



HAL
open science

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

Françoise Rocher

► To cite this version:

Françoise Rocher. 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. Autre. Université de Poitiers, 2004. Français. NNT : . tel-00138898v1

HAL Id: tel-00138898

<https://theses.hal.science/tel-00138898v1>

Submitted on 28 Mar 2007 (v1), last revised 29 Mar 2007 (v2)

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 25 avril 2002)

École Doctorale: Ingénierie Chimique, Biologique et Géologie
Secteur de Recherche: Chimie Organique, Minérale, Industrielle

présentée par:

Françoise Rocher

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

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

soutenue le **12 octobre 2004** devant la Commission d'Examen

JURY:

MEMBRES:

MM. P. Leroux	Directeur de Recherche, INRA de Versailles	<i>rapporteur</i>
J.-F. Cooper	Professeur, Université de Perpignan	<i>rapporteur</i>
A. Amblès	Professeur, Université de Poitiers	<i>examineur</i>
G. Bashiardes	Professeur, Université de Poitiers	<i>examineur</i>
J.-L. Bonnemain	Professeur Émérite, Université de Poitiers	<i>examineur</i>
J.-F. Chollet	Chargé de Recherche, CNRS de Poitiers	<i>examineur</i>

MEMBRE INVITÉ:

M^{me} M. Barthe Ingénieur Agronome, CIVB Bordeaux

Remerciements

Cette thèse a été réalisée dans le Laboratoire de Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles (Directeur A. Amblès), au sein de l'équipe du professeur G. Bashiardes, en étroite collaboration avec le Laboratoire de Transport des Assimilats (Directeur. S. Delrot), au sein de l'équipe de phloémologie du docteur R. Lemoine.

J'ai le plaisir d'exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

En premier lieu, je remercie vivement le professeur Jean-Louis Bonnemain qui est à l'initiative de cette étude des maladies vasculaires de la vigne et qui a dirigé activement mes recherches, en formant un groupe « chimie-biologie » au sein duquel travail s'accorde avec confiance, enthousiasme et bonne humeur. Il m'a permis de découvrir l'intérêt que présente une collaboration entre chimistes et biologistes lors de mon stage de DEA et m'a vivement encouragée à poursuivre cette orientation dans la cadre d'une thèse, en collaboration étroite avec le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB).

Aussi, j'adresse mes remerciements au CIVB, plus particulièrement à M^{me} Muriel Barthe et M. Laurent Charlier qui ont contribué à la réalisation de mes recherches, non seulement en apportant une aide financière mais aussi une aide scientifique, par l'organisation de plusieurs réunions qui mènent à des discussions nécessaires pour orienter l'axe des recherches.

Je remercie vivement M. Pierre Leroux, directeur de recherche à l'INRA de Versailles, et M. Jean-François Cooper, professeur à l'Université de Perpignan, pour avoir accepté de se déplacer, de me faire bénéficier de leurs compétences et d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie également M. André Amblès pour l'intérêt qu'il porte à l'égard de mon travail et pour avoir eu la gentillesse d'accepter de faire partie du jury.

Je remercie également le professeur Jean-Pierre Gesson, actuellement Président de l'Université et directeur du laboratoire de chimie au début de mon travail, d'avoir permis de m'inscrire au sein de son unité de recherche, acceptant du même coup l'ouverture de la thématique de synthèse organique sur l'application dans le domaine végétal.

J'exprime ensuite ma reconnaissance au professeur Georges Bashiardes qui a accepté en toute confiance la présence d'une biologiste dans son équipe de chimistes organiciens et au professeur Serge Delrot qui m'a accordé de la place dans les locaux de son unité, notamment pour la culture du matériel végétal et fongique.

J'adresse une profonde gratitude à Jean-François Chollet qui a assuré la direction scientifique et morale de mon travail au laboratoire de chimie. Il m'a initiée à la synthèse organique et m'a permis d'acquérir une analyse rigoureuse des résultats obtenus. Ses connaissances en chimie et pharmacologie m'ont été d'une aide précieuse pour observer les

relations entre les propriétés chimiques des molécules et la physiologie des plantes ou champignons. Il a également apporté son regard d'agriculteur respectueux de la terre qui mène à des discussions pertinentes, en matière d'agropharmaceutique entre autres.

Mes remerciements vont aussi au personnel des deux laboratoires qui m'ont accueillie et ont contribué régulièrement ou ponctuellement à mon travail. Cette reconnaissance s'adresse en particulier au personnel de « Beau-Site » qui m'a apporté aide et conseils dès mon arrivée au laboratoire. Ce témoignage s'adresse également au personnel du laboratoire de chimie qui a eu la gentillesse de m'aider à découvrir le travail en laboratoire de synthèse. Je tiens à remercier tous les étudiants en thèse ou DEA que j'ai côtoyé durant ces années, à la paillasse ou lors des pauses café (ou thé selon les goûts), pour leur sympathie et leur entrain.

Mes amis, en particulier les musiciens que j'ai croisés pendant ces années de thèse, sont cordialement remerciés pour leur patience et leurs encouragements les plus mélodieux, malgré de nombreux retards aux répétitions et des absences en concert.

Enfin, je tiens aussi à remercier affectueusement mes parents pour m'avoir accordé leur confiance et permis de faire de longues études et de la même façon je remercie toute ma famille, proche ou éloignée, pour son soutien moral.

Table des matières

Avant-propos	1
Historique	5
1 - LES RELATIONS PLANTES-PATHOGÈNES	7
1.1 - <i>La relation non-hôte</i>	7
1.2 - <i>La relation hôte</i>	7
2 - LA LUTTE CHIMIQUE CONTRE LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGÈNES	9
2.1 - <i>Les fongicides</i>	9
2.1.1 - <i>Les fongicides non systémiques</i>	9
2.1.1.1 - <i>Substances polyvalentes ou multi-sites</i>	9
2.1.1.2 - <i>Substances inhibitrices de la respiration mitochondriale</i>	10
2.1.1.3 - <i>Inhibiteurs de la biosynthèse des lipides</i>	13
2.1.1.4 - <i>Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols membranaires (IBS)</i>	13
2.1.1.5 - <i>Fongicides agissant sur la formation des parois cellulaires</i>	15
2.1.1.6 - <i>Substances affectant la transduction de signaux</i>	16
2.1.1.7 - <i>Inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine</i>	16
2.1.1.8 - <i>Inhibiteurs de la formation des microtubules et des divisions cellulaires</i>	17
2.1.2 - <i>Les fongicides systémiques</i>	17
2.1.2.1 - <i>Substances inhibitrices de la respiration mitochondriale</i>	17
2.1.2.2 - <i>Inhibiteurs de la biosynthèse des lipides</i>	18
2.1.2.3 - <i>Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols membranaires (IBS)</i>	19
2.1.2.4 - <i>Inhibiteurs de la synthèse d'acides nucléiques</i>	20
2.1.2.5 - <i>Inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine</i>	21
2.1.2.6 - <i>Inhibiteurs de la formation des microtubules</i>	21
2.2 - <i>Les stimulateurs de défenses naturelles des plantes</i>	22
3 - LA SYSTÉMIE	25
3.1 - <i>Définition, avantages et inconvénients</i>	25
3.2 - <i>Généralités sur les sèves et les voies de transport</i>	27
3.2.1 - <i>Le phloème</i>	27
3.2.2 - <i>Le xylème</i>	29

3.3 - Généralités sur les transports membranaires	29
3.3.1 - La structure de la membrane plasmique	29
3.3.2 - La diffusion au travers de la bicouche lipidique	29
3.3.3 - Le transport des solutés par des protéines membranaires	30
3.4 - Mécanismes du chargement libérien	31
3.4.1 - La voie symplastique	31
3.4.2 - La voie apoplastique	32
3.5 - Cas des produits phytosanitaires phloème-mobiles	32
3.5.1 - Le piégeage d'acide	32
3.5.2 - L'intervention de transporteurs	33
4 - CONCLUSION	35

Matériel & Méthodes **37**

1 - TESTS DE SYSTÉMIE	39
1.1 - Matériel végétal	39
1.2 - Absorption de composés exogènes par les cotylédons de ricins et collecte de sève phloémienne et/ou xylémienne	39
1.3 - Détection des molécules exogènes par chromatographie liquide haute performance (CLHP)	41
1.3.1 - Appareillage	41
1.3.2 - Les éluants	42
1.3.3 - Le type d'élution	42
1.3.4 - Solutions d'étalonnage	42
1.3.5 - Préparation des échantillons	42
1.3.6 - Calcul des concentrations des substances exogènes de la sève	42
1.4 - Absorption de molécules radiomarquées sur disques cotylédonaires de ricin	43
2 - TESTS D'ACTIVITÉ FONGICIDE	43
2.1 - Matériel fongique	43
2.2 - Tests d'activité	43

Bibliographie DES CHAPITRES HISTORIQUE & MATÉRIEL ET MÉTHODES **45**

Résultats	53
<hr/>	
Chapitre I	55
<hr/>	
• INTRODUCTION	57
• PUBLICATION « SYNTHESIS AND PHLOEM MOBILITY OF ACIDIC DERIVATIVES OF THE FUNGICIDE FENPICLONIL », PEST MANAG SCI, 2004, SOUS PRESSE	59
• PUBLICATION « ACIDIC DERIVATIVES OF THE FUNGICIDE FENPICLONIL: EFFECT OF ADDING A METHYL GROUP TO THE N-SUBSTITUTED CHAIN ON BOTH SYSTEMICITY AND FUNGICIDAL ACTIVITY », PEST MANAG SCI, 2004, SOUS PRESSE	69
Chapitre II	85
<hr/>	
• INTRODUCTION	87
• PUBLICATION « CARRIER-MEDIATED UPTAKE AND PHLOEM SYSTEMY OF A 350-DALTON CHLORINATED XENOBIOTIC WITH AN α -AMINO ACID FUNCTION », PLANT PHYSIOL, 2001	89
• SYNTHÈSE ET ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE CONJUGUÉS FONGICIDE - ACIDE AMINÉ OU ACIDE SALICYLIQUE (OU ANALOGUE) - ACIDE AMINÉ	103
1 - SYNTHÈSE DE DIFFÉRENTS CONJUGUÉS AVEC DES AMINOACIDES	104
1.1 - Synthèse d'un conjugué acide salicylique-lysine	104
1.2 - Synthèse d'un conjugué acide salicylique-cystéine	104
1.2.1 - Première étape : blocage de la fonction acide carboxylique de la cystine	104

1.2.2 - Deuxième étape : blocage de la fonction amine	105
1.2.3 - Troisième étape : coupure du pont disulfure	105
1.2.4 - Quatrième étape : formation d'une liaison thioester entre l'acide acétylsalicylique et le produit de la troisième étape	106
1.2.5 - Cinquième étape : déblocage des fonctions acide α -aminé et hydroxyle	106
1.3 - Synthèse d'un conjugué acide 3,5-dichlorobenzoïque-lysine	107
1.3.1 - Première étape : blocage de la fonction aminoacide de la lysine et synthèse du chlorure de l'acide 3,5-dichlorobenzoïque	107
1.3.2 - Couplage du sel cuprique de lysine et du chlorure de l'acide 3,5-dichlorobenzoïque	108
1.3.3 - Déblocage du complexe cuprique	109
2 - PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES	110
2.1 - Conjugué alcool triazolique-acide aspartique	110
2.2 - Conjugué acide salicylique-lysine	112
2.3 - Conjugué acide 3,5-dichlorobenzoïque-lysine	113
2.4 - Comparaison avec des conjugués herbicide-acide aminé	113
3 - CONCLUSION	116
Chapitre III	117
<hr/>	
• INTRODUCTION	119
• MANUSCRIT À SOUMETTRE « EVALUATION OF THE RICINUS PHLOEM CAPACITY TO ACCUMULATE EXOGENOUS SALICYLIC ACID »	121
Conclusion générale	143
<hr/>	
Table des illustrations	151
<hr/>	

Liste des abréviations

2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
AS	Acide salicylique
ANT1	Aromatic and neutral aminoacid transporter
ATP	Adénosine triphosphate
ABC	ATP binding cassette
BABA	Acide β -aminobutyrique
CAV	Cellule associée aux vaisseaux
CCCP	Carbonyl cyanure 3-chlorophénylhydrazone
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthanesulfonique
IBS	Inhibiteur de la biosynthèse des stérols
INA	Acide 2,6-isonicotinique
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MES	Acide 4-morpholineéthanesulfonique
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
PCMBs	Acide <i>p</i> -chloromercuribenzènesulfonique
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
RSA	Résistance systémique acquise
RSI	Résistance systémique induite
THF	Tétrahydrofurane

Avant-propos

L'espèce humaine a fait son apparition sur Terre il y a des millions d'années et a su profiter du couvert végétal qui constituait non seulement des abris mais aussi lui apportait quelques victuailles. Au fil des années, l'Homme a cessé le rituel de la cueillette et est devenu cultivateur. C'est ainsi qu'il a vu l'apparition de dommages sur les plantes qui appauvrissent les récoltes. Les premières civilisations incriminaient la colère des esprits et vivaient alors des périodes de famine et de maladies mystérieuses.

En 1600, un célèbre agronome, Olivier de Serres, fait paraître un ouvrage intitulé « Théâtre d'Agriculture et Mesnage des Champs » qui traite des pratiques culturales de l'époque. À cette époque, on incriminait encore des actions divines mystérieuses et on utilisait alors des produits naturels dont on peut douter de l'efficacité (urine, vin, lie, cendres, graisses, ail...) ou bien encore on pratiquait des rites, pratiques obscures qui montrent la méconnaissance des ravageurs.

C'est peu après, au milieu du XVII^e siècle, que des horticulteurs ont ensuite tenté l'identification plus rationnelle des maladies des plantes et des ravageurs afin de mieux lutter contre ces fléaux. L'apparition des techniques microscopiques ont permis les premières caractérisations des organismes responsables de ces maladies. C'est Malpighi qui le premier a commencé la comparaison histologique de plantes saines et de plantes parasitées. Au XVIII^e siècle, Linné nomme et classe ces pathologies identifiées sur les végétaux. C'est aussi au cours de ce siècle que Fabricius démontre que des champignons microscopiques sont associés aux tissus de végétaux malades sans savoir si ce phénomène est la cause ou la conséquence de la maladie. À partir de cette découverte, le champ de recherche sur les phytopathologies était ouvert et de nombreux ouvrages sont parus par la suite. À cette époque, les seules maladies connues étaient celles des céréales (rouille, carie, charbon), les autres menaces pour les récoltes étant les insectes (au champ et surtout dans les réserves de grains de blé). C'est alors au XIX^e siècle qu'un premier traitement contre la carie du blé est découvert: il s'agit du sulfate de cuivre.

Au milieu du XIX^e siècle, les cultures occupent une surface de plus en plus étendue et les échanges entre régions et pays se sont développés grâce aux nouveaux modes de transport des denrées agricoles. C'est autour de 1845 que les premiers ravages causés par un champignon (*Phytophthora infestans* - Mildiou) apparaissent sur les pommes de terre en Irlande, causant famine et exode. Durant la même période, les vignobles français sont envahis par *Uncinula necator*, un autre champignon qui provoque l'oïdium de la vigne. Un anglais, Kyle signale un remède efficace contre ces champignons qu'est l'application de soufre. D'autres maladies fongiques sont apparues à la fin du XIX^e siècle, menaçant à nouveau le vignoble: ce sont le mildiou en 1845 et le black-rot en 1885. Le soufre s'est avéré

inefficace contre le mildiou. Durant la même période, dans la région bordelaise, on pulvérisait du lait de chaux sur les bordures des vignobles, avec des sulfateuses en cuivre, de façon à décourager les voleurs. Il a alors été remarqué que les ceps ainsi traités étaient protégés contre le mildiou : on venait d'expérimenter l'efficacité du sulfate de cuivre, qui, neutralisé avec de la chaux, est appelé bouillie bordelaise. Ce produit a également permis de lutter contre le black-rot. Entre temps, en 1864, une invasion de petits insectes *Phylloxera vastatrix* a causé des pertes mondiales estimées à 15 milliards de dollars et un bouleversement du paysage viticole...

Au début du xx^e siècle, les produits chimiques minéraux étaient largement utilisés contre champignons et insectes : soufre, sulfate de cuivre (neutralisé avec de la chaux dans la bouillie bordelaise), des arséniate et d'autres composés dont les constituants étaient le cuivre, le zinc, le manganèse, l'arsenic, le plomb. On utilisait aussi des extraits végétaux qui apportaient des principes actifs tels le pyrèthre, la roténone, la nicotine.

C'est seulement pendant la Seconde Guerre Mondiale, qu'apparaissent les premiers pesticides organiques, permettant de lutter plus efficacement contre de nombreux fléaux. Les pesticides chlorés ont été développés alors qu'on fabriquait des armes chimiques à base de chlore. On disposait à l'époque d'énormes quantités de chlore, puisqu'il s'agit d'un sous-produit de l'industrie de la soude caustique, difficile à éliminer et à stocker. Ceci a permis une expansion rapide de l'industrie chimique. De nombreux organochlorés sont apparus par la suite et ont été très largement utilisés jusqu'aux années 1960, moment où ces composés ont été reconnus nocifs, polluants et persistants.

Peu à peu, des organophosphorés ont été produits. Ils sont généralement plus toxiques que les organochlorés puisqu'ils neutralisent les cholinestérases et donc paralysent le système nerveux des insectes, mais leur dégradation est rapide. Le premier organophosphoré est apparu en 1944, il s'agit du parathion.

De nombreuses classes de pesticides sont déterminées : les plus développés sont les herbicides, les fongicides et les insecticides. Les autres produits tels les molluscicides, rodenticides, nématicides, corvicides, fumigants, les bactéricides, les virulicides sont employés en moindres quantités.

En 2003, le marché mondial des pesticides était de 26,71 milliards de dollars (source : UIPP (Union des Industries de la Protection des Plantes). Il est réparti comme suit : 50 % pour les herbicides, 25 % pour les insecticides, 22 % pour les fongicides et 3 % pour les autres. Cette même année, le marché européen était de 7510 millions de dollars, devant le marché asiatique (5817 millions de \$) et derrière l'Amérique du Nord (7849 millions de \$).

La France est le premier consommateur européen avec 74500 tonnes utilisées en 2003. L'industrie française des produits phytosanitaires a représenté 1744 millions d'euros de chiffre d'affaires lors de la campagne agricole 2002-2003. Notons qu'en 2000, la France était le pays qui disposait du plus grand nombre de produits autorisés sur le marché (527).

Ceci a été modifié en 2003, année où un grand nombre de produits estimés les plus toxiques ou trop anciens ont été retirés.

Depuis le siècle dernier, l'effet d'une importante densité d'une même espèce végétale sur nos sols cultivés a facilité l'installation de pathogènes au sein des cultures. De plus, cela a favorisé la diversification des organismes indésirables et ceux-ci ont su s'adapter aux nouvelles cultures et à l'évolution de leur(s) plante(s) hôte(s). Dans la nature « non cultivée », le grand nombre de variétés de plantes par surface de sol, sélectionnées naturellement par effet de compétition pour l'absorption d'eau par les racines ou de lumière par les feuilles, a créé au fil des siècles un écosystème stable. Ces couverts végétaux sont généralement peu favorables aux agents pathogènes, ces derniers ne trouvant qu'une faible densité de plantes hôtes à envahir. Ainsi, naturellement, les maladies s'étendent peu et les plantes adaptent des moyens de lutte contre les pathogènes pour affaiblir ces derniers. Si des plantes sont amenées à disparaître dans un endroit donné, d'autres espèces mieux adaptées, insensibles aux pathogènes déjà présents vont prendre place et assurer un renouvellement sain de la végétation. Il s'installe donc un équilibre entre les divers végétaux et les multiples microorganismes. Ceci empêche l'apparition de dégâts faisant disparaître la végétation.

Notre civilisation ne pouvant plus se dispenser de culture pour l'alimentation du bétail et des hommes, nous devons continuer une lutte raisonnée contre les phytopathogènes. Il est actuellement possible de lutter contre certaines maladies de façon biologique. Cependant, cette méthode n'est pas adaptable contre tous les agents pathogènes. Contre de nombreux fléaux, seule la lutte chimique est efficace, mais il subsiste quelques maladies fongiques vasculaires contre lesquelles il n'existe pas encore de moyen de lutte sinon l'arrachage des plants infectés et leur incinération. C'est le cas de l'eutypiose, provoquée par *Eutypa lata* sur les ceps de vigne, les abricotiers et amandiers. L'esca est une seconde maladie vasculaire de la vigne, elle est la conséquence d'une invasion de multiples champignons. Jusqu'en 2002, on pouvait protéger le vignoble avec l'arsénite de sodium. En 2003, l'utilisation de ce produit dangereux a été interdite et il n'existe pas d'autre alternative pour éviter la recrudescence de cette maladie qui est responsable d'une perte de rendement importante.

