37 Hz) ; 1,95-2,32 (2m, 2H, CH_2) ; 4,74 (dd, 1H, CH, J = 9,94 & 5,30 Hz) ; 7,25 (d, 1H, H5, J = 2,22 Hz) ; 7,39 (t, 1H, H5', J = 7,72 Hz) ; 7,45 (dd, 1H, H4' ou 6', J = 7,77 & 1,92 Hz) ; 7,56 (dd, 1H, H4' ou 6', J = 7,67 & 1,92 Hz) ; 7,69 (d, 1H, H2, J = 2,22 Hz) ; 7,97 (s, 1H, OH)

• ^{13}C RMN (CD_3COCD_3) : 10,90 (CH_3) ; 27,40 (CH_2) ; 66,17 (CH) ; 93,65 (C3) ; 116,51 (CN) ; 123,31 (C4) ; 123,47 (C5) ; 128,60 (C5') ; 129,83 (C2) ; 130,31 (C4' ou 6') ; 130,98 (C4' ou 6') ; 131,84 (C2') ; 133,96 (C3') ; 135,5 (C1') ; 173,39 (CO)

• SM (ESI, cf. Tab. 2)

• Pureté vérifiée par HPLC : colonne Supelco Discovery RP-amide C16, eau - ACN - TFA (50/50/0,1) à 0,8 ml.min^{-1} détection UV à 218 nm

VI : *N*-(1-carboxypentyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole.



• ^{1}H RMN (CD_3COCD_3) : 0,89 (t, 3H, CH_3, J = 7,03 Hz) ; 1,14-1,52 (m complexe, 4H, 2H3'', 2H4'') ; 2,08-2,38 (m, 2H, 2H2''), 5,03 (dd, 1H, CH, J = 10,22 & 5,20 Hz) ; 7,30 (d, 1H, H5, J = 2,12 Hz) ; 7,42 (t, 1H, H5', J = 7,71 Hz) ; 7,47 (dd, 1H, H4' ou 6', J = 7,80 & 2,02 Hz) ; 7,59 (dd, 1H, H4' ou 6', J = 7,61 & 2,02 Hz) ; 7,75 (d, 1H, H2, J = 2,31 Hz) ; 5,62 (s large, OH)

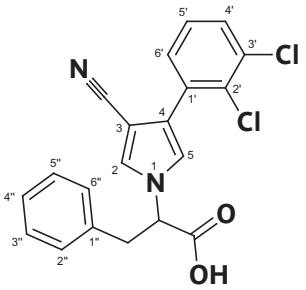
• ^{13}C RMN (CD_3COCD_3) : 14,1 (CH_3) ; 22,59 (C4'') ; 28,66 (C3'') ; 32,92 (C2'') ; 63,00 (CH) ; 94,3 (C3) ; 116,25 (CN) ; 123,4 (C5) ; 123,8 (C4) ; 128,7 (C5') ; 129,9 (C2) ; 130,53 (C4' ou 6') ; 131,06 (C4' ou 6') ; 131,93 (C2') ; 134 (C3') ; 135,03 (C1') ; 171,4 (CO)

• SM (ESI, cf. Tab. 2)

• IR (ν cm^{-1}, KBr) : 3400-2400 m large (OH) ; 2224 tF (CN) ; 1723 tF (CO)

• Pureté vérifiée par HPLC : colonne Supelco Discovery RP-amide C16, eau - ACN - TFA (50/50/0,1) à 0,8 $ml.min^{-1}$ détection UV à 218 nm

VII : N-(1-carboxy-2-phényléthyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole.



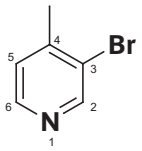
• ^{1}H RMN ($CDCl_3$) : 4,02 (dd, 1H, CH, J = 7,49 & 6,865 Hz) ; 4,24 (dd, 1H, CH_2, J = 13,98 & 6,66 Hz) ; 4,60 (dd, 1H, CH_2, J = 13,98 & 7,77 Hz) ; 6,77 (d, 1H, H5, J = 2,22 Hz) ; 7,09 (d, 1H, H2, J = 2,22 Hz) ; 7,21-7,27 (m, 2H, H[x,y]) ; 7,22 (t, 1H, H5', J = 7,87 Hz) ; 7,31 (dd, 1H, H4' ou 6', J = 7,87 & 1,72 Hz) ; 7,35-7,39 (m, 3H, H4'' + H[x,y]) ; 7,42 (dd, 1H, H4' ou 6', J = 7,87 & 1,72 Hz)

• ^{13}C RMN ($CDCl_3$) : 52,50 (CH_2) ; 53,01 (CH) ; 94,00 (C3) ; 115,66 (CN) ; 122,70 (C5) ; 123,9 (C4) ; 127,29 (C5') ; 127,87 (2C[x,y]) ; 128,70 (C2) ; 128,84 (C4'') ; 129,41 (2C[x,y]) ; 129,45 (C4' ou 6') ; 129,6 (C4' ou 6') ; 131,26 (C2') ; 133,34 (C3') ; 133,8 (C1') ; 134,19 (C1'') ; 175,7 (CO)

• SM (ESI & IE, cf. Tab. 2)

• Note : [x,y] = [2'',6''] ou [3'',5'']

VIII : 3-bromo-4-méthylpyridine

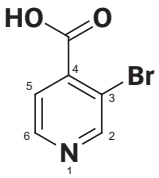


• ^{1}H RMN ($CDCl_3$) : 2,39 (s, 3H, CH_3) ; 7,16 (d, 1H, H5, J = 4,84 Hz) ; 8,37 (d, 1H, H6, J = 4,84 Hz) ; 8,64 (s, 1H, H2)

• ^{13}C RMN ($CDCl_3$) : 22,19 (CH_3) ; 123,55 (C3) ; 125,82 (C5) ; 146,83 (C4) ; 148,02 (C2) ; 151,41 (C6)

• SM (IE, cf. Tab. 2)

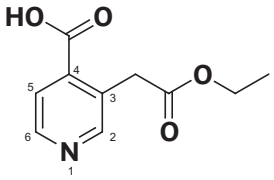
IX : 3-bromo-4-carboxypyridine



• ^{1}H RMN (CD_3SOCD_3) : 3,89 (s large, OH) ; 7,70 (d, 1H, H5, J = 4,84 Hz) ; 8,67 (d, 1H, H6, J = 4,84 Hz) ; 8,88 (s, 1H, H2)

• ^{13}C RMN (CD_3SOCD_3) : 117,18 (C3) ; 123,71 (C5) ; 141,06 (C4) ; 148,88 & 152,53 (2C, C2 & C6) ; 165,97 (CO)

X : acide 3-(2-éthoxy-2-oxoéthyl) isonicotinique

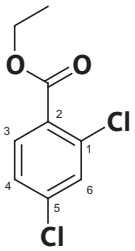


• ^{1}H RMN (CD_3COCD_3) : 1,20 (t, 3H, CH_3, J = 7,11 Hz) ; 3,02 (s large, OH) ; 4,08 (s, 2H, CH_2) ; 4,10 (q, 2H, OCH_2, J = 7,06 Hz) ; 7,87 (d, 1H, H5, J = 4,54 Hz) ; 8,55-8,85 (m, 2H, H2 & H6)

• ^{13}C RMN (CD_3SOCD_3) : 14,40 (CH_3) ; 36,97 (CH_2) ; 60,58 (OCH_2) ; 123,71 (C5) ; 130,2 (C3) ; 138,2 (C4) ; 149,7 (C6) ; 153,3 (C2) ; 167,4 (COOH) ; 170,9 (COOEt)

• SM (APCI, cf. Tab. 2)

XI : 2,4-dichlorobenzoate d'éthyle



• ^{1}H RMN ($CDCl_3$) : 1,40 (t, 3H, CH_3, J = 7,18 Hz) ; 4,40 (q, 2H, CH_2, J = 7,12 Hz) ; 7,30 (dd, 1H, H4, J = 8,43 & 2,03) ; 7,48 (d, 1H, H6, J = 2,03 Hz) ; 7,80 (d, 1H, H3, J = 8,42 Hz)

• ^{13}C RMN ($CDCl_3$) : 14,19 (CH_3) ; 61,76 (CH_2) ; 126,97 (C4) ; 128,64 (C5) ; 130,97 (C6) ; 132,42 (C3) ; 134,83 (C2) ; 138,14 (C1) ; 164,85 (CO)

Nom	P. M. (=M)	Technique	m/z (AR%)	M ± ∂	Nature Probable
V	322 (^{35}Cl)	ESI, neg.	321 (100)	-1	[M(2^{35}Cl)-H]$^-$
			325 (14)	+3	[M(2^{37}Cl)-H]$^-$
			323 (58)	+1	[M(^{35}Cl^{37}Cl)-H]$^-$
			277 (4)	-45	[M(2^{35}Cl)-H-CO_2]$^-$
			201 (4)	-121	ND
VI	350 (^{35}Cl)	ESI, neg	349 (100)	-1	[M(2^{35}Cl)-H]$^-$
			353 (12)	+3	[M(2^{37}Cl)-H]$^-$
			351 (78)	+1	[M(^{35}Cl^{37}Cl)-H]$^-$
			201 (4)	-149	ND
VII	384 (^{35}Cl)	ESI, neg.	383 (14)	-1	[M(2^{35}Cl)-H]$^-$
			387 (5)	+3	[M(2^{37}Cl)-H]$^-$
			385 (10)	+1	[M(^{35}Cl^{37}Cl)-H]$^-$
			239 (22)	-145	[F(2^{37}Cl)-H]$^-$
			237 (96	-147	[F(^{35}Cl^{37}Cl)-H]$^-$
			235 (100)	-149	[F(2^{35}Cl)-H]$^-$
VII		IE	384 (0)	0	non vu
			240 (10)	-144	[F$^{+\cdot}$(2^{37}Cl)]
			238 (62)	-146	[F$^{+\cdot}$(^{35}Cl^{37}Cl)]
			236 (100)	-148	[F$^{+\cdot}$(2^{35}Cl)]
			203 (21)	-181	[F$^{+\cdot}$(^{37}Cl)-Cl]
			201 (64)	-183	[F$^{+\cdot}$(^{35}Cl)-Cl]
			176 (15)	-208	ND
			174 (46)	-210	ND
VIII	171 (^{79}Br)	IE	171 (61)	0	[M$^{+\cdot}$(^{79}Br)]
			173 (59)	+2	[M$^{+\cdot}$(^{81}Br)]
			92 (100)	-79	[M$^{+\cdot}$-Br]
			91 (34)	-80	[M$^{+\cdot}$-HBr]
			65 (68)	-106	ND
X	209	APCI, pos.	210 (100)	+1	[M+H]$^+$
			182 (70)	-27	[M+H-CO]$^+$
			164 (26)	-45	[M+H-CO-H_2O]$^+$
		CID (210, 32kV)	210 (38)	+1	[M+H]$^+$
			182 (100)	-27	[M+H-CO]$^+$
			164 (41)	-45	[M+H-CO-H_2O]$^+$
		CID (182, 30kV)	182 (64)	-27	[M+H-CO]$^+$
			164 (100)	-45	[M+H-CO-H_2O]$^+$
		APCI, neg.	208 (100)	-1	[M-H]$^-$
			212 (33)	+3	ND
			162 (16)	-47	[M-H-CO-H_2O]$^-$

Tableau 2 : Données issues des expériences de spectrométrie de masse. Pour chaque composé, le poids moléculaire théorique (P.M.) est donné (ceci pour un seul des isotopes en présence). Les techniques employées sont l'impact électronique (IE) en GC-MS, l'ionisation par électrospray (ESI) et l'ionisation chimique (APCI) en LC-MS. Chaque pic observé correspond à la masse (m/z en ppm) d'un fragment de la molécule et présente une absorbance relative (AR) comprise entre 0 et 100. L'écart entre la masse théorique et celle du fragment est reporté (M±∂, en ppm). Le premier pic (ligne grisée) confirme la masse du composé. Les autres pics sont dus à des variations isotopiques ou issus d'une fragmentation. La nature probable du fragment est mentionnée (F : fenpiclonil ; M : composé analysé ; ND : non déterminée).

2 - L'activité biologique de molécules d'intérêt

2.1 - Tests de phytotoxicité

L'inocuité pour la plante de xénobiontes venant d'être synthétisés est un préalable à toute étude biologique.

2.1.1 - Effet de deux dérivés du fenpiclonil (F 30 et F 31) sur la d.d.p. transmembranaire de cellules de ricin

Avant d'étudier les propriétés de mobilité des dérivés du fenpiclonil à l'aide de plantules de ricin, il convient de s'assurer qu'ils ne sont pas phytotoxiques, en particulier qu'ils ne dépolarisent pas la différence de potentiel transmembranaire des tissus cotylédonaires. Les valeurs du gradient électrochimique de protons entretenu par l'ATPase-H^+ de la membrane plasmique (MP) constituent un bon indicateur de l'activité de cette pompe et de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la MP, mais aussi des membranes mitochondriales et chloroplastiques (synthèse d'ATP). Rappelons que la dissipation de la force proton motrice (sans cesse restaurée par l'ATPase-H^+ de la MP) permet l'influx de nutriments dans la cellule via des translocations secondaires (symports H^+-saccharose et H^+-acides aminés par exemple) et que l'une de ses deux composantes (ΔpH) peut entretenir un influx de molécules acides à travers la bicouche lipidique (voir Historique, § 4.2.4). À cet égard, les nombreux enregistrements électrophysiologiques que nous avons effectués montrent que le dérivé F 31 (Fig. 46), utilisé à la concentration de 250 µM, demeure sans effet sur la d.d.p transmembranaire (Fig. 47 A et B). Durant la phase de récupération des tissus cotylédonaires soumis à un nouveau milieu, c'est-à-dire durant les 120 - 150 premières minutes d'incubation, la d.d.p. transmembranaire des cellules sous-épidermiques passe d'environ -100 mV à près de -125 mV, ceci aussi bien pour les cotylédons témoins que pour les cotylédons incubant dans la solution avec F 31

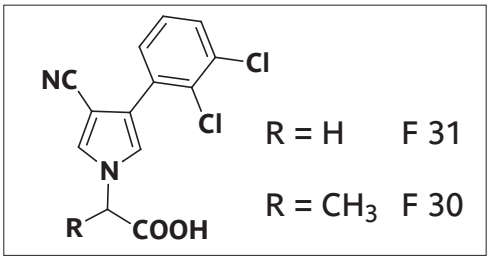


Figure 46: structure des composés étudiés quant à leur phytotoxicité sur ricin.

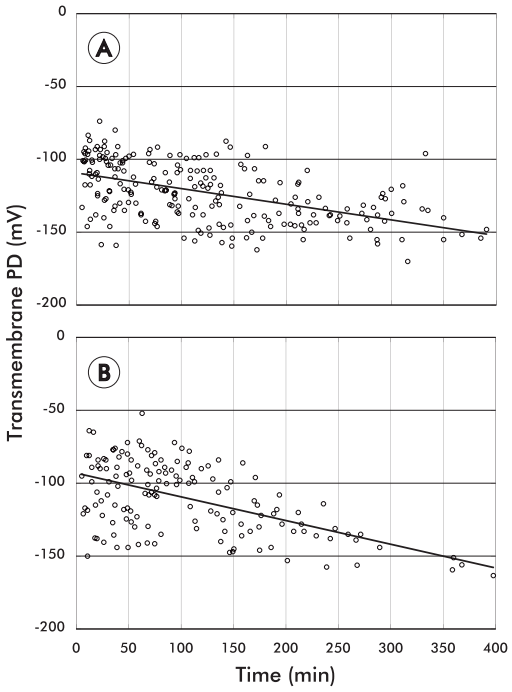


Figure 47: Effet du composé F 31 sur la d.d.p. transmembranaire de cellules subépidermiques de crosse de l'hypocotyle de ricin. A : lot témoin, les tissus sont incubés dans le milieu standard (pH 5,0) ; B : lot traité, les tissus sont incubés dans la même solution avec le composé F 31 à la concentration de 250 µM. La régression linéaire a été calculée avec le logiciel Kaleidagraph v. 3.5.

250 µM. Par la suite, avec le phénomène d'ageing, l'hyperpolarisation de la d.d.p. transmembranaire se poursuit, et cette dernière atteint -150 mV environ dans les deux lots après six heures d'incubation. Des résultats analogues ont été obtenus avec le dérivé F 30 (Fig. 46) à la concentration de 250 µM. Toutefois, la d.d.p. transmembranaire reste stable durant l'ageing, se maintenant à -125 mV environ. Cet ensemble de données suggère que les conditions sont requises pour estimer valablement les propriétés de mobilité phloémienne de ces deux dérivés du fenpiclonil à l'aide du système ricin (1). Compte tenu de la fragilité des tissus cotylédonaires (Jousse, 2002), F 30 sera en général utilisé à la concentration de 100 µM pour les tests de systémie.

2.1.2 - Effet du dérivé F30 appliqué sur les feuilles sur la croissance et le développement de boutures de vigne

En fait, c'est un mélange de F 30 à la concentration de 5 mM et d'acide 5-chlorosalicylique à la concentration de 1 mM qui a été appliqué sur l'ensemble des feuilles adultes de boutures de vigne à l'aide d'un pinceau. Après trois applications à quinze jours d'intervalle, le traitement n'entraîne aucun effet perceptible sur la croissance des tiges, ceci sur une période de 60 jours (Fig. 48). De même le développement et l'aspect des feuilles sont les mêmes dans les deux cas (traités ou témoins; Fig. 49). Toutefois, on peut noter une nécrose très localisée des pointes foliaires probablement due à un entraînement des produits appliqués vers les hydathodes suite aux mouvements d'eau dans le compartiment apoplastique (Fig. 50).

Figure 48: aspect d'une bouture issue de culture hydroponique, 60 jours après le premier traitement phytosanitaire. La bouture a été élaguée à 1m20 env. pour faciliter les traitements et le suivi. Les feuilles matures les plus anciennes sont traitées trois fois (cf. matériel & méthodes, § 1.3.4). L'allure générale de la plante est représentative de l'ensemble des boutures traitées de ce lot. Les boutures témoins ont le même aspect.

Figure 49: feuilles de bouture de vigne en culture hydroponique traitée par de l'Agral 90 uniquement.

(1) Ces résultats sont publiés dans Chollet *et al.*, 2004 (pages 7 & 8 et Fig. 6) ainsi que dans Chollet *et al.*, 2005 (page 379).

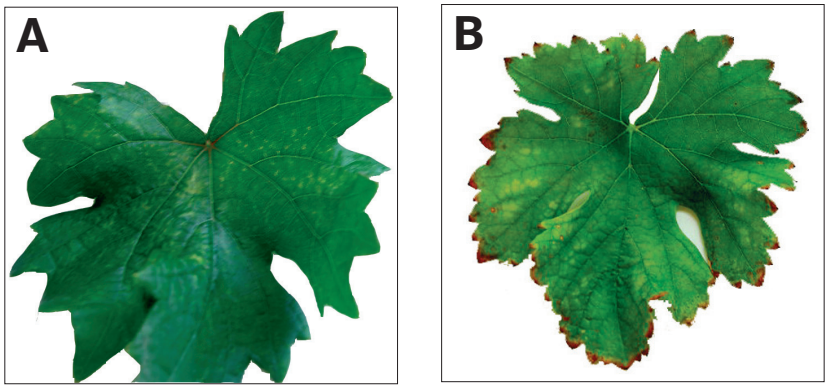


Figure 50A et B : Feuilles traitées par le mélange phytosanitaire (cf. matériel & méthodes, § 1.3.4) et récoltées 60 jours après le premier traitement. On peut noter au niveau des feuilles les plus âgées (B) la présence de nécroses aux pointes du limbe où se situent les hydathodes (zones de forte transpiration).

2.2 - Tests d'activité antifongique sur les champignons pionniers de l'esca

Chaque expérience est réalisée habituellement au sein d'une boîte de culture à 6 puits, plus rarement dans une boite de Pétri de 90 mm de diamètre. Dans le premier cas, trois puits sont soumis aux mêmes conditions expérimentales. Le diamètre fongique moyen d'une colonie dans un puits est obtenu en réalisant la moyenne sur deux notations de diamètre réalisées à 90° l'une de l'autre. Chaque point de graphe correspond à la moyenne des trois diamètres moyens obtenus sur les trois puits aux mêmes conditions expérimentales.

2.2.1 - La versatilité des colonies mycéliennes

2.2.1.1 - La croissance des colonies témoin (Fig. 51)

Nous avons comparé la croissance des colonies de différentes espèces sur un milieu témoin à 25 °C. Hormis *E. lata*, les souches testées ont été cultivées dans deux conditions de température : à 25 °C dans une enceinte climatisée et à la température ambiante de la salle (22-26 °C). On constate que la croissance des souches fongiques est sensiblement la même dans ces deux conditions. La croissance d'*Eutypa lata* est très nettement la plus rapide, le mycélium atteignant 34 mm au cinquième jour. L'allure des courbes montre une phase linéaire de croissance (y = 7,11x-1,08) du troisième au dixième jour (*E. lata*) et à partir du troisième jour (*Phaeoacremonium aleophilum*, souche LR 96, y = 0,32x+16,15), du cinquième jour (*Phaeomoniella chlamydospora*, souche LR 43, y = 1,42x-5,80 ; souche PP1S936, y = 1,56x-4,42) ou du dixième jour (*Pm. aleophilum*, souche PP2F55, y = 2,38x+0,66). Ces résultats définissent les caractéristiques de la croissance des trois espèces et mettent en exergue les performances très différentes des souches testées de *Pm aleophilum*.

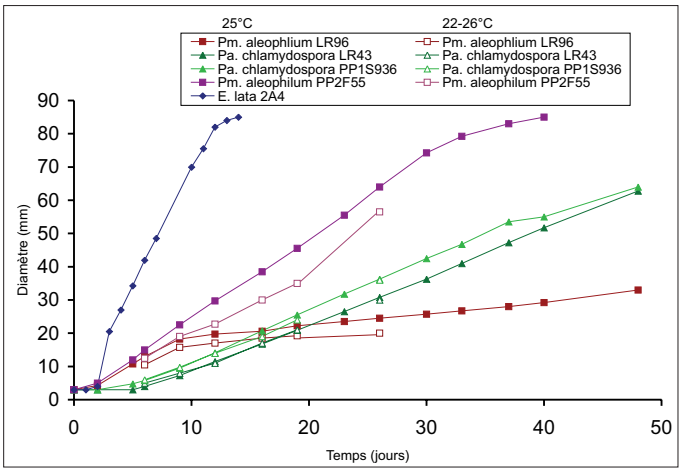


Figure 51 : Croissance mycélienne des espèces fongiques pionnières de l'esca. La culture se fait en boite de Pétri de 90 mm de diamètre sur milieu malt-agar non tamponné.

2.2.1.2 - L'impact du milieu de culture (Fig. 52)

La croissance mycélienne des différentes espèces a été étudiée dans deux milieux malt-agar (MA) différents. Le milieu MA habituellement utilisé au laboratoire contient de l'agar de la marque Acros. En ce qui concerne *Pa. chlamydospora*, les spores de la souche PP1S936 ne se développent pas dans ce milieu, contrairement à la souche *Pm. aleophilum* PP2F55. En revanche, les spores des deux souches se développent dans un milieu MAu contenant un agar de la marque Univar.

Des implants mycéliens appartenant aux trois espèces sont déposés sur les deux types de milieu MA. Les croissances diamétrales sont comparées pour chaque souche fongique. Pour *E. lata*, la variation de croissance est faible, entre les deux conditions de culture (Fig. 52A). Les deux courbes plafonnent peu avant le quinzième jour (avec quelques mm d'écart). Pour *Pa. chlamydospora,* on observe des différences de croissance pour la souche PP1S936 uniquement. L'écart se creuse dans les vingt cinq premiers jours puis se stabilise jusqu'au quarante-cinquième jour (Fig. 52B). Pour la souche LR-43, les deux courbes sont quasiment superposées (Fig. 52C). La croissance de PP1S936 cultivé sur agar Univar est

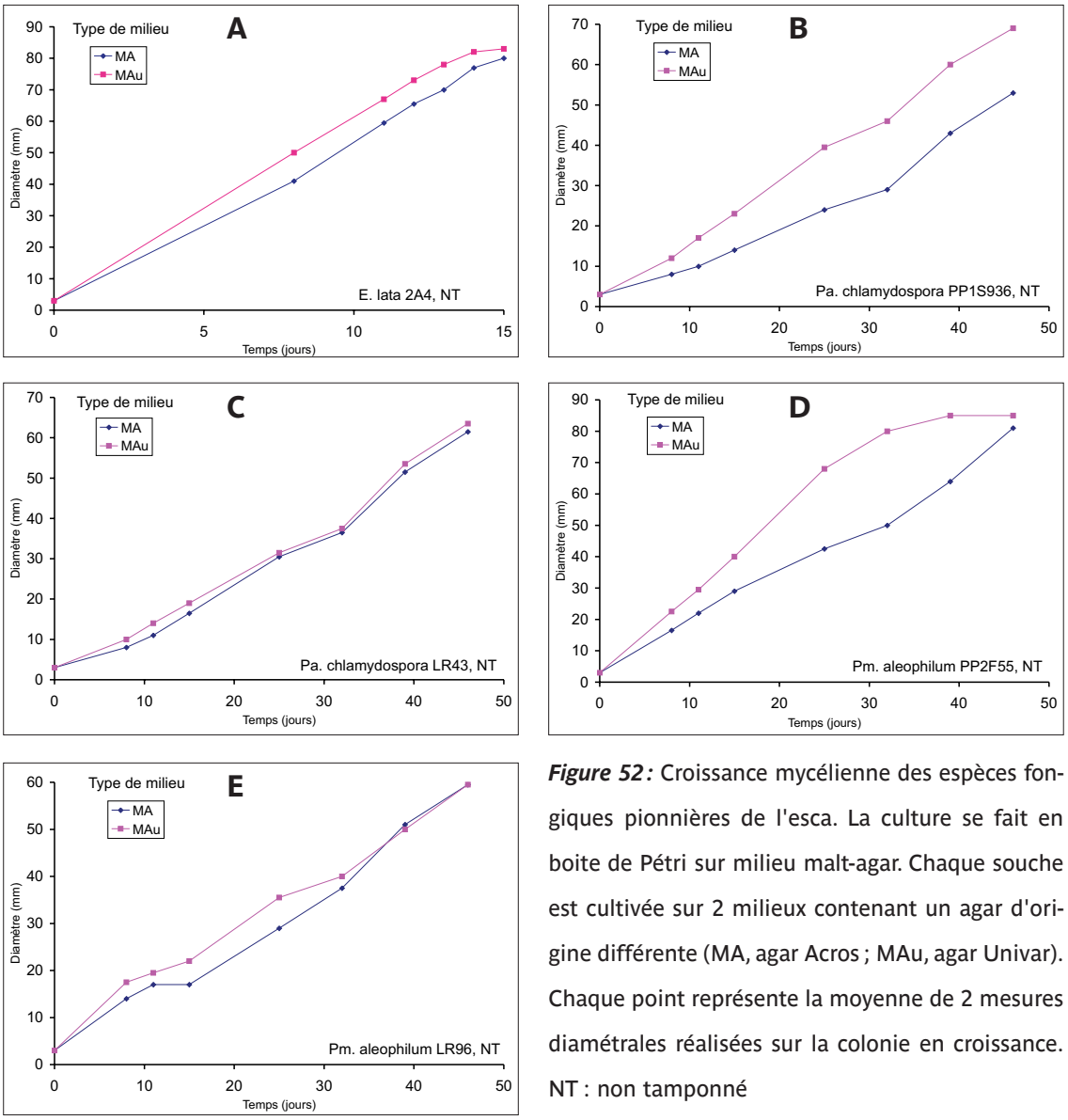


Figure 52 : Croissance mycélienne des espèces fongiques pionnières de l'esca. La culture se fait en boite de Pétri sur milieu malt-agar. Chaque souche est cultivée sur 2 milieux contenant un agar d'origine différente (MA, agar Acros ; MAu, agar Univar). Chaque point représente la moyenne de 2 mesures diamétrales réalisées sur la colonie en croissance. NT : non tamponné

plus importante que celles de la souche LR-43 (quel que soit le milieu) alors que la croissance de PP1S936 sur agar Acros est plus faible. De même, avec *Pm. aleophilum*, la souche PP2F55 (Fig. 52D) est nettement plus sensible au milieu que la souche LR-96 (Fig. 52E). Avec PP2F55, nous avons deux profils bien distincts. Sur agar Univar la croissance plafonne plus rapidement alors qu'avec l'agar Acros, la courbe montre une phase d'inflexion vers le trentième jour.

2.2.1.3 - L'influence du pH

Pour deux dérivés du fenpiclonil, nous avons observé l'impact d'une faible variation de pH sur l'effet antifongique des molécules (cf. § 2.2.3).

2.2.2 - Étude de l'efficacité de molécules commerciales

Dans le but d'évaluer les propriétés antifongiques de deux groupes de produits commerciaux sur les champignons pionniers de l'esca (*Pa. chlamydospora* et *Pm. aleophilum*) nous avons sélectionné différentes molécules (Fig. 37 p. 77). Deux phénylpyrroles, fenpiclonil et fludioxonil, agissent sur une protéine kinase impliquée dans l'homéostasie. Des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols ont été choisis dans la classe I (penconazole, propiconazole et pyrifénox) ou la classe II (fenpropidine et fenpropimorphe).

Ces molécules sont utilisées à cinq concentrations différentes (0,1 µM ; 1 µM ; 10 µM ; 100 µM ; 1000 µM = 1 mM). Leur action sur la croissance mycélienne est comparée à un témoin (0 µM). Souvent, la molécule (surtout les phénylpyrroles) précipite perceptiblement dans le milieu de culture à la concentration de 1 mM. Cela peut biaiser le résultat apporté à cette concentration. Les premières expériences sont réalisées à température non contrôlée sur des souches fournies par P. Larignon . Les suivantes, principalement réalisées sur les souches de J.-P. Péros, ont été installées dans une étuve thermostatée (25 °C).

2.2.2.1 - Fenpiclonil

Notre travail complète celui de C. Delétage-Grandon *et al.* (2001) concernant l'activité de cette molécule sur *Eutypa lata* (souche 2A4).

• Deux expériences ont été réalisées sur *Pa. chlamydospora* (souche PP1S936) (Fig. 53). Cette molécule inhibe totalement la croissance mycélienne pour des concentrations de 1 mM et 100 µM, et de 10 µM dans l'une des deux expériences (Fig. 53B). Les autres implants mycéliens, soumis à des concentrations en fenpiclonil inférieures, montrent un ralentissement de leur croissance. Celui-ci est bien net pour les implants au contact de concentrations en fenpiclonil de 1 µM. Comparé au témoin, l'écart de croissance diamétrale au vingt-huitième jour est de 43 % et 54 % avec un retard de dix jours au démarrage à 1 µM. Le ralentissement devient plus marginal lorsque cette concentration est de 0,1 µM (avec des écarts voisins de 25 % par rapport au témoin). Cet effet fongistatique, dépendant de la concentration en fongicide apportée, perdure au moins jusqu'à cinquante jours.

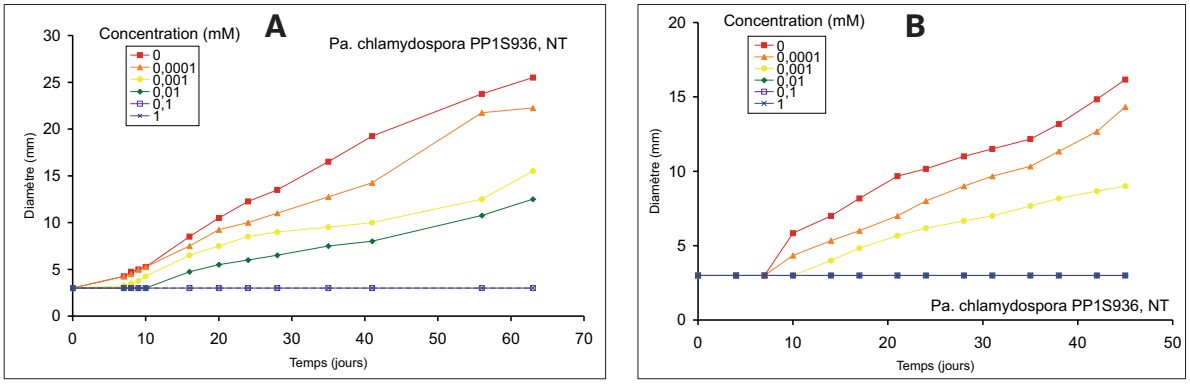


Figure 53 : Action antifongique du fenpiclonil sur *Pa. chlamydospora*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

• Deux expériences ont été réalisées sur *Pm. aleophilum* (Fig. 54) (souche PP2F55). Dans aucun cas, on observe une inhibition totale de la croissance de ce pathogène. On note seulement un ralentissement de la croissance qui s'amenuise aux plus faibles concentrations. Au vingtième jour, les plus fortes concentrations (1 mM et 100 µM) apportent une inhibition de croissance diamétrale avec un retard au démarrage de la croissance d'environ 7 jours allant de 60 à 80 % par rapport au témoin. Au-delà d'un mois, l'effet fongistatique tend à s'estomper, le diamètre de la colonie mycélienne témoin plafonne à 25 mm au-delà du trentième jour de culture.