Il serait souhaitable de mettre au point de nouveaux moyens de lutte contre ces pathologies mais l'entreprise n'est pas aisée. De nos jours, les fongicides commercialisés ne sont efficaces que sur les champignons qui restent à la surface de la plante ou pénètrent peu. Il n'existe malheureusement pas de produits capables de pénétrer suffisamment dans les tissus végétaux et d'atteindre leur système vasculaire où se logent les champignons.

Ce problème a fait l'objet de quelques travaux à l'Université de Poitiers, en étroite collaboration avec le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux. L'étude présentée dans ce mémoire est une contribution à la mise au point de molécules mobiles dans les plantes et douées d'une activité fongicide contre *Eutypa lata*.

Historique

Historique

1 - LES RELATIONS PLANTES-PATHOGÈNES

D'une manière assez générale, les plantes mettent en œuvre des mécanismes très efficaces qui contrôlent et limitent leurs rapports avec les agents potentiellement pathogènes. À cet égard, il est classique de distinguer deux grands types de réaction (Lepoivre, 2003):

1.1 - La relation non-hôte

Celle-ci, habituellement comparée à l'incompatibilité pollen-pistil d'espèces différentes, caractérise l'incompatibilité fondamentale entre tous les cultivars d'une espèce végétale donnée et tous les biotypes d'un parasite déterminé. Fort heureusement, les plantes sont des « non-hôtes » vis-à-vis de la plupart des microorganismes de leur environnement. Elles ne sont attaquées que par un nombre restreint de microorganismes.

1.2 - La relation hôte

Celle-ci, comparable aux relations pollen-pistil d'un même individu, peut conduire, selon les cas, à l'incompatibilité ou à la compatibilité. Dans ce dernier cas, le pathogène (dit virulent) peut se développer au sein de l'hôte (dit sensible) et induire la maladie.

Parmi les nombreuses avancées ayant eu lieu dans le domaine de la phytopathologie au siècle dernier, il convient de citer les travaux de Flor (1946, 1947) consacrés à la rouille du lin causé par *Melampsora lini* et qui sont à l'origine de la théorie dite « gène pour gène ». Selon ce concept, un mécanisme de résistance conduisant à l'incompatibilité est induit chez la plante-hôte si, et seulement si, le produit d'un gène de résistance R de la plante reconnaît un gène d'avirulence Avr de l'agresseur (Fig 1).

Plusieurs gènes d'avirulence ont été isolés chez divers microorganismes. Leurs produits, c'est-à-dire les protéines d'avirulence (protéines Avr) sont en général des protéines hydrophiles solubles, parfois nommées élicitines. On connaît aussi maintenant plusieurs dizaines de gènes R qui sont répartis en 6 classes. Ceux-ci diffèrent par leurs modules structuraux et leur localisation (Lahaye, 2002; Durand-Tardif et Pelletier, 2003), la dernière classe de gènes de résistance identifiée ayant probablement une localisation nucléaire (Lahaye, 2002). Les gènes R de cinq de ces classes possèdent un motif répété riche en leucine (LRR, Leucine Rich Repeat domain) qui est vraisemblablement impliqué dans la reconnaissance du produit du gène Avr et qui constitue en quelque sorte un système de surveillance, notamment lorsqu'il est exposé à la face externe de la membrane plasmique, comme c'est le cas dans la figure 1. Le domaine NBS (Nucleotide Binding Site), identifié dans 3 classes,

présente des homologues avec des protéines impliquées dans la mort cellulaire programmée chez les animaux.

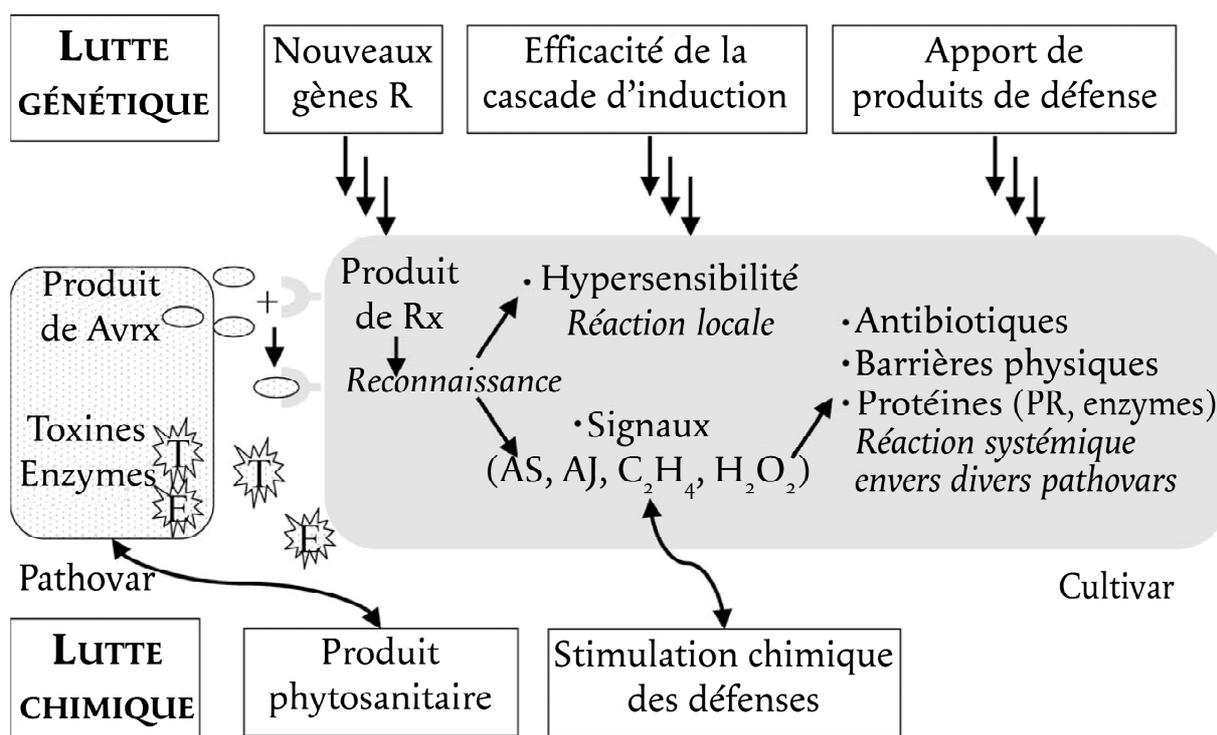


Figure 1. Réaction d'incompatibilité et place des luttes génétique et chimique, d'après Durand-Tardif, 2003

En cas d'incompatibilité (reconnaissance du produit du gène d'avirulence par le produit du gène de résistance), on note au niveau des sites infestés par un pathogène, une cascade d'événements (en particulier la production de formes actives de l'oxygène) qui conduisent à des lésions nécrotiques (Benhamou, 1996 ; Esquerré-Tugayé, 2001 ; Lepoivre, 2003 ; Durand-Tardif et Pelletier, 2003). Il s'agit de la « réaction d'hypersensibilité » (ou « réponse hypersensible ») qui s'apparente à la mort cellulaire programmée des animaux. Ces nécroses contribuent à circonscrire le pathogène au niveau du site d'infestation et entravent de ce fait la dissémination dans l'organisme. Il s'agit là de la première urgence pour la plante.

Dans un second temps, mais de manière quasi-simultanée, les autres parties de la plante sont alertées de la présence de l'agresseur. Elles mettent en place, en quelque sorte, un système de veille non spécifique qui va permettre une défense très active contre une large gamme de pathogènes. Ce phénomène, connu depuis longtemps (Chester, 1933), nommé initialement « Résistance Systémique Acquisée » (RSA ou SAR) (parfois confondue avec la « Résistance Systémique Induite » (RSI ou ISR)), a suscité de nombreux travaux au cours des deux dernières décennies (White *et al.*, 1987 ; Ryals *et al.*, 1996 ; Sticher *et al.*, 1997 ; Klarzynski et Fritig, 2001 ; Heil, 2001 ; Kúc, 2001).

2 - LA LUTTE CHIMIQUE CONTRE LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGÈNES

2.1 - Les fongicides

Plusieurs stratégies chimiques permettent de lutter contre l'invasion d'une plante par un champignon, de façon directe ou indirecte. En effet, certains fongicides agissent sur le système énergétique des cellules fongiques en inhibant les processus respiratoires. D'autres agissent sur la synthèse des constituants du champignon. Des substances ont encore pour but de désorganiser les cellules et leurs divisions au sein des tissus fongiques. Un classement de ces matières actives consiste à distinguer plusieurs catégories suivant leur pénétration dans la plante et leur fonction chimique.

2.1.1 - Les fongicides non systémiques

Les fongicides non systémiques sont ceux qui demeurent au niveau du point d'application sur la plante. Ils sont dits de surface s'ils restent à l'extérieur du végétal, à la surface des feuilles dans le cas d'une application foliaire. Lorsque les fongicides sont suffisamment lipophiles, ils sont piégés au niveau de la cuticule des feuilles; on les appelle alors cuticulaires. Ils peuvent aussi franchir la cuticule et diffuser dans les parois des premières couches cellulaires. Dans ce cas, il s'agit de fongicides pénétrants.

2.1.1.1 - Substances polyvalentes ou multi-sites

Il s'agit de la première classe de fongicides apparus dès le XIX^e siècle, aux prémices de la lutte chimique. Ces composés inhibent simultanément plusieurs fonctions essentielles du champignon; ils n'ont pas de cible enzymatique spécifique. De ce fait, on n'observe pas ou très peu de résistance de champignons vis-à-vis de ces molécules (Leroux, 2003 a). Les produits multi-sites sont utilisés soit en pulvérisation sur le feuillage des cultures, soit en traitement des semences. Ils inhibent plus particulièrement la germination des spores. Du fait de leur faible rémanence, leur application doit être régulièrement renouvelée. Plusieurs familles chimiques appartiennent à cette catégorie.

- *Les substances minérales*

Ces matières minérales, à base de cuivre (bouillie bordelaise, bouillie bourguignonne, oxychlorure de cuivre) ou de soufre, ont permis la lutte contre les mildious et les oïdiums. Les produits cupriques sont par ailleurs également utilisés contre les phyto bactérioses. Quant à l'arsénite de sodium, il a été longtemps utilisé pour lutter efficacement contre l'esca de la vigne, ceci jusqu'en 2003, date à laquelle il a été retiré de la vente.

- *Les substances organiques*

Après la seconde guerre mondiale, l'essor de l'industrie chimique a conduit à la synthèse de nombreux fongicides organiques multi-sites. Ce sont tout d'abord les organomercuriques et les organostanniques (acétate de fentine, hydroxyde de fentine) (Fig 2) qui ont été retirés du marché en 2003. Des phénomènes de résistance vis-à-vis de ces produits

avaient été observés. Les dithiocarbamates (mancozèbe, manèbe, zinèbe, zirame, thirame...) sont des produits non phytotoxiques et même activateurs de croissance des plantes (Fig 2). Dotés du même mode d'action polyvalent, les chloronitriles (chlorothalonil) sont toujours commercialisés. Il en est de même pour les phthalimides (captane, folpel), les sulfamides (tolylfluanide) et les guanidines (doguadine). En revanche, une triazine, l'anilazine n'est plus commercialisée depuis janvier 2003.

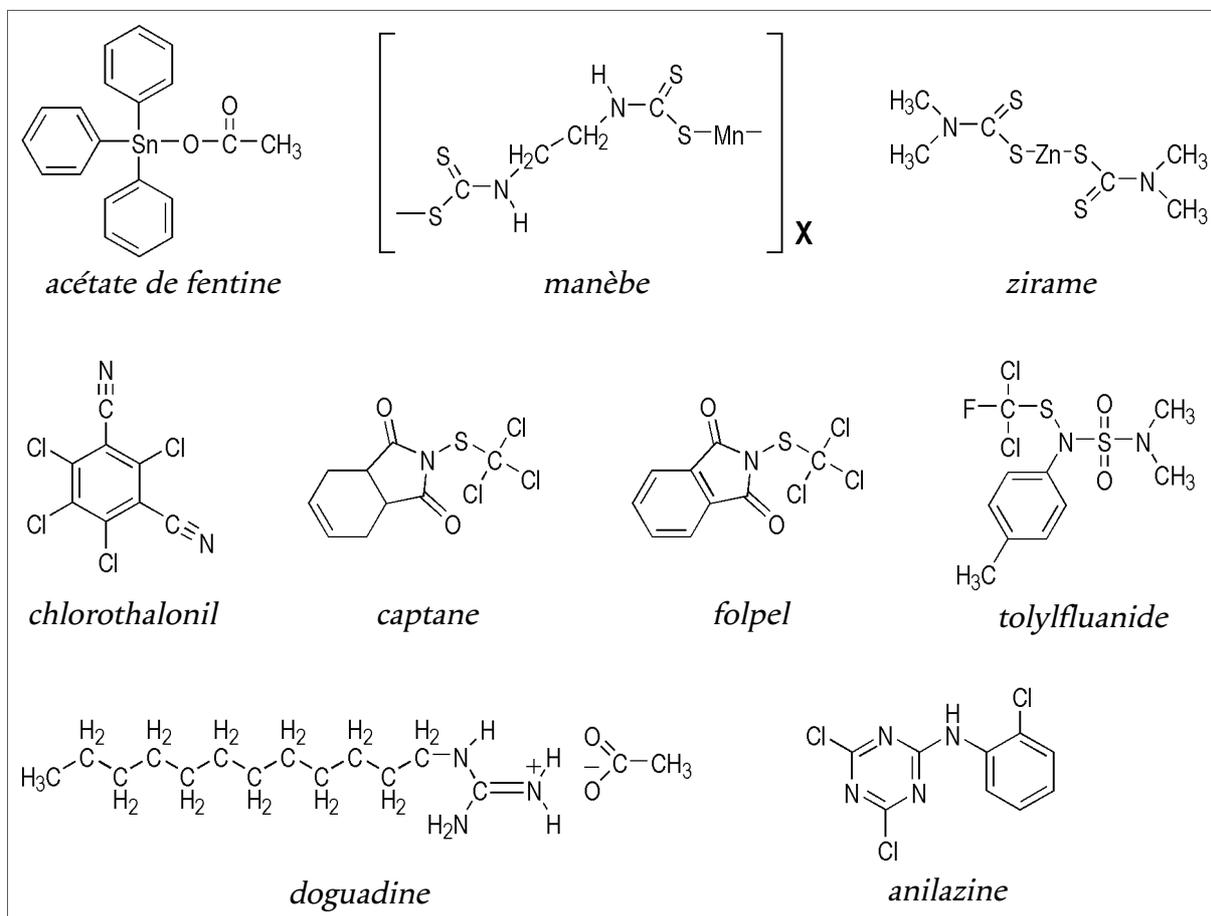


Figure 2. Substances multi-sites

2.1.1.2 - Substances inhibitrices de la respiration mitochondriale

Les processus respiratoires correspondent chez les champignons et plus généralement chez les Eucaryotes au catabolisme oxydatif des glucides, lipides et protéines. Ces mécanismes enzymatiques génèrent une source d'énergie à l'organisme, essentiellement sous forme d'ATP (Fig 3). De nombreux fongicides (environ un tiers) ont pour cible les mitochondries et de ce fait sont de bons inhibiteurs de la germination des spores des champignons.

- Inhibition du complexe III (cytochrome *bcl*) (Fig 4)

Ces inhibiteurs se fixent sur le cytochrome *b_{C1}*, soit sur la face interne au niveau de l'ubiquinone réductase, soit sur la face externe au niveau de l'ubiquinol oxydase.

Le cyazofamide, un cyanoimidazole, se fixe sur la face interne du complexe. Il est utilisé pour lutter contre le mildiou de la tomate et de la pomme de terre. À ce jour, aucun

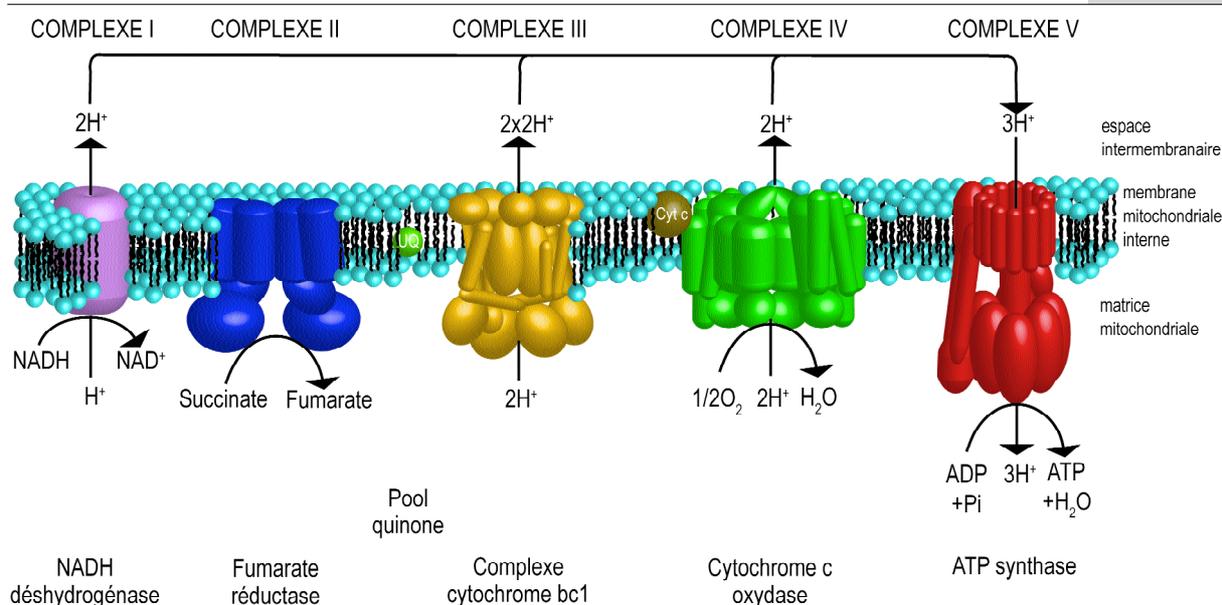


Figure 3. La phosphorylation oxydative, d'après Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, Université de Kyoto, 2004)

phénomène de résistance n'a été rapporté pour ce composé. Il n'en va pas de même pour les inhibiteurs qui se fixent du côté externe du complexe ; ceux-ci engendrent des problèmes de résistance chez de nombreux champignons cibles (Leroux, 2003 a). De plus, lorsqu'un tel champignon acquiert des propriétés de résistance, il devient résistant à tous les fongicides ayant le même mode d'action : on parle alors de résistance croisée. De fait, ils sont préférentiellement utilisés avec un fongicide ayant une autre cible moléculaire. Les inhibiteurs de l'ubiquinol oxydase appartiennent à différentes familles chimiques :

- la fenamidone (famille des imidazolinones) est utilisée pour prévenir l'apparition du mildiou ;

- la famoxadone (famille des oxazolidinediones) est une substance cuticulaire utilisée en pulvérisation foliaire qui possède donc l'avantage de ne pas être lessivée par les pluies.

D'autres composés au même mode d'action dérivent d'une molécule naturelle, la strobilurine, qui est une toxine sécrétée par des champignons Basidiomycota du genre *Strobilurus*, *Oudemansiella* et *Mycena*. Ce sont des champignons lignicoles qui se défendent contre d'autres champignons colonisateurs des mêmes milieux que les premiers. Cependant, les strobilurines naturelles sont volatiles et/ou instables à la lumière (Leroux, 2003 a). Pourtant, leur large spectre d'activité a suscité un intérêt considérable. La recherche de dérivés plus stables a mené à la commercialisation de nombreux analogues depuis 1992 :

- le krésoxim-méthyl, dont la partie toxique de la molécule est un méthyl méthoxyiminoacétate. Cet analogue de strobilurine a la propriété d'être redistribué à l'extérieur de la plante en phase vapeur. C'est la raison pour laquelle cette matière est dotée d'une longue persistance d'action et peut être utilisée en traitement préventif ;

- les propriétés actives de la pyraclostrobine, apparue sur le marché en 2003, sont attribuées au méthylméthoxycarbamate. Cette substance est dotée d'une très faible systémie (Couteux et Lejeune, 2004).