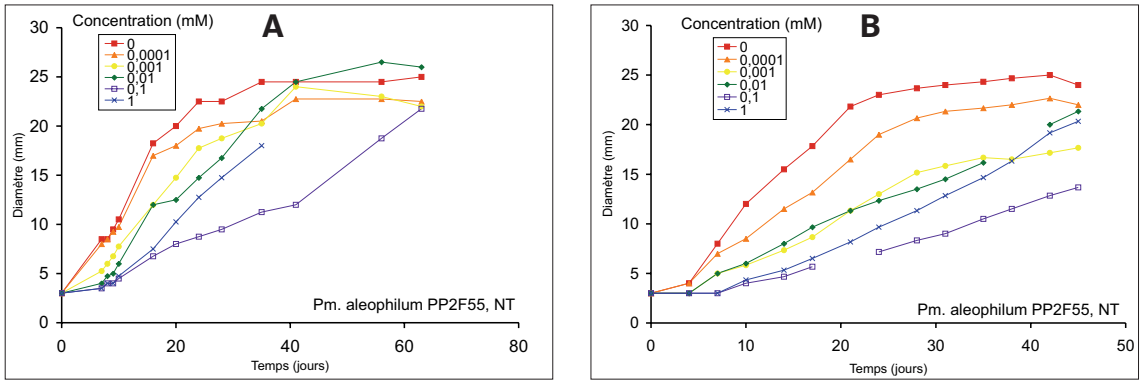


Figure 54 : Action antifongique du fenpiclonil sur *Pm. aleophilum*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

2.2.2.2 - Fludioxonil

• Deux expériences sont réalisées sur *Pa. chlamydospora* (Fig. 55)(souche PP1S936). Cette molécule provoque un ralentissement de croissance qui s'exerce dès 0,1 µM (40 et 45% d'écart avec le témoin pour la croissance diamétrale au vingt-huitième jour). On observe en outre un retard de croissance (5 à 10 jours selon les cas) de l'ensemble des implants soumis au fongicide, par rapport aux témoins. À 100 µM, on peut noter une inhibition totale ou quasi totale de la croissance.

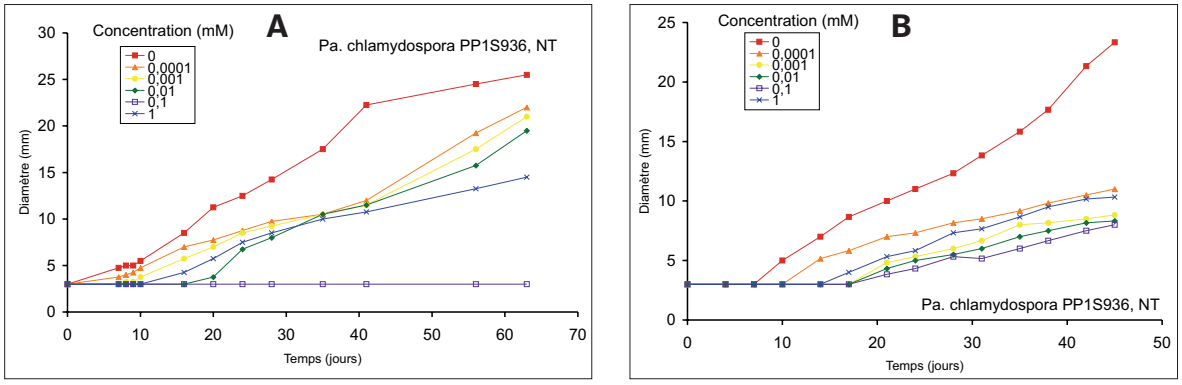


Figure 55 : Action antifongique du fludioxonil sur *Pa. chlamydospora*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

• Deux expériences ont été réalisées sur *Pm. aleophilum* (Fig. 56)(souche PP2F55). On n'observe qu'un très léger retard de croissance des implants soumis au fongicide comparé aux témoins, ceci indépendamment de la concentration en fongicide apportée. Les courbes de croissance ont des physionomies similaires, la courbe témoin stagne entre 20 et 25 mm après le trentième jour de culture. Contrairement aux observations faites sur *Pa. chlamydospora*, la molécule n'exerce ici qu'un effet marginal. Au vingtième jour de culture, l'inhibition de croissance diamétrale avoisine les 40 % dans les meilleurs cas.

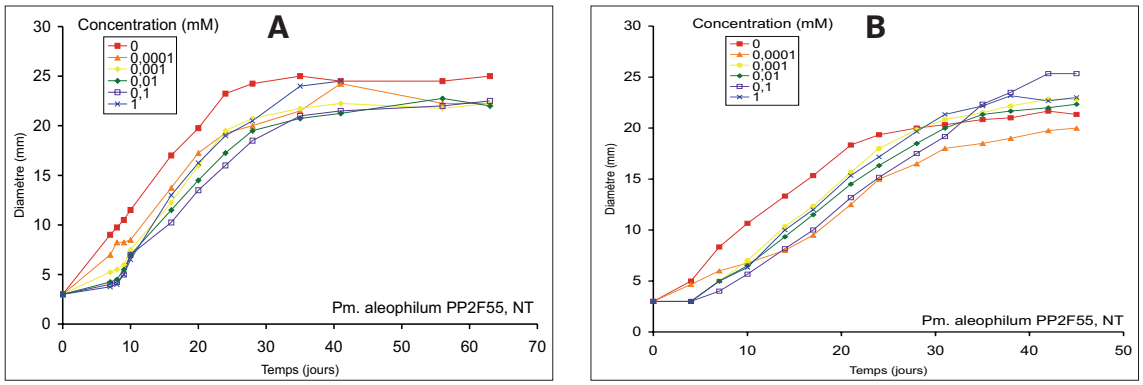


Figure 56 : Action antifongique du fludioxonil sur *Pm. aleophilum*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

2.2.2.3 - Fenpropidine

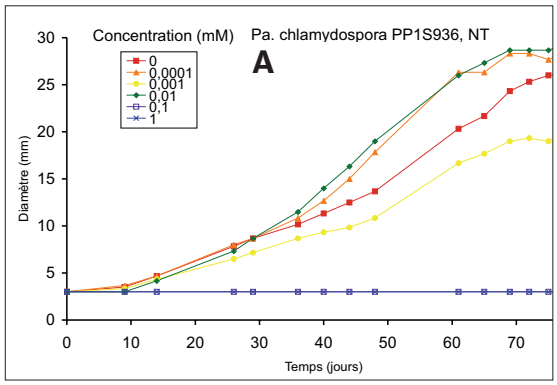
• Action sur *Pa. chlamydospora* (Fig. 57)

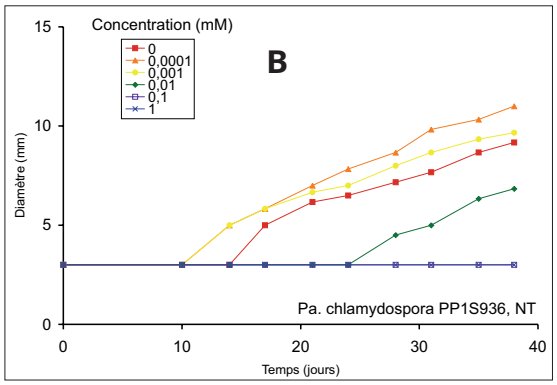
Deux expériences ont été réalisées sur la souche PP1S936 (Fig. 57A et B). Ce composé inhibe totalement la croissance mycélienne à 1 mM et 100 µM mais l'effet fongicide *stricto sensu* n'a pas été vérifié. À noter une moindre croissance fongique chez le témoin par comparaison aux mycélia traités par de faibles doses de fongicide (0,1 µM et 1 µM). Au trentième jour, la croissance diamétrale des témoins est inférieure à 10 mm, ce qui est bien en-dessous des autres témoins. Une stabilisation de la croissance est observée bien après soixante jours (soit 26 mm environ pour les colonies témoins). Un léger effet retardant la

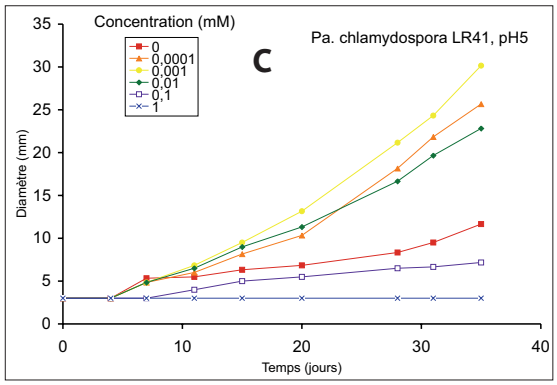
croissance mycélienne est notable à la concentration de 10 µM. Il est précédé par un démarrage plus tardif de la croissance mycélienne dans la deuxième expérience (dix jours après le lot témoin).

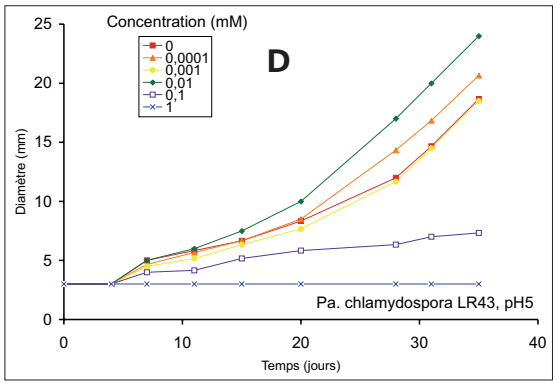
Sur la souche LR-41 (Fig. 57C), on observe aussi un effet fongicide vérifié de la fenpropidine à la concentration de 1 mM. À la concentration de 100 µM, le mycélium est aussi inhibé dans sa croissance radiale. La présence de la courbe témoin au voisinage de cette dernière, et bien au-dessous des courbes de croissance des mycélia soumis aux plus faibles concentrations en fongicide, est encore intrigante. Un éventuel effet sous forme vapeur du fongicide sur les témoins peut expliquer ce résultat.

Sur la souche LR-43 (Fig. 57D), cette molécule inhibe totalement la croissance fongique à la concentration de 1 mM. L'effet fongicide a été vérifié : l'implant est nécrosé, il ne se développe plus lors d'un repiquage sur milieu malt-agar témoin. Un retard de croissance est observé pour les mycélia confrontés à une concentration de 100 µM. L'écart se creuse à mesure que la courbe témoin s'élève. Les autres courbes ont un profil d'évolution similaire à la courbe témoin.









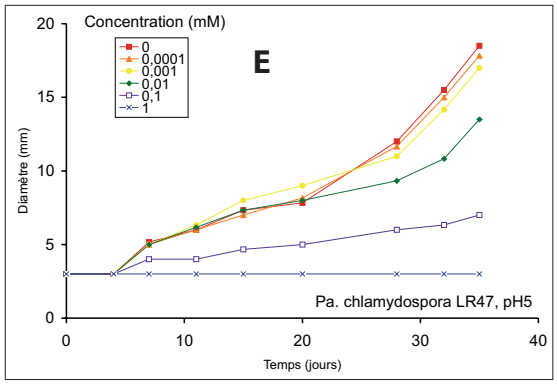


Figure 57 : Action antifongique de la fenpropidine sur différentes souches de *Pa. chlamydospora*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

Sur la souche LR-47 (Fig. 57E), l'effet fongicide est aussi obtenu à la concentration de 1 mM. Un effet toxique du produit est perceptible sur la croissance à la concentration de 100 µM. Toutes les autres courbes de croissance suivent la tendance du témoin.

• Action sur *Pm. aleophilum* (Fig. 58)

Deux expériences réalisées sur la souche PP2F55 (Fig. 58A et B) montrent un effet similaire de la molécule. En présence du fongicide à 0,1 et 1 µM, les courbes de croissance suivent la tendance de la courbe témoin. Au vingtième jour la croissance des témoins se situe vers 20 mm. Seuls les implants soumis à 0,1 & 1 mM tardent très nettement à croître (inhibition totale de croissance avant le dixième ou le vingtième jour). La courbe témoin, ainsi que celles des plus faibles concentrations, stagne après trente-cinq jours de culture (entre 20 & 25 mm).

Sur la souche LR-96 (Fig. 58C) nous observons une absence de croissance mycélienne à des concentrations de 1 mM et 100 µM. Les implants restent néanmoins vivants et peuvent se développer, à l'issue du traitement, sur un milieu malt-agar témoin. Un retard de croissance important est visible sur les colonies exposées à une concentration de 10 µM. Les deux autres courbes (1 et 0,1 µM) suivent la tendance du témoin.

Sur la souche LR-112 (Fig. 58D), le produit est un fongicide avéré à la concentration de 1 mM. Il inhibe aussi totalement la croissance fongique à la concentration de 100 µM mais l'implant demeure vivant. Une forte inhibition de croissance est observée pour les

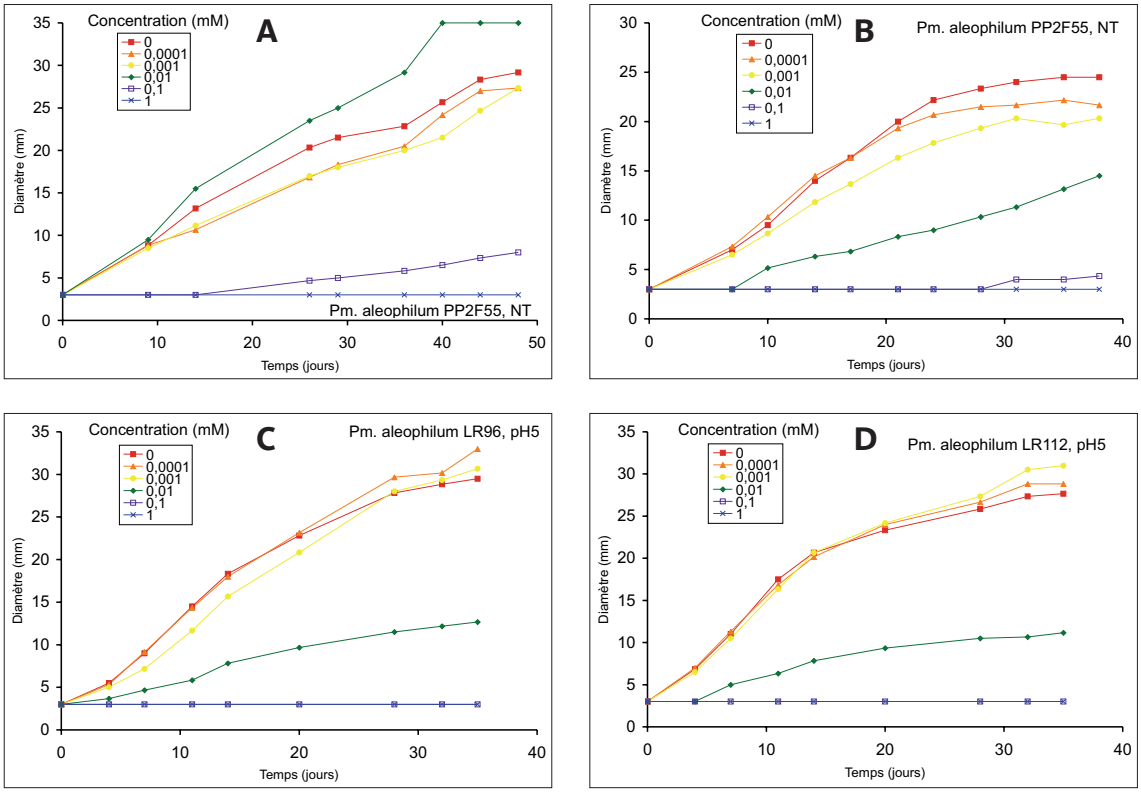


Figure 58 : Action antifongique de la fenpropidine sur différentes souches de *Pm. aleophilum*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

colonies développées sous une concentration de 10 µM. Les autres courbes (1 et 0,1 µM) montrent un comportement proche de celle témoin.

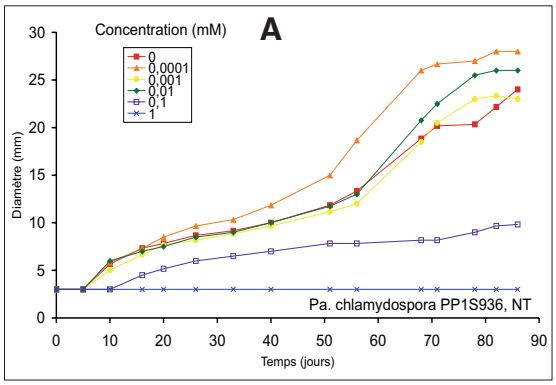
2.2.2.4 - Fenpropimorphe

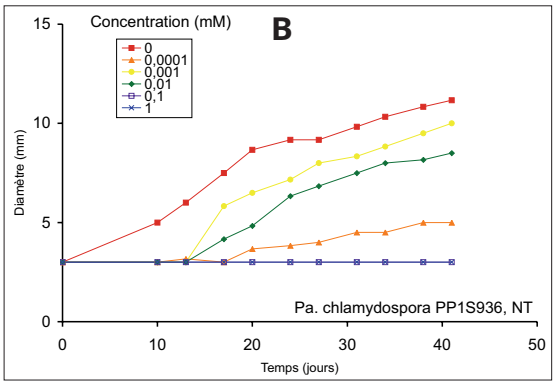
• Action sur *Pa. chlamydospora* (Fig. 59)

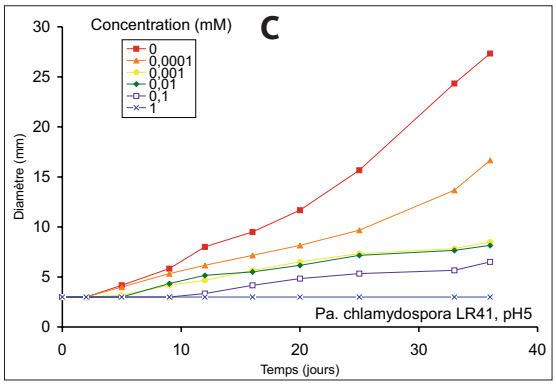
Sur la souche PP1S936, on observe un blocage de la croissance mycélienne à la concentration de 1 mM et par ailleurs à 100 µM pour une des deux expériences (Fig. 59A et B). Pour les plus faibles concentrations, les courbes de croissance sont regroupées autour de la courbe témoin (Fig. 59A) ou peuvent révéler un léger effet fongitoxique (Fig. 59B).

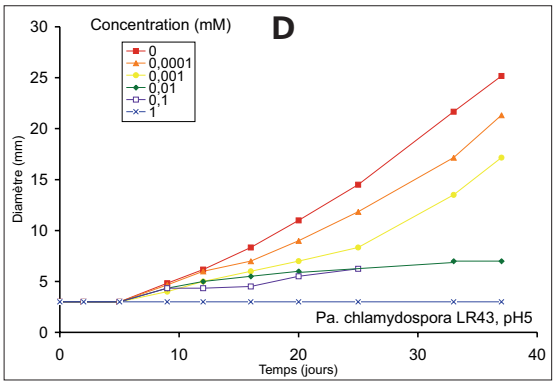
Sur la souche LR-41 (Fig. 59C), un effet fongicide *stricto sensu* a été observé pour une concentration en fongicide de 1 mM (pas de reprise de croissance sur un milieu témoin). Des retards de croissance sont observés aux plus faibles concentrations. Ces effets sont plus nets que sur la souche précédente, même à 0,1 µM.

Sur la souche LR-43 (Fig. 59D), la croissance mycélienne est totalement inhibée à la concentration de 1 mM. L'action fongicide a été vérifiée par une seconde culture des









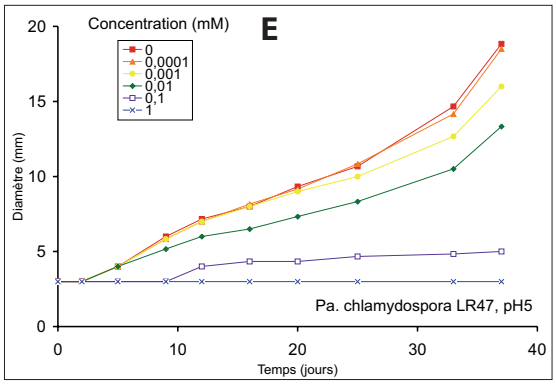


Figure 59 : Action antifongique du fenpropimorphe sur différentes souches de *Pa. chlamydospora*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

implants mycéliens sur un milieu témoin. L'inhibition de croissance est nette chez les colonies fongiques poussant aux concentrations de 100 µM et 10 µM. Cet effet s'estompe graduellement avec la diminution de la concentration en fongicide apporté au milieu.

Sur la souche LR-47 (Fig. 59E), le même effet fongicide, vérifié par repiquage de l'implant sur milieu témoin, s'observe à 1 mM. Un net effet fongistatique est noté à la concentration de 100 µM. Les autres courbes suivent la tendance de la courbe témoin, celle à 10 µM mise à part.

• Action sur *Pm. aleophilum* (Fig. 60)

Sur la souche PP2F55 (Fig. 60A et B), une inhibition totale ou quasi totale de la croissance est observée pour des concentrations de 1 mM et 100 µM en fenpropimorphe au sein du milieu de culture. Un fort effet fongistatique est observé pour une concentration de 10 µM. Les autres concentrations n'offrent pas d'effet sur la croissance mycélienne (Fig. 60B). Il faut cependant noter la position de la courbe témoin de la première expérience (Fig. 60A). Elle se situe sous les deux courbes reliées aux croissances fongiques pour les concentrations les plus faibles. On peut encore invoquer le problème d'une contamination entre les puits de la même boite en dépit des précautions prises.

Sur la souche LR-96 (Fig. 60C), l'effet fongicide est vérifié pour les colonies croissant dans le milieu à la concentration de 1 mM. L'inhibition de croissance est aussi totale au contact du milieu contenant 100 µM de fongicide. Elle est très importante au contact de

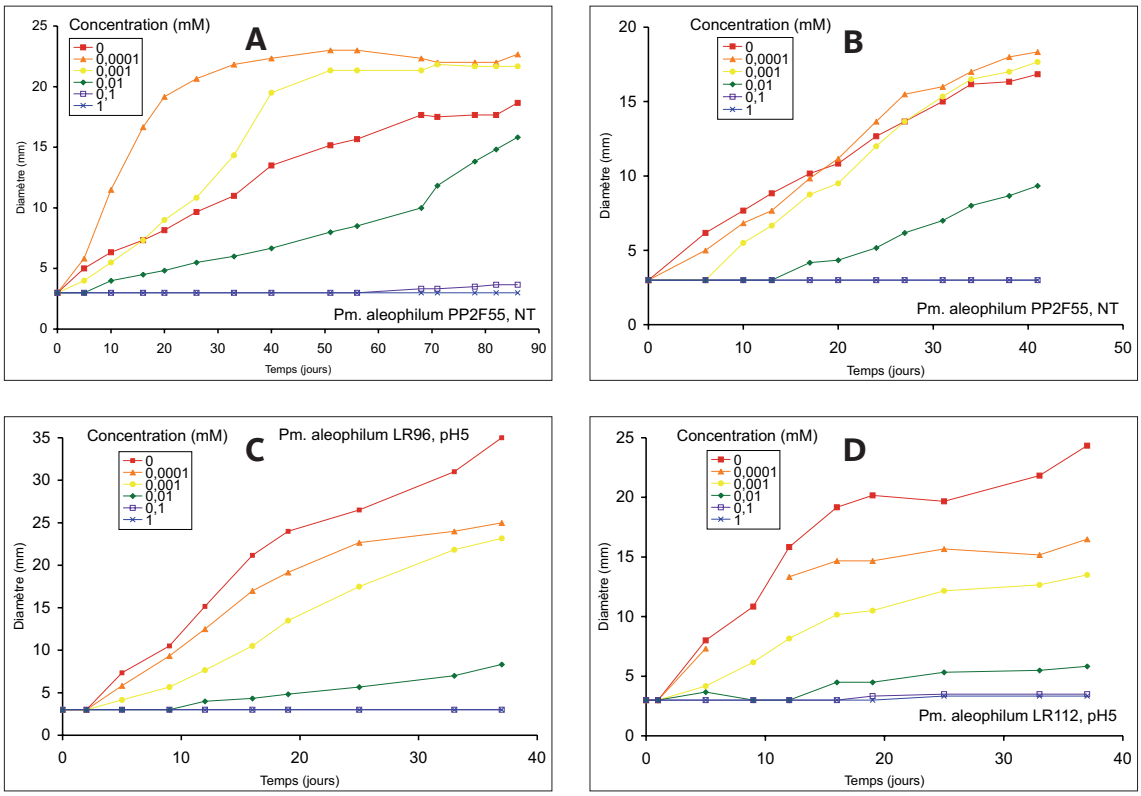


Figure 60: Action antifongique du fenpropimorphe sur différentes souches de *Pm. aleophilum*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

10 µM de fongicide. Pour les deux autres courbes (1 et 0,1 µM), on observe encore un effet inhibiteur, évidemment moins net, sur la croissance fongique.

Sur la souche LR-112 (Fig. 60D), le composé produit un effet fongicide vérifié à 1 mM. L'inhibition de croissance est aussi totale à la concentration de 100 µM sans effet fongicide. Un très fort retard de croissance est observé chez le mycélium soumis à une concentration de 10 µM. Il est encore net pour une concentration de 1 µM et s'amenuise à 0,1 µM.

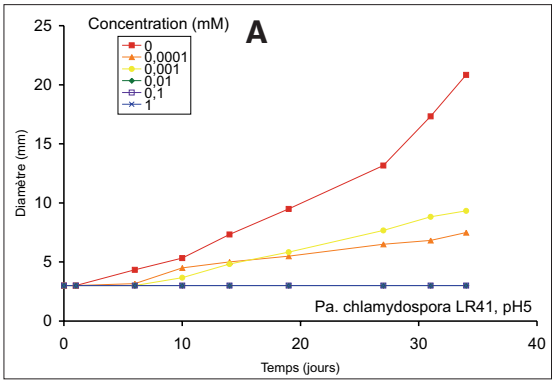
2.2.2.5 - Penconazole

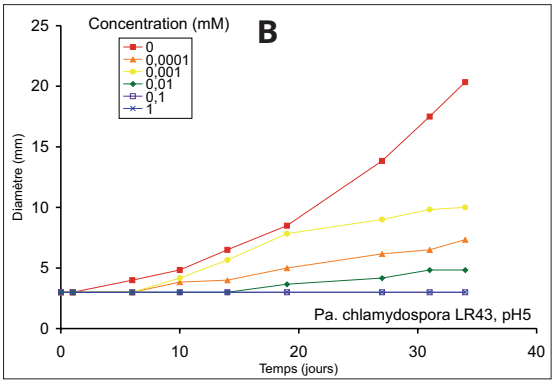
• Action sur *Pa. chlamydospora* (Fig. 61)

Sur la souche LR-41 (Fig. 61A), on observe une absence de croissance fongique dans les milieux contenant 1 mM, 100 µM et 10 µM de produit actif. Seules les deux premières concentrations se sont révélées véritablement fongicides. Les deux courbes restantes (1 et 0,1 µM) montrent néanmoins un retard de croissance bien net comparé à la courbe témoin.

Sur la souche LR-43 (Fig. 61B), l'effet fongicide est aussi retrouvé pour les concentrations 1 mM et 100 µM mais à 10 µM l'inhibition de croissance n'est plus totale, le développement du mycélium débutant vers le quinzième jour. Pour les deux courbes restantes (1 et 0,1 µM), le retard de croissance s'affirme à mesure que le temps passe.

Sur la souche LR-47 (Fig. 61C), l'absence de croissance fongique est notée pour des milieux contenant 1 mM, 100 µM et 10 µM de produit actif. L'effet fongicide est attesté pour 1 mM et 100 µM de produit. Le retard de croissance est plus flagrant à 1 µM qu'à 0,1 µM où il est mineur.





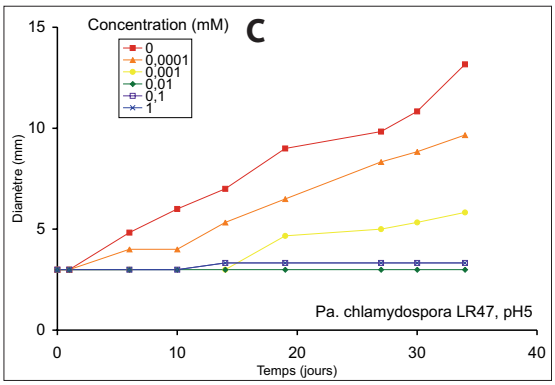


Figure 61 : Action antifongique du penconazole sur différentes souches de *Pa. chlamydospora*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions.

• Action sur *Pm. aleophilum* (Fig. 62)

Sur la souche LR-96 (Fig. 62A), l'effet fongicide est vérifié sur les implants provenant des milieux contenant 1 mM de produit. Un retard de croissance important est noté pour la concentration 100 µM. Le mycélium ne débute sa croissance qu'après le cinquième jour. Malgré un démarrage concomitant des autres lots, la courbe représentant la croissance sous 10 µM de penconazole amorce rapidement un léger retard de croissance maintenu tout le long de l'expérience.

Avec la souche LR-112 (Fig. 62B), la tendance reste la même. Un effet fongicide est obtenu à la concentration de 1 mM. Un retard de croissance important est observé à100 µM et un autre, plus ténu, l'est à 10 µM de produit.

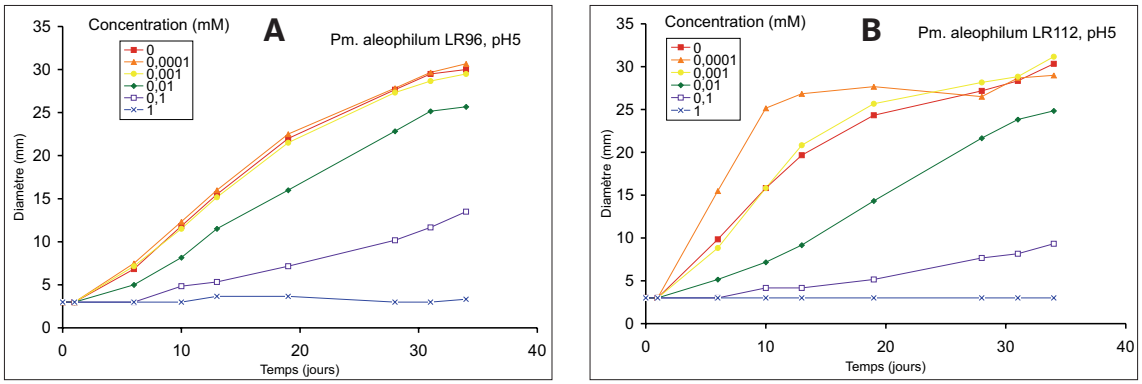


Figure 62 : Action antifongique du penconazole sur deux souches *Pm. aleophilum*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions.

2.2.2.6 - Propiconazole

• Action sur *Pa. chlamydospora* (Fig. 63)

Sur la souche PP1S936 (Fig. 63A et B), on observe un effet fongistatique total pour des concentrations de 1 mM et 100 µM. L'effet fongicide n'a pas été vérifié. L'effet fongitoxique est quasi-total pour les mycélia au contact d'une concentration en fongicide de 10 µM. On peut noter un retard de croissance conséquent du mycelium au contact de milieux contenant les concentrations les plus faibles (1 µM et 0,1 µM). Notons dans un cas (Fig. 63A) que les courbes de croissance relatives à ces deux concentrations montrent une rupture de pente après le cinquantième jour.

Sur la souche LR-41 (Fig. 63C), les courbes de croissance ont une allure similaire à celles vues précédemment. L'effet fongicide est confirmé pour les concentrations en propiconazole de 1 mM et 100 µM. L'inhibition totale de la croissance à 10 µM laisse l'implant mycélien vivant. Les autres concentrations provoquent un ralentissement conséquent du développement des colonies.

Sur la souche LR-43 (Fig. 63D), on observe une absence de croissance mycélienne et un effet fongicide avéré au contact de milieux contenant des concentrations en propicona-

zole de 1 mM, 100 µM et 10 µM. L'effet fongistatique reste net pour les autres concentrations.

Sur la souche LR-47 (Fig. 63E), l'effet fongicide est avéré aux concentrations 1 mM et 100 µM. L'inhibition de croissance est encore totale à 10 µM, un retard de croissance est noté pour les deux autres conditions de culture (1 et 0,1 µM).

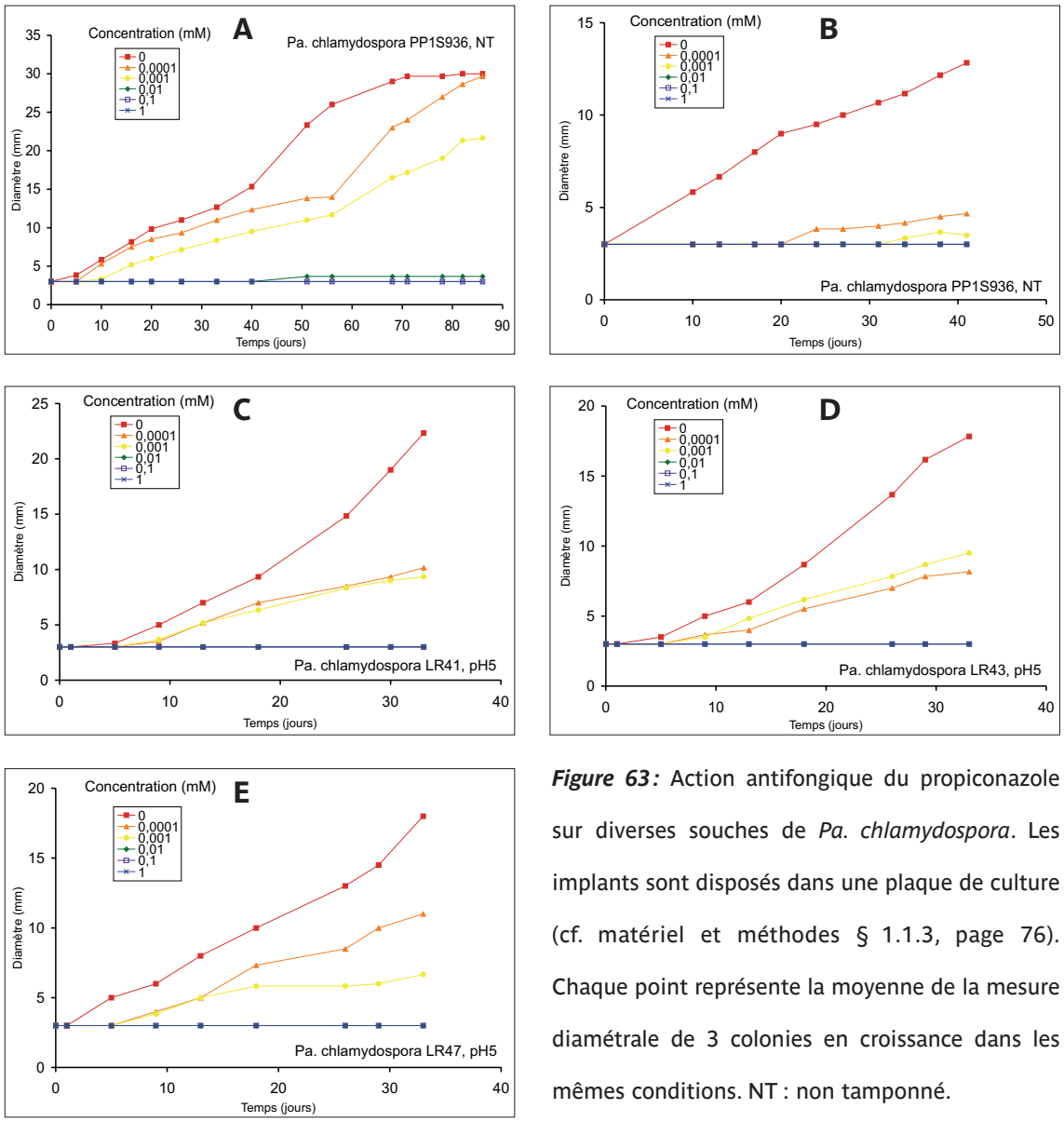


Figure 63 : Action antifongique du propiconazole sur diverses souches de *Pa. chlamydospora*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

• Action sur *Pm. aleophilum* (Fig. 64)

Sur la souche PP2F55 (Fig. 64A et B), on note une moins grande sensibilité au propiconazole par rapport aux autres souches. Une inhibition de la croissance mycélienne totale ou quasi-totale est observée pour la concentration de 1 mM uniquement. Une inhibition de croissance conséquente est notée pour le mycélium au contact d'une concentration de 100 µM. Ce retard de croissance tend à s'estomper avec le temps. En deçà de 100 µM, les courbes de croissance suivent la tendance de la courbe témoin.

Sur la souche LR-96 (Fig. 64C), l'inhibition totale de croissance fongique est obtenue à la concentration de 1 mM. L'effet fongicide est vérifié à cette concentration sur les

implants. Un retard important de la croissance s'observe lorsque la concentration en fongicide est de 100 µM. Un tel effet s'estompe à la concentration de 10 µM. Pour les plus basses concentrations, l'effet fongistatique n'est plus perceptible.

Sur la souche LR-112 (Fig. 64D), l'effet fongicide n'est pas obtenu malgré une inhibition totale de la croissance fongique au contact du propiconazole à 1 mM. Le retard de croissance à 100 µM est cependant très conséquent. À 10 µM le mycélium offre un retard important dans son développement mais il est comblé vers le trentième jour. Les autres concentrations (1 et 0,1 µM) induisent un très faible retard de croissance.

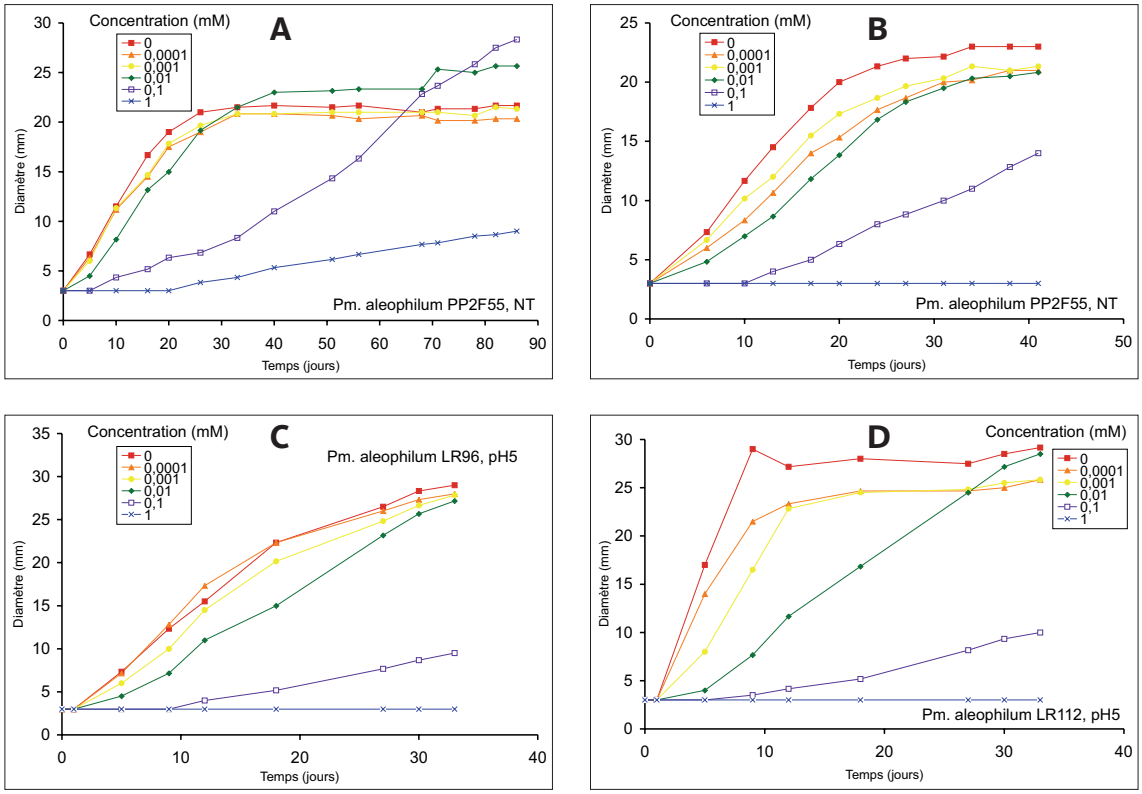


Figure 64: Action antifongique du propiconazole sur diverses souches de *Pm. aleophilum*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

2.2.2.7 - Pyriménox

• Action sur *Pa. chlamydospora* (Fig. 65)

Sur la souche PP1S936 (Fig. 65A), ce composé présente une activité très intéressante. Même après quarante jours de culture, il inhibe complètement la croissance mycélienne dans toutes les conditions de concentration (de 1 mM à 0,1 µM).

Sur la souche LR-41 (Fig. 65B), l'effet fongicide est aussi observé sur les implants confrontés aux concentrations allant de 1 mM à 1 µM. À 0, 1 µM, on observe un très léger retard de croissance.

Sur la souche LR-43 (Fig. 65C), nous avons obtenu une inhibition totale de la croissance pour des concentrations en pyriménox de 1 mM, 100 µM et 10 µM. L'effet fongicide a

été confirmé en repiquant les implants sur un milieu témoin. Un retard de croissance important est observé à la concentration de 1 µM. Le démarrage de la croissance intervient au-delà du quinzième jour d'expérience. Pour les implants soumis à une concentration de 0,1 µM le retard de croissance est également important.

Sur la souche LR-47 (Fig. 65 D), on observe un effet fongicide aux concentrations de 1 mM, 100 µM et 10 µM. Le retard de croissance est important pour des concentrations de l'ordre de 1 µM, pour lesquelles la croissance mycélienne ne débute qu'après le quinzième jour, et de 0,1 µM, qui montre un début de croissance avant le cinquième jour.

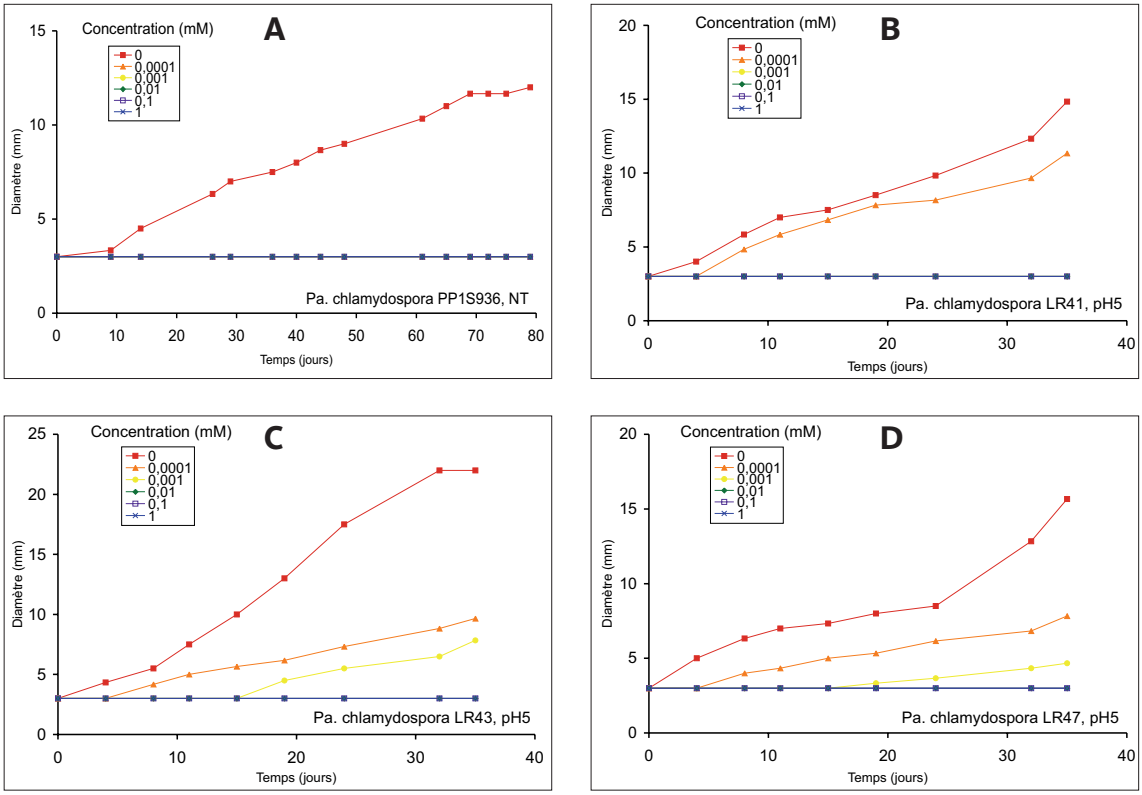


Figure 65 : Action antifongique du pyrifenox sur diverses souches de *Pa. chlamydospora*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

• Action sur *Pm. aleophilum* (Fig. 66)

Le pyrifénox montre ici beaucoup moins d'efficacité que sur *Pa. chlamydospora*. Sur la souche PP2F55 (Fig. 66A et B), il empêche tout développement mycélien seulement à la concentration de 1 mM. Un retard de croissance est notable pour les implants au contact du produit à la concentration de 100 µM. Les effets sont plus restreints (Fig. 66A), voire nuls (Fig. 66B), pour les concentrations inférieures (10 µM, 1 µM et 0,1 µM).

Sur la souche LR-96 (Fig. 66C), on observe une absence de croissance du mycélium à la concentration 1 mM. Cet effet n'est cependant pas fongicide *stricto sensu*. Toutes les autres courbes démarrent de manières concomitantes. Un léger retard de croissance est

notable sur la courbe du mycélium soumis à 100 µM de fongicide, mais il est comblé vers le vingt-cinquième jour. Les autres courbes suivent les tendances du témoin.

Sur la souche LR-112 (Fig. 66D), il n'y a pas non plus d'effet fongicide malgré une absence de croissance fongique à la concentration 1 mM. De la même manière que précédemment, les colonies soumises à 100 µM de pyrifénox sont légèrement moins développées dans les premiers temps puis comblent leur retard vers le vingt-cinquième jour.

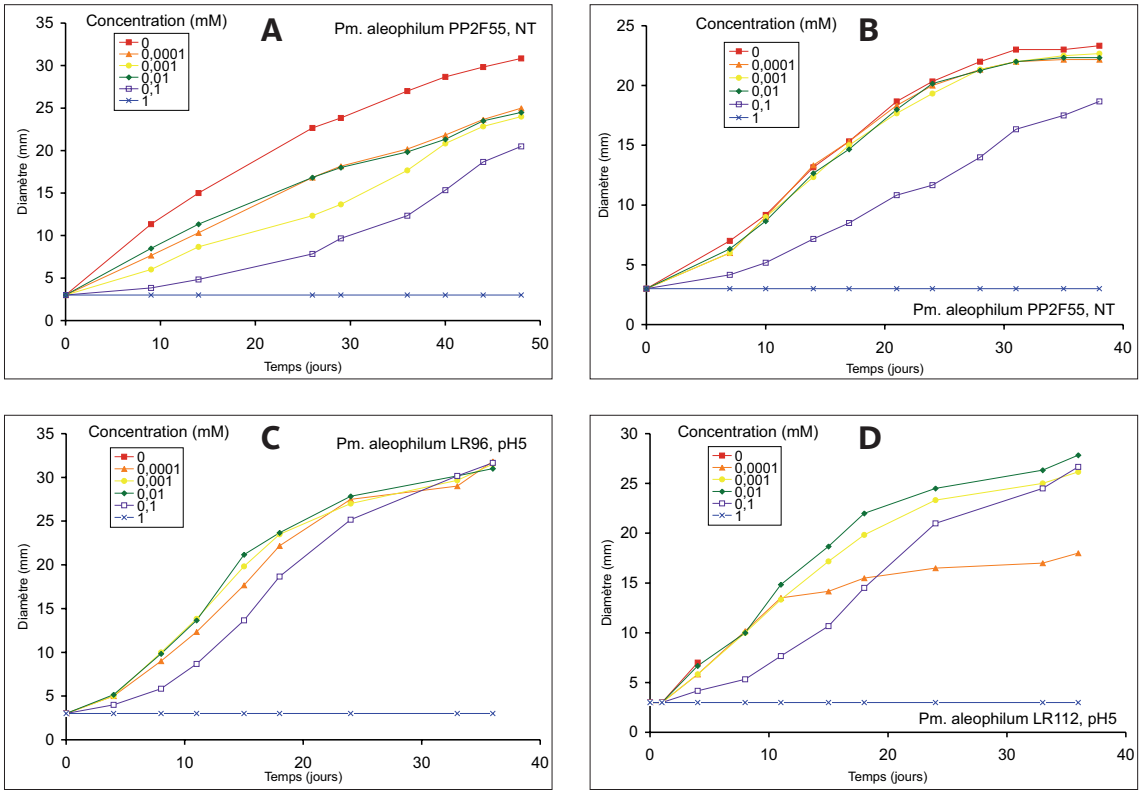


Figure 66: Action antifongique du pyrifenox sur plusieurs souches de *Pm. aleophilum*. Les implants sont disposés dans une plaque de culture (cf. matériel et méthodes § 1.1.3, page 76). Chaque point représente la moyenne de la mesure diamétrale de 3 colonies en croissance dans les mêmes conditions. NT : non tamponné.

2.2.2.8 - Conclusion quant à la variabilité entre espèces et entre souches vis-à-vis de l'effet de 5 fongicides

D'une manière générale, *Pa. chlamydospora* est plus sensible aux fongicides testés que *Pm. aleophilum* et ceci est particulièrement net en réponse au pyrifénox. Par ailleurs, les comparaisons que nous avons effectuées nous montrent qu'il y a, en général, peu de variabilité entre les différentes souches testées vis-à-vis de l'effet fongicide *stricto sensu* de diverses familles de produits et ceci, que ce soit pour *Pa. chlamydospora* ou pour *Pm. aleophilum*. Néanmoins, on peut observer un écart au niveau des concentrations en fongicide qui peut aller jusqu'à un facteur 10 (Tableau 3).

3 - Les tests de systémie

3.1 - Sur plantules de ricin

3.1.1 - Les dérivés du fenpiclonil

Les résultats obtenus sont le fruit d'une collaboration avec F. Rocher (2004). Ils ont fait l'objet de deux publications (Chollet *et al.*, 2004 ; 2005).

3.1.1.1 - Dérivé F 31 (= composé 9 dans Chollet et al., 2004 ; composé 2a dans Chollet et al., 2005)

• *Détection de la mobilité phloémienne de ce composé*

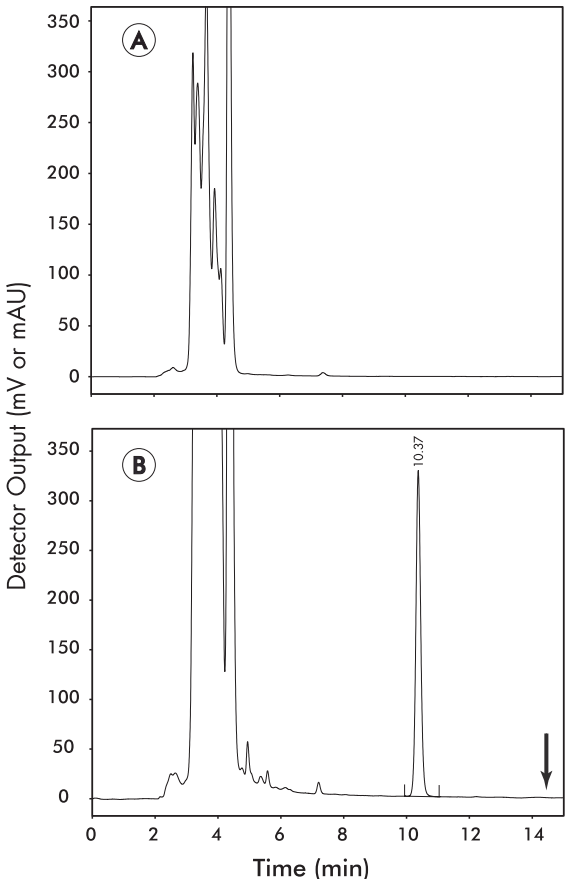


Figure 87 : Analyse de sève de ricin par CLHP. A : lot témoin, les cotylédons ont incubé dans le milieu standard (pH 5,0) ; B : lot traité, les cotylédons de ricins ont incubé dans la même solution contenant le composé F 31 (Temps de rétention : 10,37 min) à la concentration de 250 µM. La flèche indique le temps de rétention du fenpiclonil.

Grâce au modèle ricin, nous avons pu vérifier la mobilité de ce dérivé du fenpiclonil (Fig. 87). L'analyse par CLHP de la sève phloémienne, récoltée à la suite d'une phase d'incubation des cotylédons dans une solution contenant le xénobionte (à 250 µM), montre la présence de ce composé (Rt : 10,37 min ; Fig. 87B). Pour comparaison, l'analyse de sève témoin (plantes ayant incubé dans le milieu standard) nous a fourni le chromatogramme de la Fig. 87A. De plus, nous ne décelons pas la présence de fenpiclonil dans les échantillons de sève analysés. Le composé F 31 est donc chargé dans le phloème et transporté en l'état.

• *Influence du pH de la solution d'incubation sur le transport de F 31*

La cinétique d'enrichissement en F 31 de la sève phloémienne en fonction du temps varie avec le pH du milieu d'incubation. Elle est progressive à pH 5,0 (Fig. 88A). En revanche, à pH 4,6 la teneur en F 31 augmente rapidement pendant les 90 premières minutes puis atteint un plateau (Fig. 88B). Ceci nous a conduit à étudier de manière plus détaillée l'incidence du paramètre pH. Celui-ci influe de manière importante sur la concentration en xénobionte dans la sève libérienne. Pour une solution tamponnée à pH 4,6, le

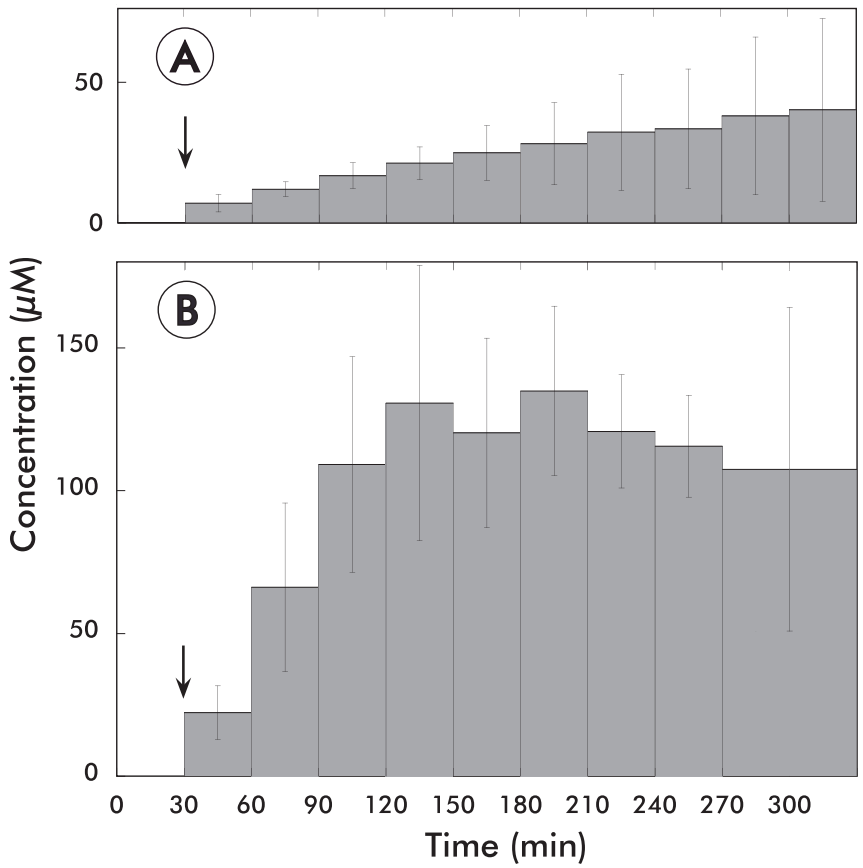


Figure 88: cinétique temporelle de la concentration en composé F 31 dans la sève phloémienne de ricin. Au temps 0, le composé F 31 (250 µM, concentration finale) est ajouté au milieu standard tamponné à (A) pH 5,0 ou (B) 4,6. La crosse est sectionnée au temps 30 min (flèche). Moyenne de 6 lots de 6 plantes ± erreur standard (A); moyenne de 5 lots de 3 plantes ± erreur standard (B).

facteur de concentration de F 31 dans la sève analysée est de 0,4. Il est de 0,15 lorsque la solution employée est tamponnée à pH 5,0 puis devient nul à pH 6,5. De plus, le pourcentage de forme non dissociée de F 31 à ces différents pH est corrélé avec le résultat des analyses, selon les calculs du logiciel ACD Log D v 7.0. (Fig. 89)

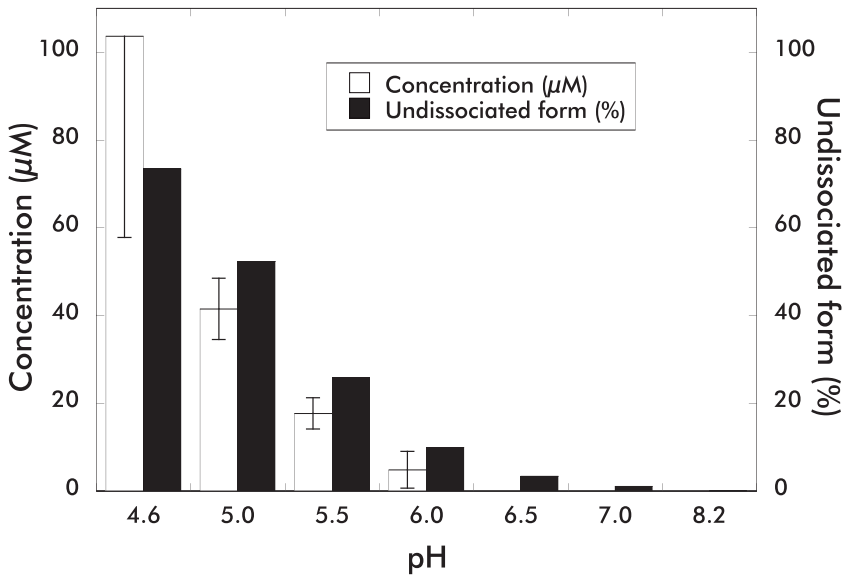


Figure 89: concentration en composé F 31 (appliqué à la concentration de 250 µM dans la solution externe) dans la sève phloémienne de ricin en fonction du pH du milieu d'incubation et du pourcentage de forme non dissociée calculée par ACD Log D. La sève est collectée durant les troisième et quatrième heures d'incubation. Moyenne de 8 lots de 3 plantes (pH 4,6) ou 3 lots de 3 plantes (autres pH) ± erreur standard.

3.1.1.2 - Dérivé F 30 (= composé 2b dans Chollet et al., 2004)

Tout comme F 31, nous avons pu vérifier son transport grâce au modèle ricin. Une étude préliminaire montre que l'on détecte cette molécule dans la sève phloémienne par

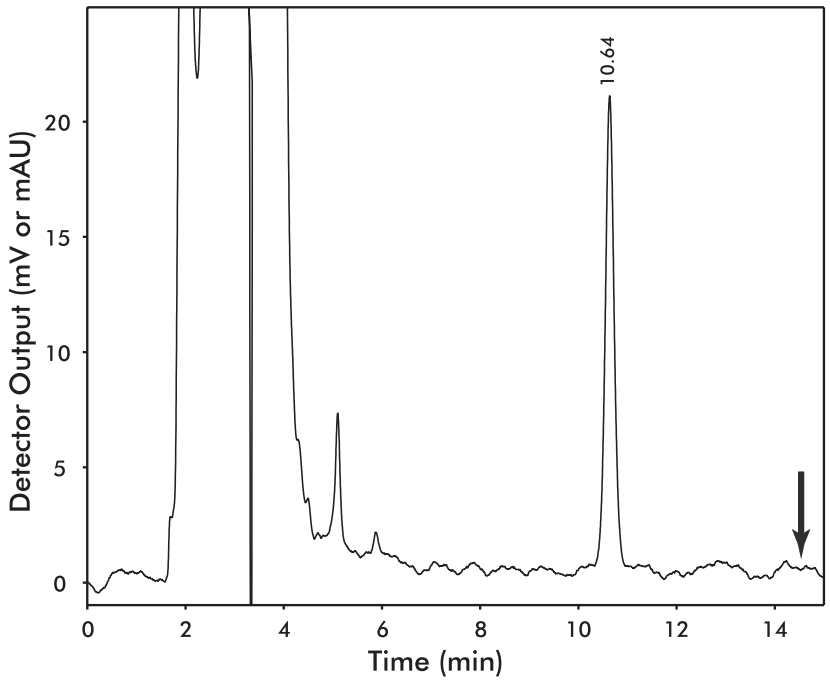


Figure 90 : Analyse de sève de ricin par CLHP. Les cotylédons ont incubé dans le milieu standard contenant le composé F 30 (Temps rétention : 10,64 min) à la concentration de 100 µM. La flèche indique le temps de rétention du fenpiclonil.

une analyse en CLHP (Fig. 90). L'absence de fenpiclonil dans les échantillons de sève analysés (tout comme pour F 31) est aussi à noter. F 30 (à 100 µM dans la solution d'incubation) est donc chargé dans le phloème et transporté tel quel par le flux de sève. Deux types d'expériences ont été réalisés afin d'évaluer cette capacité de transport :

• *Étude de l'évolution de la concentration en F 30 au sein de la sève phloémienne de ricin au cours du temps d'incubation*

Les cotylédons de ricin sont placés dans une solution d'incubation, tamponnée à pH 5,0 et contenant F 30 à la concentration de 100 µM. Dans une première série d'expériences, la collecte fait suite à une phase d'incubation de 30 min et dure 5 h En effet, au-delà, les collectes deviennent sporadiques et la sève prend une coloration jaunâtre très prononcée. L'analyse des sèves par CLHP révèle une progression rapide de la concentration

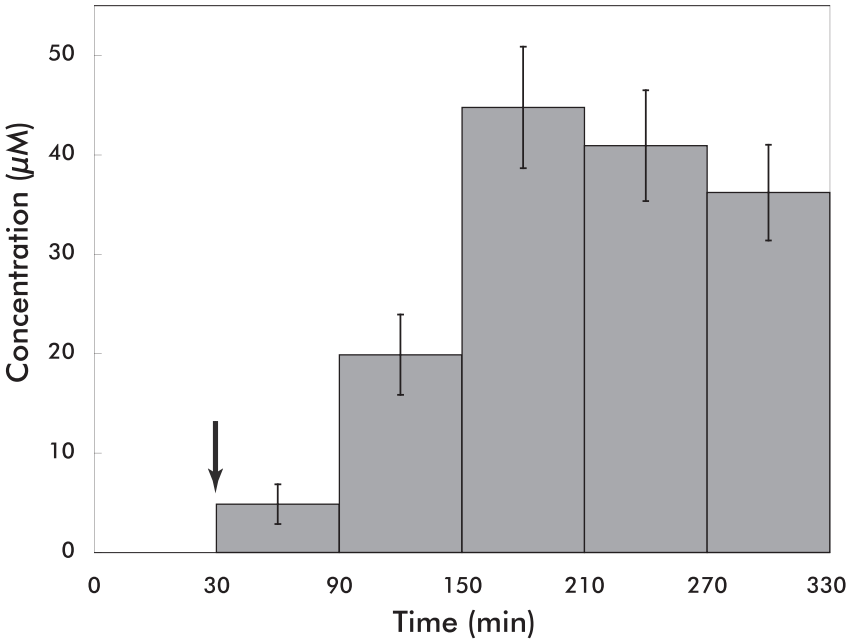


Figure 91 : cinétique temporelle de la concentration en composé F 30 dans la sève phloémienne de ricin. Au temps 0, le composé F 30 (100 µM, concentration finale) est ajouté au milieu standard tamponné à pH 5,0. La crosse est sectionnée au temps 30 min (flèche). Moyenne de 12 plantes ± erreur standard.

qui atteint son maximum après 2 h 30 d'incubation, soit 45 µM environ. Par la suite, la concentration diminue légèrement jusqu'à 5 h 30 d'incubation, terme de l'expérience (Fig. 91). Dans une deuxième série d'expériences, nous avons décalé la phase de collecte en allongeant la phase d'incubation initiale de 1 h 30 soit 2 h au total. Les résultats obtenus sont similaires à ceux présentés Fig. 91.

• *Étude de l'influence du pH de la solution d'incubation sur la concentration en F 30 dans la sève phloémienne de ricin*

Nous avons réalisé une nouvelle série d'expériences en modulant uniquement le pH de la solution dans laquelle sont immergés les cotylédons, une fois dégagés de leur albumen. La solution d'incubation contient F 30 à la concentration de 100 µM. La phase d'incubation initiale est de 2 h, puis l'hypocotyle de chaque plantule est sectionné. La collecte s'effectue pendant les 2 h qui suivent. Le facteur de concentration de F 30 dans la sève est de 0,4 à pH 4,6, de 0,33 à pH 5,0; il devient marginal à pH 6,0 et nul à pH 6,5 (Fig. 92). Ceci montre à nouveau que le pH du milieu d'incubation a un impact déterminant sur l'absorption de F 30. De plus, une corrélation existe entre le pourcentage en forme non dissociée du xénobionte à ces pH (selon le logiciel ACD Log D) et sa concentration observée dans la sève phloémienne.