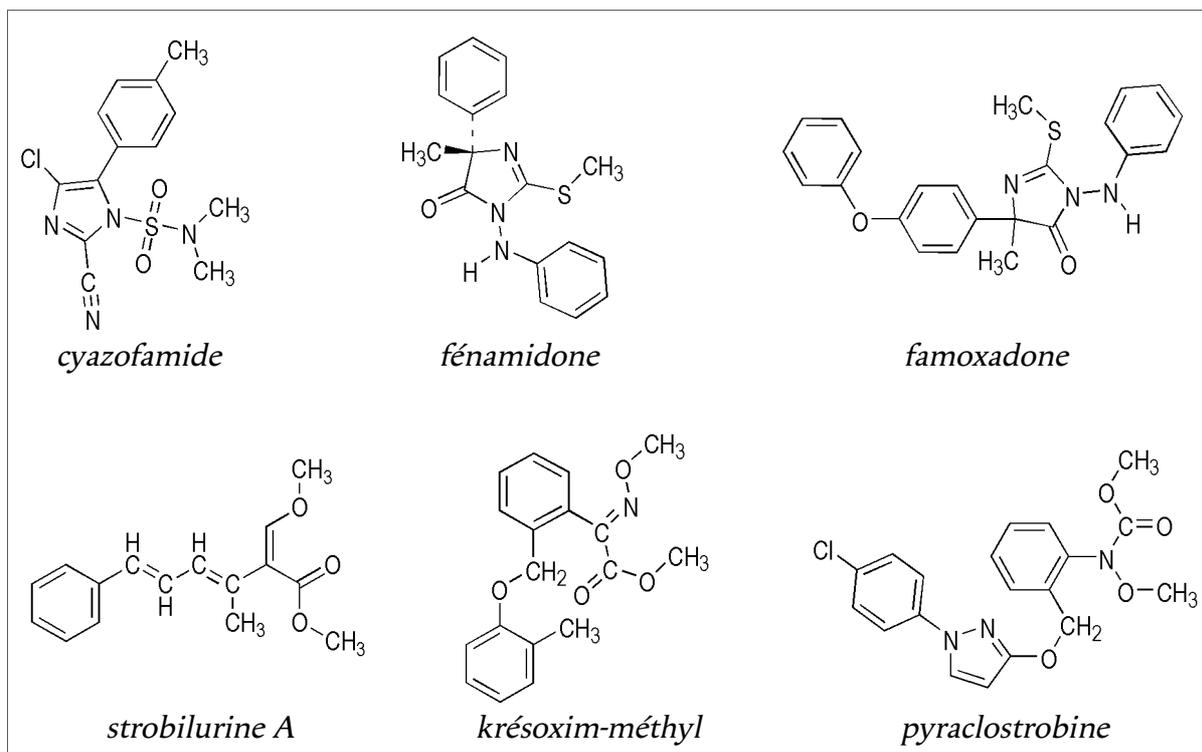


Figure 4. Inhibiteurs du complexe III mitochondrial

- Les découplants de la phosphorylation oxydative (Fig 5)

Le dinocap qui est un mélange d'isomères de crotonates de nitrophényles est particulièrement efficace contre les oïdiums. Il n'y a pas de phénomène de résistance observé à ce jour. Une seconde molécule nommée fluazinam est une 2,6-dinitroaniline qui est utilisée de façon préventive contre la germination et la production des spores de nombreux champignons.

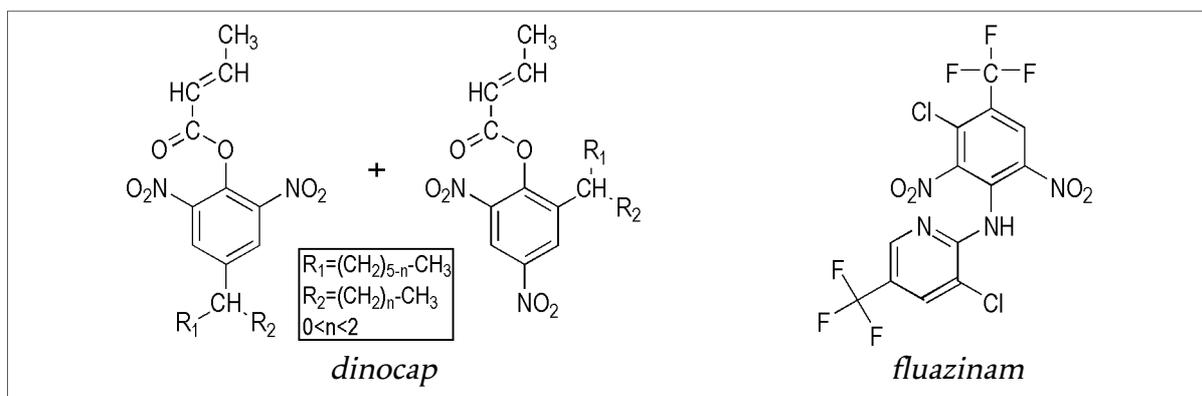


Figure 5. Découplants de la phosphorylation oxydative

- Inhibition de la production d'ATP (Fig 6)

Le silthiofam est un fongicide apparu récemment sur le marché (2003). C'est un silylamide qui empêche la libération de l'ATP mitochondrial et agit au niveau de la rhizosphère. Il est utilisé contre le piétin échaudage dans les cultures céréalières et il n'y a pas de résistance connue à ce jour pour ce produit.

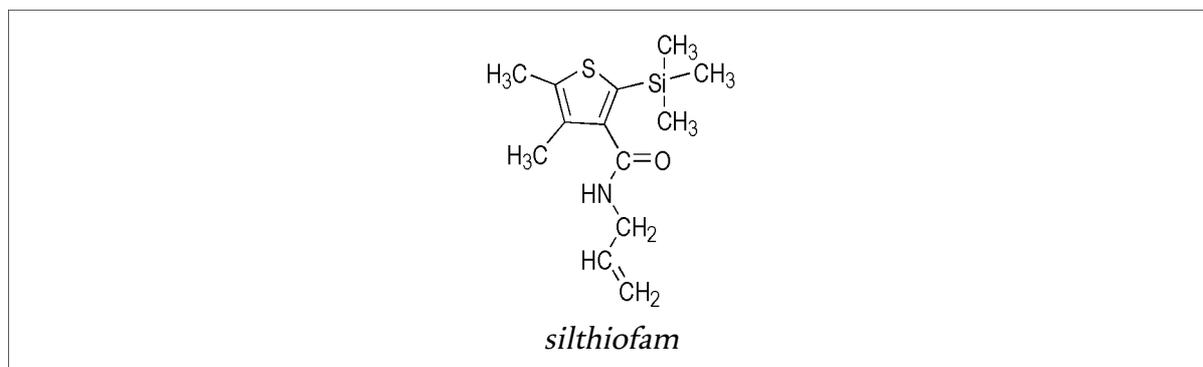


Figure 6. Inhibiteur de la production d'ATP

2.1.1.3 - Inhibiteurs de la biosynthèse des lipides

- Inhibiteurs de la NADH cytochrome c réductase dans la peroxydation des lipides (Fig 7)

Ce sont des dicarboximides qui présentent des risques de résistance en particulier lors de l'utilisation contre *Botrytis cinerea*. Pour cette raison, il est vivement conseillé de les utiliser en association avec d'autres matières actives. Iprodione, procymidone et vinchlozoline sont employées pour traiter tous types de cultures, hormis les céréales, contre de nombreuses maladies (Botrytis, moniliose, sclérotiniose, alternariose).

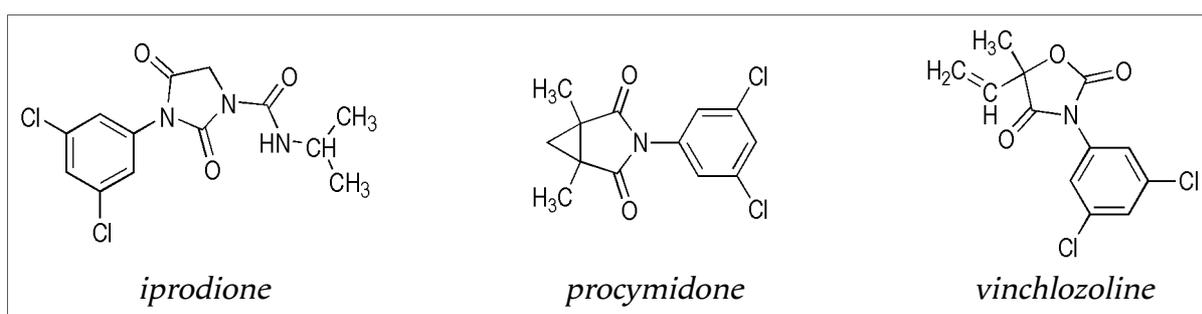


Figure 7. Inhibiteurs de la NADH cytochrome c réductase

- Autre inhibiteur de la peroxydation des lipides (Fig 8)

Le tolclofos-méthyl est un organophosphoré employé sur les semences, notamment contre le rhizoctone de la pomme de terre. Peu de cas de résistances ont été observés.

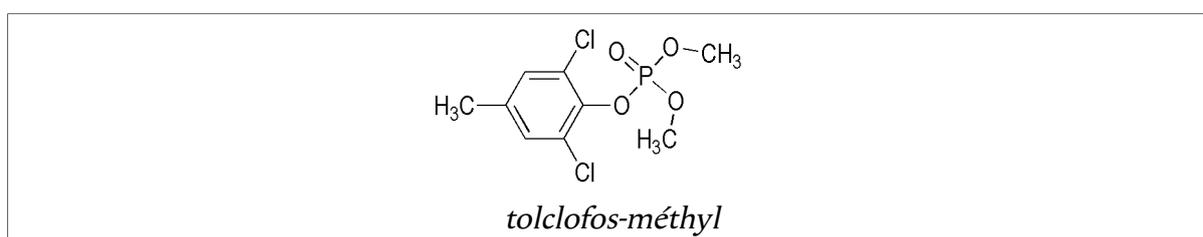


Figure 8. Inhibiteur de la peroxydation des lipides

2.1.1.4 - Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols membranaires (IBS)

Chez les champignons, les stérols - constituants membranaires - sont en général très majoritairement représentés par l'ergostérol. Cependant, certains parasites fongiques synthétisent pour stérol majoritaire une molécule voisine de l'ergostérol, par exemple l'ergosta-5, 24(28)-diénol chez les oïdiums (Leroux, 2003 a) (Fig 9). D'autres champignons de la

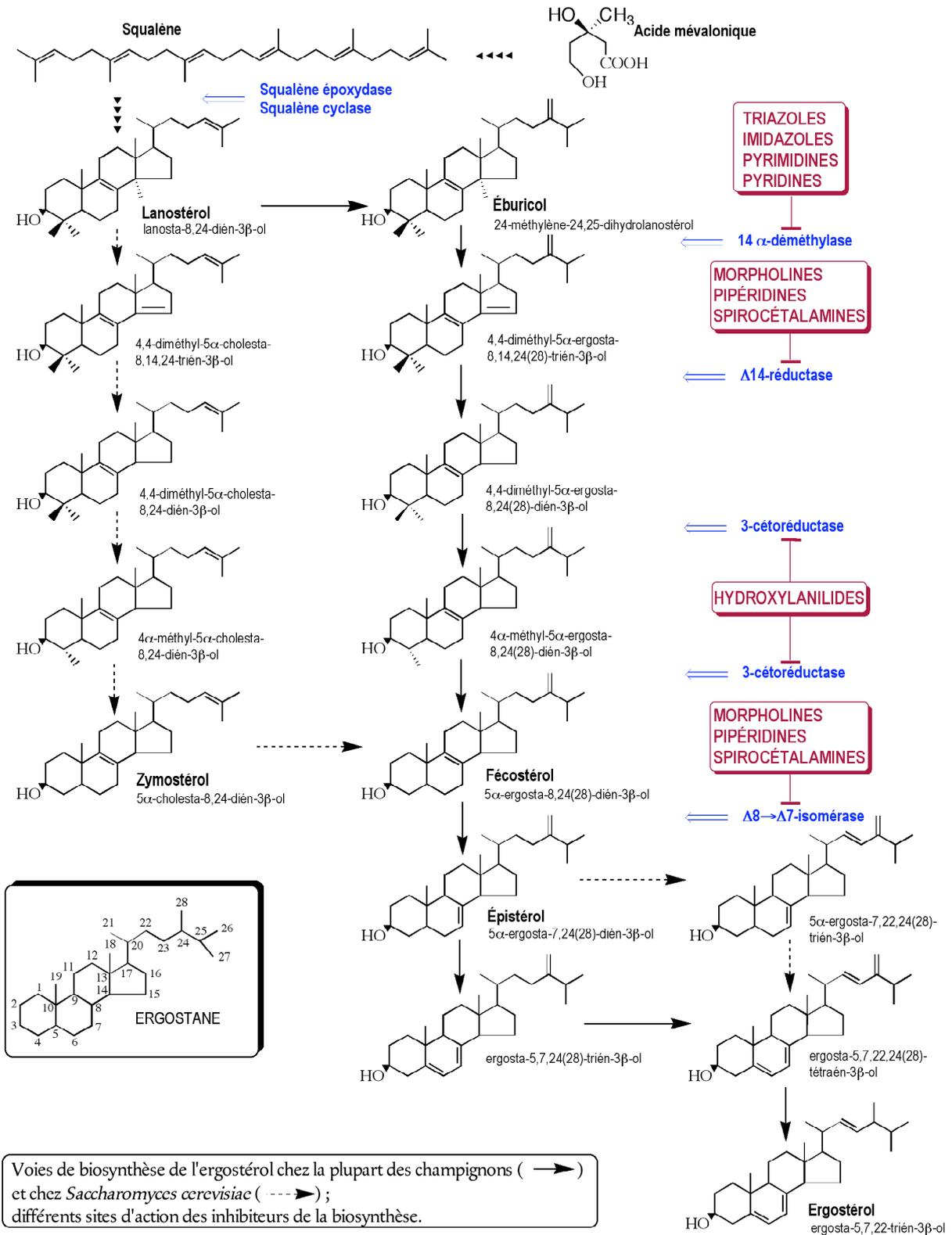


Figure 9. Voies de biosynthèse des stérols chez les champignons

famille des Oomycota ne synthétisent pas de stérols, leur squalène époxydase étant non fonctionnelle.

- Inhibiteurs de la 14 α -déméthylase (ou IDM) (Fig 10)

Le prochloraze est un imidazole commercialisé sous forme d'un complexe de manganèse. Il est employé contre la pourriture grise de diverses cultures florales.

La plus grande famille chimique de fongicides IBS est celle des triazoles. Ces molécules sont en majeure partie systémiques xylémiennes (se reporter au § 2.1.2.3). Trois d'entre elles sont toutefois des fongicides de contact : le prochloraze (imidazole), le bitertanol et le difénoconazole (triazoles).

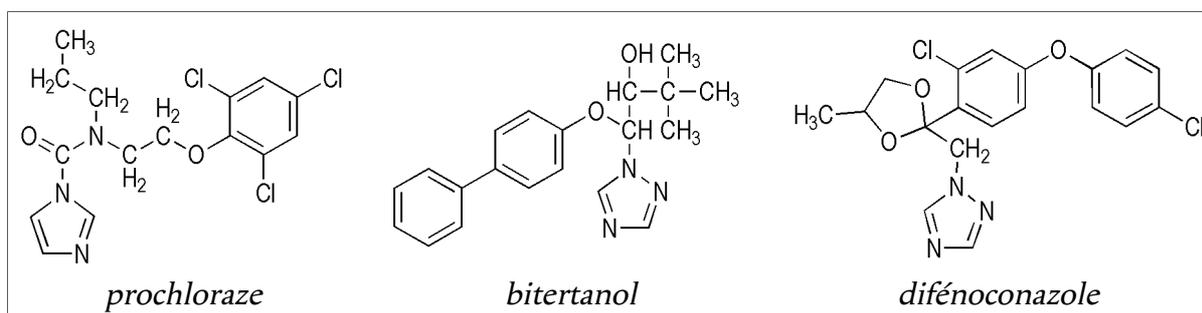


Figure 10. Inhibiteurs de la 14 α -déméthylase

- Inhibiteur de la 3-cétoréductase (C4-déméthylation) (Fig 11)

Le fenhexamide est un botryticide qui réduit la synthèse de l'ergostérol par l'inhibition de la 3-cétoréductase (Debieu *et al.*, 2001). Il s'agit d'un hydroxyanilide employé depuis 1997 sur les cultures de vigne, fraisiers ou tomates pour prévenir l'apparition de la pourriture grise. Des problèmes de résistance sont apparus, certaines souches de *Botrytis* pouvant détoxifier le fenhexamide (Leroux *et al.*, 2000).

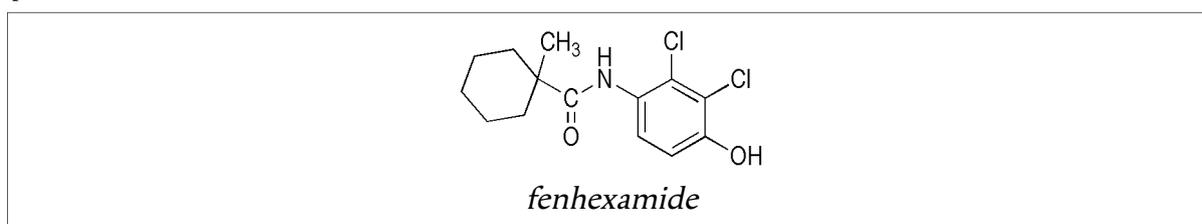


Figure 11. Inhibiteur de la 3-cétoréductase

2.1.1.5 - Fongicides agissant sur la formation des parois cellulaires (Fig 12)

L'efficacité du cymoxanil est liée au métabolisme du champignon. Ceci a été démontré chez *Botrytis cinerea* par Tellier *et al.* en 2004. Les souches sensibles sont celles qui dégradent les cyano-oximes en métabolites acides. Ces fongicides sont particulièrement efficaces contre les Oomycota. Le cymoxanil est un acétamide souvent employé en synergie avec d'autres fongicides. Le diméthomorphe, dérivé de l'acide cinnamique, est utilisé contre

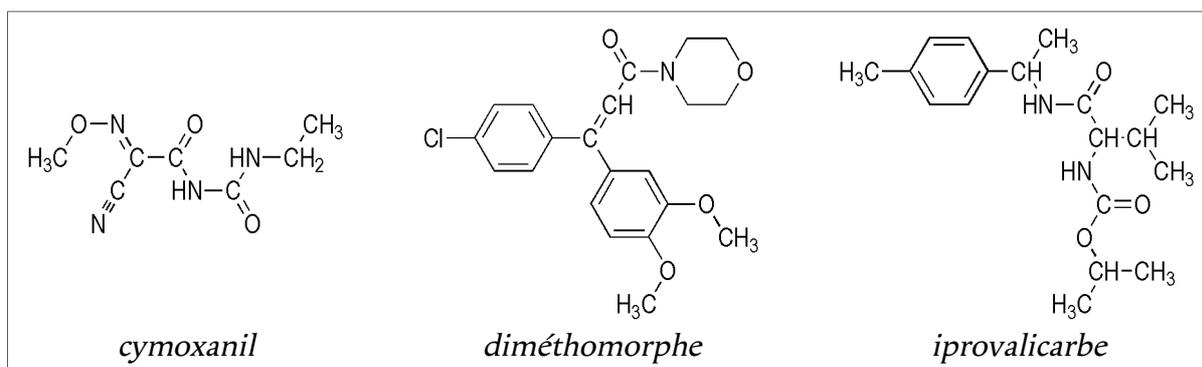


Figure 12. Substances agissant sur la formation des parois cellulaires

le mildiou. Tout comme pour l'iprovalicarbe (amino-acide carbamate), il est mentionné que ce produit diffuse dans la plante (Couteux et Lejeune, 2004).

2.1.1.6 - Substances affectant la transduction de signaux

- Fongicide agissant au niveau des protéines-G (Fig 13)

Le quinoxyfène est une quinoléine dont le mode d'action supposé pourrait être une interaction avec les protéines G. Cette matière est notamment active pour lutter contre les oïdiums.