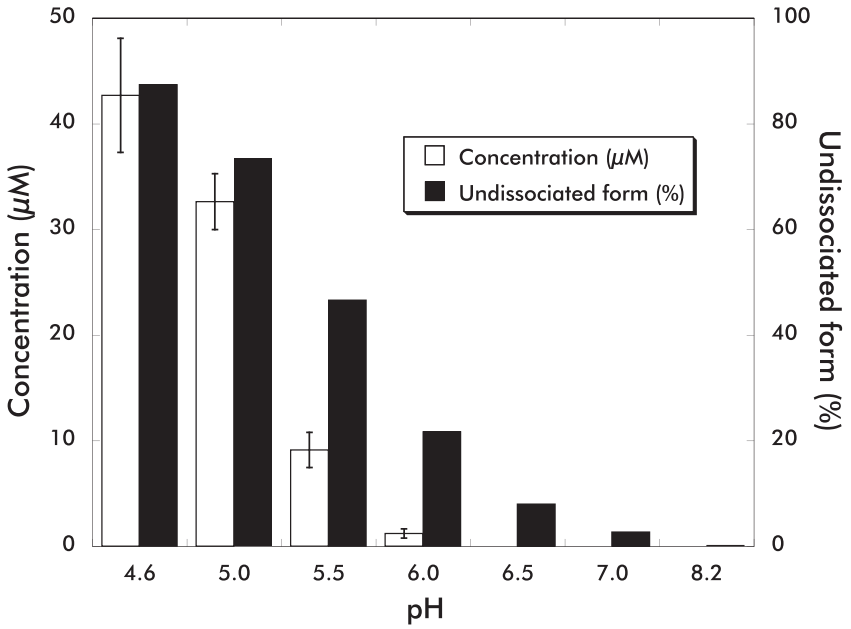


Figure 92: concentration en composé F 30 (appliqué à la concentration de 100 µM dans la solution externe) dans la sève phloémienne de ricin en fonction du pH du milieu d'incubation et du pourcentage de forme non dissociée calculé par ACD Log D. La sève est collectée durant les 3e et 4e heures d'incubation. Moyenne de 52 plantes (pH 4,6), 58 plantes (pH 5,0), 88 plantes (pH 5,5), 39 plantes (pH 6,0), 22 plantes (pH 6,5), 12 plantes (pH 7,0) et 11 plantes (pH 8,2) ± erreur standard.

Des essais complémentaires ont été réalisés sur quelques lots de ricin afin de recueillir et d'analyser la sève xylémienne. À l'issue d'une phase d'incubation des cotylédons dans une solution de F 30 à la concentration de 100 µM pendant 2 h, la collecte de cette sève s'étale sur 2 h. Les analyses en CLHP n'ont pas permis de détecter la molécule au sein de cette sève.

À la vue des bons résultats concernant l'étude de la systémie phloémienne de F 30, nous avons poursuivi nos investigations sur le transport de cette molécule. Les études suivantes concernent alors la vigne et sont regroupées dans un prochain paragraphe.

3.1.1.3 - Dérivé V

Suite à la synthèse de trois nouveaux dérivés du fenpiclonil et à l'étude de leur activité antifongique (cf. § 2.2.3.2, § 2.2.3.3, § 2.2.3.4), nous avons sélectionné le composé **V** pour des tests préliminaires de systémie sur le modèle ricin. La solution d'incubation utilisée est tamponnée à pH 5,0 et contient le xénobionte à la concentration de 100 µM. Les cotylédons des plantules sont d'abord immergés durant 30 min Suite à cette phase d'incubation initiale, l'hypocotyle de chaque plantule est sectionné. La sève phloémienne est récoltée toutes les heures. La sève exsudée de chaque section est analysée séparément en CLHP. Les valeurs du plateau obtenu se situent au voisinage de 15 µM (Fig. 93). Le facteur de concentration est donc de 0,15 alors qu'il est de 0,4 pour F 30 lors du même type d'expérience.

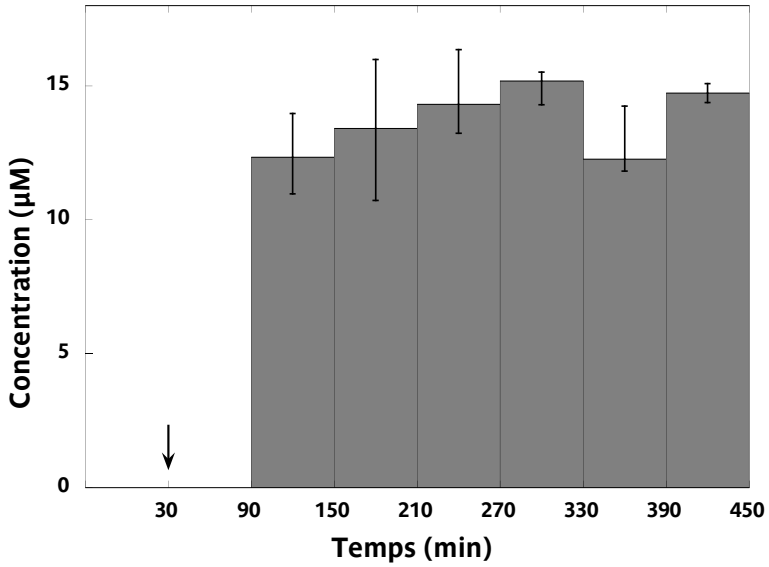


Figure 93: cinétique temporelle de la concentration en composé **V** dans la sève phloémienne de ricin. Le composé **V** (100 µM, concentration finale) est ajouté au milieu standard tamponné à pH 5,0. La crosse est sectionnée au temps 0 (flèche) après 30 min d'incubation. Médianes ± quartiles. n = 8 plantes.

3.1.2 - L'acide salicylique et ses dérivés halogénés

Parmi les molécules impliquées dans la résistance systémique acquise, l'acide salicylique (AS) est l'une des plus connues (cf. § 2.3.2.2 page 12 et suiv.). Dans la littérature, il apparaît que certains de ses dérivés halogénés sont également impliqués, principalement les acides 3,5-dichlorosalicylique et 5-chlorosalicylique (Kauss *et al.*, 1993 ; Siegrist *et al.*, 1994). Le tableau (Tableau 4) précise les caractéristiques physicochimiques (pourcentage de forme non dissociée, log D et log P) de chacun de ces composés. L'étude des propriétés du transport de l'AS a été largement entamée par F. Rocher (2004) et nous sommes intervenu dans ce travail soit pour étudier personnellement un point (systémie phloémienne et xylémienne de l'acide salicylique marqué au ^{14}C) en complément du travail mené par F. Rocher, soit en collaboration (systémie phloémienne de l'acide 3,5-dichlorosalicylique). L'ensemble des résultats obtenus a fait l'objet d'une publication (Rocher, 2006). Notre travail de thèse inclut également l'étude des propriétés du transport de l'acide 5-chlorosalicylique et de l'acide 5-fluorosalicylique.

Produit	% de forme non dissociée à pH 5,0	Log D à pH 5,0	Log P (molécule globalement neutre)
Acide salicylique	10	-0,7	2,06
Acide 5-chlorosalicylique	28	0,47	3,42
Acide 5-fluorosalicylique	12	-0,37	2,57
Acide 3,5-dichlorosalicylique	13	1,31	4,40
Acide 3,5-dichlorobenzoïque	97,2	2,38	3,92

Tableau 4 : paramètres physico-chimiques de l'acide salicylique et de quelques analogues chlorés calculés avec le logiciel ACD Log D suite v. 9.0.2.

3.1.2.1 - Systémie phloémienne et xylémienne de l'acide salicylique-^{14}C

Dans son travail de thèse, F. Rocher (2004) a montré, par analyse en CLHP de la sève phloémienne de ricin, que le facteur de concentration de l'AS dans ce compartiment était de l'ordre de 10, pour des pH externes de 4,6 et de 5,0. L'AS est également présent dans la sève xylémienne, mais les quantités sont trop faibles pour des mesures en CLHP durant les premières heures de transport. En parallèle, nous avons donc étudié les propriétés de mobilité de l'AS-^{14}C et l'analyse des sèves a été effectuée en scintillation liquide.

Pour ce type d'expérience, un grand nombre de plantules de ricin a été utilisé. Celles-ci sont divisées en 8 lots. Les durées de collecte de sève sont les mêmes pour chaque lot : 30 min pour la sève phloémienne et 20 min pour la sève xylémienne. C'est l'instant de la section de l'hypocotyle pour la collecte des sèves qui varie pour chaque lot (doubles flèches de la Fig. 94) : la collecte de sèves la plus précoce a lieu 30 min après le début de l'incubation des cotylédons dans la solution avec AS-^{14}C pour le premier lot ; la collecte la plus tardive a lieu 5 heures après le début de l'incubation pour le huitième lot.

• *Systémie phloémienne de l'AS-^{14}C (Fig. 94A)*

Lorsque les cotylédons de ricin incubent dans une solution d'incubation tamponnée à pH 4,6 et contenant l'AS-^{14}C à la concentration de 10 µM, les molécules marquées s'accumulent rapidement dans le phloème comme le souligne l'examen du premier et du deuxième lot de plantules. On atteint un palier à près de 80 µM avec les troisième et quatrième lots. Puis la concentration en molécules marquées de la sève phloémienne s'élève encore pour atteindre environ 100 µM. Cette cinétique temporelle est exactement la même que celle obtenue par analyse CLHP de la sève phloémienne collectée à différents moments à partir de la même section d'hypocotyle (Rocher *et al.*, 2006 ; Fig. 3). Cette similitude suggère que le stress "section des tissus" a peu d'incidence sur les quantités de molécules d'intérêt collectées. Elle révèle par ailleurs que les métabolites marqués de l'AS-^{14}C ne circulent pas dans le phloème, car si c'était le cas la concentration en molécules marquées serait supé-

rieure à celle de l'AS non marqué estimée par CLHP (Rocher *et al.*, 2006 ; Fig. 3). C'est donc essentiellement la concentration d'AS-^{14}C qui a été mesurée.

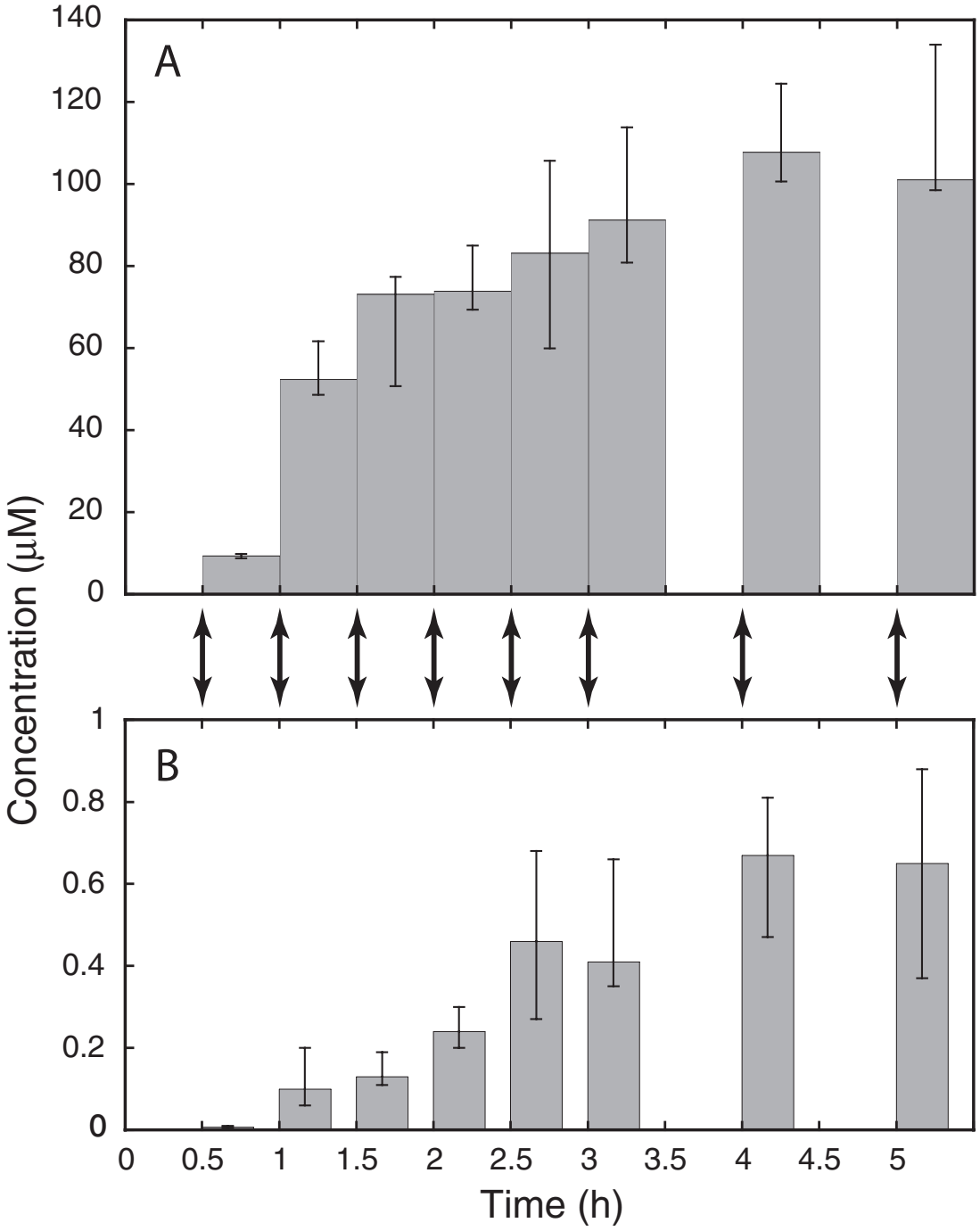


Figure 94: cinétique temporelle de la concentration en molécules marquées dans la sève phloémienne (A) et xylémienne (B) de ricin. Les cotylédons ont incubé dans un milieu standard tamponné à pH 4,6 contenant l'AS- ^{14}C à la concentration de 10 µM. Les plantules ont été réparties en huit lots et l'hypocotyle a été sectionné au niveau de la crosse à différents temps (de 0,5 à 5 heures) en fonction des lots (doubles flèches). La sève phloémienne et la sève xylémienne (traitement avec $CaCl_2$ 1 M) ont été collectées respectivement durant 30 et 20 min. La largeur de la colonne indique la durée de la collecte. Médianes ± quartiles ; n = 6 triplicates.

• *Ambimobilité de l'AS : recherche de l'AS-^{14}C dans la sève xylémienne (Fig. 94B)*

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre "Matériel et méthodes", pour éviter une pollution de la sève xylémienne par la sève phloémienne, la section de la partie basale de l'hypocotyle a été traitée par $CaCl_2$ 1 M pendant une minute (Kallarachal et al., 1989). Ce traitement a pour effet de colmater complètement les tubes criblés. Néanmoins nous avons tenu à vérifier la pureté de la sève xylémienne collectée. À cet égard, nous avons utilisé la 5(6)-carboxyfluorescéine (CF), un marqueur du compartiment symplastique (Oparka, 1991). Après incubation des cotylédons de ricin dans une solution contenant CF à la concentration de 100 µM, cette molécule bien présente dans la sève phloémienne (Fig. 95A) est distribuée dans l'ensemble de la plante. Par contre, elle ne peut être détectée dans la sève xylémienne (Fig. 95C) dans nos conditions expérimentales. Celle-ci est donc réellement pure.

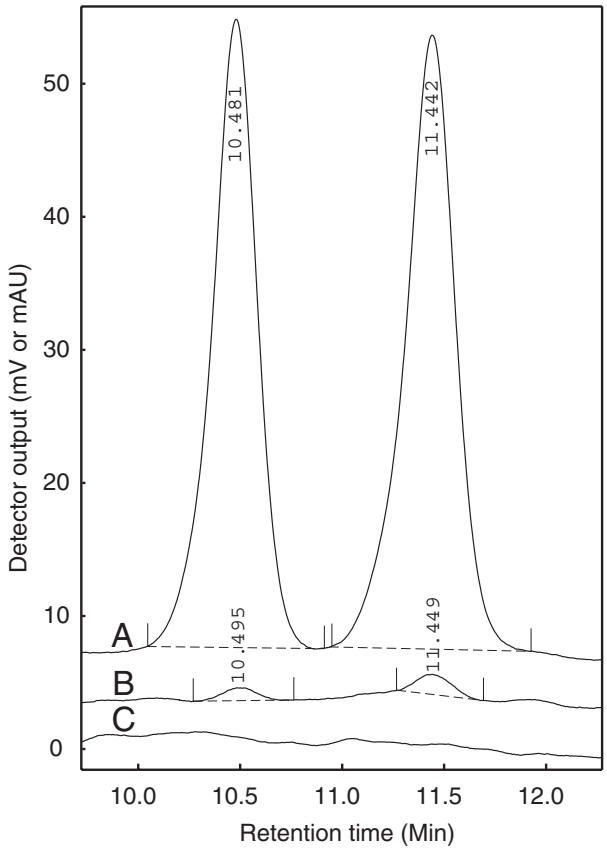


Figure 95: La carboxyfluorescéine (CF) comme marqueur spécifique de la sève phloémienne de ricin. Les cotylédons de ricin ont été incubés durant 1 heure dans un milieu standard tamponné à pH 4,6 contenant la CF à la concentration de 100 µM. L'hypocotyle a ensuite été sectionné au niveau de la crosse. La CF est retrouvée à la concentration de 22,6 µM dans la sève phloémienne (A) alors qu'elle n'est pas détectée dans la sève xylémienne (C). Noter que la double signature de la CF est encore bien nette aux très basses concentrations (0,05 µM ; B).

Sur ces bases, nous avons analysé l'évolution de la teneur en molécules marquées dans la sève xylémienne des 8 lots de plantules de ricin, les cotylédons incubant, rappelons-le, dans une solution contenant de l'AS-^{14}C à la concentration de 10 µM. Cette teneur augmente d'abord lentement comme l'indique l'analyse des trois premiers lots, puis plus nettement à partir de la deuxième heure d'incubation pour atteindre un palier (0,67 µM + 0,14 -0,20, médiane± interquartiles, n = 6 triplicates).

Afin de préciser la nature des molécules marquées véhiculées par la sève xylémienne, une expérience complémentaire a été effectuée en utilisant un milieu d'incubation contenant l'AS non marqué à la concentration de 100 µM, c'est-à-dire une concentration 10 fois supérieure à celle de l'expérience précédente. Dans ces conditions, on peut déter-

Bibliographie

J. Abblard, C. Decoret, L. Cronenberger, H. Pacheco (1972) Préparation et détermination de structure de nouvelles pyridines halogénées. Mécanisme de l'halogénation. Bulletin de la Société Chimique de France **6**, 2466-2481

D.E. Ames, W.D. Dodds (1972) Condensation of β-dicarbonyl compounds with halogenopyridinecarboxylic acids. A convenient synthesis of some naphthyridine derivatives. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 705-710

T.-L. Au-Yeung, K.-Y. Chan, W.-K. Chan, R.K. Haynes, I.D. Williams, L.L. Yeung (2001) Reactions of (R_p)- and (S_p)-*tert*-butylphenylphosphinobromidates and *tert*-butylphenylthionophosphinochloridates with heteroatom nucleophiles; preparation of *P*-chiral binol phosphinates and related compounds. Tetrahedron Letters **42**, 453-456

T.J. Avis, R.R. Boulanger, R.R. Bélanger (2000) Synthesis and biological characterization of (Z)-9-heptadecenoic and (Z)-6-methyl-9-heptadecenoic acids : fatty acids with antibiotic activity produced by *Pseudozyma flocculosa*. Journal of Chemical Ecology **26**, 987-1000

T.J. Avis, R.R. Bélanger (2001) Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. Applied and Environmental Microbiology **69**, 2595-2602

M.-C. Bonnaud (1999) Synthèse et activité phytosanitaire d'analogues du fenpiclonil (produit fongicide). Thèse de doctorat de l'Université de Poitiers

P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, E.V. Minelli, F. Cabitza, M. Cubeddu (1997) Fate of Some New Fungicides (Cyprodinil, Fludioxonil, Pyrimethanil and Tebuconazole) from Vine to Wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45, 2708-2710

A. Chamel (1997) La cuticule des plantes : Rôle dans les transferts de produits phytosanitaires dans l'environnement. Phytoma - La Défense des Végétaux **491**, 11-15

Y.Cheng, D.J. McNally, C. Labbé, N. Voyer, F. Belzile, R.R. Bélanger (2003) Insertional mutagenesis of a fungal biocontrol agent led to discovery of a rare cellobiose lipid with antifungal activity. Applied and Environmental Microbiology **69**, 2595-2602.

J.-F. Chollet, C. Delétage, M. Faucher, L. Miginiac, J.-L. Bonnemain (1997) Synthesis and structure-activity relationships of some pesticides with an α-amino acid function. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects **1336**, 331-341

J.-F. Chollet, F. Rocher, C. Jousse, C. Delétage-Grandon, G. Bashiardes, J.-L. Bonnemain (2004) Synthesis and phloem mobility of acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil. Pest Management Science **60**, 1063-1072

J.-F. Chollet, F. Rocher, C. Jousse, C. Delétage-Grandon, G. Bashiardes, J.-L. Bonnemain (2005) Acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil: effect of adding a methyl group to the *N*-substituted chain on systemicity and fungicidal activity. Pest Management Science **61**, 377-382

P.D.G. Dean (1965) Halogenolysis of Methyl Glycyrrhetate with Lithium Ioidide-Dimethylformamide. Journal of the Chemical Society, 6655

W.J. Houlihan, J.H. Gogerty, V.A. Parrino, E. Ryan (1983) Antidepressant Activity of 5-Aryl-2,3,5,6-tetrahydroimidazo[2,1-a]isoquinolin-5-ols. Journal of Medicinal Chemistry **26**, 765-768

C. Delétage-Grandon (2000) Effets de diverses modulations structurales sur les propriétés d'absorption et de transport des xénobiontes. Premières applications aux fongicides. Thèse de Doctorat de l'Université de Poitiers

C. Delétage-Grandon, J.-FChollet., M. Faucher, F. Rocher, E. Komor, J.-L. Bonnemain (2001) Carrier-mediated uptake and phloem systemy of a 350 D chlorinated xenobiotic with an α-amino acid function. Plant Physiology **125**, 1620-1632

F. Dorn (1983) Fungicidal pyridine and pyrazine derivatives. Brevet FR2523966

H. Gershon, J. Shapira, J.S. Meek, K. Dittmer (1954) The syntheses and microbiological properties of acetylenic amino acids - Propargyl glycine and 2-amino-3-methyl-4-pentynoic acid. Journal of American Chemical Society **76**, 3484-3486

F. Dininno, N. Guthikonda Ravindra (1994) 2-(aza-9-fluorenonyl) carbapenem antibacterial agents. Brevet WO 9409002

W.C. Guida, D.J. Mathre (1980) Phase-Transfer Alkylation of Heterocycles in the Presence of 18-Crown-6 and Potassium *tert*-Butoxide. The Journal of Organic Chemistry **45**, 3172-3176

T. Imbert, B. Monse, W. Koek (2003) Novel 3beta-amino azabicyclooctane heteroaromatic amide derivatives, preparation method and therapeutic uses thereof. Brevet WO 03037904

C. Jousse (2002) Etude de la systémie et du métabolisme de deux dérivés du fenpiclonil chez *Ricinus communis* L., des fongicides potentiels contre les maladies vasculaires? Mémoire de DEA de l'Université de Nantes

J. Kallarachal, G. Orlich, C. Shobert, E. Komor (1989) Sucrose transport into phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as measured by the analysis of sieve-tube sap. Planta **177**, 327-335

H. Kauss, R. Franke, K. Krause, U. Conrath, W. Jeblick, B. Grimmig, U. Matern (1993) Conditioning of Parsley (Petroselinum crispum L.) Suspension Cells Increases Elicitor-Induced Incorporation of Cell Wall Phenolics. Plant Physiology **102**, 459-466

J.E. Mc Murry, G.B. Wong (1972) An Improved Method for the Cleavage of Methyl Esters. Synthetic Communications **2**, 389-394

R. Nyfeler and P. Ackermann(1992) Phenylpyrroles, a new class of agricultural fungicides related to the natural antibiotic pyrrolnitrin, in Synthesis and chemistry of agrochemicals III, ed by Baker DR, Fenyes JG and Steffens JJ, American Chemical Society, Washington, DC, pp 395–404

K.J. Oparka (1991) Uptake and compartmentation of fluorescent probes by plant cells. Journal of Experimental Botany **42**, 565-579

F. Rocher (2004) Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense. Thèse de doctorat de l'Université de Poitiers.

F. Rocher, J.-F. Chollet, C. Jousse, J.-L. Bonnemain (2006) Salicylic acid, an ambimobile molecule exhibiting a high ability to accumulate in the phloem Plant Physiology **141**, 1684-1693

M. Sako, T. Kihara, Y. Maki, A. Miyamae, T. Azuma, S. Kohda, T. Masugi (2002) Novel photodegradation fo the antifungal antibiotic pyrrolnitrin in anhydrous and aqueous aprotic solvents. The Journal of Organic Chemistry **67**, 668-673

M. Schirra, S. D'Aquino, A. Palma, S. Marceddu, A. Angioni, P. Cabras, B. Scherm, Q. Migheli (2005) Residue level, persistence, and storage performance of the citrus fruit treated with fludioxonil. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**, 6718-6724

J. Siegrist, W. Jeblick, H. Kaus (1994) Defense Responses in Infected and Elicited Cucumber (Cucumis sativus L.) Hypocotyl Segments Exhibiting Acquired Resistance. Plant Physiology **105**, 1365-1374

N. Yoshikawa, Y.M.A. Yamada, J. Das, H. Sasai, M. Shibasaki (1999) Direct Catalytic Asymmetric Aldol Reaction. Journal of American Chemical Society **121**, 4168-4178

Publications

1 - Synthesis and phloem mobility of acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil

Pest Management Science

Pest Manag Sci **60**:1063–1072 (online: 2004)
DOI: 10.1002/ps.906

Synthesis and phloem mobility of acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil

Jean-François Chollet,[1†] Françoise Rocher,[1†] Cyril Jousse,[1,2]
Céline Delétage-Grandon,[2] Georges Bashiardes[1] and Jean-Louis Bonnemain[2*]

[1]*Laboratoire 'Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles', Unité Mixte de Recherche CNRS 6514, 40, av du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France*

[2]*Laboratoire 'Transport des Assimilats', Unité Mixte de Recherche CNRS 6161, 40, av du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France*

Abstract: A series of derivatives of the phenylpyrrole fungicide fenpiclonil was synthesized in which a carboxyl group was present at various sites of this non-phloem-mobile molecule. Using the Kleier model, all these acidic analogues were predicted to be moderately phloem-mobile, especially the *N*-substituted derivatives. One of these latter molecules, *N*-carboxymethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole, exhibited some fungicidal activity on the pathogenic fungus *Eutypa lata*, and was then tested as a phloem-mobile pesticide in the *Ricinus* system. The compound was indeed mobile in the sieve tubes and was not degraded to fenpiclonil in the phloem sap under our experimental conditions. Its concentration in the sap was closely correlated to the percentage of the undissociated form of the molecule in the external medium, and was similar under acidic conditions (external pH 4.6–5.0) to that of the herbicide glyphosate.
© 2004 Society of Chemical Industry

Keywords: phenylpyrroles; fenpiclonil; systemicity; phloem mobility; antifungal activity; *Eutypa lata*

1 INTRODUCTION

The movement of xenobiotics within plants is, as a general rule, governed by their physicochemical properties, more precisely their lipophilicity (assessed as the 1-octanol/water partition coefficient, log K_{ow}) and pKa values.[1–6] It also depends on the parameters of the plant vascular system.[1,6,7]

Except for a few xenobiotic molecules (eg the nematicide oxamyl), the phloem-mobile pesticides are herbicides. Most of these are either acidic molecules or esters that can be hydrolyzed to an acid once they are in the plant tissues.[6] Transport across the plasma membrane occurs by diffusion of the lipophilic undissociated form of the acid from the phloem apoplast (pH $\approx$ 5.0). Once inside the phloem symplast (pH $\geq$ 7.5), these molecules dissociate into hydrophilic anions that are generally unable to diffuse back through the plasma membrane. Thus, weak-acid herbicides can be loaded into the phloem and then transported within the plant.[1,8–10] In addition, phloem loading of auxinic herbicides (eg 2,4-D) involves two mechanisms, the ion-trap mechanism as described above, and an active process mediated by a carrier.[11,12]

The term 'systemic fungicide' applies usually to fungicides that are mobile only in the apoplastic compartment.[6,13] They include benzimidazoles, thiophanates, anilides, sterol-biosynthesis inhibitors, carbamates and strobilurins.[14] The phloem mobility of these molecules is either undetectable or minute. In the past, the acylalanines have excited some researchers over the potential ability of basipetal phloem transport to control root pathogens. However, only trace amounts of label were observed in the root system after foliar applications of ^{14}C-metalaxyl.[13,15] Since metalaxyl is an ester, the ester group was hydrolyzed to produce a weak acid. The apparent phloem mobility was thus due to the free acid of metalaxyl, but this was no longer a fungicide.[13]

The development of phloem-mobile or ambimobile fungicides that can be applied to foliage to control root or vascular system pathogens has long been needed. However, as noted by Kleier *et al*,[6] the molecular modifications which enhance phloem systemicity have the unintended consequence of suppressing biological activity, and this is particularly true for fungicides.

The purpose of the present work was (1) to synthesize ionizable analogues of fenpiclonil, a non-phloem-mobile fungicide and (2) to study their properties in terms of biological activities and phloem mobility. Fenpiclonil was the first phenylpyrrole fungicide, developed by Ciba-Geigy (now Syngenta) for seed treatment in cereals.[16,17] It is an analogue of the antifungal metabolite pyrrolnitrin, which

* Correspondence to: Jean-Louis Bonnemain, Laboratoire 'Transport des Assimilats', Unité Mixte de Recherche CNRS 6161, Université de Poitiers, 40, av du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France
E-mail: jl.bonnemain@voila.fr
†Jean-François Chollet and Françoise Rocher contributed equally to the paper.
Contract/grant sponsor: Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux
(*Received 12 December 2003; revised version received 13 February 2004; accepted 25 March 2004*)
Published online 15 June 2004

© 2004 Society of Chemical Industry. *Pest Manag Sci* 1526–498X/2004/$30.00

is produced by several *Pseudomoniae*. It has very low oral toxicity for rats (>5000 mg kg^{-1}). Various Ascomycota, Basidiomycota and Deuteromycota are sensitive to this fungicide.[18] Although no longer commercialized, fenpiclonil was selected at this stage of the work because of the possibilities of adding a carboxyl group at various sites in the molecule.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Synthesis

Compounds with an acidic function on the benzene ring (Fig 1: **4a–c**) were prepared by the method of cyclization used for the synthesis of fenpiclonil. Compounds **7**, **9**, **11a** and **11b** were prepared from fenpiclonil.

*2.1.1 Synthesis of fenpiclonil derivatives with an acidic function on the benzene ring (Fig 1, **4a–c**)*

*2.1.1.1 Aromatic amines (Fig 1, **1a–c**).* 3-Aminobenzoïc acid (**1a**) and ethyl 2-aminobenzoate (**1b**) were obtained from Acros Organics (Noisy-le-Grand) and were used for the synthesis of the respective 2-chloronitriles.

Methyl 3-amino-2-chlorobenzoate (**1c**) was prepared from 2-chloro-3-nitrobenzoic acid in two steps. After esterifying the acidic group with thionyl chloride and methanol, the nitro group was reduced with stannous chloride (5 equiv) in absolute ethanol. The mixture was stirred at 70 °C for 30 min, cooled to room temperature, poured on ice and basified (pH ≈ 7) with aqueous sodium carbonate (250 g litre^{-1}). The compound was extracted three times with ethyl acetate. After washing the combined organic layers with brine (15 ml) and drying with anhydrous magnesium sulfate, the solvent was evaporated to provide **1c**, X=Cl, Y=$COOCH_3$, as an oil; yield: 91%; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 3.84 (s, 3H, CH_3), 4.41 (large s, 2H, NH_2), 6.65–7.25 (m, 3H, C_6H_3); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 51.70 (CH_3), 116.53 (C—Cl), 117.96, 119.25 and 126.35 (C—H), 130.28 (*C*—COO), 143.98 (C—N), 166.30 (C=O).

*2.1.1.2 Preparation of 2-chloronitriles (Fig 1, **2a–c**).*[19] To a solution of aromatic amine **1** (10 mmol) in acetic acid (3.5 ml), a mixture of hydrochloric acid (12 M) and water (0.3 ml) was added dropwise. After cooling to 0 °C, a solution of sodium nitrite (0.69 g; 11 mmol) in water (2.1 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 2 h at 0 °C. The resulting solution containing the diazonium salt was then added at 20 °C to a solution of acrylonitrile (2.15 g; 40 mmol) in acetone (1 ml). After warming to 30 °C, a solution of cuprous chloride (0.20 g, 2 mmol) in hydrochloric acid (12 M, 2.1 ml) was added dropwise. The mixture was warmed for 30 min at 40 °C, poured on ice and extracted with dichloromethane (3 × 25 ml). The combined organic layers were washed with hydrochloric acid (6 M, 2 × 20 ml) and water (2 × 20 ml), dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to give 2-chloronitriles (**2**) which were used without further purification.

2a, X=H, Y=COOH; yield: 79%; mp 110–116 °C decomp; ^{1}H NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 3.39 (d, 2H, CH_2, J 6.9 Hz), 5.30 (t, 1H, CH, J 6.9 Hz), 7.15–8.20 (m, 4H, C_6H_4), 11.04 (s large, 1H, COOH); ^{13}C NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 41.05 (CH_2), 43.23 (C—Cl), 117.19 (CN), 128.65, 128.97, 130.79 and 134.02 (C—H), 131.42 (*C*—COO), 134.61 (*C*—CH_2), 167.34 (C=O).

2b, X=$COOC_2H_5$, Y=H; yield: 63%; oil; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 1.39 (t, 3H, CH_3, J 7.1 Hz), 3.61 (d, 2H, CH_2, J 7.8 Hz), 4.35 (q, 2H, OCH_2, J 7.1 Hz), 4.98 (t, 1H, CH, J 7.8 Hz), 7.10–7.70 (m, 3H, H3, H4 and H5), 7.85–8.20 (m, 1H, H6); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 13.96 (CH_3), 41.50 (CH_2), 42.39 (*C*(CN)(Cl)), 61.13 (OCH_2), 116.77 (CN), 129.39 (C—COO), 128.23, 131.18, 132.40 and 132.88 (C—H), 135.36 (C—Cl), 166.47 (C=O).

2c, X=Cl, Y=$COOCH_3$; yield: 83%; oil; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 3.53 (d, 2H, CH_2, J 7.7 Hz), 3.93 (s, 3H, CH_3), 4.78 (t, 1H, CH, J 7.7 Hz), 7.20–7.65 (m, 2H, H4 and H5), 7.70–7.90 (m, 1H, H6); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 40.66 (CH_2 and *C*(CN)(Cl)), 52.51 (CH_3), 116.23 (CN), 126.85, 131.06 and 134.94 (C—H), 131.78, 132.82 and 133.18 (arom C), 165.85 (C=O).

*2.1.1.3 Preparation of cinnamonitriles (Fig 1, **3a–c**).*[20] To a solution of 2-chloronitrile (**2**, 14.3 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (THF; 10 ml) was added dropwise at room temperature a solution of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-5-ene (DBU; 4.6 g, 30 mmol) in anhydrous THF (34 ml). The mixture was stirred overnight, then hydrolyzed with water (15 ml). The aqueous phase was acidified to pH 2 using hydrochloric acid (2 M) only for **3a** and then was extracted with ethyl acetate (3 × 20 ml). The combined organic layers were washed with hydrochloric acid (2 M, 20 ml) and water (20 ml), dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to provide cinnamonitrile **3**. Compounds **3a** and **3b** were used without further purification and **3c** was purified by sublimation (110–130 °C; 0.05 mm Hg).

3a, X=H, Y=COOH; yield: 99%; mp 202–214 °C decomp; ^{1}H NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 6.25 (d, 1H, =CHCN, J 16.7 Hz), 7.20–8.30 (m, 5H, C_6H_4 and CH=), 10.71 (s large, 1H, COOH); ^{13}C NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 97.62 (=*C*HCN); 117.85 (CN), 128.35, 128.86, 131.03 and 131.51 (arom CH); 131.78 and 133.63 (arom C), 149.26 (CH=), 166.81 (C=O).

3b, X=$COOC_2H_5$, Y=H; yield: 96%; oil; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 1.40 (t, 3H, CH_3, J 7.0 Hz), 4.37 (q, 2H, CH_2, J 7.0 Hz), 5.78 (d, 1H, =CHCN, J 16.6 Hz), 7.15–8.10 (m, 4H, C_6H_4), 8.28 (d, 1H, CH=, J 16.6 Hz); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 13.78 (CH_3), 61.13 (CH_2), 98.45 (=*C*HCN), 117.43 (CN), 129.00 (*C*—COO), 126.82, 129.90, 130.55

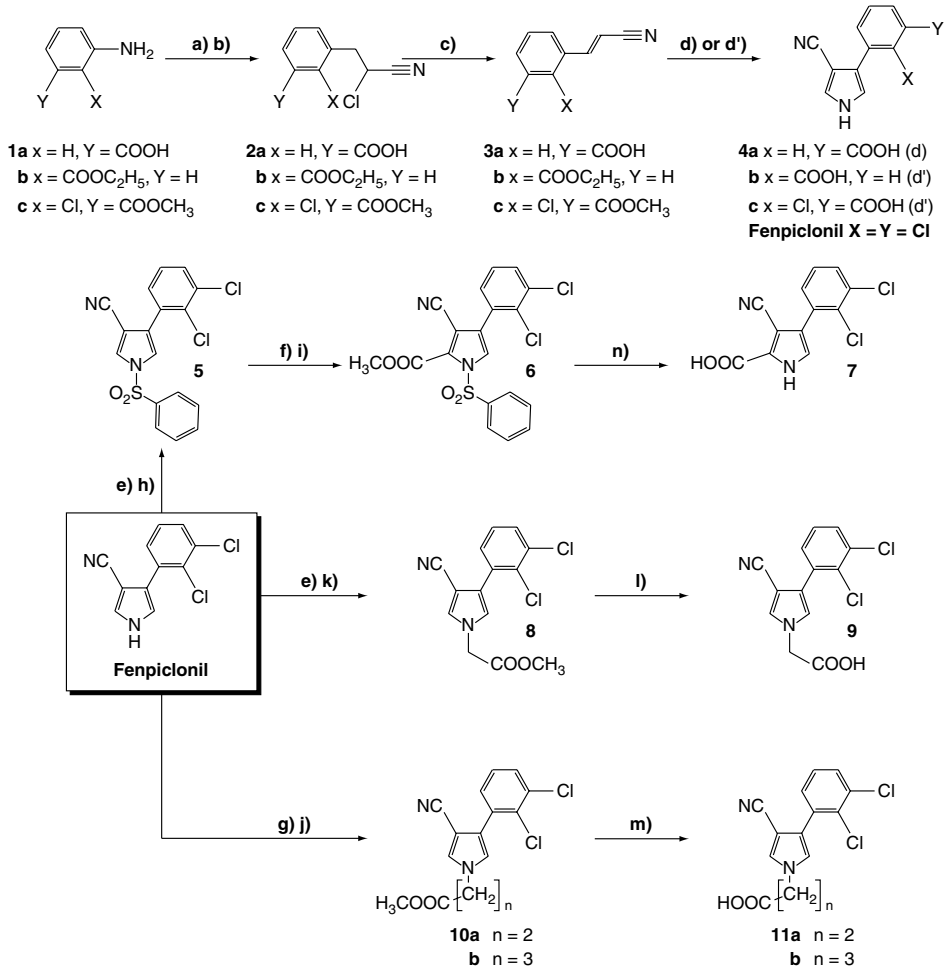


Figure 1. General reaction scheme: **a)** $NaNO_2/CH_3COOH$, HCl 12 M, H_2O/2.5 h, 0 °C; **b)** $CH_2{=}CHCN$/acetone/20 °C then CuCl/HCl 12 M/30 min, 40 °C; **c)** 1,8-diazabicyclo[5-4-0] undec-5-ene (DBU)/THF/15 h, 20 °C; **d)** tosylmethyl isocyanide (TosMIC), NaH 2.4 eq/diethyl ether, DMSO/1 h, 20 °C; **d')** same as **d)** but NaH 3.5 eq/3 h, 20 °C then 2 h, 34 °C; **e)** *n*-BuLi/THF/3 h, 0 °C; **f)** LDA/THF/1 h, −80 °C; **g)** CH_3ONa, CH_3OH/DMF/3 h, 20 °C; **h)** $ClSO_2C_6H_5$/2 h, 0 °C then 15 h, 20 °C; **i)** $ClCOOCH_3$; 5h, −80 °C then 15 h, −80 °C to 20 °C; **j)** $Br(CH_2)_nCOOCH_3$, NaI/DMF/n = 2, 24 h, 100 °C; n = 3, 10 h, 120 °C; **k)** $BrCH_2COOCH_3$/3 h, 0 °C then 15 h, 20 °C; **l)** LiI/DMF/18 h, reflux; **m)** NaOH 1.25 M in water/C_2H_5OH/1 h, 20 °C then 1 h, 60 °C; **n)** NaOH 8 M in water/THF/CH_3OH/reflux 48 h.

and 132.19 (arom CH), 134.79 (*C*—CH=), 149.53 (CH=), 165.76 (C=O).

3c, X=Cl, Y=$COOCH_3$; yield: 68%; mp 66–76 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 3.94 (s, 3H, CH_3), 5.96 (d, 1H, =CHCN, J 16,7 Hz), 7.15–8.15 (m, 4H, C_6H_3 and CH=); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 52.42 (CH_3), 100.18 (=*C*HCN), 117.07 (CN), 126.73, 129.36 and 132.52 (arom CH), 132.02, 132.25 and 133.18 (arom C), 145.80 (CH=), 165.46 (C=O).

2.1.1.4 Synthesis of phenylpyrroles (Fig 1, ***4a–c****).*[21] To a mixture of **3** (6 mmol), *p*-(tolylsulfonyl)methyl isocyanide (TosMIC, 1.17 g, 6 mmol), anhydrous dimethyl sulfoxide (5.5 ml) and anhydrous diethyl ether (10 ml) was added dropwise a suspension of sodium hydride (0.34 g, 14.4 mmol for **4a**, 0.50 g, 21 mmol for **4b** and **4c**) in anhydrous diethyl ether (25 ml for **4a**, 38 ml for **4b** and **4c**) at 20 °C. The mixture was stirred at 20 °C for 1 h (**4a**) or 3 h (**4b** and **4c**) and then warmed at 34 °C for 2 h (**4b** and **4c**). After cooling to room temperature, diethyl ether (20 ml) and water (20 ml) were added. The aqueous layer was acidified using hydrochloric acid (2 M, pH 2.0) and then extracted with ethyl acetate (3 × 15 ml). The ethyl acetate layers were combined, washed with water (6 × 20 ml), dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to give phenylpyrroles **4**.

4a, X=H, Y=COOH; yield: 65%; mp 236–246 °C decomp; ^{1}H NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 6.90–8.90 (m, 7H, H2, H5, C_6H_4 and NH or COOH), 11.99 (s large, 1H, NH or COOH); ^{13}C NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 89.44 (*C*—CN), 117.16 (CN), 124.26 (*C*—C_6H_4), 118.14, 126.65, 127.42, 128.23, 129.03 and 130.14 (CH), 131.48 and 133.63 (arom C), 167.22 (C=O).

4b, X=COOH, Y=H; yield: 63%; mp 77–89 °C decomp; ^{1}H NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 6.70–8.50 (m, 7H, H2, H5, C_6H_4 and NH or COOH), 11.76 (s large, 1H, NH or COOH); ^{13}C NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 92.22 (*C*—CN), 116.89 (CN), 125.30 (*C*—C_6H_4), 118.29, 127.01, 127.18, 129.42, 130.91 and 131.09 (CH), 132.29 and 132.67 (arom C), 169.13 (C=O).

4c, X=Cl, Y=COOH; yield: 52%; mp 158–170 °C decomp; ^{1}H NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 6.80–8.05 (m, 5H, H2, H5 and C_6H_3), 10.10 and 11.98 (2s large, 2H, NH and COOH); ^{13}C NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 92.55 (*C*—CN), 116.65 (CN), 122.53 (*C*—C_6H_3), 120.05, 126.92, 127.36, 128.86 and 133.60 (CH), 129.99, 133.60 and 134.11 (arom C), 167.58 (C=O).

2.1.2 Synthesis of a fenpiclonil derivative with an acidic function on the pyrrole ring (Fig 1, 7)

*2.1.2.1 3-Cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-*N*-phenylsulfonylpyrrole (Fig 1, **5**).* A solution of *n*-butyllithium in hexane (6.6 ml of 1.6 M solution, 10.05 mmol) was added dropwise at 0 °C to a solution of fenpiclonil (2.37 g, 10 mmol) in anhydrous degassed THF (30 ml). The mixture was stirred for 3 h at 0 °C, then benzenesulfonyl chloride (1.94 g, 11 mmol) was added at the same temperature. The mixture was stirred for an additional 2 h at 0 °C and overnight at room temperature, then poured into aqueous sodium bicarbonate (50 g litre^{-1}, 50 ml). The aqueous phase was extracted with dichloromethane (3 × 25 ml) and the combined organic layers were washed with aqueous sodium bicarbonate (50 g litre^{-1}, 40 ml), water (40 ml) and brine (40 ml). After drying and removing the solvent, the crude product was chromatographed on a column of silica gel using dichloromethane as eluant to give **5** as an oil which slowly crystallized on standing; yield: 85%; mp 80 °C; ^{1}H NMR (d_6 acetone) δ (ppm): 7.30–8.30 (m, 10H, H2, H5, C_6H_3 and C_6H_5); ^{13}C NMR (d_6 acetone) δ (ppm): 100.83 (*C*—CN), 114.43 (CN), 127.68 (*C*—C_6H_3), 122.31, 128.81, 129.14, 129.77, 131.35, 131.98 and 136.63 (CH), 132.54, 133.41, 134.51 and 138.57 (arom C).

*2.1.2.2 3-Cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-2-methoxycarbonyl-*N*-phenylsulfonyl pyrrole (Fig 1, **6**).*[22] A solution of *n*-butyllithium in hexane (1.8 ml of 1.6 M solution, 2.85 mmol) was added dropwise to diisopropylamine (0.3 g, 3 mmol) dissoved in THF (7 ml). The mixture was stirred at 0 °C for 15 min then cooled to −80 °C. A solution of **5** (1 g, 2.65 mmol) in degassed THF (7 ml) was added dropwise. After stirring at −80 °C for 1 h, methyl chloroformate (1.5 g, 16 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred at −80 °C for 5 h and at room temperature overnight. Saturated aqueous ammonium chloride (15 ml) and dichloromethane (15 ml) were then successively added. The aqueous phase was extracted with dichloromethane (2 × 15 ml) and the combined organic layers were washed with water (15 ml) and brine (15 ml). After removing solvent and then volatile impurities under vacuum (140 °C, 0.01 mm Hg), **6** was obtained as an oil which slowly crystallized on standing; yield: 87%; mp 115–116 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 3.88 (s, 3H, CH_3), 7.15–8.20 (m, 9H, H5, C_6H_3 and C_6H_5); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 52.62 (CH_3), 105.19 (*C*—CN), 112.25 (CN), 124.88 (*C*—C_6H_3), 126.73, 127.36, 128.52, 129.00, 129.48, 130.79 and 134.82 (CH), 131.60, 133.81 and 136.91 (arom C), 156.99 (C=O).

2.1.2.3 2-Carboxy-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-pyrrole (Fig 1, 7).[22] A mixture of **6** (1.3 g, 3 mmol), THF (100 ml) and methanol (300 ml) was treated with aqueous sodium hydroxide (8 M, 120 ml) and refluxed for 48 h. After cooling to room temperature, solvents were removed and the residue was taken up in water (400 ml). The aqueous layer was acidified using hydrochloric acid (12 M) and then extracted with ethyl acetate (3 × 50 ml). The combined organic layers were washed with water (2 × 10 ml), dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to give **7** as a solid which was purified by washing with dichloromethane (5 ml); yield: 70%; mp 247–249 °C decomp; ^{1}H NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 7.10–7.90 (m, H5 and C_6H_3), 13.06 and 13.40 (s and large s, 2H, NH and COOH); ^{13}C NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 96.96 (*C*—CN), 114.74 (CN), 125.60 (*C*—C_6H_3), 123.60, 128.11, 130.17 and 130.50 (CH), 128.41, 130.86, 132.59 and 133.48 (arom C), 159.82 (C=O).

2.1.3 Synthesis of N*-substituted fenpiclonil derivatives (Fig 1, **9** and **11**)*

*2.1.3.1 3-Cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-*N*-(1-methoxycarbonylmethyl)pyrrole **8**.* Fenpiclonil (2.37 g, 10 mmol) was lithiated with *n*-butyllithium as described in Section 2.1.2.1. A solution of methyl bromoacetate (2.29 g, 15 mmol) in degassed THF (20 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 3 h at 0 °C and overnight at room temperature. After cooling to 0 °C, cold water (50 ml) was added dropwise. The aqueous phase was extracted with dichloromethane (3 × 25 ml). The combined dichloromethane layers were washed with water (20 ml), dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to provide **8** as yellowish crystals; yield: 71%; mp 130 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 3.76 (s, 3H, CH_3), 4.68 (s, 2H, CH_2), 6.93 (d, 1H, H5, J 2.0 Hz), 7.15–7.50 (m, 4H, H2 and C_6H_3); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 50.77 (CH_2), 52.68 (CH_3), 94.36 (*C*—CN), 115.34 (CN), 123.87 (*C*—C_6H_3), 123.24, 127.12 and 129.48 (CH), 131.12, 133.24 and 133.57 (arom C), 167.43 (C=O).

2.1.3.2 N*-Carboxymethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole (**9**).*[23,24] A mixture of **8** (3.09 g, 10 mmol), lithium iodide (9.3 g, 57 mmol) and *N*,*N*-dimethylformamide (DMF; 300 ml) was refluxed for 18 h. The mixture was cooled to room temperature, diluted with water (300 ml), acidified using hydrochloric acid (2 M) and then extracted with

dichloromethane (3 × 50 ml). The combined organic layers were washed with water (3 × 30 ml), dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to provide **9** as a brown powder; yield: 61%; mp 192 °C; ^{1}H NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 4.88 (s, 2H, CH_2), 7.18 (d, 1H, H5, J 2.0 Hz), 7.25–7.85 (m, 4H, H2 and C_6H_3), 10.45 (large s, 1H, OH); ^{13}C NMR (d_6 DMSO) δ (ppm): 50.60 (CH_2), 92.40 (*C*—CN), 115.82 (CN), 122.23 (*C*—C_6H_3), 124.05, 127.81, 129.45, 129.90 and 130.85 (CH), 130.47, 132.76 and 133.96 (arom C), 169.40 (C=O).

*2.1.3.3 3-Cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-*N*-(2-methoxycarbonylethyl)pyrrole (**10a**) and 3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-*N*-(3-methoxycarbonylpropyl) pyrrole (**10b**).*[25] A solution of sodium methoxide in methanol (300 g litre^{-1}, 2 ml) was added dropwise to a solution of fenpiclonil (2.37 g, 10 mmol) in anhydrous DMF. The mixture was stirred at room temperature for 3 h and treated dropwise with a solution of methyl 3-bromopropionate (for **10a**) or methyl 4-bromobutyrate (for **10b**) (10 mmol) and sodium iodide (0.40 g, 2.7 mmol) in DMF (16 ml). The mixture was warmed at 100–105 °C for 24 h (**10a**) or at 120–125 °C for 10 h (**10b**). After cooling and addition of water (40 ml), the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 25 ml) and the combined organic layers were washed with water (10 ml), dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated. The crude products were chromatographed on a column of silica gel using chloroform + methyl acetate (9 + 1 by volume) as eluant.

10a, yield: 60%; mp 64 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 2.80 (t, 2H, CH_2, J 6.4 Hz); 3.67 (s, 3H, OCH_3), 4.24 (t, 2H, NCH_2, J 6.4 Hz), 6.95 (d, 1H, H5, J 2.3 Hz), 7.05–7.50 (m, 4H, H2 and C_6H_3); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 35.17 (CH_2), 45.37 (NCH_2), 51.73 (OCH_3), 93.35 (*C*—CN), 115.52 (CN), 123.51 (*C*—C_6H_3), 122.08, 126.97, 128.32, 129.18 and 129.30 (CH), 130.85 and 133.33 (arom C), 170.47 (C=O).

10b, yield: 58%; oil; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 1.85–2.50 (m, 4H, CH_2), 3.67 (s, 3H, OCH_3), 4.01 (t, 2H, NCH_2, J 6.6 Hz), 6.92 (d, 1H, H5, J 2.2 Hz), 7.05–7.55 (m, 4H, H2 and C_6H_3); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm): 25.89 (CH_2), 30.01 (CH_2CO), 49.07 (NCH_2), 51.43 (OCH_3), 93.29 (*C*—CN), 115.58 (CN), 123.57 (*C*—C_6H_3), 122.02, 127.00, 128.05, 129.21 and 129.33 (CH), 130.94, 133.39 and 133.48 (arom C), 172.29 (C=O).

2.1.3.4 N*-(2-Carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole (**11a**) and* N*-(3-carboxy-propyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole (**11b**).*[26] Aqueous sodium hydroxide (1.25 M, 21 ml) was added to a solution of ester **10** (10 mmol) in 95% ethanol (18 ml). The mixture was stirred at room temperature for 1 h and then warmed at 60 °C for an additional hour. After cooling and diluting with water (28 ml), the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 40 ml) and acidified using hydrochloric acid (2 M, pH 1–2). The acidic layer was extracted with dichloromethane (3 × 40 ml), dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to provide **11**.

11a, yield: 98%; mp 129–133 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3 + d_6$ DMSO) δ (ppm): 2.80 (t, 2H, CH_2, J 6.5 Hz), 4.26 (t, 2H, NCH_2, J 6.5 Hz), 7.06 (d, 1H, H5, J 2.3 Hz), 7.15–7.70 (m, 4H, H2 and C_6H_3), 7.80 (large s, 1H, OH); ^{13}C NMR ($CDCl_3 + d_6$ DMSO) δ (ppm): 35.17 (CH_2); 45.41 (NCH_2), 92,49 (*C*—CN), 115.43 (CN), 122.83 (*C*—C_6H_3), 122.17, 127.01, 128.68, 128.97 and 129.33 (CH), 130.56, 132.82 and 133.60 (arom C), 171.64 (C=O).

11b, yield: 91%; mp 121 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3 + d_6$ DMSO) δ (ppm): 1.70–2.45 (m, 4H, CH_2), 4.05 (t, 2H, NCH_2, J 6.6 Hz), 4.75 (large s, 1H, OH), 7.18 (d, 1H, H5, J 2.0 Hz), 7.30–7.90 (m, 4H, H2 and C_6H_3); ^{13}C NMR ($CDCl_3 + d_6$ DMSO) δ (ppm): 25.86 (CH_2), 30.34 (CH_2CO), 48.81 (NCH_2), 92.01 (*C*—CN), 115.79 (CN), 122.56 (*C*—C_6H_3), 122.56, 127.72, 129.27, 129.36 and 129.90 (CH), 130.35, 132.49 and 133.96 (arom C), 173.43 (C=O).

2.2 *In vitro* fungicidal activity on *Eutypa lata*

2.2.1 Fungal-growth conditions

The strain of *Eutypa lata* (Pers ex Fr) Tul & C Tul used in these experiments was isolated from a vine stock showing symptoms of eutypiosis. The strain was grown on a sterile culture medium solidified with agar (20 g litre^{-1}), containing malt extract (15 g litre^{-1}) and chloramphenicol (0.25 g litre^{-1}). This pathogenic fungus destroys wood, cambium and phloem.

2.2.2 Mycelium-growth assays

The effects of phenylpyrroles on mycelial growth were measured on cultures made in wells (35 or 55 mm diameter), containing the solid medium (as in Section 2.2.1). The media were autoclaved under 500 hPa for 15 min. Compounds were added during cooling at 50–55 °C at the desired concentration from a 100 mM aqueous stock solution. The inoculum consisted of a 3-mm diameter mycelial disk taken from a solid culture. The experiments were carried out in the dark at 20 °C. The diameter of the mycelium was measured daily in six identical wells for 7 and 21 days.

2.3 Tests of systemicity

2.3.1 Plant material

Castor bean seeds (*Ricinus communis* L cv Sanguineus), obtained from Ball-Ducrettet (Margencel, France), were placed in humid cotton-wool for 24 h at 27 (±1) °C prior to sowing in wet vermiculite. Seedlings were grown at 80 (±5)% RH and 27 (±1) °C in dim light (14 h photoperiod) and used 6 days after sowing.

2.3.2 Electrophysiological measurements

The hook region (ie the upper part of the hypocotyl) was severed from the base of the seedling and then fixed to the bottom of a Petri dish with inert adhesive paste (Terostat). Tissues were preincubated

in a standard medium containing calcium chloride (0.5 mM), magnesium chloride (0.25 mM), ethanol (20 ml litre^{-1}) and 2-[*N*-morpholino]ethanesulfonic acid (MES; 20 mM) as buffer (pH 5.0). After 1 h of preincubation, the tissues were incubated in the same solution without (control) or with compound **9** (0.25 mM). The reference electrode was bathed in this medium, and a glass microelectrode was inserted into a cell of the outer part of the cortical parenchyma. Trans-membrane potential difference (PD) measurements were repeated over a 400-min period. They were made in a Faraday cage, using equipment previously described.[27] In brief, the glass microelectrode (tip diameter <1 μm, tip resistance 15–20 MΩ) and the reference microelectrode (diameter 1 mm, filled with 3 M potassium chloride in 10 g litre^{-1} agar) were connected to an electrometer-amplifier (model M707, WP instruments, New-Haven, CT). The output signal of the amplifier was monitored with an oscilloscope (DM 64, Telequipment, Tektronix UK, London, UK) and a chart recorder (Kipp and Zonen, Delft, The Netherlands).

2.3.3 Sap collection and analysis[28,29]

The endosperm of seedlings was carefully removed without bending or crushing the cotyledons. These latter organs were preincubated for 30 min in a buffer solution containing magnesium chloride (0.25 mM) and calcium chloride (0.5 mM), then incubated in the same medium supplemented with compound **9** at 250 μM concentration. Thirty minutes or 2 h later according to the experiments, the hypocotyl was severed in the hook region for phloem exudation. The phloem sap was collected from the upper part of the hypocotyl maintained in the incubation solution and was stored in ice until analysis. To reduce evaporation, the sap was collected in a Plexiglas microcabinet laid out with wet filter paper. The buffers used were MES 20 mM (pH 5.0–6.5) and HEPES 20 mM (pH 4.6, 7.0 and 8.2). Buffers containing citrate could not be used at acidic pH due to their chelating effect toward cations and especially Ca^{++}. Due to the weak buffer properties of HEPES around pKa_1 (3.55), the stated pH value (4.6) was the mean of the initial pH of the incubation medium (pH 4.3) and that measured at the end of the experiment (4.9 or 5.0). The phloem sap was analyzed by HPLC after dilution with pure water. We employed reverse-phase chromatography using a Discovery C16 RP-amide column (length 250 mm, internal diameter 4.6 mm; Supelco, Bellefonte, PA) connected to a photodiode-array detector (218 nm), eluting with acetonitrile + water containing 1 ml litre^{-1} trifluoroacetic acid (1 + 1 by volume) at a flow rate of 0.8 ml min^{-1}.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Screening of the active and non-active derivatives

Measuring the short-term effect of fenpiclonil and the various acidic derivatives at 100 μM concentration on the mycelial growth of *E lata* (Fig 2), compounds **4a–c** had no biological activity, but the other derivatives inhibited the growth of the fungus by approximately 60%. After a three-week culture, compounds **11a, 11b** and especially **9** exhibited the greatest efficacy, despite being less active than fenpiclonil under our experimental conditions. Compound **9** at 50 μM concentration not only limited fungal growth (Fig 3)

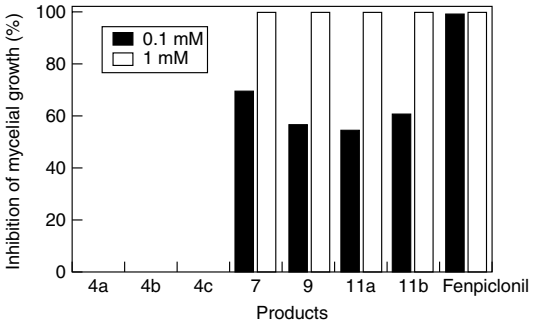


Figure 2. Short-term effect (7 days of culture) of fenpiclonil and its acidic derivatives on *Eutypa lata* mycelial growth (mean of six wells, SD were negligible).

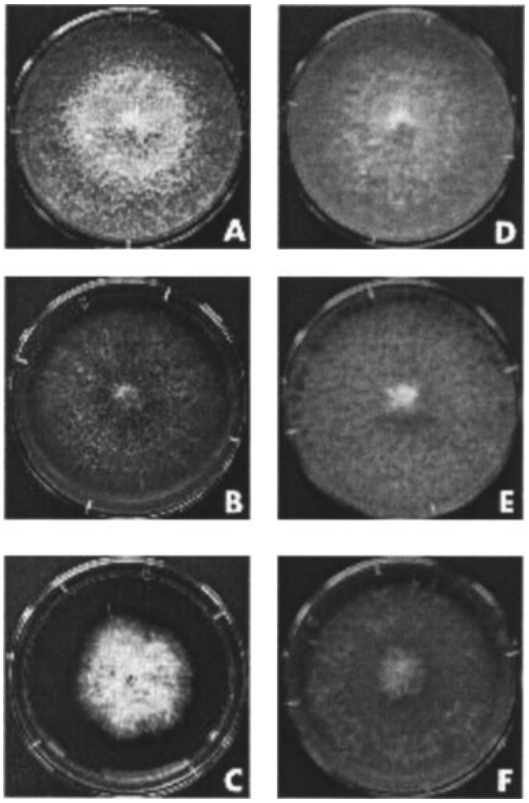


Figure 3. Long-term effect (21 days of culture) of fenpiclonil (A, B, C) and compound **9** (D,E,F) on *Eutypa lata* mycelial growth. The products were used at 0 mM (A, D), 10 μM (B, E) and 50 μM (C, F) concentration. Note the mycelium necrosis around the inoculum in B and F. The experiment was repeated six times with similar results.

but also destroyed the oldest part of the mycelial colony around the inoculum disk. These effects became increasingly tenuous at lower doses. At 10 μM, biological activity was no longer noted, whereas at the same concentration, fenpiclonil exhibited approximately the same effect as compound **9** at 50 μM.

The biological effect of the various xenobiotics must be influenced in part by their capacity to be taken up by the fungus. Fenpiclonil (log $K_{ow} = 3.9$) is rapidly accumulated to high levels in mycelial suspensions of *Fusarium sulphureum* Schlecht, particularly into mycelial lipids.[30] However, with the exception of compound **7**, our acidic derivatives are lipophilic only in their undissociated form (Fig 4). As a consequence, their uptake depends on the pH of the external medium. The pH of the culture medium of *E lata* ranges from 5.0 to 5.5. Under these conditions, the undissociated permeating form is predominant (compounds **11a** and **11b**) or is poorly represented (compounds **7** and **9**). This means that other factors determined biological activity.

3.2 Predicting phloem mobility of fenpiclonil derivatives and evaluation of systemicity of compound 9

In the last decade, models based on the physico-chemical properties of pesticides have been put forward to predict their phloem mobility.[1,4,6] With the exception of a few products, including xenobiotics whose transport is carrier-mediated,[31] much of the data on xenobiotic transport in plants fits well into these schemes.[4,6] Phloem mobility for fenpiclonil and its analogues was predicted using the Kleier map (Table 1, Fig 5).[6] The fenpiclonil acidic derivatives range into the areas of the moderately phloem mobile compounds though the lipophilicity of fenpiclonil itself appears inconsistent with phloem systemicity.

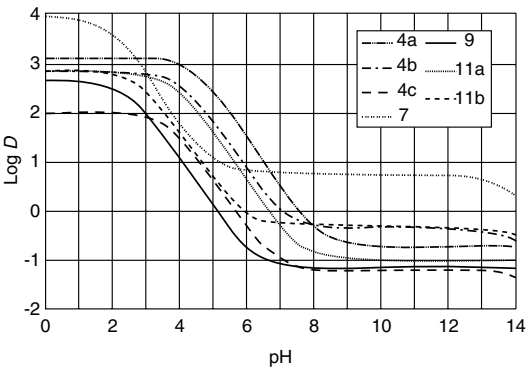


Figure 4. Dependence of log *D* of the various acidic derivatives on pH (calculated using ACD Log *D* v 7.0 software). The partition coefficient for dissociative mixtures, log *D*, is defined as follows:

$$\log D = \log\left(\frac{\sum a_i^{org}}{\sum a_i^{H2O}}\right)$$

where a_i^{H2O} is the concentration of *i*-th microspecies in water; a_i^{org} is the concentration of *i*-th microspecies in organic phase.