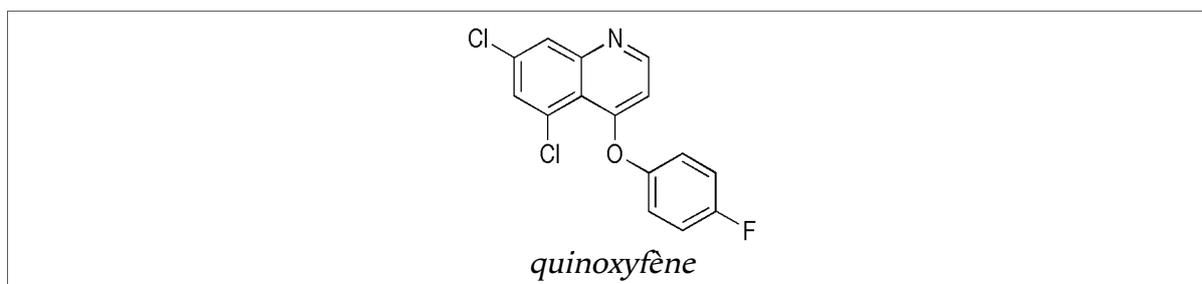


Figure 13. Substance agissant au niveau des protéines G

- Fongicides agissant sur la transduction de signaux osmotiques (Fig 14)

Le mode d'action des phénylpyrroles est plus précisément une interaction avec des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) de la cascade de transduction de signaux osmotiques (FRAC, Fongicide Resistance Action Committee, 2003).

Les phénylpyrroles sont dérivés d'une molécule naturelle, la pyrrolnitrine, qui est synthétisée par des bactéries du sol, notamment *Pseudomonas pyrocinia*. Les substances actives de cette famille chimique sont le fenpiclonil (qui n'est plus commercialisé depuis quelques années) et le fludioxonil qui est encore utilisé contre la pourriture grise de la vigne.

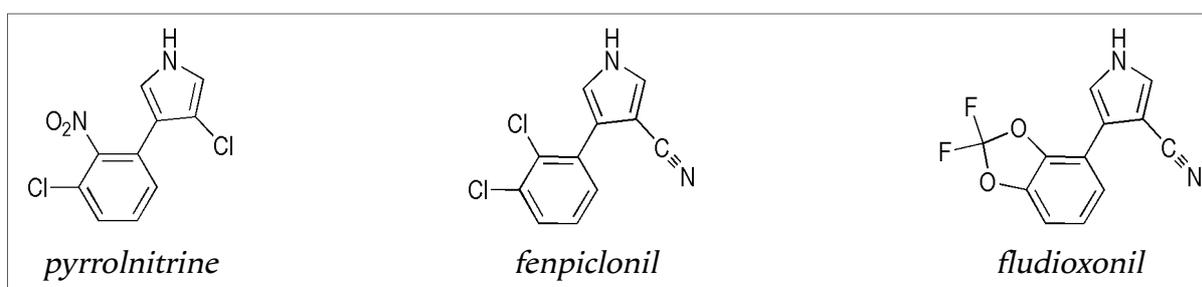


Figure 14. Substances agissant sur la transduction de signaux osmotiques

2.1.1.7 - Inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine (Fig 15)

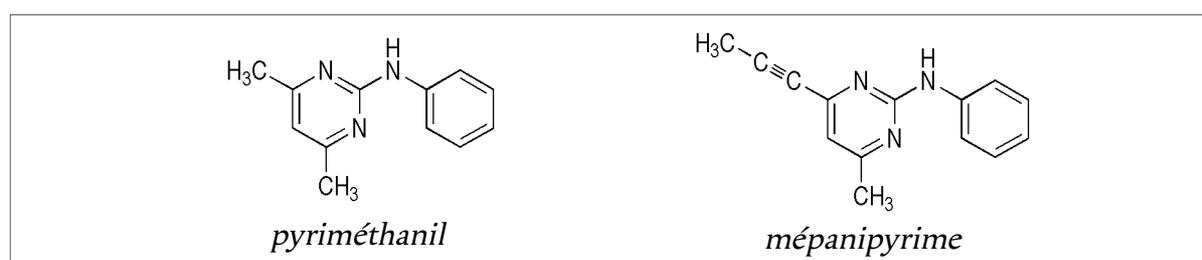


Figure 15. Inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine

Les inhibiteurs de la synthèse de méthionine agissent sur la cystathionine β -lyase de façon non compétitive (Fritz *et al.*, 2003). Ce sont des anilinopyrimidines, dont le pyriméthanil efficace contre *Botrytis* et l'agent de la tavelure (*Venturia inaequalis*). Cependant, il existe des souches résistantes de *B. cinerea* (Fritz *et al.*, 2003). Le mépanipyrimine, apparu récemment sur le marché (2003), est également efficace contre la pourriture grise.

2.1.1.8 - Inhibiteurs de la formation des microtubules et des divisions cellulaires (Fig 16)

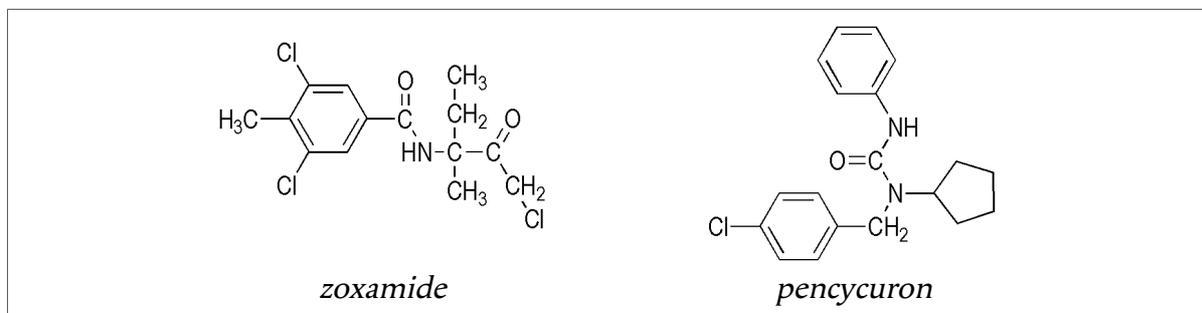


Figure 16. Inhibiteurs de la formation des microtubules et des divisions cellulaires

- Substances affectant l'assemblage de la β -tubuline

Le zoxamide est un benzamide apparu sur le marché en 2003. Cette substance, persistante dans le feuillage du fait de son absorption cuticulaire, est active contre les Oomycota. Elle est commercialisée uniquement en association avec le mancozèbe.

- Inhibition de la division cellulaire

Le pencycuron est une phénylurée dont le mode d'action précis n'est pas élucidé. Il est utilisé en culture maraîchère contre le rhizoctone.

2.1.2 - Les fongicides systémiques

La systémie des fongicides se limite uniquement à une systémie xylémienne : le produit diffuse de la semence (zone d'application) vers le sol environnant puis est absorbé par les racines au moment de la germination pour migrer vers les parties aériennes.

2.1.2.1 - Substances inhibitrices de la respiration mitochondriale

- Inhibition du complexe II (succinate déhydrogénase) (Fig 17)

Les carboxamides sont des inhibiteurs du complexe II (Fig 3) de la mitochondrie. Ceux-ci déclenchent des phénomènes de résistance chez certains champignons. Ils sont donc souvent commercialisés en association avec un second fongicide.

La carboxine est un phénylamide auquel on attribue des propriétés systémiques. Son mode d'action n'est pas encore élucidé (Couteux et Lejeune, 2004). Particulièrement efficace contre les Basidiomycota, il est actuellement commercialisé uniquement en association. Le flutolanil est, quant à lui, un anilide utilisé sur les semences de pomme de terre pour lutter contre le rhizoctone. Ce produit présente la caractéristique d'être persistant durant tout le cycle du végétal. Le mépronil, efficace contre le rhizoctone de la laitue a été retiré en 2003.

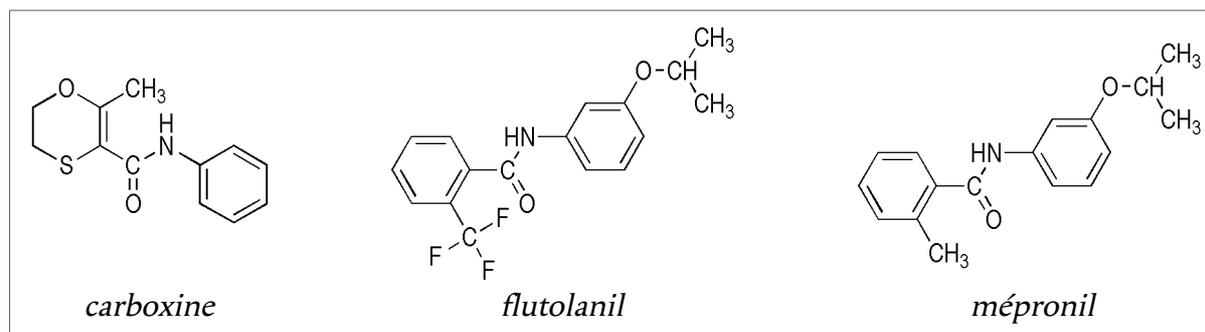


Figure 17. Inhibiteurs du complexe II mitochondrial

- *Inhibition du complexe III (cytochrome bc_1) (Fig 18)*

Parmi les analogues de strobilurines commercialisés depuis 1992, deux composés sont systémiques :

- l'azoxystrobine, dont le toxophore (groupement exerçant l'effet toxique) est un méthyl β méthoxyacrylate, est utilisé sur les plants de chicorée pour lutter contre le mildiou. Cette molécule présente de plus la propriété d'être redistribuée à l'extérieur de la plante en phase vapeur, de la même manière que le krésoxim-méthyl, non systémique (Leroux, 2003 b);
- la picoxystrobine est apparue plus récemment sur le marché européen (2003). Son spectre d'action est étendu. Elle est rapidement absorbée par la plante et est aussi redistribuée sous forme de vapeurs autour de celle-ci.

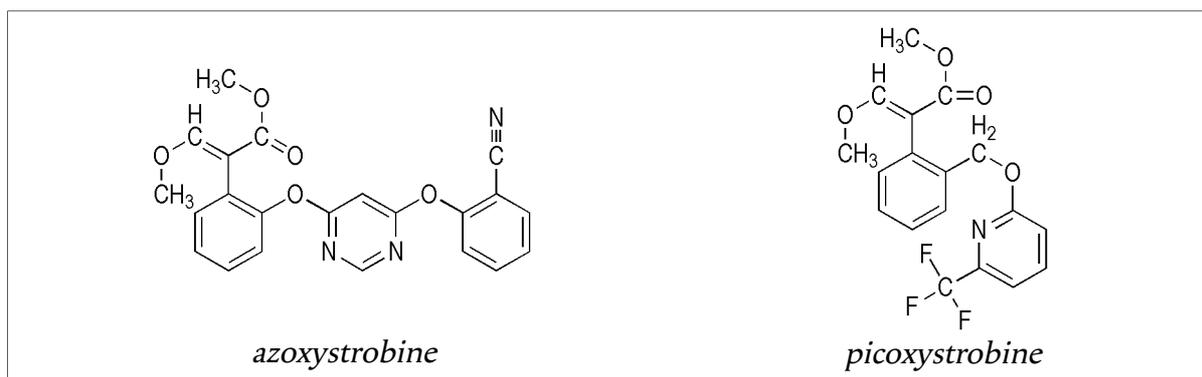


Figure 18. Inhibiteurs du complexe III mitochondrial

Au début des années 90, les analogues des strobilurines étaient annoncés comme étant des molécules très prometteuses. Ceci était appuyé notamment par l'étendue de leur spectre d'action et l'absence de phytotoxicité. Seulement, comme la plupart des inhibiteurs agissant sur la face externe du complexe III, les strobilurines causent des problèmes de résistance (Leroux, 2003 a) et de ce fait ces molécules doivent être utilisées en association.

2.1.2.2 - Inhibiteurs de la biosynthèse des lipides

- *Perturbateurs de la perméabilité membranaire (Fig 19)*

Les carbamates, dont le propamocarbe, sont utilisés en traitement des sols pour contrôler la fonte des semis. Ce produit est particulièrement spécifique des Oomycota. Cependant, son mode d'action n'est pas bien connu; il est supposé agir sur la synthèse d'acides gras (FRAC, 2004).

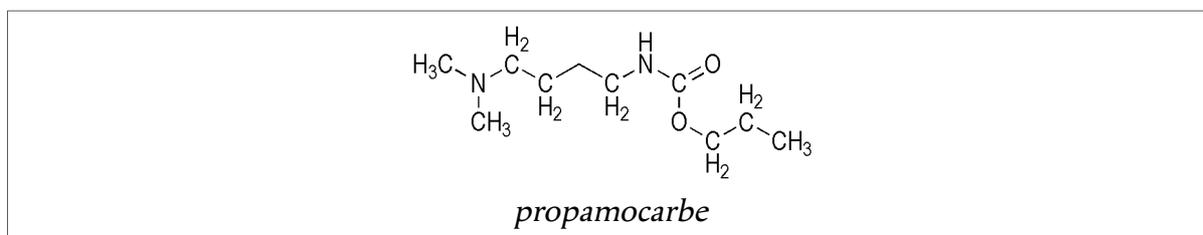


Figure 19. Perturbateur de la perméabilité membranaire

2.1.2.3 - Inhibiteurs de la biosynthèse des stérols membranaires (IBS)

Il s'agit d'une importante classe de fongicides qui est développée depuis 1973. Ces inhibiteurs peuvent provoquer l'apparition de résistance chez les champignons pathogènes, en particulier si leur utilisation est excessive.

- Inhibition de la 14 α -déméthylase (IDM) (Fig 20)

Parmi les inhibiteurs de la 14 α -déméthylase systémiques, on trouve actuellement 3 familles chimiques. Les pipérazines et les pyridines, familles auxquelles appartiennent respectivement la triforine et le pyrifénox et qui sont retirées du marché depuis 2003. Les pyrimidines sont toujours autorisées à la commercialisation : ce sont le fénarimol - utilisé en

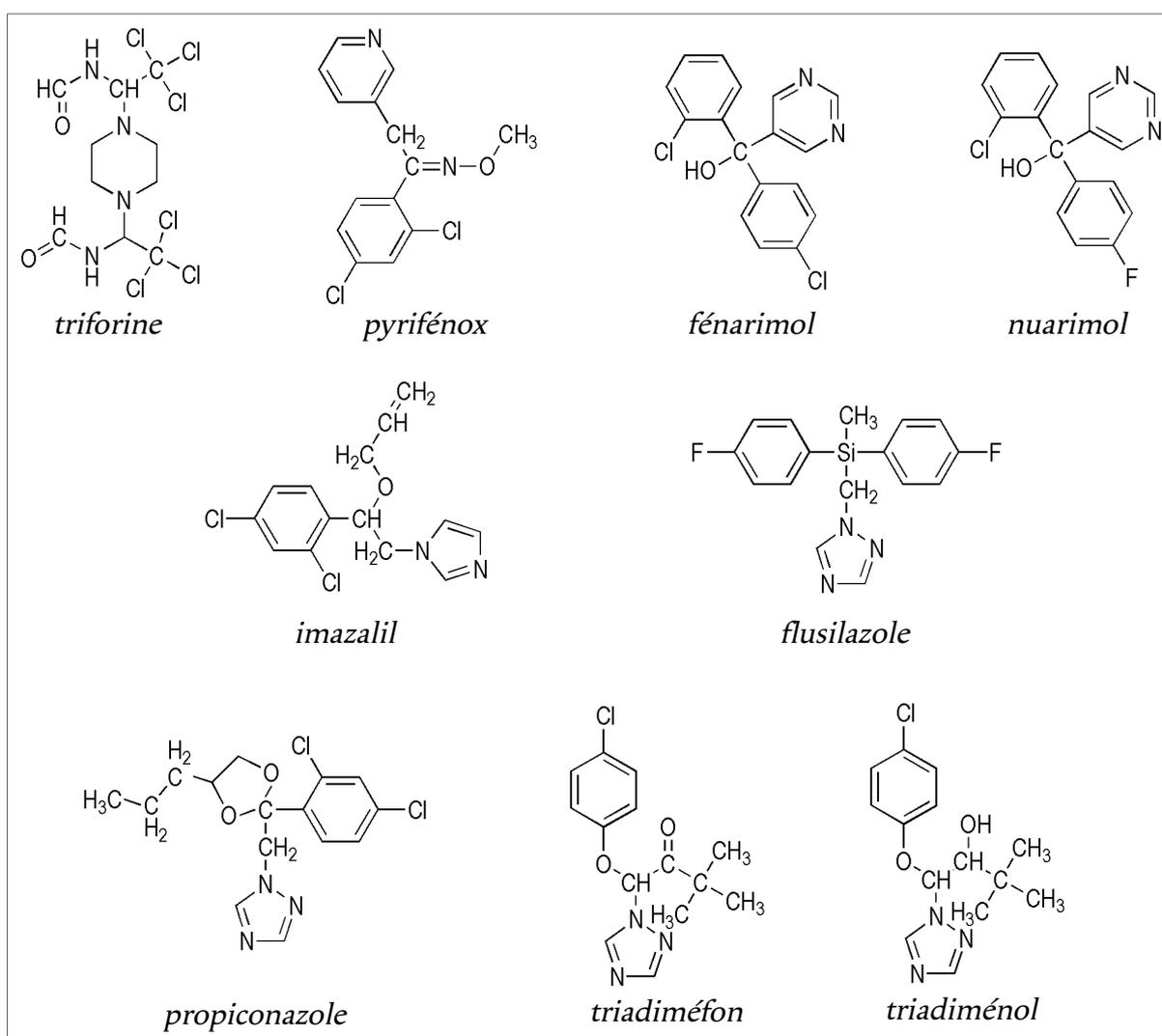


Figure 20. Inhibiteurs de la 14 α -déméthylase

particulier contre les oïdiums - et le nuarimol, qui est uniquement proposé en association avec d'autres matières actives. Parmi les imidazoles, l'imazalil n'est plus commercialisé seul. La famille chimique comprenant le plus grand nombre de molécules actives est celle des triazoles; on ne compte pas moins de 18 substances, dont on peut citer à titre d'exemple le flusilazole, le propiconazole et le triadiménol.

- Inhibition de la $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -isomérase et de la Δ^{14} -réductase (Fig 21)

Les morpholines sont des inhibiteurs de ce groupe. Dodémorphe et fenpropimorphe sont utilisés seuls alors que le tridémorphe est employé uniquement en association avec d'autres fongicides. Fenpropimorphe et tridémorphe sont de très bons inhibiteurs de la Δ^8 - Δ^7 -isomérase (Debieu *et al.*, 2000). La fenpropidine est une pipéridine utilisée sur le blé et l'orge en traitement du mildiou, alors que la spiroxamine, une spirocétalamine efficace également contre les oïdiums, est utilisée non seulement sur les céréales mais aussi en viticulture.

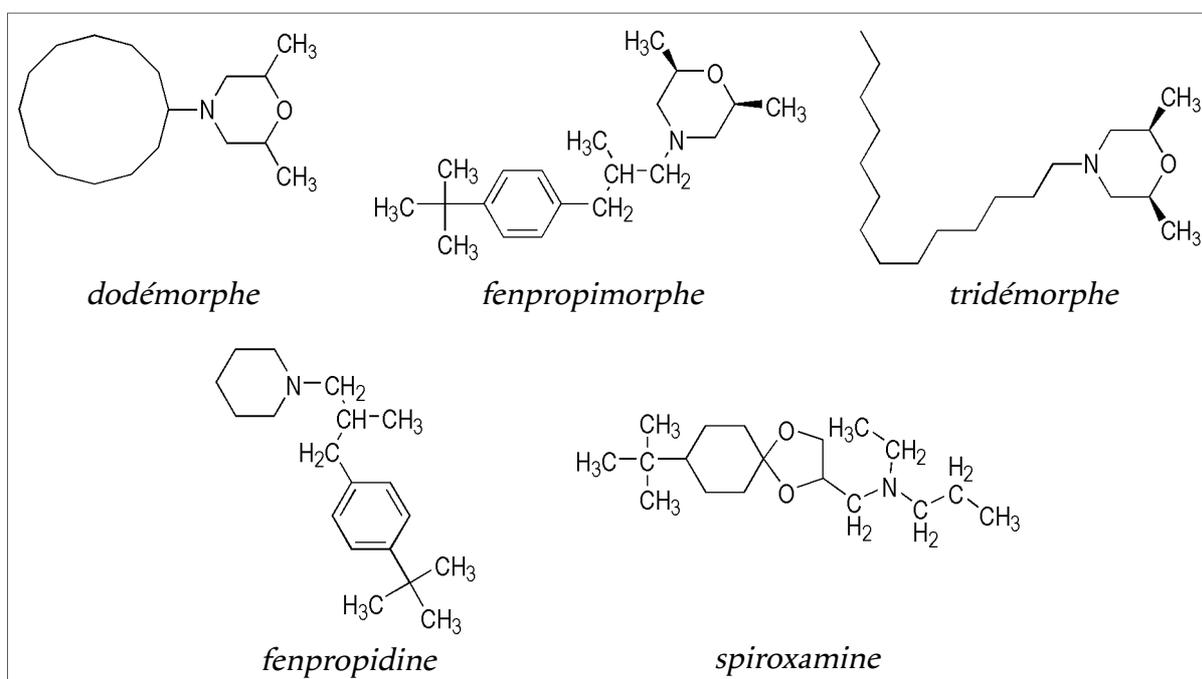


Figure 21. Inhibiteurs de la $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -isomérase et de la Δ^{14} -réductase

2.1.2.4 - Inhibiteurs de la synthèse d'acides nucléiques

- Inhibition de la synthèse d'ARN (Fig 22)

Des phénylamides, comme le béalaxyl et le méfénoxame inhibent l'action de la polymérase 1. Ces fongicides sont actifs sur les Oomycota, mais ceux-ci développent des résistances. Ces inhibiteurs sont donc préférentiellement utilisés en association.