Table 1. Predicted pKa and log K_{ow} values of the products using ACD Log D v 7.0 software

Product	pKa	log K_{ow}
4a	4.01	2.82
4b	3.68	1.98
4c	2.75	2.85
7	1.83	3.93
9	2.44	2.63
11a	3.81	2.80
11b	4.44	3.07
Fenpiclonil	13.63	3.88

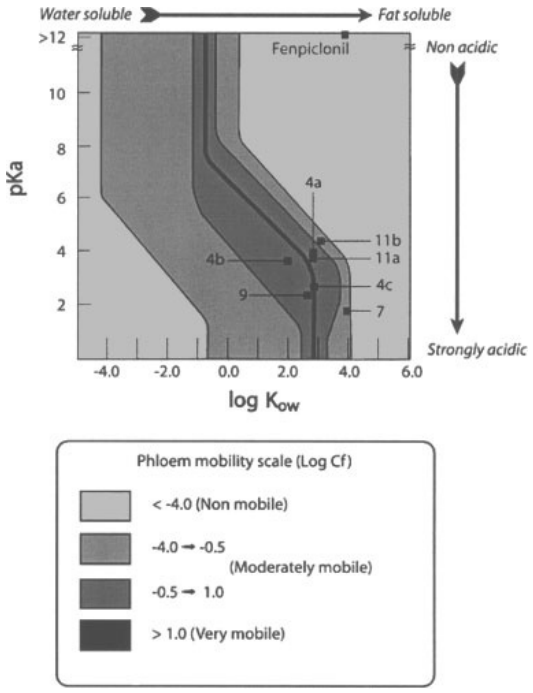


Figure 5. Prediction of phloem mobility of fenpiclonil and its acidic derivatives using the Kleier map (log C_f as a function of log K_{ow} and pKa). Log K_{ow} and pKa were calculated using ACD Log *D* v 7.0 software (see Table 1). Plant parameters are given in Kleier.[1]

We have studied the phloem mobility of compound **9** because it is located in the moderately phloem-mobile area. To evaluate phloem mobility, we used the castor bean system, a biological model widely employed in the recent past to study phloem sap composition and transport properties of nutrients.[28,32,33] The castor bean is also very useful to study the phloem mobility of xenobiotics.[8,29] However, this model is reliable only if the xenobiotics tested are not phytotoxic in these short-term experiments, particularly if they do not depolarize the transmembrane PD. Values of the transmembrane PD are a good indicator of the activity of plasma membrane proton-pumping ATPase which energizes secondary translocation of nutrients and maintains acidic molecule influx through the lipid bilayer.[4,6,10] Compound **9** has no depolarizing effect

on the transmembrane PD (Fig 6). On the one hand, the transmembrane PD of subepidermal cells of the hook is close to −100 mV both in the control and that incubated with compound **9** at 250 μM immediately after isolation of the upper part of the young plant (cotyledons and hook). On the other hand, hyperpolarization of transmembrane PD which takes place during the phenomenon of ageing is the same in the two sets. The transmembrane PD reaches values close to −150 mV after 5 h of incubation. These results should be compared with those obtained with fenpiclonil. Although this fungicide enhances the accumulation of tetraphenylphosphonium bromide (TPP^+) in *F sulphureum* cells, it does not seem to affect the functioning of the plasma membrane. The increased accumulation of TPP^+ caused by fenpiclonil probably reflects changes in potentials over membranes of intracellular organelles rather than that of the plasma membrane.[30] Our results indicate that the *Ricinus* system is suitable for testing the phloem systemicity of fenpiclonil acid derivatives.

When *Ricinus* cotyledons were incubated in the presence of 250 μM fenpiclonil, the fungicide was not detected in the phloem sap.[29] By contrast, when cotyledons were incubated in an acidic solution with compound **9** at the same concentration, the derivative was clearly found in the phloem sap (Fig 7). These data are consistent with the predictions made above (Fig 5). Furthermore, in the latter experiment, fenpiclonil, the parent molecule, was not detected in the phloem sap, indicating that compound **9** does not undergo loss of the *N*-carboxymethyl group to any significant extent in the sieve element–companion cell complex. In a recent past, it has been observed that the fungicidal activity of some *N*-substituted derivatives of the 3-cyano-4-phenylpyrroles was dependent on their ability to release the parent compound.[17] If this is also relevant to our acidic derivatives (in that case the products could be degraded by the fungus), then compound **9** can be considered as a phloem-mobile profungicide.

As *Ricinus* is a symplastic–apoplastic loader,[32] compound **9** molecules moving in the sieve-tubes may be taken up from the phloem apoplast or may come from the mesophyll and especially the cotyledon epidermis via the symplastic route, but in the latter case, the xenobiotic must also cross the plasma membrane. Time-course experiments have indicated that compound **9** concentration in the phloem sap increased linearly for a few hours before reaching a

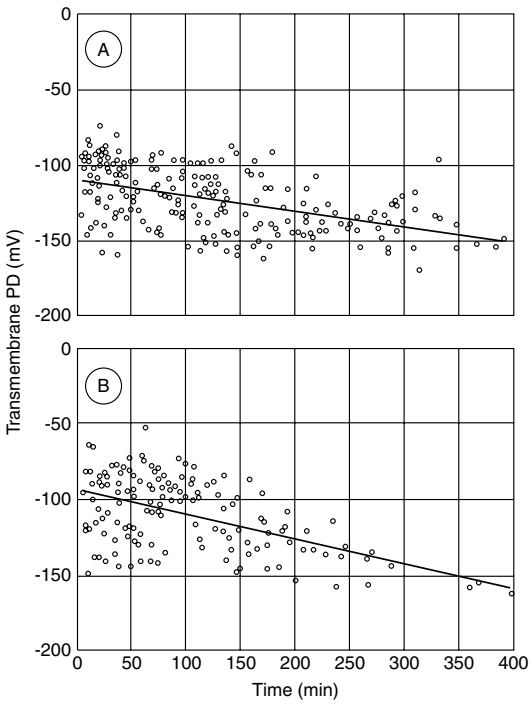


Figure 6. Effect of compound **9** on the transmembrane PD of subepidermal cells of *Ricinus* hook. A: control, the tissues were incubated in the standard medium (pH 5.0); B: treated set, the tissues were incubated in the same solution with compound **9** at 250 μM concentration. Linear regression was calculated with Kaleidagraph v 3.5 software.

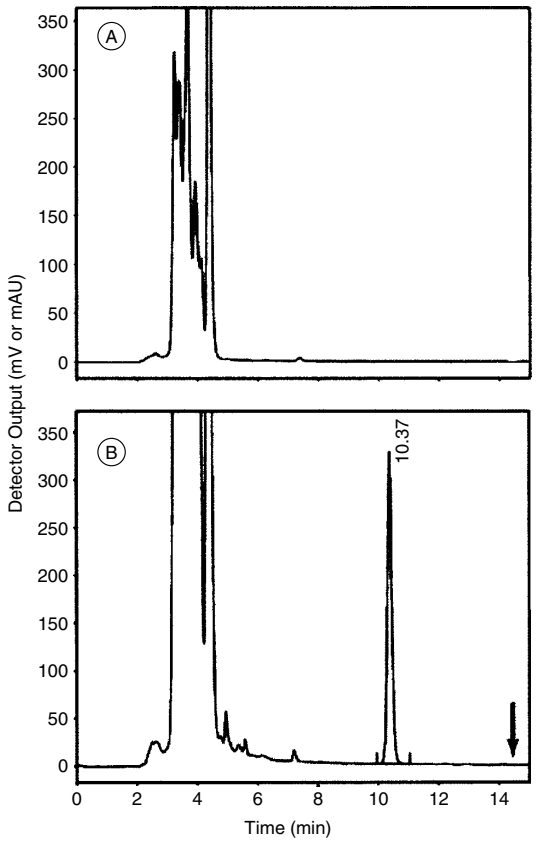


Figure 7. *Ricinus* sap analysis by HPLC. A: control, the cotyledons were incubated in the standard medium (pH 5.0); B: treated set, *Ricinus* cotyledons were incubated in the same solution with compound **9** (RT: 10.37 min) at 250 μM concentration. The arrow indicates the retention time of fenpiclonil.

plateau (Fig 8A and B). Also the xenobiotic loading was much faster and greater under the most acidic incubation condition (Fig 8B). This strongly indicates that compound **9** uptake is pH-dependent and Fig 9 shows that this is indeed the case. The fungicide derivative was not taken up at neutral and alkaline pH values. Its concentration in the phloem sap was clearly correlated to the percentage of the undissociated form in the incubation solution and was maximal at the most acidic pH value. Thus compound **9** uptake is due to passive transport of the lipophilic form through the plasma membrane. Subsequent dissociation, especially inside the symplastic phloem compartment, to the poorly permeating anion leads to long-distance transport, as already described for acidic herbicides.[1,4,6,8,10] Compound **9** concentration in the phloem sap was 0.15- and 0.40-fold that of the incubation solution buffered at pH 5.0 and 4.6 respectively. These values were much lower than those already noted when testing acidic herbicides, especially 2,4-D (10-fold)[8,29] which is taken up by two mechanisms, the ion-trap mechanism and an active carrier-mediated process.[11,12] However, they were similar to that found in studies of the phloem mobility of the herbicide glyphosate (0.2-fold) under similar experimental conditions.[29]

4 CONCLUSION

A series of derivatives of fenpiclonil was synthesized containing a carboxyl group at various sites on the benzene or pyrrole rings. Taking into account their physico-chemical properties, all these acidic derivatives were predicted to be moderately phloem-mobile but the group of *N*-substituted fenpiclonil derivatives, particularly *N*-carboxymethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole (compound **9**), received special attention because it exhibited some activity on *E lata*, a pathogenic fungus located in the vascular system of various plant species.

Systemicity tests using the *Ricinus* system demonstrated that, unlike fenpiclonil, compound **9** does move in the phloem without being degraded in detectable amounts. This indicates that this derivative is relatively stable, which facilitates export out of the leaf tissues and long-distance transport within the plant. In addition, the close correlation between the concentration of compound **9** in the phloem sap and the concentration of the permeating (ie undissociated) form of the molecule in the external medium indicates that systemicity is due to the ion-trap mechanism.

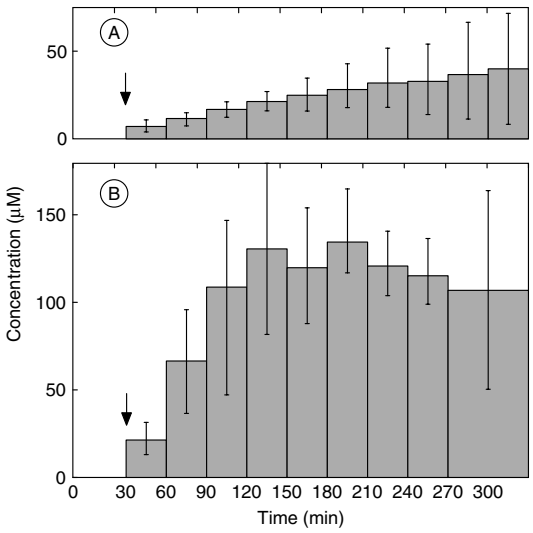


Figure 8. Time course of compound **9** concentration in phloem sap of *Ricinus*. At time 0, compound **9** at 250 µM concentration was added to the standard medium buffered at (A) pH 5.0 or (B) 4.6. The hook was severed at time 30 min (arrow). Mean of six sets of six plants ± SD (A); mean of five sets of three plants ± SD (B).

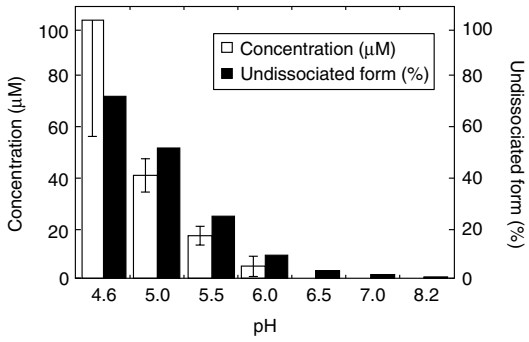


Figure 9. Concentration of compound **9** (applied at 250 µM concentration to the external solution) in phloem sap of *Ricinus* as a function of the pH of the incubation medium and the percentage of its undissociated form in this medium. The sap was collected during the third and fourth hours of incubation. Mean of eight sets of 3 plants (pH 4.6) or 3 sets of 3 plants (other pH values) ± SD.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux for the financial support of this work. The authors are indebted to two anonymous referees for constructive criticism.

REFERENCES

1 Kleier DA, Phloem mobility of xenobiotics. I. Mathematical model unifying the weak acid and intermediate permeability theories, *Plant Physiol* **86**:803–810 (1988).
2 Hsu FC, Kleier DA and Melander WR, Phloem mobility of xenobiotics. II. Bioassay testing of the unified mathematical model. *Plant Physiol* **86**:811–816 (1988).
3 Bromilow RH, Chamberlain K and Evans AA, Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicides. *Weed Sci* **38**:305–314 (1990).
4 Bromilow RH, Chamberlain K and Evans AA, Molecular structure and properties of xenobiotics in relation to phloem translocation, in *Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation*, ed by Bonnemain JL, Delrot S, Lucas WJ and Dainty J, Quest Editions, Presses Academiques, Nantes, pp 332–340 (1991).
5 Grimm E, Grube A, Jahnke S and Neumann S, Retention of xenobiotics along the phloem path. *Planta* **197**:11–18 (1995).

6 Kleier DA, Grayson BT and Hsu FC, The phloem mobility of pesticides. *Pestic Outlook* **9**:26–30 (1998).
7 Tyree MT, Peterson CA and Edgington LV, A simple theory regarding ambimobility of xenobiotics with special reference to the nematicide, oxamyl. *Plant Physiol* **63**:367–374 (1979).
8 Rigitano RLO, Bromilow RH, Briggs GG and Chamberlain K, Phloem translocation of weak acids in *Ricinus communis*. *Pestic Sci* **19**:113–133 (1987).
9 Bromilow RH and Chamberlain K, Designing molecules for systemicity, in *Mechanisms and regulation of transport process*, ed by Atkin RK and Clifford DR, Monograph 18, British Plant Growth Regulator Group, Bristol, pp 113–128 (1989).
10 Delrot S and Bonnemain JL, Absorption et migration des herbicides, in *Les herbicides, mode d'action et principes d'utilisation*, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, pp 51–77 (1991).
11 Kasai F and Bayer DE, Quantitative evaluation of the weak acid hypothesis as the mechanism for 2,4-D absorption by corn root protoplasts. *Nihon Noyaku Gakkaishi (J Pestic Sci)* **16**:163–170 (1991).
12 Chen L, Ortiz-Lopez A, Jung A and Bush DR, ANT1, an aromatic and neutral amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **125**:1813–1820 (2001).
13 Edgington LV, Structural requirements of systemic fungicides. *Annu Rev Phytopathol* **19**:107–214 (1981).
14 Leroux P, Delorme R and Gaillardon P, Évolution des produits phytosanitaires à usages agricoles II—Les fongicides. *Phytoma* **545**:8–15 (2002).
15 Zaki AI, Zentmyer GA and Le Baron HM, Systemic translocation of ^{14}C-labeled metalaxyl in tomato, avocado and *Persea indica*. *Phytopathology* **71**:509–514 (1981).
16 Nevill D, Nyfeler R and Sozzi D, CGA 142 705: a novel fungicide for seed treatment, in *Proc Brighton Crop Prot Conf—Pests Dis*, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp 65–72 (1988).
17 Nyfeler R and Ackermann P, Phenylpyrroles, a new class of agricultural fungicides related to the natural antibiotic pyrrolnitrin, in *Synthesis and chemistry of agrochemicals* III, ed by Baker DR, Fenyes JG and Steffens JJ, American Chemical Society, Washington, DC, pp 395–404 (1992).
18 Gehmann K, Nyfeler R, Leadbeater AJ, Nevill D and Sozzi D, CGA 173 506: a new phenylpyrrole fungicide for broad-spectrum disease control, in *Proc Brighton Crop Prot Conf—Pests Dis*, BCPC, Farnham, Surrey, UK, p 399 (1990).
19 Ackermann P, Ehrenfreund J, Nyfeler R and Martin P, Mikrobizide mittel, Eur Pat Appl EP 0 310 558 (1989).
20 Wollweber D and Brandes W, 1-Aminomethyl-3-(2-fluor-3-chlorphenyl)-4-cyano-pyrrol-Derivate, Eur Pat EP 0 327 977 (1989).
21 Froyd JD and Smith DB, Method of controlling phytopathogenic fungi, Eur Pat Appl EP 0 358 047 (1990).
22 Gribble GW, Keavy DJ, Davis DA, Saulnier MG, Pelcman B, Barden TC, Sibi MP, Olson ER and Belbruno JJ, Syntheses and Diels–Alder cycloaddition reactions of 4*H*-furo[3,4-b] indoles. A regiospecific Diels–Alder synthesis of ellipticine. *J Org Chem* **57**:5878–5891 (1992).
23 Dean PDG, Halogenolysis of methyl glycyrrhetate with lithium iodide–dimethylformamide. *J Chem Soc* 6655 (1965).
24 McMurry JE and Wong GB, An improved method for the cleavage of methyl esters. *Synth Commun* **2**:389–394 (1972).
25 Van Reet G, Heeres J and Wals L, 1-(ß-Aryl)-äthyl-1H-1,2,4-triazolketale und ihre Salze, Verfahren zu ihrer Herstellung und fungizide Mittel und pflanzenwuehsregulierende Mittel, Ger Offen DE 2 551 560 (1976).
26 Gershon H, Shapira J, Meek JS and Dittmer K, The syntheses and microbiological properties of acetylenic amino acids—Propargyl glycine and 2-amino-3-methyl-4-pentynoic acid. *J Am Chem Soc* **76**:3484–3486 (1954).
27 Mounoury G, Delrot S and Bonnemain JL, Energetics of threonine uptake by pod wall tissues of *Vicia faba* L. *Planta* **161**:178–185 (1984).
28 Kallarackal J, Orlich G, Schobert C and Komor E, Sucrose transport into the phloem of *Ricinus communis* L seedlings as measured by the analysis of sieve-tube sap. *Planta* **177**:327–335 (1989).
29 Delétage-Grandon C, Chollet JF, Faucher M, Rocher F, Komor E and Bonnemain JL, Carrier-mediated uptake and phloem systemy of a 350-Dalton chlorinated xenobiotic with an α-amino acid function. *Plant Physiol* **125**:1620–1632 (2001).
30 Jespers Ad BK, Davidse LC and De Waard MA, Interference of the phenylpyrrole fungicide fenpiclonil with membranes and membrane function. *Pestic Sci* **40**:133–140 (1994).
31 Wright KM and Oparka KJ, Physicochemical properties alone do not predict the movement and compartmentation of fluorescent xenobiotics. *J Exp Bot* **45**:35–44 (1994).
32 Orlich G and Komor E, Phloem loading in *Ricinus* cotyledons: sucrose pathways via the mesophyll and the apoplasm. *Planta* **187**:460–474 (1992).
33 Schobert C and Komor E, The differential transport of amino acids into the phloem of *Ricinus communis* L seedlings as shown by the analysis of sieve-tube sap. *Planta* **177**:342–349 (1989).

2 - ACIDIC DERIVATIVES OF THE FUNGICIDE FENPICLONIL : EFFECT OF ADDING A METHYL GROUP TO THE *N*-SUBSTITUTED CHAIN ON SYSTEMICITY AND FUNGICIDAL ACTIVITY

Pest Management Science

Pest Manag Sci **61**:377–382 (2005)
DOI: 10.1002/ps.977

Acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil: effect of adding a methyl group to the *N*-substituted chain on systemicity and fungicidal activity

Jean-François Chollet,[1†] Françoise Rocher,[1†] Cyril Jousse,[1,2]
Céline Delétage-Grandon,[2] Georges Bashiardes[1] and Jean-Louis Bonnemain[2*]

[1]*Laboratoire ≪Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles≫, Unité Mixte de Recherche CNRS 6514, 40, av du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France*
[2]*Laboratoire ≪Transport des Assimilats≫, Unité Mixte de Recherche CNRS 6161, 40, av du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France*

Abstract: A new acidic derivative of the fungicide fenpiclonil was synthesized containing a methyl group on the alpha-position of the carboxyl function of *N*-carboxymethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole. The phloem mobility of the resulting *N*-(1-carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole was comparable with that of the former compound, but was higher at external pH 5.0. Unlike the derivatives previously synthesized, it was comparable with fenpiclonil in its fungicidal activity against the pathogenic fungus *Eutypa lata*.
© 2004 Society of Chemical Industry

Keywords: phenylpyrroles; fenpiclonil; acidic derivatives; systemicity; phloem mobility; antifungal activity; *Eutypa lata*

1 INTRODUCTION

The development of fungicides that can be translocated downward in the phloem to control root or vascular pathogens has long been needed.[1] Unlike several herbicides (especially auxins, glyphosate, sulfonylureas, imidazolinones) that are phloem mobile, the so-called 'systemic' fungicides are mobile only within the apoplastic compartment.[1,2] The phloem mobility of these moderately lipophilic xenobiotics is either undetectable or minute. Attempts to derivatize fungicides to make them phloem mobile have generally had the discouraging consequence of decreasing their biological activity.[1,3] However, two derivatives of cymoxanil containing a free carboxyl group, a moiety which has been shown to confer phloem systemicity, exhibit high biological activity against *Peronospora parasitica* Fr.[4] With one known exception,[2] this incompatibility between induced phloem mobility and biological activity also affects the insecticide–nematicide group.[2,3]

As reported recently,[5] the fungicide fenpiclonil was used as a model molecule because of the possibilities of adding a carboxyl group at various sites on the benzene or pyrrole rings. Using the mathematical model of Kleier,[3,6] all these acidic analogues were predicted to be phloem-mobile. However, only the group of *N*-substituted derivatives exhibited some long-term fungicidal activity, particularly *N*-carboxymethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole (compound **2a**, Fig 1), ie the compound with the shortest *N*-chain. The phloem mobility of this xenobiotic was investigated and it was shown that its concentration in the sieve tube sap was correlated with the percentage of the undissociated form of the molecule (predicted using ACD LogD v 7.0 software) in the apoplastic incubation solution.

According to the predictions using the ACD LogD software, the second group of *N*-substituted derivatives (**11a**, Fig 1) also exhibits a good profile for phloem systemicity (see Fig 4 in reference 5), taking into account the high percentage of its undissociated form at apoplastic pH values (pH 5.0–6.0). However the fungicidal activity of this group is less than that of compound **2a**. Another strategy to modulate lipophilicity and dissociation could be to insert a lipophilic substituent on the carbon adjacent to the acidic function. The

* Correspondence to: Jean-Louis Bonnemain, Laboratoire ≪Transport des Assimilats≫, Unité Mixte de Recherche CNRS 6161, Université de Poitiers, 40, av du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France
E-mail: jl.bonnemain@voila.fr
†These authors contributed equally to the paper
Contract/grant sponsor: Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux
(*Received 16 June 2004; revised version received 16 August 2004; accepted 27 August 2004*)
Published online 10 November 2004

© 2004 Society of Chemical Industry. *Pest Manag Sci* 1526–498X/2004/$30.00

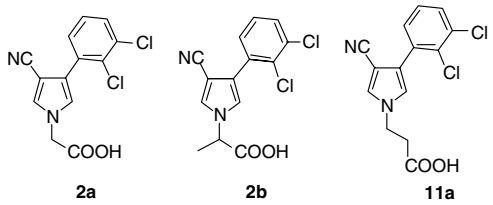


Figure 1. Acidic derivatives of fenpiclonil exhibiting a good profile for phloem systemicity.

present paper describes the synthesis and biological properties of *N*-(1-carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Synthesis

This proceeds in two stages: obtaining an ester derivative and hydrolysis of this to obtain the carboxylic acid derivative.

The synthesis of compound **2a** (compound **9** of reference 5) has been described previously.[5]

*2.1.1 3-Cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-*N*-(1-methoxycarbonylethyl)pyrrole (Fig 2, **1b**)*

Fenpiclonil (2.37 g, 10 mmol) dissolved in anhydrous degassed tetrahydrofuran (THF; 30 ml) was lithiated by a dropwise addition of a solution of *n*-butyllithium in hexane (1.6 M, 6.6 ml; 10.05 mmol). The mixture was stirred for 3 h at 0 °C. Methyl 2-bromopropionate (2.5 g, 15 mmol) in degassed THF (20 ml) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 h at 0 °C followed by 15 h at 60 °C. After cooling to 0 °C, cold water (50 ml) was carefully added dropwise. The aqueous phase was extracted with dichloromethane (3 × 25 ml). The combined dichloromethane layers were washed with water (20 ml), dried over magnesium sulfate and evaporated to provide **1b** as an oil. The product was then used without further purification. Yield: 90%; ^{1}H NMR(deuterochloroform), δ (ppm): 1.75 (d, 3H, CH_3, J 7.3 Hz), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 4.83 (q, 1H, CH, J 7.3 Hz), 7.00 (d, 1H, H5, J 2.3 Hz), 7.10–7.55 (m, 4H, H2 and C_6H_3); ^{13}C NMR (deuterochloroform), δ (ppm): 18.19 (CH_3), 52.92 (OCH_3), 57.61 (CH), 94.12 (*C*–CN), 115.52 (CN), 123.75 (*C*–C_6H_3), 121.45, 127.15, 127.51 and 129.51 (arom CH); 131.18, 133.39 and 133.66 (arom C), 170.14 (C=O); IR, ν (cm^{-1}): 3150, 1410 (pyrrole), 3060, 1590, 795, 710 (C_6H_3 1′, 2′, 3′-trisubstituted), 2220 (CN), 1750 (C=O), 1215, 1160 (COC); MS (EI), *m*/*z*: 322 (M^+), 34%; 263, 100%; 228, 6%; 192, 11%; 138, 6%.

2.1.2 N-*(1-Carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole (Fig 2, **2b**)*[7,8]

Compound **1b** (3.37 g, 10 mmol) and lithium iodide (9.3 g, 57 mmol) were refluxed in dimethylformamide (300 ml) for 18 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with water (300 ml), acidified (pH ≈ 3) using hydrochloric acid (2 M), and then extracted with dichloromethane (3 × 100 ml). The organic phase was washed with water (3 × 40 ml), dried over anhydrous magnesium sulfate, and the solvents removed under reduced pressure to give **2b** as an oil which slowly crystallized. Purification was achieved by washing the product with dichloromethane (50 ml) and drying under vacuum. The purity of the compound was verified using HPLC (Discovery C16 RP-amide column 250 × 4.6 mm (Supelco, Bellefonte, PA), eluting with acetonitrile + water containing 1 ml litre^{-1} trifluoroacetic acid (1 + 1 by volume), flow 0.8 ml min^{-1}, detection wavelengh 218 nm). Yield: 52%; mp 181 °C; log K_{ow} 2.98, p*K*a 2.53 (calculated using ACD log *D* v 8.0 software); ^{1}H NMR (hexadeuterodimethyl sulfoxide), δ (ppm): 1.72 (d, 3H, CH_3, J 7.3Hz), 5.13 (q, 1H, CH, J 7.3Hz), 7.30–8.30 (m, 6H, H2, H5, C_6H_3, OH)); ^{13}C NMR (hexadeuteroacetone), δ (ppm): 17.78 (CH_3), 57.16 (CH), 92.16 (*C*–CN), 116.00 (CN), 122.47 (*C*–C_6H_3), 122.14, 128.05, 129.33, 129.63 and 130.14 (arom CH), 130.35, 132.61 and 134.02 (arom C), 171.70 (C=O); IR, ν (cm^{-1}): 3300-2500 (OH), 3130, 1410 (pyrrole), 3060, 1587, 810, 785, 715 (C_6H_3 1′, 2′, 3′-trisubstituted), 2220 (CN), 1740 (C=O); MS (EI), *m*/*z*: 236, 100%; 201, 35%; 174, 39%; 166, 27%; 138, 18%; 100, 25%; 83, 31%.

2.2 Tests of systemicity

2.2.1 Plant material

Castor bean seedlings (*Ricinus communis* L cv Sanguineus), obtained from Ball-Ducrettet (Margencel, France), were used 6 days after sowing, as described previously.[5]

2.2.2 Electrophysiological measurements

Transmembrane potential difference (PD) measurements of subepidermal cells in *Ricinus* hook were made according to the method previously described.[5,9]

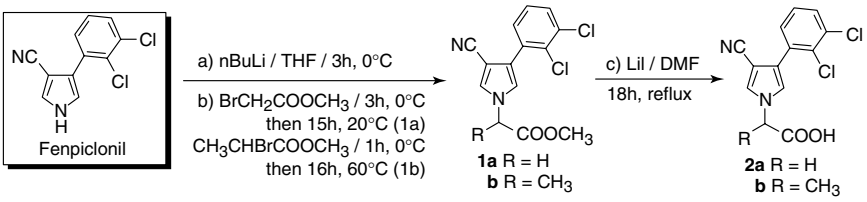


Figure 2. Reaction scheme for the synthesis of *N*-(1-carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole (compound **2b**).

2.2.3 Sap collection and analysis

Cotyledons were incubated in a buffered solution supplemented with the fenpiclonil acidic derivative and the phloem sap was collected from the upper part of the *Ricinus* seedlings according to the methods already described.[5,10] Young *Ricinus* cotyledons isolated from endosperm are very sensitive to environmental parameters:[5] at pH 4.5, citrate cannot be used as a buffer owing to its chelating effect toward Ca^{++}; in the absence of xenobiotics, a too acidic incubation medium (pH 4.0) inhibits phloem sap exudation whatever the buffer used. At pH 4.5, in the presence of HEPES (20 mM) used as a buffer, compound **2b** at 250 μM also altered phloem sap exudation. Consequently, the fenpiclonil derivative was used at 100 μM in these experiments. The phloem sap was analyzed by HPLC.

2.3 *In vitro* fungicidal activity against *Eutypa lata*

2.3.1 Fungal growth conditions

The effect of compound **2b** was studied on the strain (ELJFC 02) of *Eutypa lata* (Pers ex Fr) Tul & C Tul used previously.[5] This pathogenic fungus, which destroys the wood and phloem of vine stocks, was grown on a sterile culture medium solidified with agar (20 g litre^{-1}), containing malt extract (15 g litre^{-1}) and chloramphenicol (0.25 g litre^{-1}).

2.3.2 Mycelium growth assays

The effects of compound **2b** on mycelial growth were measured on cultures made in 55 mm diameter wells.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Predicting phloem mobility of compound 2b and evaluation of its systemicity

Phloem mobility for compound **2b** (p*K*a 2.53, log K_{ow} 2.98) was predicted using the model of Bromilow *et al*[11] and the mathematical model of Kleier.[3] In both models, the acidic fenpiclonil derivative ranged into the areas of moderately phloem mobile compounds (Fig 3). The predictions are almost the same as those for compound **2a** (p*K*a 2.44, log K_{ow} 2.63), the physicochemical properties of both acidic derivatives being nearly the same.

Before evaluating the phloem systemicity of compound **2b** in the *Ricinus* system, its effect on the activity of the plasma membrane proton-pumping ATPase (PM H^+-ATPase) was studied. This intrinsic master enzyme generates an electrochemical proton gradient across this membrane[12] and is indirectly involved in maintaining acidic molecule influx through the lipidic bilayer.[13] Values of transmembrane PD are a good indicator of the PM H^+-ATPase activity. Compound **2b** at 250 μM did not depolarize the hypocotyl tissues. The transmembrane PD of sub-epidermal cells of the hook was indeed close to −100 mV both in control (see Fig 6a in reference 5) and treated sets immediately after isolation of the upper part of the young plant (cotyledons and hook). However, hyperpolarization of transmembrane PD, which usually takes place during ageing,[14] was weaker in the treated set than in the control (about −125 mV and −150 mV, respectively, after 6 h of incubation).

When cotyledons were incubated in acidic solution (pH 5.0) in presence of compound **2b** at 100 μM, this derivative was found in the phloem sap (Fig 4) and no fenpiclonil could be detected. This indicates that, like compound **2a**,[5] compound **2b** is not degraded to the

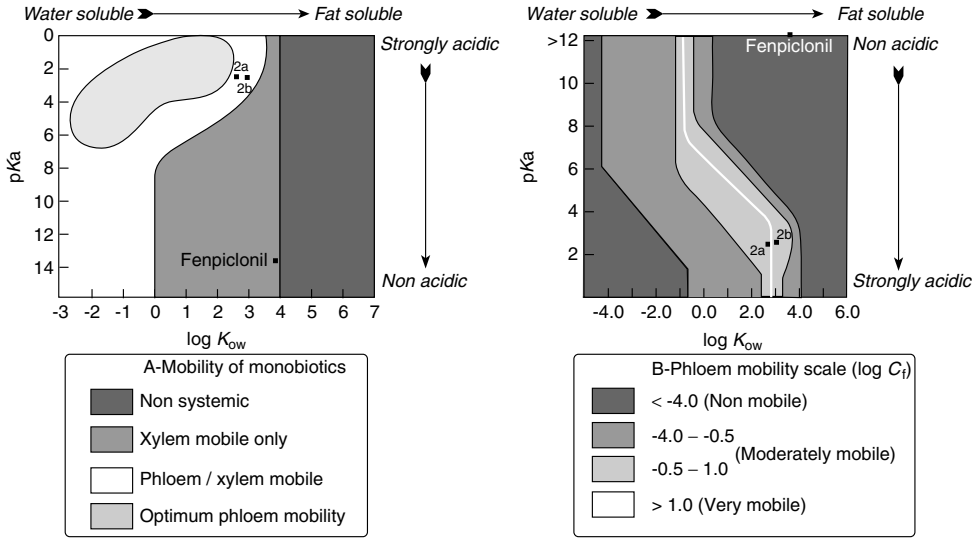


Figure 3. Prediction of phloem mobility of fenpiclonil and its two acidic derivatives using (A) the model of Bromilow *et al*[11] (mobility as a function of log K_{ow} and p*K*a) and (B) the Kleier[3] map (log C_f as a function of log K_{ow} and p*K*a; plant parameters are for a short plant[6]).

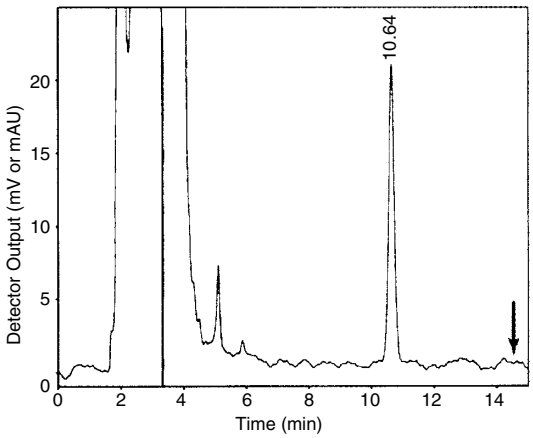


Figure 4. *Ricinus* sap analysis by HPLC. *Ricinus* cotyledons were incubated in the standard medium with compound **2b** (RT: 10.64 min) at 100 μM concentration. The arrow indicates the retention time of fenpiclonil.

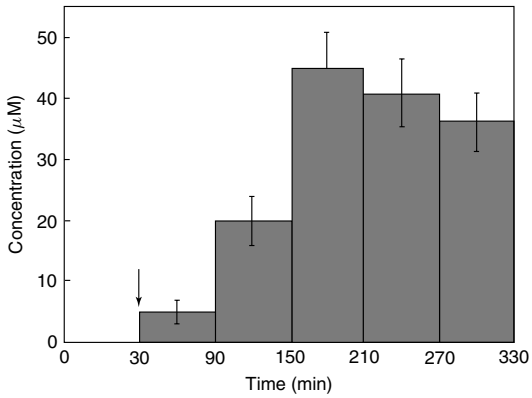


Figure 5. Time course of compound **2b** concentration in phloem sap of *Ricinus*. At time 0, compound **2b** (100 μM, final concentration) was added to the standard medium buffered at pH 5.0. The hook was severed at time 30 min (arrow). Mean of twelve plants (±SE).

parent compound in the sieve-tubes. Its concentration in the phloem sap increased for 150 min before reaching a plateau (Fig 5).

Although compounds **2a** and **2b** exhibit almost similar physicochemical properties (Fig 3), the percentages of their respective undissociated forms may differ markedly at apoplastic pH values (according to ACD logD v 8.0 software predictions). The range of these values is estimated to be between 5.0 and 6.0 in the leaf apoplast. For instance, leaf tissues of *Vicia faba*, an apoplastic loader, acidify the incubation medium at pH 5.4 before ageing.[15] However, expression of the PM H^+-ATPase is higher in the phloem than in the mesophyll.[16–18] This suggests that the micro-environment of the plasma membrane must be more acidic in the former tissue than in the latter in spite of the passive influx of protons driving the phloem-loading processes. During ageing, a phase

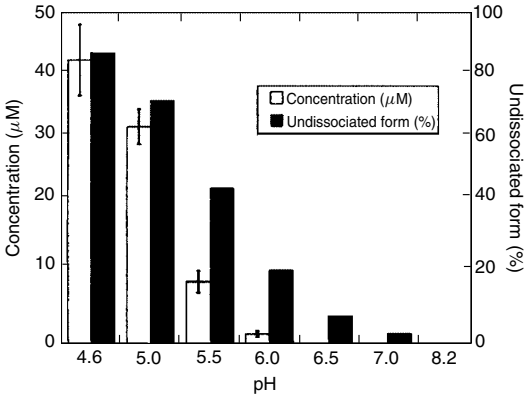


Figure 6. Concentration of compound **2b** (100 μM concentration in the external solution) in phloem sap of *Ricinus* as a function of the pH of the incubation medium and the percentage of its undissociated form at the apoplast/plasma membrane interface according to ACD log D v 8.0 software predictions. The sap was collected during the third and fourth hours of incubation. Mean (±SE) of 52 plants (pH 4.6), 58 plants (pH 5.0), 88 plants (pH 5.5), 39 plants (pH 6.0), 22 plants (pH 6.5), 12 plants (pH 7.0) and 11 plants (pH 8.2).

characterized by an increasing activity of the PM H^+-ATPase within the mesophyll, broad bean leaf tissues acidify the incubation medium at pH 5.0 or even at more acidic values.[19,20] All these data suggest that the pH values of the phloem apoplast must be close to 5.0, at least in apoplastic loaders. The concentration factor of compound **2b** (ie the concentration in the phloem sap related to that of the incubation medium), similar to that of compound **2a** at pH 4.6 (0.4), became higher at pH 5.0 (0.33 and 0.17 respectively) in accordance with the predictions of ACD Log D v 8.0 software (compare Fig 6 of this paper and Fig 9 in reference 5). However the concentration factor of compound **2b** (0.09) in the phloem sap did not differ significantly from that of compound **2a** (0.07) at pH 5.5. Similarly to compound **2a**, compound **2b** uptake was marginal at pH 6.0 and could not be detected at neutral and alkaline pH values. These data indicate that phloem uptake of compound **2b** occurs by diffusion of its lipophilic undissociated form which dissociates into poorly permeating anions into the phloem symplast, ie a mechanism elegantly demonstrated for herbicides in the 1980s.[21,22]

3.2 Biological activity of compound 2b

The fungicidal activities of fenpiclonil and compound **2b** on the mycelial growth of *E lata* were compared over a large range of concentrations. In the presence of fenpiclonil at 1 mM, the mycelium grew vertically from the inoculum after a latency period of a few days, and then covered the culture medium slowly and compactly (Fig 7A). By contrast, the pathogenic fungus growth was completely inhibited by compound **2b** at the same concentration (Fig 7F). In the presence of fenpiclonil at 50 μM, the response of the mycelium was practically the same as that described at 1 mM

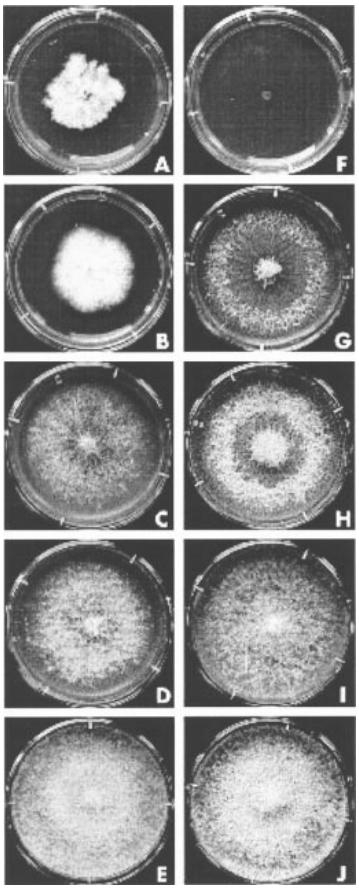


Figure 7. Long-term effect (21 days of culture) of (A–E) fenpiclonil and (F–J) compound **2b** on *Eutypa lata* mycelial growth. The products were used at 1 mM (A, F) 50 μM (B, G), 10 μM (C, H), 1 μM (D, I) and 0 mM (E, J) concentrations. The experiment was repeated six times with similar results.

(Fig 7B). *Eutypa lata* development was no longer totally inhibited by compound **2b** when used at 50 μM, but a large inner part of the colony became necrosed around the inoculum disk after a three-week culture (Fig 7G) while the outer part was reduced to a thin halo. The necrosis of the older part of the mycelial colony was still observed after a three-week culture both in the presence of fenpiclonil and of compound **2b** at 10 μM (Fig 7C and H). However, the growth of the mycelial halo was less inhibited by contact with **2b**. Finally, at 1 μM, fenpiclonil and the acidic derivative reduced the thickness of *E lata* mycelium (Fig 7D and I) to a similar degree when compared with the control (Fig 7E and J).

Compound **2b** exhibits a fungicidal effect greater than that of the recently described **2a**.[5] The latter acidic derivative is not active at 10 μM, whereas compound **2b** still exhibits some fungistatic effect at 1 μM. Taking into account the pH values of the culture medium of *E lata* (from 5.0 to 5.5)[5] and the calculated percentage of the undissociated form of the two acidic derivatives under these conditions (Fig 6 of this paper and Fig 9 in reference 5), uptake of compound **2b** may in theory be more efficient than that of compound **2a**. However, this point, supported only in part in the *Ricinus* system (Fig 6), cannot alone explain the difference in biological activity observed (compare Fig 7 of this paper with Fig 3 in reference 5). The fungicidal activity of the *N*-substituted derivatives may also depend on their ability to release the parent compound in CH_3CN/H_2O (3/7) as suggested by Nyfeler and Ackermann.[23] Compound **2b** (like compound **2a**) is not degraded to fenpiclonil to a detectable amount in the phloem sap. A detailed analysis of what happens to it in plant tissues and fungus is now needed to establish whether this acidic derivative is a phloem mobile pro-fungicide or a new phloem-mobile fungicide.

4 CONCLUSION

Unsuccessful attempts made in the 1970s to synthesize a phloem-mobile fungicide from a non-mobile or apoplastic fungicide have discouraged further work in this research area. In the last two decades, except for work on cymoxanil acidic derivatives,[4] no data were published in this field to our knowledge, the main challenge being to maintain the fungicidal activity of the parent compound. Fenpiclonil, an analogue of a metabolite produced by several *Pseudomoniae*, was selected as a model molecule as a first approach. It has proved possible to synthesize many derivatives from the parent compound and, in this way, to manipulate the physicochemical properties of the phenylpyrrole molecules. In this paper, we show that addition of a methyl group at the alpha-carbon adjacent to the carboxyl function of *N*-carboxymethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole, recently described, improves the phloem systemicity at pH 5.0, ie a pH value close to that of the phloem apoplast in apoplastic loaders. Furthermore, the new *N*-(1-carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole exhibited an apparent fungicidal activity on *Eutypa lata* better than that of fenpiclonil at high concentration (1 mM) and an almost similar biological effect at the lower concentrations (10 and 1 μM) tested. In this case, the problem arising from the conflicting requirements for activity and phloem mobility was solved. Because of lack of information concerning the selectivity of the biological effect of phenylpyrroles, this paper must be considered only as basic research on the phloem systemicity of fungicides.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux for their financial support of this work. The authors are indebted to two anonymous referees for constructive criticism.

REFERENCES

1 Edgington LV, Structural requirements of systemic fungicides. *Annu Rev Phytopathol* **19**:107–214 (1981).

2 Hsu FC, Sun K, Kleier DA and Fielding MJ, Phloem mobility of xenobiotics VI. A phloem-mobile pronematicide based on oxamyl exhibiting root-specific activation in transgenic tobacco. *Pestic Sci* **44**:9–19 (1995).

3 Kleier DA, Grayson BT and Hsu FC, The phloem mobility of pesticides. *Pestic Outlook* **9**:26–30 (1998).

4 Smith PH, Chamberlain K, Sugars JM and Bromilow RH, Fungicidal activity of *N*-(2-cyano-2-methoximinoacetyl)-amino acids and their derivatives. *Pestic Sci* **44**:219–224 (1995).

5 Chollet JF, Rocher F, Jousse C, Delétage-Grandon C, Bashiardes G and Bonnemain JL, Synthesis and phloem mobility of acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil. *Pest Manag Sci* **60**:1063–1072 (2004).

6 Kleier DA, Phloem mobility of xenobiotics. V. Structural requirements for phloem systemic pesticides. *Pestic Sci* **42**:1–11 (1994).

7 Dean PDG, Halogenolysis of methyl glycyrrhetate with lithium iodide–dimethylformamide. *J Chem Soc* 6655 (1965).

8 McMurry JE and Wong GB, An improved method for the cleavage of methyl esters. *Synth Commun* **2**:389–394 (1972).

9 Mounoury G, Delrot S and Bonnemain JL, Energetics of threonine uptake by pod wall tissues of *Vicia faba* L. *Planta* **161**:178–185 (1984).

10 Kallarackal J, Orlich G, Schobert C and Komor E, Sucrose transport into the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as measured by the analysis of sieve-tube sap. *Planta* **177**:327–335 (1989).

11 Bromilow RH, Chamberlain K and Evans AA, Molecular structure and properties of xenobiotics in relation to phloem translocation, in *Recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation*, ed by Bonnemain JL, Delrot S, Lucas WJ and Dainty J, Ouest Editions, Presses Academiques, Nantes, pp 332–340 (1991).

12 Serrano R, Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**:61–94 (1989).

13 Delrot S and Bonnemain JL, Absorption et migration des herbicides, in *Les herbicides, mode d'action et principes d'utilisation*, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, pp 51–77 (1991).

14 Mertz SM and Higinbotham N, Transmembrane potential in barley roots as related to cell type, cell location, and cutting and ageing effects. *Plant Physiol* **57**:123–128 (1976).

15 Delrot S, Despeghel JP and Bonnemain JL, Phloem loading in *Vicia faba* leaves: effect of *N*-ethylmaleimide and parachloromercuribenzenesulfonic acid on H^+ extrusion, K^+ and sucrose uptake. *Planta* **149**:144–148 (1980).

16 Parets-Soler A, Pardo JM and Serrano R, Immunocytolocalization of plasma membrane H^+-ATPase. *Plant Physiol* **93**:1654–1658 (1990).

17 Bouché-Pillon S, Fleurat-Lessard P, Fromont JC, Serrano R and Bonnemain JL, Immunolocalization of the plasma membrane H^+-ATPase in minor veins of *Vicia faba* in relation to phloem loading. *Plant Physiol* **105**:691–697 (1994).

18 Dewitt ND and Sussman MR, Immunological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H^+-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* **7**:185–186 (1995).

19 Delrot S and Bonnemain JL, Échanges H^+-Rb^+ et cotransport H^+-glucide dans les tissus foliaires de *Vicia faba* L. *CR Acad Sci Paris* **288**:71–76 (1979).

20 Noubhani AM, Sakr S, Denis MH and Delrot S, Transcriptional and post-translational control of the plant plasma membrane H^+-ATPase by mechanical treatments. *Biochem Biophys Acta* **1281**:213–219 (1996).

21 Neumann S, Grimm E and Jacob F, Transport of xenobiotics in higher plants. I. Structural prerequisites for translocation in the phloem. *Biochem Physiol Pflanzen* **180**:257–268 (1985).

22 Rigitano RL, Bromilow RH, Briggs GG and Chamberlain K, Phloem translocation of weak acids in *Ricinus communis*. *Pestic Sci* **19**:113–133 (1987).

23 Nyfeler R and Ackermann P, Phenylpyrroles, a new class of agricultural fungicides related to the natural antibiotic pyrrolnitrin, in *Synthesis and chemistry of agrochemicals III*, ed by Baker DR, Fenyes JG and Steffens JJ, American Chemical Society, Washington, USA, pp 395–404 (1992).

3 - Salicylic acid, an ambimobile molecule exhibiting a high ability to accumulate in the phloem

Salicylic Acid, an Ambimobile Molecule Exhibiting a High Ability to Accumulate in the Phloem[1]

Françoise Rocher[2], Jean-François Chollet[2], Cyril Jousse, and Jean-Louis Bonnemain*

Laboratoire Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles, Unité Mixte de Recherche 6514 (F.R., J.-F.C., C.J.), and Laboratoire Transport des Assimilats, Unité Mixte de Recherche 6161 (C.J., J.-L.B.), Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Poitiers, 86022 Poitiers cedex, France

The ability of exogenous salicylic acid (SA) to accumulate in castor bean (*Ricinus communis*) phloem was evaluated by HPLC and liquid scintillation spectrometry analyses of phloem sap collected from the severed apical part of seedlings. Time-course experiments indicated that SA was transported to the root system via the phloem and redistributed upward in small amounts via the xylem. This helps to explain the peculiarities of SA distribution within the plant in response to biotic stress and exogenous SA application. Phloem loading of SA at 1, 10, or 100 μM was dependent on the pH of the cotyledon incubating solution, and accumulation in the phloem sap was the highest (about 10-fold) at the most acidic pH values tested (pH 4.6 and 5.0). As in animal cells, SA uptake still occurred at pH values close to neutrality (i.e. when SA is only in its dissociated form according to the calculations made by ACD LogD suite software). The analog 3,5-dichlorosalicylic acid, which is predicted to be nonmobile according to the models of Bromilow and Kleier, also moved in the sieve tubes. These discrepancies and other data may give rise to the hypothesis of a possible involvement of a pH-dependent carrier system translocating aromatic monocarboxylic acids in addition to the ion-trap mechanism.

The potential of plants to react to pathogens by activating local and long-distance mechanisms has been known for a long time (Chester, 1933). The systemic response was called systemic acquired resistance (SAR) and was explained by the production of a signal released from mature infected leaves and translocated to the upper parts of the plant (Ross, 1966). Then grafting and stem-girdling experiments have suggested that the SAR signal moves in the phloem (Jenns and Kuc, 1979; Guedes et al., 1980). Interest in the role of salicylic acid (SA) in disease resistance arose from the observation that application of exogenous SA or acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to the *Tobacco mosaic virus* (TMV) in tobacco (*Nicotiana tabacum*; White, 1979) and is highly effective in activating pathogenesis-related (PR) genes (White et al., 1987). A few years later, it was shown that development of SAR in a cultivar of tobacco resistant to TMV is accompanied by a dramatic increase in the level of endogenous SA in the infected leaves after TMV inoculation and also, to a lesser extent, in uninfected upper leaves. Induction of *PR* gene expression parallels the rise in SA levels in both infected and uninfected tissues (Malamy et al., 1990). Furthermore, inoculation of mature cucumber (*Cucumis sativus*) leaves with either the *Tobacco necrosis virus* or the fungal pathogen *Colletotrichum lagenarium* leads to a clear rise in SA levels in the phloem sap and to the development of SAR (Métraux et al., 1990). TMV infection also induces an increase in SA concentration in the phloem sap of tobacco (Yalpani et al., 1991). These data indicate that SA plays an important role in plant defense against pathogen attack and suggest that it may function as an endogenous signal in the transmission of SAR. That SA plays a role in disease resistance was further supported using transgenic tobacco plants expressing the bacterial *nahG* gene encoding salicylate hydrolase, which degrades SA into cathecol. These plants are unable to accumulate SA and to express SAR (Gaffney et al., 1993).

SA phloem transport from the inoculated leaves to the systemically protected tissues is at this time clearly demonstrated. The first strong evidence has come from in vivo labeling with $^{18}O_2$ of the SA synthesized in TMV-inoculated lower leaves of tobacco. Spatial and temporal distribution of [^{18}O]SA indicated that about 70% of the SA detected in the upper uninoculated leaves was ^{18}O-labeled and had therefore been transported from the TMV-inoculated tissue (Shulaev et al., 1995). The biosynthesis and transport of [^{14}C]SA have been studied after injection of ^{14}C-labeled benzoic acid into cucumber cotyledons inoculated with *Tobacco necrosis virus*. Labeled SA has been detected in the phloem and in the upper uninoculated leaf before the development of SAR (Mölders et al., 1996). The specific activity of [^{14}C]SA decreased in the systemically protected tissue, indicating that, in addition to transport,

[1] This work was supported by the Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux, the Centre Technique Interprofessionnel de la Vigne et du Vin, the Office National Interprofessionnel des Vins, the Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, and Inter Rhône.

[2] These authors contributed equally to the paper.

* Corresponding author; e-mail jl.bonnemain@voila.fr; fax 33–5–49–45–39–65.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Jean-Louis Bonnemain (jl.bonnemain@voila.fr).

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.106.082537.

the upper leaf also produced more SA. This systemic SA synthesis is likely to be induced by a previous signal (Mölders et al., 1996). Finally, recent data have suggested that the pattern of SAR induction within the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) rosette was not confined to the pattern of phloem allocation of [^{14}C]SA from a donor leaf (Kiefer and Slusarenko, 2003). All these data have been discussed in relation to the complexity of the systemic signaling (Métraux, 2001; Durrant and Dong, 2004), a debate initiated in the last decade (Rasmussen et al., 1991; Vernooij et al., 1994; Ryals et al., 1996; Durner et al., 1997; Van Loon, 1997). In this regard, detaching inoculated leaves, as well as grafting experiments, has indicated that SA is not the primary systemic signal (Rasmussen et al., 1991; Vernooij et al., 1994). This one might be a lipid-base molecule (Maldonado et al., 2002). Consequently, SA is now considered as an essential secondary signal for both local resistance and SAR (Maldonado et al., 2002; Durrant and Dong, 2004). In addition, SA, regarded as a plant hormone, has been reported to inhibit seed germination and growth, block the wound response, and reverse the effects of abscisic acid (Shettel and Balke, 1983; Davies, 2004).

Membrane transport of SA in plant cells, unlike in animal cells (Enerson and Drewes, 2003), is very poorly documented. According to Kleier's predicting mathematical model (Yalpani et al., 1991), the physical properties of SA, in terms of pK_a value and the octanol/water partitioning coefficient (log K_{ow}), are nearly ideal for phloem systemicity by way of the ion-trap mechanism. Physiological data about SA uptake properties are restricted to Lemna fronds and isolated cells. Uptake of [^{14}C]SA in *Lemna gibba* is linear for at least 24 h. Because of probable sequestration of both free and bound SA in the vacuole, transfer of SA from mother fronds to daughter fronds cannot be observed (Ben-Tal and Cleland, 1982). SA uptake by tobacco cells is pH dependent and inversely correlated with the increase of medium pH, whereas SA release is likely to involve a Ca-dependent pathway (Chen and Kuc, 1999). Paradoxically, membrane transport of SA metabolites is better known. The vacuolar uptake of SA 2-*O*-β-D-glucoside occurs through an ATP-binding cassette transporter mechanism (Dean and Mills, 2004) and an H^+-antiporter mechanism (Dean et al., 2005).

The purpose of this work was to assess, using the Ricinus system, the capacity of the phloem to load SA from the apoplast in comparison with various endogenous molecules and xenobiotics and to examine whether long-distance transport of SA along the axis is limited or not to the phloem tissue.

RESULTS AND DISCUSSION

Predicting Phloem Mobility of SA in Comparison with Other Moderately Lipophilic Acidic Compounds

Two models based on physicochemical properties of molecules, more precisely their lipophilicity (assessed as the 1-octanol/water partition coefficient log K_{ow}) and their pK_a values are currently used to predict the systemicity of xenobiotics and natural ionizable compounds (Kleier, 1988, 1994, 1998; Bromilow et al., 1991). Much of the data on xenobiotic transport fit rather well into these schemes. These two models were used in this article to predict the phloem mobility of SA as compared with some other natural molecules and xenobiotics (Figs. 1 and 2). It has already been mentioned that measured physicochemical properties of SA (pK_a = 2.98; log K_{ow} = 2.26; Minnick and Kilpatrick, 1939; Hansch and Anderson, 1967) make it well suited for long-distance phloem transport (Yalpani et al., 1991). These values are practically identical to those calculated using ACD LogD version 9.0 software (pK_a = 3.01; log K_{ow} = 2.06). According to the calculations made by this software, two acidic derivatives of fenpiclonil (compounds 2a and 2b) recently synthesized (Chollet et al., 2004, 2005) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) exhibited a phloem mobility ability near to that of SA (Fig. 2, A and B). In contrast, 3,5-dichlorobenzoic acid (3,5-ClBA; pK_a = 3.46; log K_{ow} = 3.92) was on the boundary between the poorly mobile and the nonmobile molecule areas in both models, whereas 3,5-dichlorosalicylic acid (3,5-ClSA; pK_a = 1.99; log K_{ow} = 4.40) was in the nonmobile molecule area whatever the predicting model used (Fig. 2, A and B).

Endogenous SA Levels in the Phloem and Xylem Saps Exuded from Severed Seedlings

To evaluate the potential ability of phloem to trap exogenous SA from the incubation medium, it was necessary to measure endogenous SA levels in the phloem sap exported by Ricinus cotyledons beforehand. Endogenous SA concentration did not exceed the basal level (<1 μM). Very low values (≈ 0.5 μM) were also noted in the phloem sap of cucumber (control set; Métraux et al., 1990). Endogenous SA concentration in the xylem sap exuded from the Ricinus root system was so low that it could not be detected. These data suggest that SA levels do not change significantly in response to wounding, consistent with previous data (Malamy et al., 1990).

Time-Course Experiments

The Ricinus system is a biological model widely employed to study the phloem uptake of nutrients (Schobert and Komor, 1989; Orlich and Komor, 1992; Zhong et al., 1998) to identify endogenous molecules moving in sieve tubes (Schobert et al., 1995; Antognoni et al., 1998) and to evaluate phloem systemicity of xenobiotics (Bromilow et al., 1987; Delétage-Grandon et al., 2001). Because the castor bean is a symplastic-apoplastic loader (Orlich and Komor, 1992), exogenous SA molecules found in the phloem sap may be taken up from the phloem apoplast or may come, via the symplastic route, from other cells and, especially, from the cotyledon

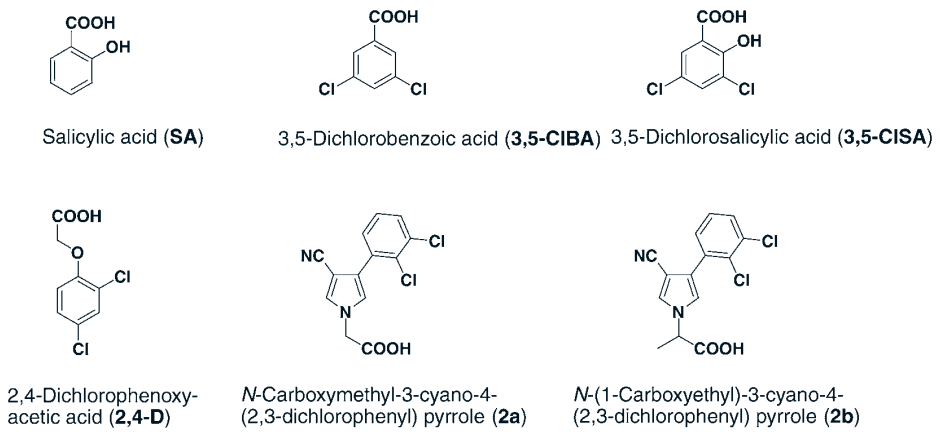


Figure 1. Chemical structure of SA, dichlorinated analogs, and other acidic compounds used in this work.

epidermis. However, in the latter case, exogenous SA molecules must also cross the plasma membrane. In this article, the term SA phloem loading does not discriminate between the various possible sites of transmembrane SA uptake.

When cotyledons were incubated in an acidic solution (pH 4.6) in the presence of SA at 10 μM, the molecule quickly accumulated in the phloem sap. Its concentration increased sharply for about 1.5 h before reaching a near plateau and was then about 10-fold that of the incubation medium (Fig. 3). Thus, in later experiments (pH dependence of SA phloem loading), the sap was collected when SA levels plateaued (i.e. from 2 to 4 h after the beginning of cotyledon incubation). The ability of phloem to accumulate exogenous SA is discussed below.

The presence of exogenous SA in the xylem sap collected from the basal part of the hypocotyl was also

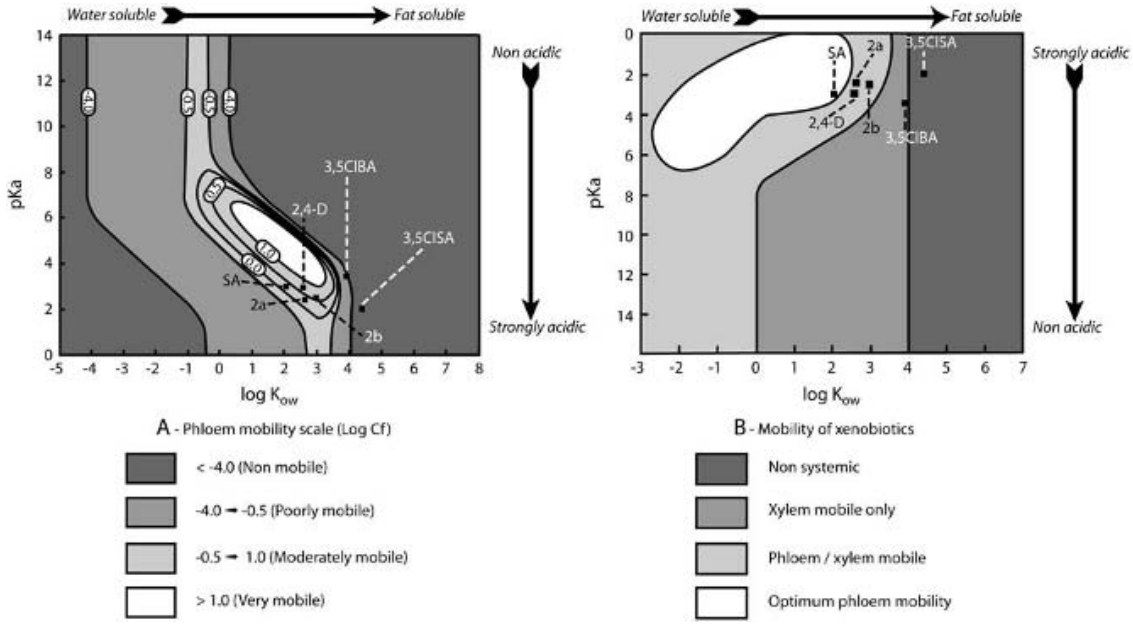


Figure 2. Prediction of phloem mobility of SA, 3,5-ClBA, 3,5-ClSA, and 2,4-D. A, Kleier map (log C_f as a function of log K_{ow} and pK_a) according to Kleier (1994, 1998); plant parameters are for a short plant (Kleier, 1994). B, Bromilow model (degrees of mobility as a function of log K_{ow} and pK_a). For comparison, the predicted phloem mobility of two fenpiclonil acidic derivatives (compounds 2a and 2b; Chollet et al., 2005) was added. Log K_{ow} and pK_a were calculated using ACD LogD suite version 9.0 software.

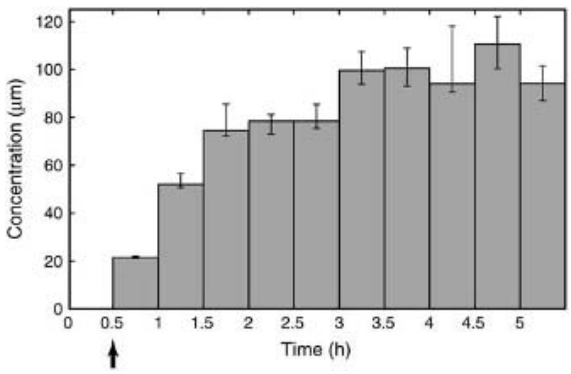


Figure 3. Time course of SA concentration in phloem sap of Ricinus. At time 0, SA at 10 μM (final concentration) was added to the buffered medium, pH 4.6. The hypocotyl was severed in the hook region at time 0.5 h (arrow), and then the sap was collected every half hour during 5 h. The width of the columns indicates the duration of the successive phloem sap collections from the same cut. Medians ± quartiles; n = 8 plants.

investigated. In this case, the hypocotyl was severed at different times according to the sets, as indicated in Figure 4. Phloem sap exuded by leaf pressure from the apical part of the seedling and xylem sap exuded by root pressure from the basal part were collected in parallel to compare the time course of SA enrichment in both saps. Preliminary assays indicated that SA concentration in xylem sap was so low during the first hours of transport that it could not be quantified by HPLC. Therefore, experiments were conducted using [^{14}C]SA at 10 μM and the amounts of labeled molecules in both saps were analyzed by liquid-scintillation spectrometry. The time course of labeled molecule enrichment in phloem sap (Fig. 4A) was exactly similar to that of nonlabeled SA (Fig. 3), suggesting that practically all the systemic labeled molecules were unchanged SA. This is consistent with previous data. SA 2-*O*-β-D-glucoside, which accumulates in the tissues in response to an increase of free SA level, does not move in the phloem (Enyedi et al., 1992) but is stored in the vacuole (Dean and Mills, 2004; Dean et al., 2005). Small amounts of labeled molecules were found in xylem sap (Fig. 4B). At first, xylem labeling increased slowly contrary to phloem enrichment. Thus, when the hook was severed 1.5 h after the beginning of cotyledon incubation, apoplastic sap labeling was only 20% of the maximal value noted later (Fig. 4B), compared to 75% for phloem sap (Fig. 4A). Then xylem sap labeling accelerates somewhat before reaching a plateau 4 h after the beginning of [^{14}C]SA uptake. Labeled molecule concentration (0.67 + 0.14 − 0.20 μM, median ± interquartiles, n = 6 triplicates) in xylem sap exuded by root pressure was then about one-fifteenth that of cotyledon incubation medium and one-one hundred fiftieth that noted in phloem sap (compare Fig. 4, A and B). The velocity of xylem sap exudation (41.5 μL/triplicate/20 min) being 5 times higher than that of phloem sap (12.75 μL/triplicate/30 min), the amount of labeled molecules exuded from the vessels per time unit was about one-thirtieth that released from the sieve tubes under our experimental conditions.