D'autres substances inhibent l'adénosine déaminase I. C'est le cas du bupirimate qui est une hydroxypyrimidine employée pour traiter les oïdiums de façon préventive sur les cultures légumières et fruitières.

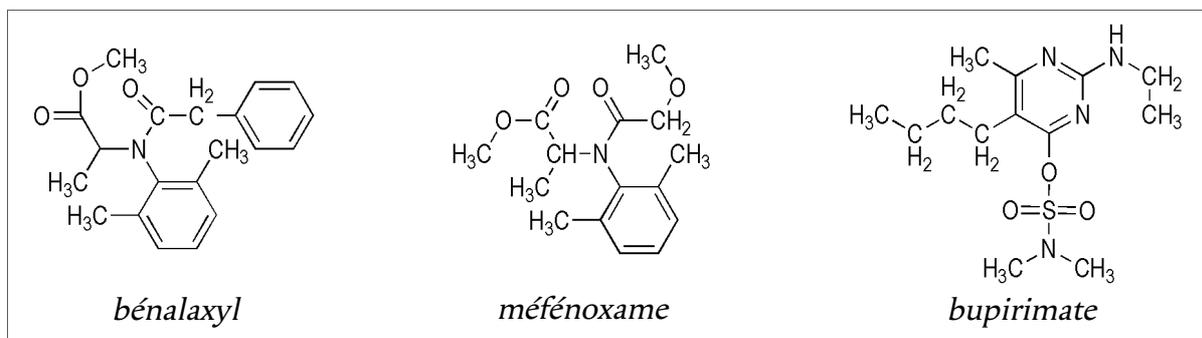


Figure 22. Inhibiteurs de la synthèse d'ARN

- Inhibition de la synthèse d'ADN (Fig 23)

L'hyméxazole est un hétérocycle azoté commercialisé depuis 1996 pour lequel aucune résistance n'a été rapportée. Cependant, on ne connaît pas encore quelle est sa cible moléculaire.

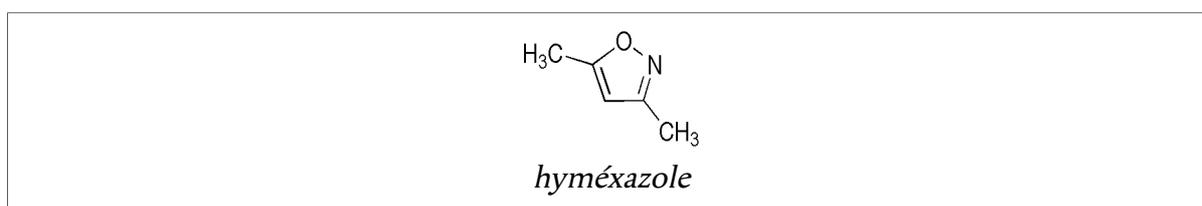


Figure 23. Inhibiteur de la synthèse d'ADN

2.1.2.5 - Inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine (Fig 24)

Le cyprodinil est une anilinopyrimidine (inhibiteur de la cystathionine β -lyase) qui est efficace contre de nombreux champignons pathogènes. Cependant, des phénomènes de résistance ont été observés, notamment chez *Botrytis* (Fritz *et al.*, 2003).

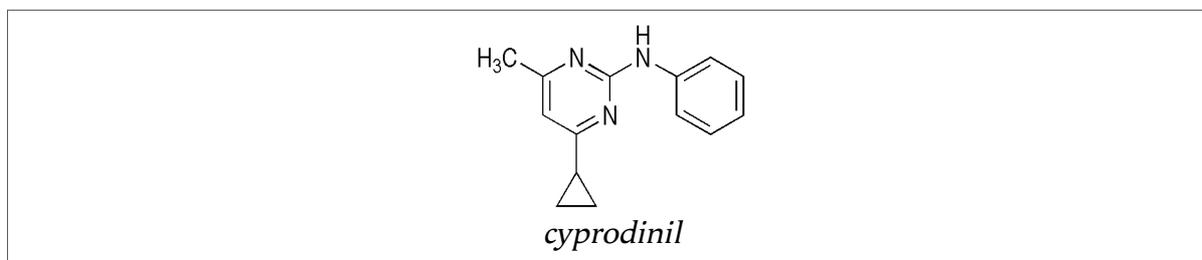


Figure 24. Inhibiteur de la biosynthèse de méthionine

2.1.2.6 - Inhibiteurs de la formation des microtubules

- Substances affectant l'assemblage de la β -tubuline (Fig 25)

Le carbendazime et le thiabendazole sont des benzimidazoles, fongicides à large spectre. Toutefois, leur utilisation doit être peu répétée car de nombreuses souches sont devenues résistantes à cette famille chimique.

Le thiophanate-méthyl présente les mêmes inconvénients. De plus, lorsqu'il est conservé longtemps en solution aqueuse, il se décompose en carbendazime.

En revanche, le diéthofencarbe est un *N*-phénylcarbamate efficace contre *Botrytis* et même sur les souches résistantes aux imidazoles. De ce fait, il est souvent employé en association avec le carbendazime.

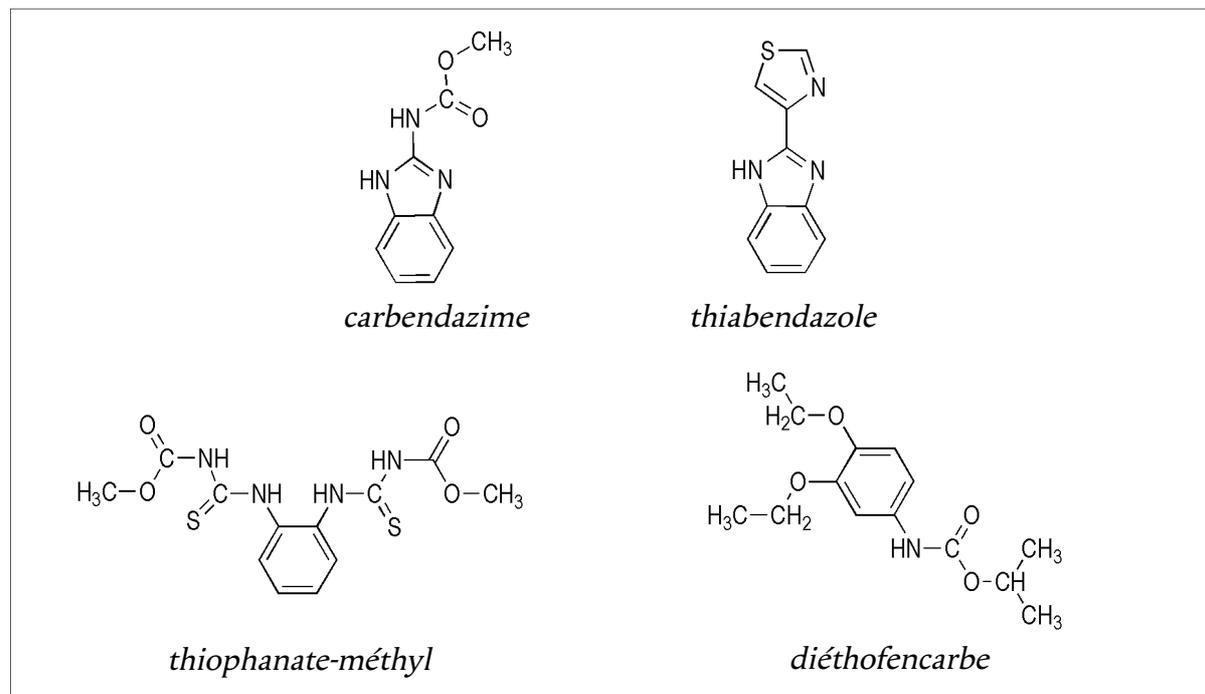


Figure 25. Substances affectant l'assemblage de la β -tubuline

2.2 - Les stimulateurs de défenses naturelles des plantes

Les mécanismes de défenses naturelles sont complexes mais de mieux en mieux connus grâce aux approches génétiques et moléculaires. Il est alors possible d'intervenir à différents niveaux en appliquant sur les plantes des substances naturelles ou des analogues dont le rôle est de stimuler les réactions de défense vis-à-vis des pathogènes.

Mais il y a aussi eu une part de hasard. C'est ainsi que le fosétyl-Al (ou phoséthyl-Al) a d'abord été testé comme antitranspirant avant que l'on découvre son effet protecteur vis-à-vis du mildiou de la vigne. Ce produit ne possède pas par lui-même de propriétés fongicides. Il est décomposé dans la plante en éthylphosphonate puis en acide phosphoreux et en acide phosphonique (Fig 26). Les phosphonates provoquent une carence phosphatée (Leroux, 2003) chez les champignons et ceux-ci produisent alors des substances qui vont induire une élicitation chez la plante-hôte. Le phosphonate est un produit fortement systémique: il parcourt la plante entière par les deux courants de sève (Leconte *et al.*, 1988). Il stimule indirectement le système de défense des plantes. En effet, chez *Arabidopsis*, il a été montré que le fosétyl induit l'expression d'une PR-protéine, *PR-1* (Chuang *et al.*, 2000) impliquée dans la résistance systémique acquise.

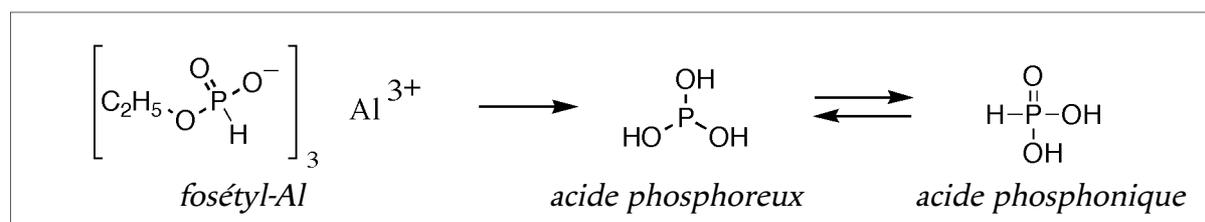


Figure 26. Métabolisme du fosétyl-Al

Le cas de l'acide salicylique (AS) est intéressant. Il a d'abord été démontré que l'aspirine (un dérivé synthétique de l'acide salicylique) pouvait induire un état de résistance systémique acquise et la production de protéines PR (White, 1979), mimant probablement l'action d'un composé benzoïque naturel agissant en tant que signal de défense (van Loon, 1983). C'est finalement en 1990 que deux démarches complémentaires démontrent que l'AS est un élément essentiel dans l'induction de la résistance systémique acquise (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990), même s'il n'est pas vraisemblablement le premier signal issu du site d'infestation (Rasmussen *et al.*, 1991; Vernooij *et al.*, 1994), ce dernier point faisant toujours l'objet de débats (Métraux, 2001). L'utilisation de l'AS a été envisagée pour la protection des cultures mais de fortes concentrations (~15 mM) sont requises. Il a été suggéré que l'AS exogène appliqué sur le feuillage ou instillé dans le mésophylle était peu mobile dans la plante (van Loon et Antoniw, 1982) ou rapidement métabolisé et compartimenté (Métraux *et al.*, 1990). Actuellement, le mode d'application qui semble le plus efficace, consiste à injecter sous pression des sels de salicylate dans le bois du cep de vigne par exemple, pour lutter contre *Eutypa lata* et *Chondostereum purpureum* (Spiers et Ward, 2001). Par conséquent, l'utilisation d'analogues naturels ou de synthèse de l'AS a été également envisagée (Fig 27).

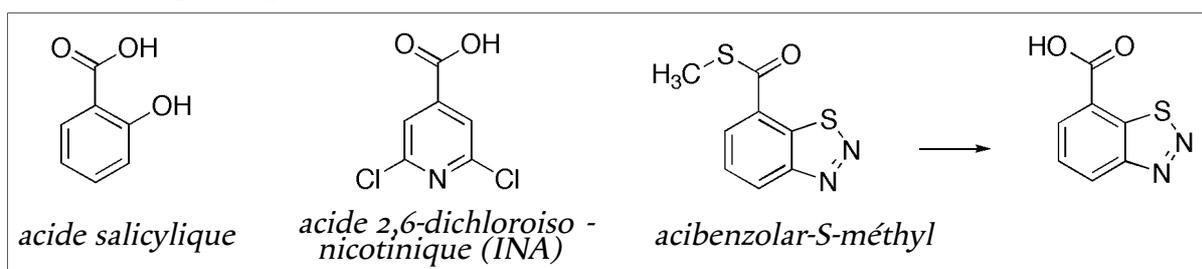


Figure 27. L'acide salicylique et des analogues fonctionnels

L'acide 3,5-dichlorosalicylique, une molécule naturelle présente dans les plantes (Lateur, 2002) a retenu l'intérêt pour lutter contre la tavelure du pommier (Ortega *et al.*, 1998) et se montre, à cet égard, plus efficace que l'acide 2,6-dichloroisocotinique (INA), un analogue de l'AS (Fig 27). L'utilisation de l'INA n'a guère dépassé le stade des essais en raison de sa phytotoxicité. En revanche, l'acibenzolar-S-méthyl, développé par Novartis (maintenant Syngenta) a été introduit en 1996 en tant qu'activateur de défenses pour le contrôle de l'oïdium des céréales en Allemagne et en Suisse (Ruess *et al.*, 1996). Il a été clairement démontré que l'acibenzolar-S-méthyl, de la même manière que l'INA, sont des composés systémiques impliqués dans la RSA, en amont ou au niveau du site d'action de l'AS (Kessmann *et al.*, 1996) (Fig 28). L'acibenzolar-S-méthyl qui n'a pas d'effet direct sur les champignons et les bactéries phytopathogènes, permet de protéger diverses plantes cultivées, outre les céréales (Fig 29). Ce produit est ainsi utilisé contre la pyriculariose du riz et plusieurs mildious (Ishii *et al.*, 1999; Leroux, 2003 b).

De même, la mise sur le marché des laminarines (Société Goëmar) est liée aux progrès de nos connaissances sur les interactions plantes-champignons pathogènes. Dès le début des années 80, il a été suggéré que les polysaccharides ne sont pas uniquement des

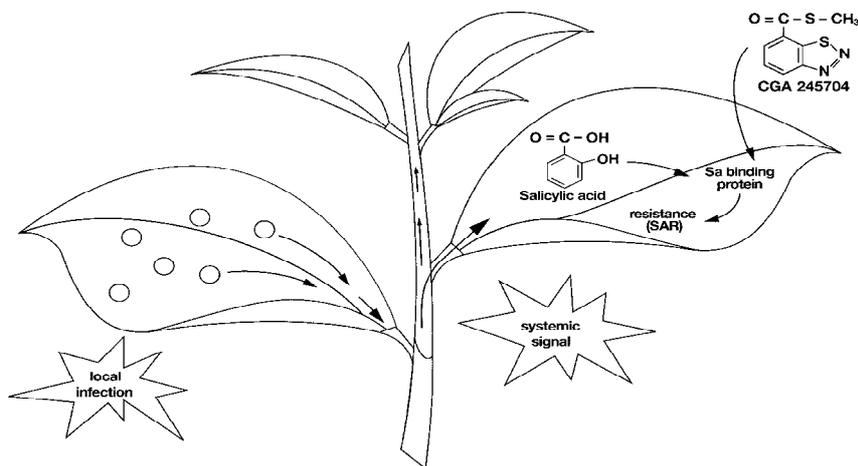


Figure 28. Site d'action de l'acibenzolar-S-méthyl (CGA 245704) dans la voie de transduction de signal de la RSA (d'après Kessmann *et al.*, 1996)

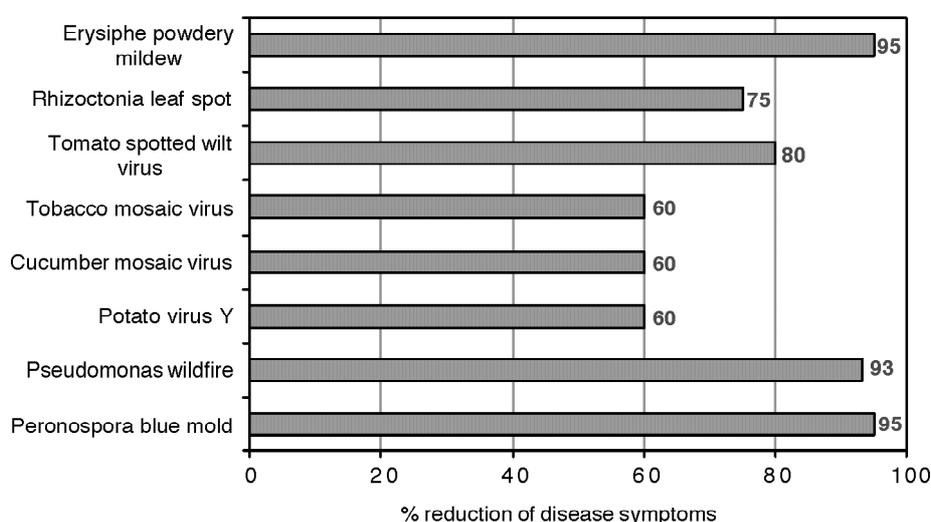


Figure 29. Spectre d'action de l'activation de la RSA par l'acibenzolar-S-méthyl (ASM) vis-à-vis de maladies du tabac (essais au champ avec BION®/ACTIGARD™ utilisé à 12-37 g d'ASM/ha) (source : Novartis, dans Oostendorp *et al.*, 2001).

éléments de structure chez les êtres vivants, mais aussi des sources capables de réguler des gènes essentiels du développement et de la défense des plantes (Albersheim *et al.*, 1983). Effectivement, dans le cadre de la confrontation entre les deux organismes, l'attaque de la paroi végétale par les polygalacturonases du champignon et l'attaque de la paroi fongique par les chitinases et glucanases de la cellule végétale aboutissent à la libération d'oligomères qui sont respectivement des éliciteurs endogènes (β -1,3 glucanes, oligogalacturonides) et des éliciteurs exogènes (β -1,3 glucanes, oligochitines). Ces éliciteurs vont amplifier la production d'enzymes hydrolytiques par la plante (Klarzynski et Fritig, 2001). D'où l'idée de produire des oligomères (ayant la taille et la structure requise pour l'élicitation) à partir d'un matériel possédant une paroi à structure intéressante et abondant en bordure d'océan, les algues brunes. Ces laminarines (β -1,6-1,3 heptaglucane; β -1,3 pentaglucane) induisent une accumulation rapide de protéines PR chez le tabac sans provoquer de mort cellulaire (Klarzynski *et al.*, 2000). La réponse induite par le produit est dépendante de la concentra-

tion en laminarine appliquée (Aziz *et al.*, 2004). En pratique, la protection des plantes par ce composé est limitée, mais il est toutefois utilisé en culture biologique (Leroux, 2003 b).

De nombreux autres activateurs des défenses de la plante sont connus (Kúc, 2001). Parmi ceux qui retiennent le plus l'attention, citons l'acide β -aminobutyrique et le probénazole.

L'acide β -aminobutyrique (BABA) est un acide β -aminé qui n'entre pas dans la composition des protéines. Ce composé stimule les défenses de la plante par la voie de transduction dépendante de l'acide salicylique et n'agit pas sur la voie dépendante de l'acide jasmonique (Zimmerli *et al.*, 2001).