To specify the nature of the labeled molecules moving within the vessels, a complementary experiment was conducted using an incubation medium with unlabeled SA at 100 μM (i.e. a concentration 10 times higher than in the preceding conditions). Four hours after the beginning of SA uptake by cotyledon tissues (i.e. when the amount of exogenous molecules moving in the vessels plateaued), three xylem sap collections of 20 min each were done successively from the same cut and then analyzed by HPLC. SA concentration in the first droplet was 5.92 + 1.61 − 1.66 μM (median ± interquartile, n = 4 triplicates) and therefore about 9 times higher than that of labeled molecules measured in the preceding experiment (Fig. 4B), indicating that most, if not all, of the latter are unchanged SA molecules. It remained the same in the second xylem sap droplet (5.48 + 1.21 − 1.14 μM) and then had a tendency

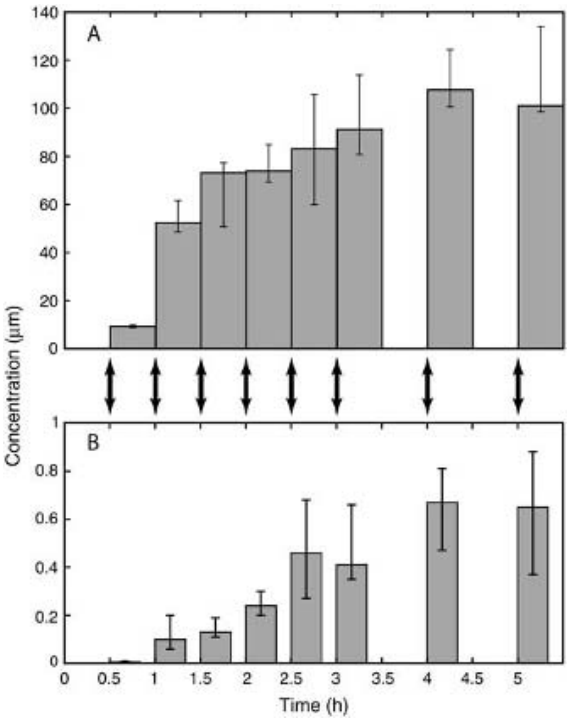


Figure 4. Time course of labeled molecule concentration in phloem sap (A) and xylem sap (B) of Ricinus. Cotyledons were incubated in a buffered solution, pH 4.6, containing [^{14}C]SA at 10 μM concentrations. Seedlings were divided into eight sets and the hook was severed at different times (from 0.5–5 h) according to the sets (double arrows). The phloem sap and the xylem sap ($CaCl_2$ 1 M treatment) were collected for 30 and 20 min, respectively. The width of the columns indicates the duration of phloem and xylem sap collections. Medians ± quartiles; n = 6 triplicates.

Table I. *Concentration of some natural compounds and xenobiotics in the Ricinus phloem sap related to the percentage of the undissociated form and log D in two phloem compartments, the phloem apoplast (pH 5.0) and the phloem sap (pH 7.5)*

The sap was collected during the third and fourth hours of incubation (pH 5.0). Mean ± SE; $n \geq 10$.

Compounds	Molecular Weight	RCOOH (%)		Log *D*		Incubation Medium	Phloem Sap
		pH 5.0	pH 7.5	pH 5.0	pH 7.5		
						μM	μM
SA	138.12	9.9	0.0	−0.70	−1.09	1	11 ± 1
						10	79 ± 8
						100	689 ± 60
3,5-ClBA	191.01	97.2	10.0	2.38	0.82	10	24 ± 4
						100	275 ± 39
3,5-ClSA	207.01	12.6	0.1	1.31	1.25	10	6.3 ± 1
2,4-D	221.04	77.5	1.1	0.57	−1.10	10	96 ± 6
						100	700 ± 10[a]
[^{14}C]Glyphosate	169.07	0	0	−5.90	−6.78	100	18 ± 1[a]
N-Carboxymethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl) pyrrole (2a)	295.12	52.3	0.3	0.10	−1.10	100	10 ± 1.5
						250	42 ± 7[b]
N-(1-Carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl) pyrrole (2b)	309.15	73.4	0.9	0.53	−0.74	100	33 ± 3[c]
[^{14}C]Suc	342.30			−3.48	−3.48	100	2,136 ± 168
[^{14}C]Phe	165.19			−1.39	−1.39	100	2,192 ± 27

[a]From Delétage-Grandon et al. (2001). [b]From Chollet et al. (2004). [c]From Chollet et al. (2005).

to decrease (4.16 ± 0.55 μM in the third droplet). This shows that SA xylem re-exportation remains unchanging for more than half hour despite the cessation of SA phloem transport toward the basal part of the seedling. Treatment of the basal hypocotyl cut with 1 M $CaCl_2$, which induced an intense callose synthesis in sieve-tube pores and cell plasmodesmata, was a severe stress. Therefore, SA levels measured in xylem sap may be somewhat underestimated. On the other hand, without treatment, the amount of SA in the xylem sap (18.3 + 10.3 − 5.7 μM, median ± interquartiles, n = 11) was about 3 times higher than those mentioned above, but in this case phloem contamination cannot be excluded.

Our data help to explain why labeled molecule distribution is not limited to the young leaves situated directly above the [^{14}C]SA infiltrated leaf as should be the case according to the phloem allocation pattern (Kiefer and Slusarenko, 2003). They may also suggest

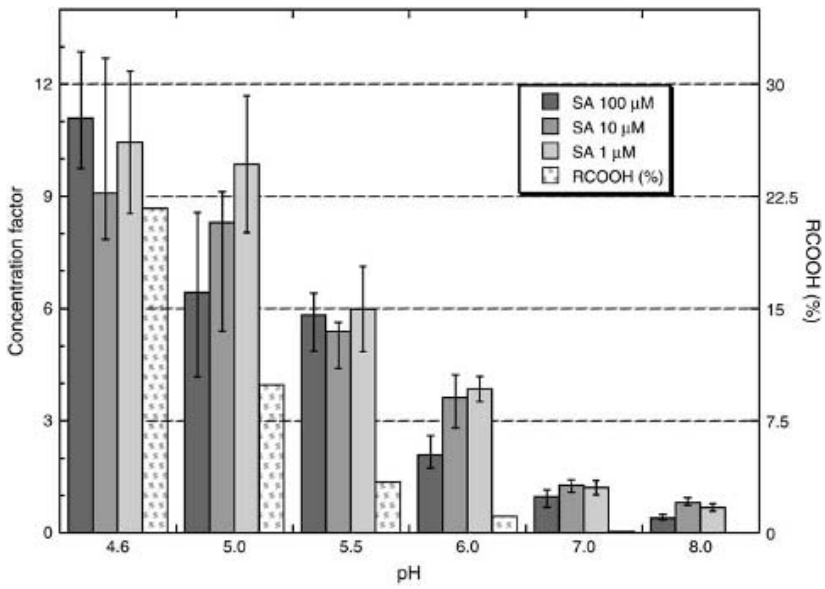


Figure 5. Concentration factor of SA (added to the incubation solution at 1, 10, 100 μM, final concentration) in phloem sap of Ricinus and percentage of SA undissociated form as a function of the pH of the incubation medium. The sap was collected during the third and fourth hours of incubation. The concentration factor was the ratio $[SA]_{sap}/[SA]_{medium}$. RCOOH (%) was calculated using ACD LogD suite version 9.0 software. Medians ± quartiles; $8 \leq n \leq 12$.

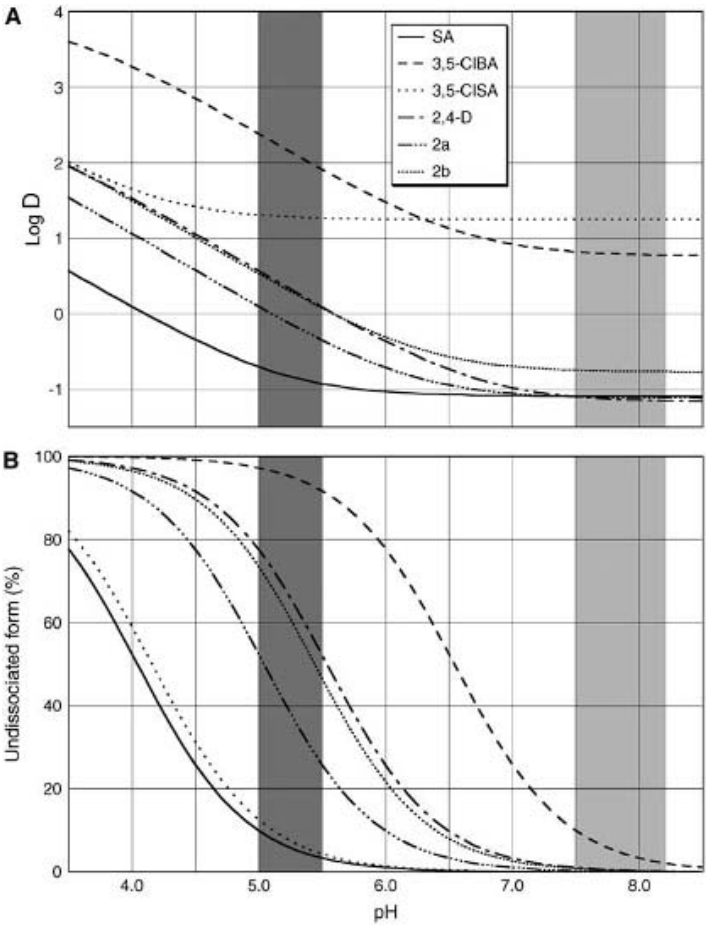


Figure 6. Log *D* (A) and percentage of undissociated form (B) of SA and other monocarboxylic compounds tested as a function of pH. Results were computed using ACD LogD suite version 9.0 software.

that xylem can contribute, although very slightly, to SA enrichment noted in the apical part of plants after mature leaf infection (Shulaev et al., 1995) in addition to phloem allocation (Métraux et al., 1990; Yalpani et al., 1991) and systemic SA synthesis in response to a previous signal (Rasmussen et al., 1991; Meuwly et al., 1995; Mölders et al., 1996). This suggestion is valid only if SA concentrations measured in the Ricinus system can be compared with those observed in response to a pathogen attack. From the very few phloem sap analyses made after leaf tissue inoculation, endogenous SA levels in phloem sap of infected plants range between about 10 to 500 μM, depending on the pathogen (Métraux et al., 1990; Rasmussen et al., 1991). These values are similar to those reported in this study (Fig. 3; Table I). Thus, it can be speculated that endogenous SA levels in xylem sap should be far from negligible in infected plants in case of strong responses induced by a pathogen. If this point is checked, the question of which must be considered is then the one concerning the physiological significance of the apoplastic component of SA long-distance transport, bearing in mind that abscisic acid plays a central role in root-to-shoot signaling via the xylem sap at micromolar concentrations in response to drought stress (Trejo et al., 1995; Jeannette et al., 1999; Assmann, 2004).

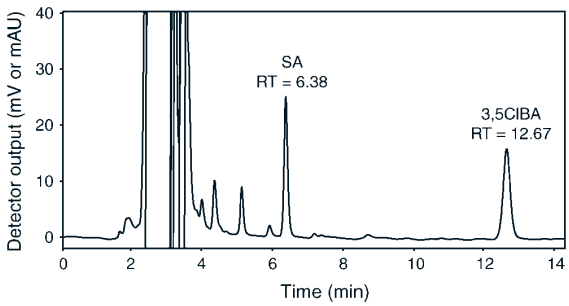


Figure 7. HPLC profile of Ricinus phloem sap. Cotyledons were incubated in a buffered solution, pH 4.6, containing 10 μM SA and 100 μM 3,5-ClBA. Note that endogenous compounds were eluted from 2 to 6 min.

Table II. *Chromatographic data for tested products*

Product	Mobile Phase		Column		Delivery	Detection UV	Retention Time
	Water + TFA 0.1%	CH_3CN	Supelco Discovery	Merck Chromolith			
					mL min^{-1}	*nm*	*min*
SA	50	50	+		0.8	236	6.38
3,5-ClBA	50	50	+		0.8	236	12.67
3,5-ClBA	50	50		+	0.8	211	4.03
3,5-ClSA	53	47		+	0.8	216	4.76
2,4-D	50	50	+		0.8	202	11
2a	57	43		+	0.8	218	5.15
CF	59	41	+		0.8	225	10.48; 11.44

pH Dependence of SA Phloem Loading

SA levels in the phloem sap were dependent on the pH of the incubation medium whatever the SA concentration in this medium (1, 10, or 100 μM). Higher concentrations (1 mM) could not be used because of their toxic effect. The concentration factor in the phloem sap was the highest (about 10-fold) at the most acidic value tested (pH 4.6) and the least (from 0.4–0.8-fold) at pH 8.2 (Fig. 5). A residual SA uptake at pH 7.5 and 8.5 was also observed in tobacco cell suspension cultures (Chen and Kuc, 1999). SA phloem loading was not clearly related to the percentage of the undissociated form of the molecule at the external side of the plasma membrane, as calculated with ACD LogD software. For instance, from pH 4.6 to pH 6.0, the concentration factor in phloem sap decreased from 10 to about 3, whereas the undissociated SA level dropped by 20 times and became marginal (about 1%) at the latter pH value. At pH 7.0, SA accumulated slightly in the phloem (concentration factor = 1.0–1.4), although the molecule was only under its hydrophilic dissociated form (i.e. the nonpermeant form through the phospholipidic layer (Fig. 6B; Table I). The discrepancy between SA uptake and percentage of the undissociated form of the molecule at biological pH is still more marked when a homogeneous aqueous medium is taken into consideration ($pK_a \approx 3.0$). By contrast, data from systemicity tests using the Ricinus system indicate that acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil (compounds 2a and 2b) are taken up only in their undissociated form in accordance with the ion-trap mechanism (Chollet et al., 2004, 2005).

A pH dependence of SA and analog uptake similar to that observed in Ricinus tissues has been described in animal cells (Takanaga et al., 1994; Tsuji et al., 1994). This was studied in detail using the human adenocarcinoma cell line, Caco-2 cells, which possess intestinal epithelial-like properties. An efficient SA uptake was noted at the pH values (5.5–6.0) measured along the surface of the intestinal villi. Transcellular transport of SA across Caco-2 cells occurs via a pH-dependent and carrier-mediated transport mechanism specific to monocarboxylic acids (Takanaga et al., 1994; Tsuji and Tamai, 1996). These works led to the characterization of a monocarboxylate transporter family in animal cells (Garcia et al., 1994; Enerson and Drewes, 2003). From these data, it can be asked whether the ion-trap mechanism is the sole mechanism involved in SA uptake in plant tissues, particularly in the phloem.

Measurement of SA Accumulation in the Phloem Sap and Comparison with Other Natural Compounds and Xenobiotics

At pH 5.0 (i.e. a pH value close to that of the phloem apoplast), at least in apolastic loaders (Delrot et al.,

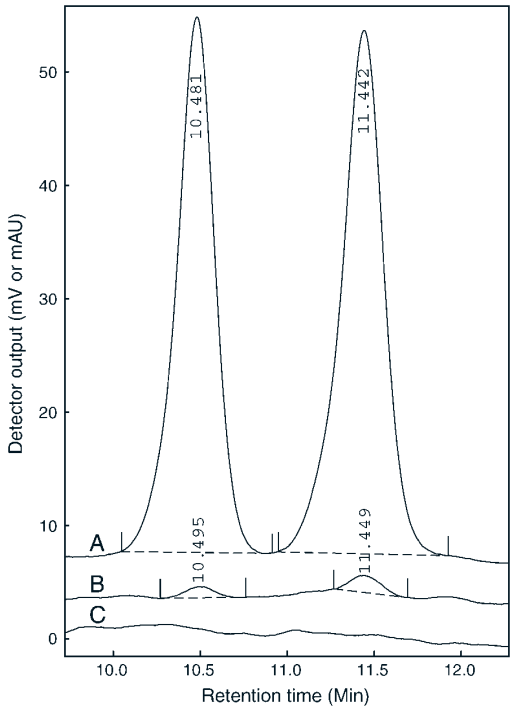


Figure 8. CF as a specific marker for the Ricinus phloem sap. Ricinus cotyledons were incubated for 1 h in a buffered solution, pH 4.6, containing CF at 100 μM before severing the hypocotyl in the hook region. CF was found at 22.6 μM concentration in phloem sap (A), whereas it could not be detected in xylem sap (C). Note that the dual signature of CF was still clear at a very low concentration (0.05 μM; B).

1980), the SA concentration factor in the phloem sap varied from 7- to 11-fold (Table I), although the SA molecule population was predicted to be slightly hydrophilic (Fig. 6A). These values were lower than those noted (21- or 22-fold) for Suc and Phe, which are taken up by specific carrier systems (Lemoine, 2000; Chen et al., 2001), much higher than those reported (0.2- or 0.3-fold) for glyphosate (Delétage-Grandon et al., 2001) and acidic derivatives of fenpiclonil (Chollet et al., 2004, 2005), but close to that noted for 2,4-D, which is less ionized than SA at apoplastic pH (Fig. 6B) but larger in size (Fig. 1). Phloem loading of this phenoxyalkanecarboxylic acid includes two mechanisms, the ion-trap mechanism and a carrier-mediated process (Kasai and Bayer, 1991; Chen et al., 2001).

Unlike the molecules mentioned above, 3,5-ClBA and, especially, 3,5-ClSA remained slightly lipophilic in the Ricinus phloem sap (Fig. 6A), the pH values of which vary from 7.5 to 8.2 according to the stage of development (Hall and Baker, 1972; Vreugdenhil and Koot-Gronsveld, 1988, 1989). This means that these two chlorinated compounds can diffuse back to the apoplastic compartment during long-distance transport. Nevertheless, in contrast to the Kleier and Bromilow model predictions (Fig. 2), 3,5-ClBA was found to be clearly mobile in the phloem (Fig. 7; Table I). Similarly, in contrast to the predictions (Fig. 2), 3,5-ClSA also moved within the sieve tubes (Table I). As already mentioned, the Kleier and Bromilow models give reliable predictions, except for compounds manipulated by a carrier system such as glyphosate (Denis and Delrot, 1993) and carboxyfluorescein (Wright and Oparka, 1994). The concentration factors of 3,5-ClBA (2.5) and 3,5-ClSA (0.6) in the phloem sap are close to those of dichlorinated aromatic conjugates with an α-amino acid function synthesized recently (Rocher, 2004). These latter are translocated by a carrier system (Delétage-Grandon et al., 2001), probably an aromatic and neutral amino acid transporter (Chen et al., 2001). These discrepancies between the predictions (Fig. 2) and experimental data (Table I) may give rise to the hypothesis according to which SA is taken up by a carrier system in addition to the ion-trap mechanism already mentioned (Yalpani et al., 1991). Interestingly, it has been demonstrated recently that biotin, a monocarboxylic acid, is translocated by a Suc carrier (Ludwig et al., 2000). Whatever the mechanism of SA uptake because of the high SA capacity to accumulate in the phloem, early variations in SA concentration in leaf tissue in response to a biotic stress must quickly generate a systemic increase of SA levels in the apical part of the plant. Further work is needed to determine this mechanism.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Castor bean (*Ricinus communis* L. cv Sanguineus) seeds, obtained from Ball-Ducrettet, were placed in humid cotton wool for 24 h at 27°C ± 1°C prior to sowing in wet vermiculite. Seedlings were grown in a humid atmosphere (80% ± 5%) at 27°C ± 1°C.

Sap Collection and Analysis

Six days after sowing, the endosperm of seedlings (about 20 mm length) was carefully removed (Kallarackal et al., 1989). At this stage of development, the cotyledon cuticle was very thin and permeable to many inorganic and organic solutes (Schobert and Komor, 1989; Orlich and Komor, 1992; Zhong et al., 1998). The cotyledons were then incubated in a buffer solution containing 0.25 mM $MgCl_2$ and 0.5 mM $CaCl_2$. The buffers used were 20 mM MES (pH 5.0, 5.5, and 6.0) and 20 mM HEPES (pH 4.6, 7.0, and 8.0). Buffers containing citrate could not be used at acidic pH due to their chelating effect toward Ca^{2+}. The buffer solution was complemented with SA or another product as described in "Results and Discussion" (Fig. 1; Table I).

At the end of the experiment, the hypocotyl was severed in the hook region at about 2.5 cm below the base of the donor tissues. The phloem and the xylem sap were collected with graded glass microcapillaries from the upper part and the basal part of hypocotyls, respectively. The saps were analyzed immediately or were stored at −80°C until analysis. To prevent exudation from the phloem when collecting the xylem sap, a droplet of 1 M $CaCl_2$ was added to the cut surface for 1 min to plug the sieve tubes (Kallarackal et al., 1989; Antognoni et al., 1998). The surface was then wiped dry with absorbing paper. The purity of the xylem sap collected after the treatment described above was then verified by using 5(6)-carboxyfluorescein (CF), which is known as a symplastic marker (Oparka, 1991). The Ricinus cotyledons were incubated for 1 h in a standard buffered medium, pH 4.6, containing 100 μM CF. After cutting the hypocotyl, xylem and phloem sap were collected after 20 or 30 min, respectively, and then analyzed by HPLC (Table II). Commercial carboxyfluorescein is a mixture of two isomers with a carboxyl group in the 5 or 6 position of fluorescein. Under the chromatographic conditions indicated in Table II, the two isomers could be clearly distinguished (Fig. 8A) and that made the detection of the product easier at very low concentrations (Fig. 8B). CF could not be detected in the xylem sap (Fig. 8C), whereas it was present at 22.6 μM concentration in the phloem sap (Fig. 8A) under our experimental conditions. We also checked that, when applied to the other side of the hypocotyl section, $CaCl_2$ 1 M completely blocked phloem exudation despite the pressure generated by cotyledon tissues.

Saps were analyzed by HPLC after dilution with pure water (1 + 9 and 1 + 1 v/v for phloem sap and xylem sap, respectively). We employed reversed-phase chromatography using a Discovery C16 RP-amide column (length 250 mm, i.d. 4.6 mm; Supelco) or a Chromolith performance RP 18e column (length 100 mm, i.d. 4.6 mm; Merck) in accordance with the procedure set out in Table II. Results were processed with PC 1000 software, version 3.5, from Thermo Electron SA. When radiolabeled molecules were used, phloem sap was analyzed by liquid scintillation spectrometry (TriCarb 1900TR; Packard Instruments).

Chemicals

The compounds to be added to incubation solutions were from Acros Organics (SA, 3,5-ClSA, 4-MES, HEPES, CF) or from Sigma-Aldrich Chimie (3,5-ClBA, SA-carboxy-^{14}C, Suc, Suc-UL-^{14}C).

Physicochemical Properties

Physicochemical properties of SA and other ionizable molecules were predicted using ACD LogD suite version 9.0 software. This unified package of programs calculates log K_{ow} (octanol-water partition coefficient for a neutral species), pK_a (ionization constant in aqueous solution), and log D. The latter is defined as the effective partitioning of all ionic forms of a compound present in equilibrium at a specific pH in octanol-water mixture:

$$\log D = \log\left(\frac{\sum a_i^{org}}{\sum a_i^{H_2O}}\right),$$

where $a_i^{H_2O}$ is the concentration of the ith microspecies in water and a_i^{org} is the concentration of the ith microspecies in the organic phase.

To calculate log D (i.e. the pH-dependent log K_{ow}), the software uses both pK_a and log K_{ow} information. The algorithms for the predictions are based on contributions of separate atoms, structural fragments, and intramolecular

interactions between different fragments. These contributions are derived from internal databases containing experimental data for 18,400 compounds (log K_{ow}) and 16,000 compounds (pK_a), including those for SA, 3,5-ClBA, and 2,4-D. Log *D* is an important parameter considered for bioavailability and absorption studies of drugs (Bös et al., 2001) and agrochemicals (Chollet et al., 2005).

Received May 2, 2006; revised May 2, 2006; accepted June 9, 2006; published June 15, 2006.

LITERATURE CITED

Antognoni F, Fornalè S, Grimmer C, Komor E, Bagni N (1998) Long-distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. Planta **204:** 520–527

Assmann SM (2004) Abscisic acid signal transduction in stomatal responses. *In* PJ Davies, ed, Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 391–412

Ben-Tal Y, Cleland CF (1982) Uptake and metabolism of [^{14}C] salicylic acid in *Lemna gibba* G3. Plant Physiol **70:** 291–296

Bös M, Sleight AJ, Godel T, Martin JR, Riemer C, Stadler H (2001) 5-HT_6 receptor antagonists: lead optimisation and biological evaluation of *N*-aryl and *N*-heteroaryl 4-amino-benzene sulfonamides. Eur J Med Chem **36:** 165–178

Bromilow RH, Chamberlain K, Evans AA (1991) Molecular structure and properties of xenobiotics in relation to phloem translocation. *In* JL Bonnemain, S Delrot, WJ Lucas, J Dainty, eds, Recent Advances in Phloem Transport and Assimilate Compartmentation. Ouest Editions, Presses Academiques, Nantes, France, pp 332–340

Bromilow RH, Rigitano RLC, Briggs GG, Chamberlain K (1987) Phloem translocation of non-ionised chemicals in *Ricinus communis*. Pestic Sci **19:** 85–99

Chen HJ, Kuc J (1999) Ca^{2+}-dependent excretion of salicylic acid in tobacco cell suspension culture. Bot Bull Acad Sin (Taipei) **40:** 267–273

Chen L, Ortiz-Lopez A, Jung A, Bush DR (2001) *ANT1*, an aromatic and neutral amino acid transporter in Arabidopsis. Plant Physiol **125:** 1813–1820

Chester K (1933) The problem of acquired physiological immunity in plants. Q Rev Biol **8:** 275–324

Chollet JF, Rocher F, Jousse C, Delétage-Grandon C, Bashiardes G, Bonnemain JL (2004) Synthesis and phloem mobility of acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil. Pest Manag Sci **60:** 1063–1072

Chollet JF, Rocher F, Jousse C, Delétage-Grandon C, Bashiardes G, Bonnemain JL (2005) Acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil: effect of adding a methyl group to the *N*-substituted chain on systemicity and fungicidal activity. Pest Manag Sci **61:** 377–382

Davies PJ (2004) The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. *In* PJ Davies, ed, Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 1–15

Dean JV, Mills JD (2004) Uptake of salicylic acid 2-*O*-β-D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. Physiol Plant **120:** 603–612

Dean JV, Mohammed LA, Fitzpatrick T (2005) The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. Planta **221:** 287–296

Delétage-Grandon C, Chollet JF, Faucher M, Rocher F, Komor E, Bonnemain JL (2001) Carrier-mediated uptake and phloem systemy of a 350-Dalton chlorinated xenobiotic with an α-amino acid function. Plant Physiol **125:** 1620–1632

Delrot S, Despeghel JP, Bonnemain JL (1980) Phloem loading of *Vicia faba* leaves: effects of *N*-ethylmaleimide and *p*-chloromercuribenzenesulfonic acid on H^+ extrusion, K^+ and sucrose uptake. Planta **149:** 144–148

Denis MH, Delrot S (1993) Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. Physiol Plant **87:** 569–575

Durner J, Shah J, Klessig DF (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends Plant Sci **2:** 266–274

Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. Annu Rev Phytopathol **42:** 185–209

Enerson BE, Drewes LR (2003) Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. J Pharm Sci **92:** 1531–1544

Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P, Raskin I (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. Proc Natl Acad Sci USA **89:** 2480–2484

Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science **261:** 754–756

Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RGW, Brown MS (1994) Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the cori cycle. Cell **76:** 865–873

Guedes NEM, Richmond S, Kuc J (1980) Induced systemic resistance to anthracnose in cucumber as influenced by the location of the inducer inoculation with *Colletotrichum lagenarium* and the onset of flowering and fruiting. Physiol Plant Pathol **17:** 229–233

Hall SM, Baker DA (1972) The chemical composition of *Ricinus* phloem exudate. Planta **106:** 131–140

Hansch C, Anderson S (1967) The effect of intramolecular hydrogen bonding on partition coefficients. J Org Chem **32:** 2583–2586

Jeannette E, Rona JP, Bardat F, Cornel D, Sotta B, Miginiac E (1999) Induction of *RAB18* gene expression and activation of K^+ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. Plant J **18:** 13–22

Jenns A, Kuc J (1979) Graft transmission of systemic resistance of cucumber to anthracnose induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. Phytopathology **69:** 753–756

Kallarackal J, Orlich G, Schobert C, Komor E (1989) Sucrose transport into phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as measure by the analysis of sieve-tube sap. Planta **177:** 327–335

Kasai F, Bayer DE (1991) Quantitative evaluation of the weak acid hypothesis as the mechanism for 2,4-D absorption by corn root protoplasts. J Pestic Sci **16:** 163–170

Kiefer IW, Slusarenko AJ (2003) The pattern of systemic acquired resistance induction within the Arabidopsis rosette in relation to the pattern of translocation. Plant Physiol **132:** 840–847

Kleier DA (1988) Phloem mobility of xenobiotics. I. Mathematical model unifying the weak acid and intermediate permeability theories. Plant Physiol **86:** 803–810

Kleier DA (1994) Phloem mobility of xenobiotics. V. Structural requirements for phloem systemic pesticides. Pestic Sci **42:** 1–11

Kleier DA, Grayson BT, Hsu FC (1998) The phloem mobility of pesticides. Pestic Outlook **9:** 26–30

Lemoine R (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. Biochim Biophys Acta **1465:** 246–262

Ludwig A, Stolz J, Sauer N (2000) Plant sucrose-H^+ symporters mediate the transport of vitamin H. Plant J **24:** 503–509

Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science **250:** 1002–1004

Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. Nature **419:** 399–403

Métraux JP (2001) Systemic acquired resistance and salicylic acid: current rate of knowledge. Eur J Plant Pathol **107:** 13–18

Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. Science **250:** 1004–1006

Meuwly P, Mölders W, Buchala A, Métraux JP (1995) Local and systemic biosynthesis of salicylic acid in infected cucumber plants. Plant Physiol **109:** 1107–1114

Minnick L, Kilpatrick M (1939) Acid base equilibria in aqueous and nonaqueous solutions. J Phys Chem **43:** 259–268

Mölders W, Buchala A, Métraux JP (1996) Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. Plant Physiol **112:** 787–792

Oparka KJ (1991) Uptake and compartmentation of fluorescent probes by plant cells. J Exp Bot **42:** 565–579

Orlich G, Komor E (1992) Phloem loading in *Ricinus* cotyledons: sucrose pathways via the mesophyll and the apoplasm. Planta **187:** 460–474

Rasmussen JB, Hammerschmidt R, Zook MN (1991) Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. Plant Physiol **97:** 1342–1347

Rocher F (2004) Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes: évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense des plantes. PhD thesis. Université de Poitiers, Poitiers, France

Ross AF (1966) Systemic effects of local lesion formation. *In* ABR Beemster, J Dijkstra, eds, Viruses of Plants. North-Holland, Amsterdam, pp 127–150

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. Plant Cell **8:** 1809–1819

Schobert C, Großmann P, Gottschalk M, Komor E, Pecsvaradi A, zur Mieden U (1995) Sieve-tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin and chaperones. Planta **196:** 205–210

Schobert C, Komor E (1989) The differential transport of amino acids into the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as shown by the analysis of sieve-tube sap. Planta **177:** 342–349

Shettel NL, Balke NE (1983) Plant growth response to several allelopathic chemicals. Weed Sci **31:** 293–298

Shulaev V, León J, Raskin I (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? Plant Cell **7:** 1691–1701

Takanaga H, Tamai I, Tsuji A (1994) pH-dependent and carrier-mediated transport of salicylic acid across Caco-2 cells. J Pharm Pharmacol **46:** 567–570

Trejo CL, Clephan AL, Davies WJ (1995) How do stomata read abscisic acid signals? Plant Physiol **109:** 803–811

Tsuji A, Takanaga H, Tamai I, Terasaki T (1994) Transcellular transport of benzoic acid across Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier-mediated transport mechanism. Pharm Res **11:** 30–37

Tsuji A, Tamai I (1996) Carrier-mediated intestinal transport of drugs. Pharm Res **13:** 963–977

Van Loon LC (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Eur J Plant Pathol **103:** 753–765

Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. Plant Cell **6:** 959–965

Vreugdenhil D, Koot-Gronsveld EAM (1988) Characterization of phloem exultation from castor-bean cotyledons. Planta **174:** 380–384

Vreugdenhil D, Koot-Gronsveld EAM (1989) Measurements of pH, sucrose and potassium ions in the phloem sap of castor bean (*Ricinus communis*) plants. Physiol Plant **77:** 385–388

White RF (1979) Acetyl salicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology **99:** 410–412

White RF, Rybicki EP, von Wechmar MB, Dekker JL, Antiniw JF (1987) Detection of PR-1 type proteins in Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Graminae and Solanaceae by immunoelectroblotting. J Gen Virol **68:** 2043–2048

Wright KM, Oparka KJ (1994) Physicochemical properties alone do not predict the movement and compartmentation of fluorescent xenobiotics. J Exp Bot **45:** 35–44

Yalpani N, Silverman P, Wilson TMA, Kleier DA, Raskin I (1991) Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. Plant Cell **3:** 809–818

Zhong WJ, Kaiser W, Köhler J, Bauer-Ruckdeschel HB, Komor E (1998) Phloem loading of inorganic cations and anions by the seedling of *Ricinus communis* L. J Plant Physiol **152:** 328–335