Le probénazole est un composé de synthèse qui n'a pas d'activité antifongique directe. Ce produit est en fait un précurseur de la saccharine qui est un métabolite actif chez la plante (Fig 30). Celui-ci stimule notamment la résistance systémique acquise en amont de l'induction de l'acide salicylique chez le tabac (Nakashita *et al.*, 2002).

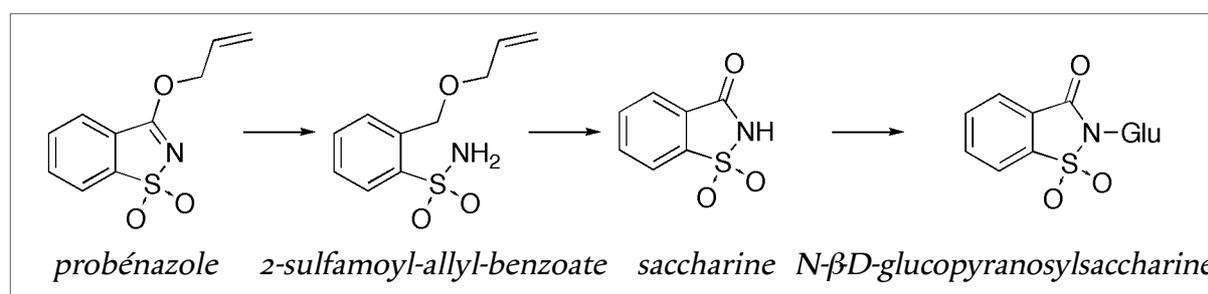


Figure 30. Le probénazole et ses métabolites (Oostendorp *et al.*, 2001)

3 - LA SYSTÉMIE

3.1 - Définition, avantages et inconvénients

La systémie est l'aptitude d'une molécule à se déplacer dans la plante pour atteindre sa cible. Autrement dit, un composé est dit systémique lorsqu'il est retrouvé dans la plante, en dehors de la zone ou du point d'application. Pour ce faire, le produit emprunte les voies de transport à longue distance de la plante : ce sont les vaisseaux du xylème et les tubes criblés du phloème qui véhiculent respectivement la sève vasculaire (ou sève brute) et la sève phloémienne (ou sève élaborée). Le premier courant de sève, ascendant, permet à la plante de diriger l'eau, les ions issus du sol et diverses molécules organiques jusqu'aux sites où siège la photosynthèse. Les produits de ce métabolisme et les molécules recyclées issues des racines sont ensuite distribués aux divers organes en croissance ou de stockage par la sève phloémienne. Celle-ci circule donc dans les deux sens pour alimenter, d'une part, les racines et éventuellement les tubercules et, d'autre part, les jeunes organes aériens apicaux.

En ce qui concerne les produits phytosanitaires, la systémie est généralement une propriété avantageuse, en premier lieu parce que cela implique que les produits soient

pénétrants ce qui les met à l'abri des lessivages et de l'action de la lumière, en second lieu (et surtout) parce que les produits sont aptes à se déplacer vers une cible normalement peu ou non accessible.

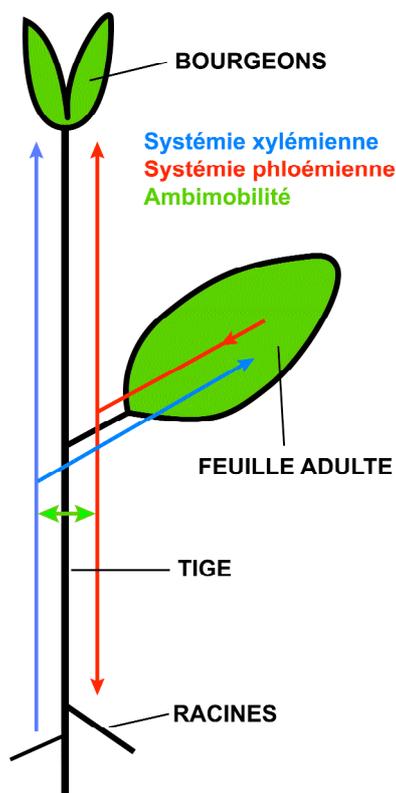


Figure 31. Les différents types de systémie

Dans le cas d'une systémie xylémienne (ou apoplastique) (Fig 31), la molécule doit être appliquée sur le sol ou enrober la graine. Ensuite, lors de la croissance de la plante, la matière active (insecticide, fongicide) est véhiculée des racines vers les parties aériennes de la plante où elle peut exercer son effet biologique. S'il s'agit de produits apoplastiques, ceux-ci pénètrent peu dans les organes (fruits, graines) récoltés pour l'alimentation animale ou humaine. Ceci limite les risques dans la chaîne alimentaire. Le principal inconvénient est lié au mode d'application puisque l'absorption du produit par le végétal n'est que partielle. Le reste est exposé au lessivage d'où un risque de pollution du sol et des eaux.

Dans le cas de la systémie phloémienne (ou symplastique) (Fig 31), les xénobiontes sont entraînés vers les parties de la plante en voie de croissance (notamment les apex caulinaire et racinaire) et vers les organes de stockage (tubercules, rhizomes). Cette propriété est évidemment très favorable aux herbicides (2,4-D, glyphosate, etc.) qui leur permet d'atteindre des sites stratégiques contrôlant la pérennité et le développement de la plante.

Du fait des échanges entre phloème et xylème habituellement constatés le long des voies de transport, les produits phloème-mobiles peuvent être repris en partie par le courant de sève vasculaire, ce qui leur assure une large distribution dans la plante. La plupart des produits à systémie libérienne sont de ce fait ambimobiles, c'est-à-dire mobiles dans les deux voies de transport à longue distance.

La systémie phloémienne et l'ambimobilité sont des propriétés a priori avantageuses pour les insecticides, nématicides et les fongicides pour lutter respectivement contre les pucerons et autres insectes piqueurs, contre les nématodes et contre les champignons pathogènes du système racinaire et des tissus conducteurs. Il n'y a pas d'inconvénient particulier lorsqu'il s'agit de cultures non collectées pour l'alimentation animale ou humaine (cotonnier par exemple). En revanche, l'utilisation de tels produits systémiques doit nécessiter une vigilance particulière dans le cas contraire (spécificité de la cible, période d'utilisation, turn-over et compartimentation dans la plante...)

3.2 - Généralités sur les sèves et les voies de transport

3.2.1 - Le phloème

La circulation de la sève phloémienne est un écoulement par pression de turgescence selon le concept de Münch (1930): les produits de la photosynthèse s'accumulent dans les éléments conducteurs du phloème, générant ainsi un influx d'eau en provenance des cellules voisines ou du compartiment apoplastique, d'où une poussée du liquide vers les parties de la plante en voie de croissance (Fig 32). Ce modèle a été abandonné dans les années 1950 et 60 lorsque divers auteurs ont constaté que des inhibiteurs du métabolisme ou des refroidissements appliqués localement sur le pétiole (ou une portion de tige) stoppaient la circulation libérienne. Il a été réhabilité vers le milieu des années 70 (Bonnemain, 1975) et admis depuis.

La circulation de la sève xylémienne peut résulter « d'une poussée racinaire » liée à un influx d'ions dans les vaisseaux entraînant un mouvement osmotique d'eau à travers la membrane plasmique des cellules contiguës (Fig 32). Les conséquences de cette poussée racinaire sont visibles dans la nature, tôt le matin, lorsque des gouttelettes d'eau apparaissent

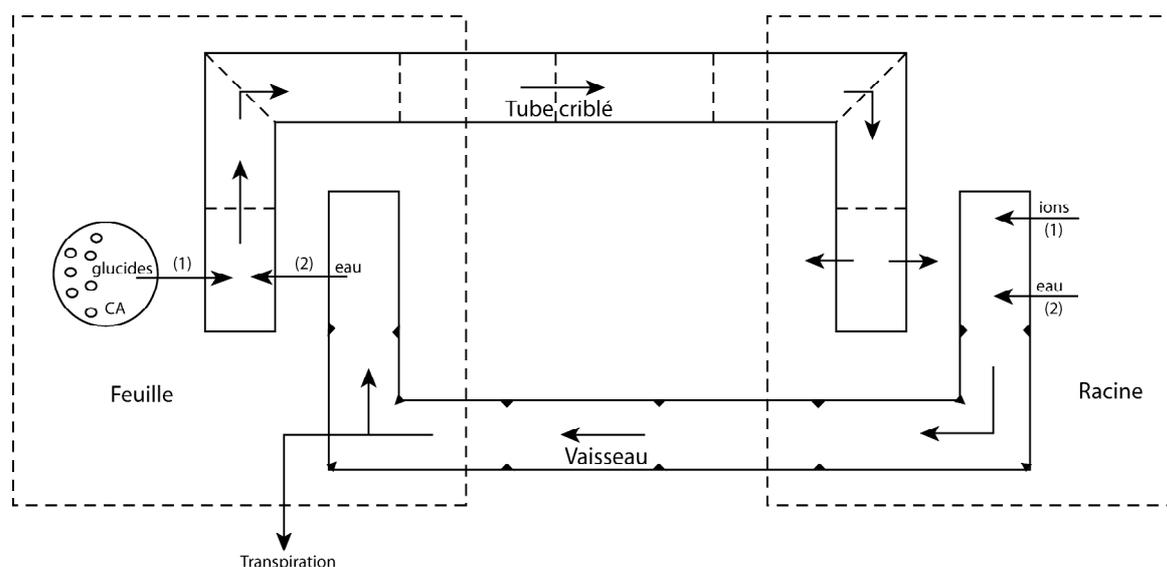


Figure 32. Schématisation de la circulation des sèves chez le végétal (Bonnemain, 1975)

sent en bordure ou à l'extrémité du limbe de diverses espèces, plus précisément au niveau d'orifices nommés hydátodes. Durant le jour, la perte d'eau par transpiration au niveau du feuillage génère un appel d'eau et la sève xylémienne est alors sous tension (Fig 32).

Le phloème est un tissu composé de plusieurs types cellulaires ayant des fonctions spécifiques, mais on ne retiendra ici que le complexe cellule compagne-cellule criblée. Ces deux cellules sont issues de la même cellule méristématique mais leur différenciation et leur fonction sont très différentes. La cellule compagne différenciée se caractérise notamment par la présence d'un noyau volumineux, un vacuome réduit, des plastes sans amidon, de nombreuses mitochondries et enfin par l'abondance des ribosomes (en partie associés au réticulum endoplasmique) (Fig 33). La cellule criblée subit une autolyse programmée, partielle car il n'y a pas de mort cellulaire, au cours de sa différenciation. Lorsque celle-ci est achevée, il s'agit d'une cellule sans noyau, sans appareil vacuolaire et apparemment, sans ribosomes. La partie centrale de la cellule paraît vide ; il ne subsiste plus que quelques mitochondries, quelques plastes avec amidon et des éléments de réticulum lisse qui se situent en bordure de la membrane plasmique. L'élément criblé communique avec la cellule compagne sœur par des plasmodesmes branchus et aux éléments criblés sus-jacents et sous-jacents par des pores qui résultent de l'élargissement des plasmodesmes (Fig 33). L'ensemble forme le tube criblé au sein duquel s'écoule la sève phloémienne (Fig 33). Chez de nombreuses espèces, les cellules criblées contiennent des protéines spécifiques, les protéines-P (P pour phloème). Ces protéines peuvent s'assembler pour former des structures nommées maintenant forisome (il s'agit du « corps protéique cristallin » dans la Fig 33). En réponse à un stress (choc thermique, stress chimique, blessure), le forisome se disperse et ses éléments obturent les pores du crible (Van Bel *et al.*, 2002). La synthèse de callose, un processus plus lent, aboutit au même résultat. Ce sont les raisons pour lesquelles il n'y a pas en général « d'hémorragie » phloémienne après section d'un pétiole ou d'une tige. *Ricinus communis* que nous allons utiliser pour nos expériences fait partie des exceptions.

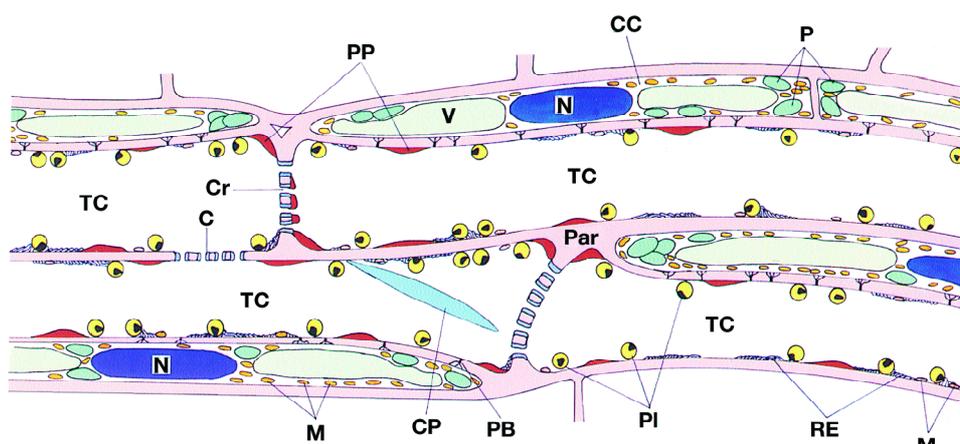


Figure 33. Reconstitution de la structure des tubes criblés (TC) et des cellules compagnes (CC) dans *Vicia faba* (d'après Knoblauch *et al.*, 1998)

TC et CC sont connectés par de nombreux plasmodesmes branchus (PB). Les plastes du TC (PI), les mitochondries (M) et le réticulum endoplasmique (RE) sont distribués le long de la membrane plasmique où des protéines pariétales (PP) sont agrégées. PP et RE sont parfois localisés sur les cribles (Cr), en marge des pores. C: callose; CP: corps protéique cristallin; Par: paroi; N: noyau; P: plastes; V: vacuole.

3.2.2 - Le xylème

Le xylème comprend également plusieurs types cellulaires ayant des fonctions spécifiques. On évoquera ici brièvement que deux types cellulaires, la cellule associée aux vaisseaux (CAV) et l'élément de vaisseau. Ceux-ci proviennent de cellules méristématiques différentes. La différenciation de l'élément de vaisseau est un processus complet de mort cellulaire programmée, accompagnée de la lignification des parois longitudinales. Chez les espèces végétales évoluées, les parois transversales sont détruites. En conséquence, chaque élément de vaisseau communique au suivant par une large perforation pour former un vaisseau. Chaque vaisseau est ainsi constitué d'une dizaine ou de quelques dizaines d'éléments de vaisseau dispersés bout à bout. C'est dans cette tuyauterie que circule la sève xylémienne. L'élément de vaisseau est bordé par un nombre variable de CAVs selon les espèces. La CAV présente de nombreuses analogies structurales avec la cellule compagne du phloème, mais ne communique pas avec l'élément de vaisseau par les plasmodesmes (Czaninski, 1977). C'est donc essentiellement la membrane plasmique de la CAV qui régit les échanges de solutés avec la sève xylémienne et qui participe au contrôle du pH de cette sève (Fromard *et al.*, 1995).

3.3 - Généralités sur les transports membranaires

3.3.1 - La structure de la membrane plasmique

Les principaux constituants sont des phospholipides qui, par leur structure allongée, possèdent une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Ils sont ordonnés de façon à former une bicouche lipidique, établissant une séparation entre le compartiment symplastique (c'est-à-dire le compartiment bordé extérieurement par la membrane plasmique) et le compartiment apoplastique (qui comprend la paroi, les méats et les cellules mortes, comme les éléments de vaisseaux). Des protéines s'associent à la surface de cet assemblage. D'autres, compte tenu de leurs propriétés physicochimiques, s'enchâssent entièrement ou en partie dans la bicouche. Lorsqu'elles sont dotées d'un motif glycosydique, celui-ci demeure à la surface de la membrane. L'élasticité et la perméabilité de la membrane dépendent étroitement de l'agencement des lipides et sont modulées notamment par la présence de stérols (Bach et Benveniste, 1997).

3.3.2 - La diffusion au travers de la bicouche lipidique

Toute molécule suffisamment lipophile peut s'insérer de façon spontanée dans la bicouche et peut y rester enchâssée ou bien traverser celle-ci de part en part, ceci sans utiliser l'énergie de la cellule (Fig 34). Ce mouvement réduit le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane. Il s'agit d'un transport non saturable. De nombreux composés peuvent diffuser de cellule à cellule de cette manière. Les composés hydrophiles ou chargés n'ont pas cette propriété et adoptent d'autres moyens de traverser la membrane plasmique.

3.3.3 - Le transport des solutés par des protéines membranaires

De nombreuses protéines membranaires ont un rôle fondamental dans le transport des solutés organiques et inorganiques (Fig 34) au travers de la membrane plasmique.

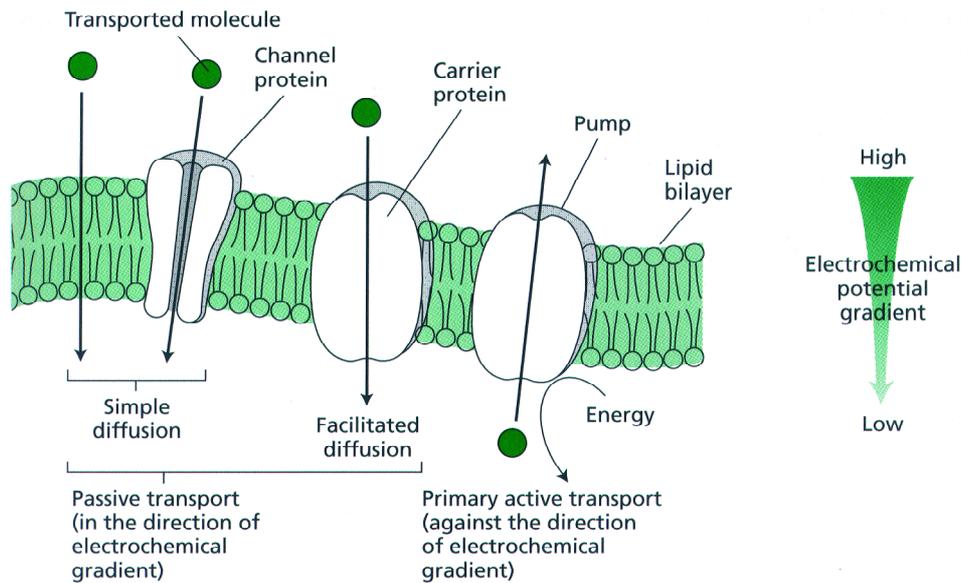


Figure 34. Diffusion simple, diffusion contrôlée par un canal, transport le long du gradient de concentration assuré par un transporteur et transport actif primaire (Taiz et Zeiger, 1998)

- *Diffusion assurée par des canaux*

Des protéines intrinsèques fonctionnent comme des pores membranaires. Elles jouent un rôle important dans les échanges de cations et d'anions, la spécificité et la durée de la diffusion étant contrôlées respectivement par des parties du canal nommées « filtre de sélectivité » et « portes ».

- *Diffusion facilitée*

À la différence de la diffusion simple, ce type de transport est saturable. En effet, il résulte d'une interaction entre le soluté et un constituant du transporteur. Il se produit sans dépense d'énergie, le transport ayant lieu dans le sens du gradient de concentration.

- *Le transport actif primaire*

Il est directement couplé à une source métabolique d'énergie, par exemple l'hydrolyse de l'ATP. Ces transporteurs sont appelés « pompes » et transportent des ions comme H^+ ou Ca^{2+} contre leur gradient de concentration. Toutefois, les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) qui manipulent des molécules organiques, sont aussi des pompes.

- *Transport actif secondaire ou transport secondaire (Fig 35)*

Ce type de transport est dépendant des gradients électrochimiques générés activement par les pompes et tend à dissiper ces gradients. On distingue deux types de translocation secondaire. Ainsi, dans le cas d'un gradient transmembranaire de protons établi par une ATPase-pompe à proton (Fig 34), l'énergie dissipée par un proton revenant dans le compartiment initial peut être couplée au transport dans le même sens d'un autre soluté

(ion ou molécule organique) (Fig 35). Elle peut aussi être couplée au transport dans le sens opposé de l'autre soluté. Dans le premier cas, il s'agit d'un symport (ou cotransport) et dans le second cas, d'un antiport.

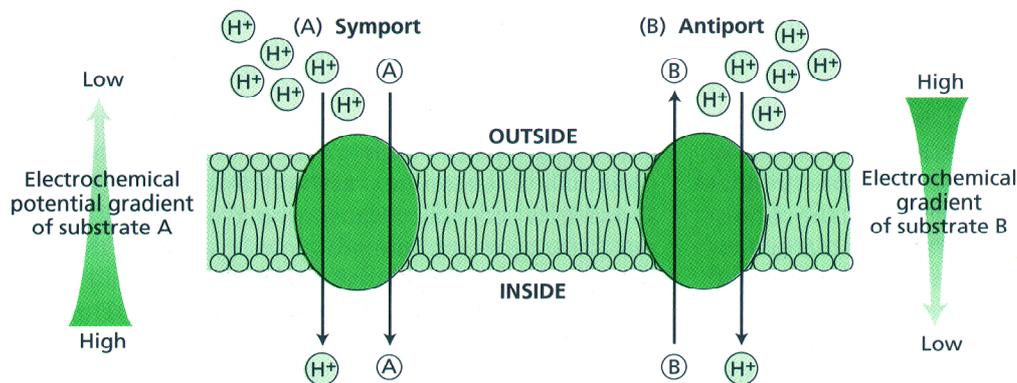


Figure 35. Les deux catégories de transport secondaire (Taiz et Zeiger, 1998).

3.4 - Mécanismes du chargement libérien

Il est admis (Taiz et Zeiger, 1998) que le chargement du complexe cellule criblée-cellule compagne du phloème a lieu selon deux voies, ceci dépendant des espèces végétales.

3.4.1 - La voie symplastique

Dans ce cas, les produits de la photosynthèse transitent d'une cellule à l'autre par les plasmodesmes, depuis les cellules assimilatrices jusqu'au complexe conducteur. Les plasmodesmes sont limités extérieurement par la membrane plasmique et appartiennent au compartiment symplastique. Il est admis que le transit à travers la paroi a lieu plus précisément au niveau de l'annulus cytoplasmique, c'est-à-dire l'espace compris entre le réticulum modifié (microtubule) et la membrane plasmique (Fig 36). L'un des principaux arguments en faveur de cette voie est l'abondance des liaisons symplastiques (c'est-à-dire des plasmodesmes) depuis les cellules assimilatrices jusqu'au complexe cellule criblée-cellule compagne.

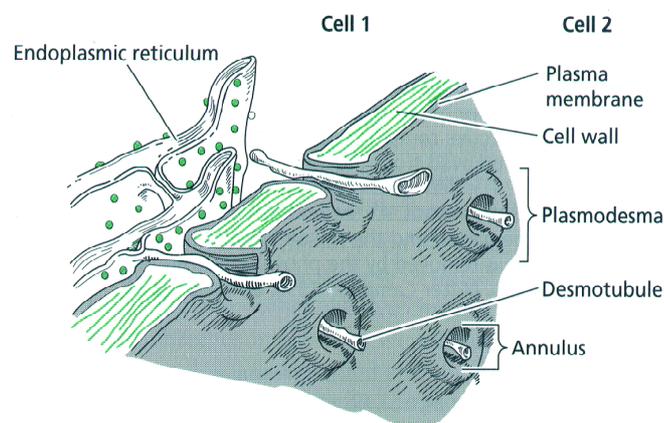


Figure 36. Vue schématique de plasmodesmes simples (Taiz et Zeiger, 1998)

3.4.2 - La voie apoplastique

Les produits de la photosynthèse, après un transit symplastique en bordure du phloème, passent dans la paroi, c'est-à-dire le compartiment apoplastique. C'est à partir de ce compartiment qu'ils s'accumulent dans le complexe cellule criblée-cellule compagne. Le mécanisme de chargement est un ensemble de transports secondaires (symport H^+ -saccharose, symport H^+ -acides aminés, etc.) énergisés par le gradient électrochimique de proton de la membrane plasmique du complexe créé et entretenu par l'ATPase-pompe à proton de la membrane plasmique du complexe cellule criblée-cellule compagne (Giaquinta, 1977; Delrot et Bonnemain, 1978, 1981; Delrot, 1981; Bonnemain *et al.*, 1984) (Fig 37).

L'ATPase-pompe à proton de la membrane plasmique des plantes est une enzyme intrinsèque dont l'importance est équivalente à celle de l'ATPase/ Na^+ , K^+ des animaux. Elle est représentée par diverses isoformes qui sont en fait les produits d'une famille d'une dizaine de gènes (Palmgreen, 2001). Elle est fortement exprimée dans le phloème et plus particulièrement dans la cellule compagne (Bouché-Pillon *et al.*, 1994; DeWitt et Sussmann, 1995). Autre conséquence de son activité, le pH de la sève phloémienne est nettement alcalin (pH ~ 8,0) alors que le pH de l'apoplaste phloémien est voisin de 5,0 ou de 5,5. Il s'agit d'une situation amplifiant à ce niveau le phénomène de piégeage d'acides faibles endogènes (Fig 36) et qui doit avoir une incidence sur l'absorption et la systémie de xénobiontes acides. À noter que chez certaines espèces, *Ricinus communis* par exemple (Orlich et Komor, 1992), les deux voies coopèrent pour assurer le chargement libérien.

3.5 - Cas des produits phytosanitaires phloème-mobiles

Dans un premier temps, un produit phytosanitaire appliqué sur la surface foliaire doit franchir la cuticule. La couche cuticulaire est une surface cireuse très hydrophobe qui joue le rôle de barrière physique. Les composés trop hydrosolubles ne peuvent pas franchir aisément cet obstacle en l'absence d'adjuvants. Dans le cas où la molécule est suffisamment lipophile pour traverser ces cires, elle se retrouve alors au niveau de la paroi cellulaire. Cette paroi est typiquement constituée de cellulose, d'hémicellulose et de pectine. Les substances agropharmaceutiques systémiques arrivent au complexe cellule compagne-cellule criblée du phloème selon trois modalités: la voie symplastique (après avoir franchi la membrane plasmique de l'épiderme ou de cellules sous-jacentes), la voie apoplastique (dans ce cas, elles diffusent dans les parois avant de franchir le plasmalemma du complexe cellule criblée-cellule compagne) ou la combinaison des deux voies. Le transport à longue distance de ces produits dans le phloème est en général assuré par deux mécanismes.

3.5.1 - Le piégeage d'acide

Depuis longtemps, il a été noté que la quasi totalité des herbicides à systémie phloémienne (2,4-D; 2,4-DB; MCPA; 2,4,5-T; Dicamba; acide 3-amino-2,5-dichlorobenzoïque; 2,3,6-TBA; acide 2,2,5-triiodobenzoïque; Piclorame; hydrazide maléique; TCA; Dalapon;

etc.) étaient porteurs d'une fonction acide carboxylique (Ashton et Crafts, 1981 ; Delrot et Bonnemain, 1991). Il a par conséquent été proposé que ces molécules pénètrent dans le phloème selon le mécanisme de piégeage d'acide. Dans l'apoplaste phloémien, le pH étant voisin de 5,0, ces herbicides se présentent au moins en partie sous forme non dissociée. Sous cette forme neutre, les xénobiontes sont en général suffisamment lipophiles pour traverser la bicouche phospholipidique et se retrouvent alors dans le cytoplasme. Dans ce nouveau milieu (qui appartient au compartiment symplastique), le pH est beaucoup plus élevé (~ 7,3 pour une cellule de parenchyme, ~ 8,0 pour le tube criblé) et ceci provoque une dissociation de l'acide qui devient alors hydrophile. Cette forme RCOO^- ne peut plus traverser la membrane aisément et reste ainsi piégée dans le compartiment symplastique. Elle est alors entraînée par la sève phloémienne vers les parties en voie de croissance de la plante. Il a été clairement démontré, avec le 2,4-D, l'atrazine et le défénuron (Neumann *et al.*, 1985) que cette caractéristique d'acide faible est requise pour le transport dans la sève phloémienne : le 2,4-D dont on ôte la fonction acide perd sa mobilité phloémienne ; inversement, si une fonction acide carboxylique est ajoutée à l'atrazine ou au défénuron (systémiques xylémiens), ceux-ci sont retrouvés dans le phloème. Divers herbicides actuels (divers représentants des sulfonylurées et des imidazolinones) sont des acides (ou des esters) dont la systémie phloémienne est liée au mécanisme de piégeage d'acide (Kleier *et al.*, 1998).

L'absence de fongicides typiquement phloème mobiles a été soulignée à plusieurs reprises au cours des dernières décennies (Edgington, 1981 ; Smith *et al.*, 1995 ; Kleier *et al.*, 1998). De ce fait, une stratégie analogue à celle développée pour les herbicides a parfois été tentée mais les résultats sont plus ou moins décevants. La première tentative a été effectuée sur le métalaxyl (qui est transporté en infimes quantités vers les racines après application foliaire) pour contrôler les champignons pathogènes des racines. Le métalaxyl étant un ester, l'hydrolyse de la fonction ester pour libérer l'acide faible était a priori une bonne idée. Malheureusement, ce dernier n'exerce plus d'activité fongicide (Edgington, 1981). Plus récemment, des dérivés acides du cymoxanil, un fongicide à systémie xylémienne, ont été synthétisés. Deux de ces dérivés montrent une forte activité fongicide sur *Perenospora parasitica*, mais leurs caractéristiques physicochimiques font que leur transport phloémien est beaucoup trop faible pour envisager une application au champ (Smith *et al.*, 1995).

En revanche, les propriétés physicochimiques de l'acide salicylique ($\text{pK}_a = 3,01$; $\log K_{ow} = 2,06$), un élément important du développement de la RSA, sont compatibles avec une forte systémie phloémienne (Yalpani *et al.*, 1991).

3.5.2 - L'intervention de transporteurs

Une systémie phloémienne de produits phytosanitaires résultant de l'activité de transporteurs a d'abord été considérée comme totalement invraisemblable et tout projet de synthétiser des pesticides manipulés par des transporteurs comme une utopie. Toutefois, il

est bien démontré maintenant que divers xénobiontes pénètrent dans le phloème par ce type de protéines intrinsèques. Ainsi le 2,4-D pénètre dans les cellules selon deux mécanismes (Fig 37), le piégeage d'acide comme cela vient d'être mentionné et par cotransport avec H^+ via un transporteur d'auxine (Kasai et Bayer, 1991). ANT1, récemment caractérisé, manipule les acides aminés aromatiques et des hormones auxiniques comme le 2,4-D (Chen *et al.*, 2001).

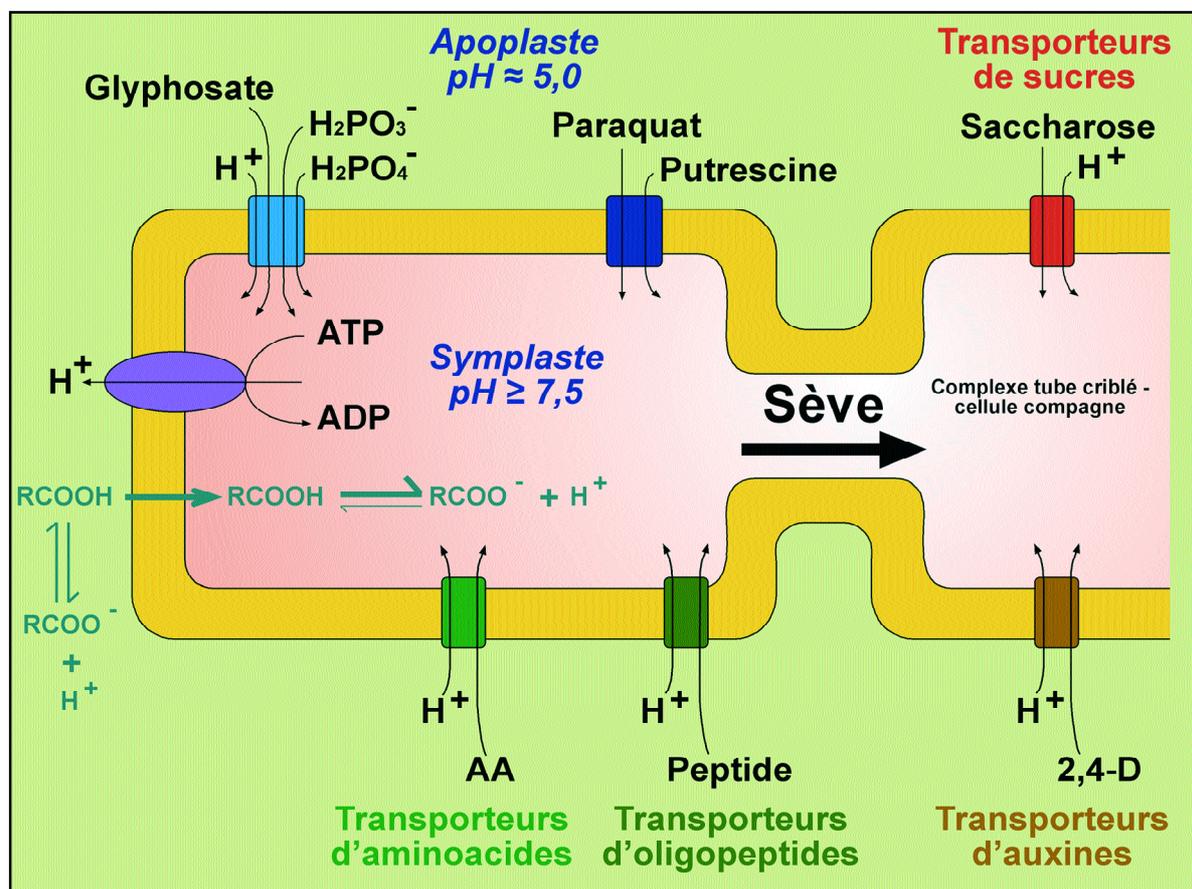


Figure 37. Mécanismes du transport de nutriments à travers la membrane plasmique du complexe tube criblé-cellule compagne et de quelques xénobiontes (RCOOH est une molécule acide endogène ou un herbicide acide)

Le phosphite, un activateur indirect des réactions de défense, très mobile dans le phloème et le xylème (Leconte *et al.*, 1988), comme nous l'avons déjà mentionné, est manipulé par un transporteur de phosphate (Leconte, 1989). Il en est de même du glyphosate (Denis et Delrot, 1993), un herbicide phloème mobile bien connu. Enfin le paraquat, un herbicide du petit groupe des bipyridyles, est manipulé par un transporteur de polyamines (Hart *et al.*, 1992; 1993).

4 - CONCLUSION

On dispose actuellement d'une large gamme de fongicides permettant de contrôler la plupart des maladies causées par les champignons phytopathogènes, le principal problème étant de remédier au développement des résistances (cas des strobilurines, par exemple). L'exception concerne les maladies vasculaires qui ne suscitent guère d'intérêt au sein des firmes de phytosanitaires, en raison des difficultés pour les combattre et des risques financiers que cela comporte. La lutte génétique (plantes transgéniques résistantes) est probablement la démarche la mieux adaptée pour y faire face, mais celle-ci suscite encore méfiance, voire hostilité, auprès du public.

Notre thèse s'inscrit dans le cadre de la lutte chimique et présente avant tout un caractère fondamental. En effet, les rares tentatives avortées de mise au point de fongicides à systémie phloémienne (ou ambimobiles) au cours de ces dernières décennies ont généré un désert conceptuel dans ce domaine. Nous avons contribué à développer deux stratégies, l'une déjà appliquée aux herbicides, l'autre originale en ce qui concerne le monde végétal, pour conférer des propriétés de mobilité phloémienne à des fongicides peu perméants ou à systémie xylémienne, puis notre intérêt s'est étendu à des molécules impliquées dans la résistance systémique acquise.

Matériel & Méthodes

Matériel et méthodes

1 - TESTS DE SYSTÉMIE

1.1 - Matériel végétal

Nous avons utilisé de très jeunes plants de ricin, *Ricinus communis* L. cv. Sanguineus. Après avoir été placés pendant 24 heures entre deux couches de coton imbibé d'eau courante, les graines de ricin sont semées dans des pots remplis de vermiculite. Les germinations sont soumises à une photophase de 14 heures à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ et à une scotophase de 10 heures à $26 \pm 1^\circ\text{C}$, l'humidité relative de l'atmosphère étant de $85 \pm 5\%$. L'arrosage à l'eau courante est quotidien.

1.2 - Absorption de composés exogènes par les cotylédons de ricins et collecte de sève phloémienne et/ou xylémienne (Fig 38)

Les germinations de ricin constituent un excellent modèle pour étudier les modalités du chargement phloémien et identifier la nature des molécules endogènes entraînées par la sève libérienne (Kallarackal *et al.*, 1989 ; Kallarackal et Komor, 1989 ; Schobert et Komor, 1989 ; Orlich, 1998 ; Orlich *et al.*, 1998). Les jeunes plants de ricin sont utilisés lorsque les cotylédons sont encore enveloppés dans l'albumen (Fig 38 A). Cinq à six jours après le semis, l'hypocotyle est bien allongé et forme une crosse de couleur rose. À ce stade, le développement de la plante ne dépend pas du métabolisme chlorophyllien, puisque la plantule puise les nutriments de l'albumen par l'épiderme des cotylédons.

Dans un premier temps, l'albumen est délicatement retiré pour dégager les cotylédons (Fig 38 B) qui sont aussitôt plongés dans un bécher contenant une solution d'incubation (20 mM MES ou HEPES [tableau 1] ; 0,5 mM CaCl_2 ; 0,25 mM MgCl_2) où est dissoute la molécule à tester (Fig 38 C).

Tableau 1. Choix des tampons utilisés. L'utilisation du tampon HEPES aux pH acides n'est pas conventionnelle. Cependant, les tampons de type citrate, acétate, propionate, du fait de leur propriété chélatante, réduisent l'exsudation phloémienne. L'HEPES ayant un second pKa de 3,6, il possède aussi un pouvoir tampon à pH 4,5 mais celui-ci est plus faible qu'aux pH 7,0 et 8,0. De ce fait, le pH indiqué (pH 4,6) est la moyenne de la valeur initiale et de la valeur mesurée en fin d'expérience.

Tampon utilisé	Valeur du pH
HEPES	4,6
MES	5,0
MES	5,5
MES	6,0
HEPES	7,0
HEPES	8,0

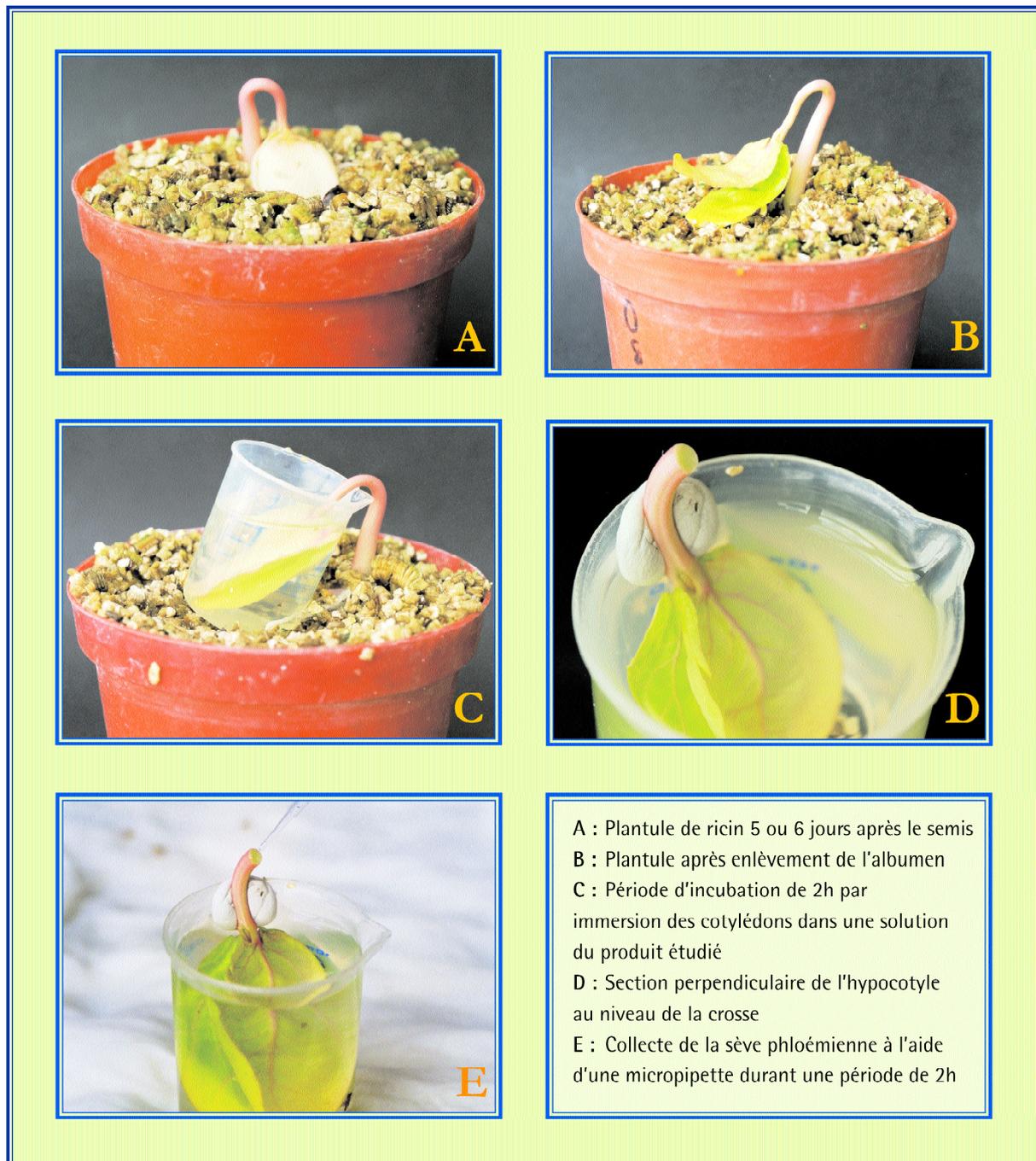


Figure 38. Les étapes du test de mobilité phloémienne chez le ricin

- *Collecte de la sève phloémienne*

Au bout de 2 heures d'incubation des cotylédons dans cette solution, l'hypocotyle est coupé au milieu de la crosse (Fig 38 D) et la partie ainsi isolée est maintenue sur la paroi du bécher par de la gomme adhésive de manière à ce que les cotylédons continuent de baigner dans la solution, la partie supérieure de l'hypocotyle étant dressée verticalement au-dessus du milieu d'incubation. Celui-ci est renouvelé et le bécher est placé dans une boîte en plexiglas où l'humidité relative est maintenue entre 90 et 95%, afin de limiter toute évaporation de l'exsudat. Après une quinzaine de minutes dans ces conditions, une goutte de sève libérienne apparaît sur la section. Celle-ci est prélevée à l'aide d'une pipette (Fig 38 E). Si la plante n'exsude pas, une fine tranche (environ 0,5 mm d'épaisseur) de l'hypocotyle

est ôtée, ce qui permet d'éliminer les bouchons de callose qui ont pu se former lors de la première blessure. Les prélèvements sont ensuite effectués toutes les 30 minutes, pendant les 2 heures qui suivent. On obtient généralement 6 à 20 µl d'exsudat phloémien par plante, qui peuvent être analysés immédiatement ou conservés par surgélation à -80°C.

- *Collectes adaptées aux cinétiques temps*

Pour la collecte de sève phloémienne, les cotylédons incubent pendant 2 heures dans la solution tampon en absence de produit à tester. Au moment de la section de l'hypocotyle, les cotylédons sont mis en présence du produit dont on veut évaluer la mobilité. À partir de ce moment (temps 0 min de la cinétique), la sève d'une même plante est collectée toutes les 30 min, pendant 5 heures.

Pour la collecte de sève xylémienne (ou vasculaire), les cotylédons incubent dans la solution tampon comportant le produit à tester durant un temps déterminé de la cinétique (30 min à 5 heures). Après la section de l'hypocotyle (réalisée comme pour la collecte de sève phloémienne) la partie inférieure de celui-ci ainsi que le système racinaire restent en place dans le pot de vermiculite. La section est délicatement épongée pour minimiser toute contamination, notamment par le phloème (à noter que la sève phloémienne circule strictement dans le sens cotylédons-système racinaire). Une seule et unique collecte de sève xylémienne est réalisée au bout de 20 min. On utilise donc un lot de plantes différent pour chaque point de la cinétique.

1.3 - Détection des molécules exogènes par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

1.3.1 - Appareillage

Nous disposons d'un appareil CLHP Spectra Physics® muni d'un système d'injection automatique AS3000 et d'une pompe P4000 qui prélève jusqu'à 4 solvants (éluants) dans les proportions demandées par l'utilisateur. L'élution peut être isocratique ou suivant un gradient de solvants si la séparation envisagée le nécessite.

La recherche des pesticides de la sève est effectuée à l'aide d'une colonne Supelco Discovery® RP-Amide C16 25cm x 4,6 mm, dont le diamètre des particules est de 5 µm. Une précolonne est placée en amont pour éviter la dégradation de la colonne par les impuretés non éluées. Une fois éluées, les substances sont détectées par un spectromètre U.V. à barrette de diodes (modèle UV 6000LP).

L'ensemble de l'appareillage est relié à un système d'acquisition de données qui facilite le pilotage et l'automatisation des injections ainsi que le retraitement des données (Logiciels Spectra Physics PC1000 pour OS2).

1.3.2 - Les éluants

Deux éluants sont utilisés :

- de l'eau ultra pure provenant d'un système Veolia Water (Elga) + 0,1% acide trifluoroacétique (TFA). Cet éluant est filtré sur membrane de nylon de 0,45 µm.
- de l'acétonitrile qualité « HPLC gradient ».

1.3.3 - Le type d'élution

L'élution peut être isocratique. Dans ce cas, le mélange des deux éluants conserve les mêmes proportions au long de l'élution. Le débit du mélange est fixé à 0,8 ml.min⁻¹. Certaines séparations ne sont pas suffisantes par cette méthode. Il faut alors recourir à une élution par un gradient de solvants, le pourcentage des éluants dans le mélange variant au cours du temps. Le pourcentage de solvant sera précisé dans les différentes parties de résultats.

1.3.4 - Solutions d'étalonnage

Plusieurs solutions standard de différentes concentrations connues (généralement 5) sont injectées de manière à obtenir une droite de calibration tracée en représentant l'aire du pic en fonction de la concentration.

Un xénobionte présent dans la sève est identifié grâce à son temps de rétention et son profil spectrophotométrique en UV (à l'aide du logiciel Spectacle [Spectra Physics]). Il est ensuite quantifié par l'aire du pic qui apparaît sur le chromatogramme.

1.3.5 - Préparation des échantillons

Les échantillons de sève sont dilués dans de l'eau ultra pure avant d'être injectés dans la colonne (la volume de la boucle d'injection est de 10 µl).

En fonction de la quantité de sève phloémienne récoltée, les facteurs de dilution se situent entre 1/10^e et 1/5^e, car la méthode d'injection utilisée par l'injecteur nécessite un volume minimum de 30 µl. Lorsqu'une plante exsude moins de 3 µl, on considère la collecte insuffisante pour effectuer une analyse fiable des xénobiontes dans la sève libérienne.

La sève xylémienne est également diluée dans l'eau pure avant injection. Toutefois, les pesticides s'y trouvant à de moindres concentrations, la sève est diluée entre 1/2 et 1/5^e.

1.3.6 - Calcul des concentrations des substances exogènes de la sève

La concentration de xénobiontes dans la sève est calculée à partir des droites d'étalonnage (aire du pic = f [concentration]) réalisées au moment de l'injection des échantillons.

Les résultats d'une partie du travail de thèse ont été traduits classiquement par la moyenne ± écarttype. Compte tenu de l'hétérogénéité du comportement physiologique des plantules de ricin et d'une manière générale de l'exsudation phloémienne (Bromilow *et al.*, 1991), la moyenne est parfois peu représentative de la population considérée. Il nous a paru plus judicieux et statistiquement plus correct, pour la dernière partie de notre travail,

de présenter nos résultats avec des valeurs de médiane et d'interquartiles de population (voir le Manuscrit à soumettre, dans le chapitre III).

1.4 - Absorption de molécules radiomarquées sur disques cotylédonaire de ricin

Cette méthode est détaillée dans les chapitres II et III.

2 - TESTS D'ACTIVITÉ FONGICIDE

2.1 - Matériel fongique

Le champignon *Eutypa lata* est un Ascomycota de la série des Pyrénomycota, ordre des Diatrypales. La souche que nous avons utilisée a été isolée à partir d'un cep de vigne infecté (cépage Sauvignon) (en relation avec le Service de Protection des Végétaux de la Vienne), puis cultivée *in vitro*, par repiquages réguliers, sur un milieu «malt-agar» (malt, 15 g.l⁻¹ ; chloramphenicol, 0,25 g.l⁻¹ ; agar, 20 g.l⁻¹).

2.2 - Tests d'activité

Les tests d'activité fongicide consistent à mesurer la croissance radiale de *Eutypa lata* sur un milieu gélosé « malt-agar », contenant ou non un xénobionte (0 à 1 mM).

Dans un premier temps, du milieu « malt-agar » est préparé et autoclavé à 120°C pendant 20 min. Après refroidissement du milieu à 50°C, le fongicide est ajouté dans le milieu agité à l'aide d'un barreau magnétique. Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de Pétri. Lorsque le milieu est solidifié et séché, le champignon est mis en culture : un implant de champignon sur gélose est prélevé à l'aide d'un emporte-pièces de 3 mm de diamètre puis mis en contact de la nouvelle gélose au milieu de la boîte. Les boîtes sont conservées à l'obscurité et à température ambiante. Le suivi de la croissance est réalisé en mesurant le diamètre du mycélium chaque semaine pendant 3 semaines consécutives et en observant l'état de la culture.

Bibliographie
des chapitres
Historique &
Matériel et méthodes

Bibliographie

- Albersheim P, Darvill AG, McNeil M, Valent BS, Sharp JK, Nothnagel EA, Davis KR, Yamazaki N, Gollin DJ, York WS, Dudman WF, Darvill JE, Dell A (1983)** Oligosaccharins: naturally occurring carbohydrates with biological regulatory functions. In O Ciferri, L Durc, eds, Structure and function of plant genomes. Plenum Publishing Corp, New York, pp 293-312
- Ashton PM, Crafts AS (1981)** Mode of action of herbicides, Ed Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto
- Aziz A, Heyraud A, Lambert B (2004)** Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* **218**: 767-774
- Bach TJ, Benveniste P (1997)** Cloning of cDNAs or genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants and other eukaryotes: heterologous expression and complementation analysis of mutations for functional characterization. *Prog Lipid Res* **36**: 197-226
- Benhamou N (1996)** Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci* **1**: 233-240
- Bonnemain JL, Delrot S, Despeghel JP (1984)** Mécanismes de l'accumulation des nutriments par les fines nervures (écrit en russe). *Physiol Rasten* **31**: 367-384
- Bouché-Pillon S, Fromont JC, Serrano R, Bonnemain JL (1994)** Immunolocalization of the plasma membrane H⁺-ATPase in minor veins of *Vicia faba* in relation to phloem unloading. *Plant Physiol.* **105**: 691-697
- 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
- Chuang HW, Hsieh TF, Duval M, Thomas T (2000)** Genomics analysis of plant responses to the fungicide fosetyl by combining SSH and DNA microarrays. In Plant & Animal Genome VIII Conference, San Diego, CA
- Couteux A, Lejeune V (2004)** Index phytosanitaire ACTA, Paris
- Czaninski Y (1977)** Vessel-associated cells. *IAWA Bull* **3**: 51-55
- Debieu D, Bach J, Arnold A, Brousset S, Gredt M, Taton M, Rahier A, Malosse C, Leroux P (2000)** Inhibition of ergosterol biosynthesis by morpholine, piperidine, and spiroketalamine fungicides in *Microdochium nivale*: effect on sterol composition and sterol $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **67**: 85-94

- Debieu D, Bach J, Hugon M, Malosse C, Leroux P** (2001) The hydroxyanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Manag Sci* **57**: 1060-1067
- Delrot S** (1981) Proton fluxes associated with sugar uptake in *Vicia faba* leaf tissues. *Plant Physiol* **68**: 706-711
- Delrot S, Bonnemain J-L** (1991) Le transport à longue distance des herbicides dans la plante. In R Scalla, ed, *Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisation*, Ed INRA, pp 51-77
- Delrot S, Bonnemain JL** (1978) Étude du mécanisme de l'accumulation des produits de la photosynthèse dans les nervures. *C R Acad Sci III* **287**: 125-130
- Delrot S, Bonnemain JL** (1981) Involvement of protons as a substrate for the sucrose carrier during phloem loading in *Vicia faba* leaves. *Plant Physiol* **67**: 560-564
- Denis M-H, Delrot S** (1993) Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. *Physiol Plant* **87**: 569-575
- DeWitt ND, Sussman MR** (1995) Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* **7**: 2053-2067
- Durand-Tardif M, Pelletier G** (2003) Apport de la biologie moléculaire et cellulaire et de la génétique à la protection des plantes. *C R Biologies* **326**: 23-35
- Edgington LV** (1981) Structural requirements of systemic fungicides. *Ann Rev Phytopathol* **19**: 107-124
- Esquerré-Tugayé MT** (2001) Plants and pathogenic agents, a refined and dangerous relationship: the example of fungi. *C R Acad Sci III* **324**: 899-903
- Flor HH** (1946) Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. *J Agriculture Res* **73**: 335-357
- Flor HH** (1947) Inheritance of reaction to rust in flax. *J Agriculture Res* **74**: 241-262
- FRAC** (2004) Fungicide List of Fungicide Resistance Action Committee. <http://www.frac.info/publications.html>
- Fritz R, Lanen C, Chapeland-Leclerc F, Leroux P** (2003) Effect of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil on the cystathionine b-lyase of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **77**: 54-65
- Fromard L, Babin V, Fleurat-Lessard P, Fromont JC, Serrano R, Bonnemain JL** (1995) Control of vascular sap pH by the vessel-associated cells in woody species. *Plant Physiol* **108**: 913-918
- Giaquinta RT** (1977) Possible role of pH gradient and membrane ATPase in the loading of sucrose into the sieve tubes. *Nature* **267**: 369-370

- Hart JJ, DiTomaso JM, Kochian LV (1993) Characterization of paraquat transport in protoplasts from maize (*Zea mays* L.) suspension cells. *Plant Physiol* **103**: 963-969
- Hart JJ, DiTomaso JM, Linscott DL, Kochian LV (1992) Transport interactions between paraquat and polyamines in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiol* **99**: 1400-1405
- Heil M (2001) The ecological concept of costs of induced systemic resistance. *Eur J Plant Pathol* **107**: 137-146
- Ishii H, Tomita Y, Horio T, Narusaka Y, Nakazawa Y, Nishimura K, Ywamoto S (1999) Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases. *Eur J Plant Pathol* **105**: 77-85
- Kallarackal J, Komor E (1989) Transport of hexoses by the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings. *Planta* **177**: 336-341
- Kallarackal J, Orlich G, Schobert C, Komor E (1989) Sucrose transport into the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as measured by the analysis of sieve-tube sap. *Planta* **177**: 327-335
- Kasai F, Bayer DE (1991) Relationship between intracellular pH and 2,4-D absorption by corn root protoplasts under the influence of metabolic inhibitors and antiauxins. *J Pest Sci* **16**: 171-177
- KEGG (2004) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG Pathway Database. <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>, Université de Kyoto.
- Kessmann H, Oostendorp M, Staub T, Goerlach J, Friedrich L, Lawton K, Ryals J (1996) CGA 245704, mode of action of a new plant activator. In Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases, British Crop Protection Council, Farnham, UK, pp 961-966
- Klarzynski O, Fritig B (2001) Stimulation of plant natural defenses. *C R Acad Sci III* **324**: 953-963
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B (2000) Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol* **124**: 1027-1038
- Kleier DA, Grayson BT, Hsu FC (1998) The phloem mobility of pesticides. *Pestic Outlook* **9**: 26-30
- Knoblauch M, van Bel AJE (1998) Sieve tubes in action. *Plant Cell* **10**: 35-50
- Kúć J (2001) Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur J Plant Pathol* **107**: 7-12
- Lahaye T (2002) The Arabidopsis RRS1-R disease resistance gene-uncovering the plant's nucleus as the new battlefield of plant defense? *Trends Plant Sci* **7**: 425-427

- Lateur M** (2002) Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance acquise. *Biotechnol Agron Soc Environ* **6**: 67-77
- Leconte F** (1989) Étude des propriétés du transport des métabolites du phosétyl-Al et de l'atrazine chez les plantes supérieures en relation avec l'aptitude à la systémie de ces molécules. Thèse de doctorat. Université de Poitiers
- Leconte F, Bonnemain J-L, de Cormis L, Barchietto T** (1988) Devenir métabolique, distribution et formes de transport (système xylémienne et système phloémienne) du phosétyl-Al chez *Lycopersicon esculentum* Mill. *C.R. Acad. Sci. III* **307**: 221-227
- Lepoivre P** (2003) *Phytopathologie*, Ed de Boeck
- Leroux P** (2003 a) Fungicide resistance in plant pathogens: A phenomenon difficult to manage? *Phytoma* **566**: 36-40
- Leroux P** (2003 b) Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *C R Biologies* **326**: 9-21
- Leroux P, Chapeland F, Arnold A, Gredt M** (2000) New cases of cross-negative resistance between fungicides, including sterol biosynthesis inhibitors. *Journal of General Plant Pathology* **66**: 75-81
- 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
- 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 on the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006
- Moll F, Stauff D** (1985) Interactions between acetylsalicylic acid and lysine in solution. *Arch Pharm* **318**: 120-127
- Nakashita H, Yasuda M, Nishioka M, Hasegawa S, Arai Y, Uramoto M, Yoshida S, Yamaguchi I** (2002) Chloroisonicotinamide derivative induces a broad range of disease resistance in rice and tobacco. *Plant Cell Physiol* **43**: 823-831
- Neumann S, Grimm E, Jacob F** (1985) Transport of xenobiotics in higher plants - I. Structural prerequisites for translocation in the phloem. *Biochem Physiol Pflanzen* **180**: 257-268
- Oostendorp M, Kunz W, Dietrich B, Staub T** (2001) Induced disease resistance in plants by chemicals. *Eur J Plant Pathol* **107**: 19-28

- Orlich G** (1998) Analysis of the driving forces of phloem transport in *Ricinus* seedlings: sucrose export and volume flow are determined by the source. *Planta* **206**: 266-271
- Orlich G, Hofbrückl M, Schulz A** (1998) A symplasmic flow of sucrose contributes to phloem loading in *Ricinus* cotyledons. *Planta* **206**: 108-116
- Orlich G, Komor E** (1992) Phloem loading in *Ricinus* cotyledons: sucrose pathways via the mesophyll and the apoplasm. *Planta* **187**: 460-474
- Ortega F, Steiner U, Dehne HW** (1998) Induced resistance: a tool for fungicide resistance. *Pestic Sci* **53**: 193-196
- Palmgreen MG** (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 817-845
- Rasmussen JB, Hammerschmidt R, Zook MN** (1991) Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol* **97**: 1342-1347
- Ruess W, Mueller K, Krauf-Beiter G, Kunz W, Staub T** (1996) Plant activator CGA 245704: An innovative approach for disease control in cereals and tobacco. In Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases, pp 53-60
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819
- 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
- Smith PH, Chamberlain K, Sugars JM, Bromilow RH** (1995) Fungicidal activity of *N*-(2-cyano-2-methoximinoacetyl)amino acids and their derivatives. *Pestic Sci* **44**: 219-224
- Spiers A, Ward BG** (2001) Injection treatment for control of plant diseases. In Patent Cooperation Treaty, Vol PCT WO 01/76355 A1, Nouvelle Zélande
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **35**: 235-270
- Taiz L, Zeiger E** (1998) *Plant Physiology*, 2nd edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts
- Tellier F, Carlin-Sinclair A, Fritz R, Cherton JC, Leroux P** (2004) Activity and metabolism of cyano-oxime derivatives in various strain of *Botrytis cinerea*. *Pestic Biochem Physiol* **78**: 151-160
- van Bel AJ, Ehlers K, Knoblauch M** (2002) Sieve elements caught in the act. *Trends Plant Sci* **7**: 126-132

- van Loon LC** (1983) The induction of pathogenesis related proteins by pathogens and specific chemicals. *Neth J Plant Pathol* **89**: 265-273
- van Loon LC, Antoniw JF** (1982) Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon with virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco. *Neth J Plant Pathol* **88**: 237-256
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessman 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* **8**: 1809-1819
- White R, Rybicki EP, von Wechmar MB, Dekker JL, Antiniw JF** (1987) Detection of PR-1 type proteins in Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Gramineae and Solanaceae by immunoblotting. *J Gen Virol* **68**: 2043-2048
- White RF** (1979) Acetyl salicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* **99**: 410-412
- Yalpani N, Silverman P, Wilson TM, 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
- Zimmerli L, Métraux JP, Mauch-Mani B** (2001) β -Aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **126**: 517-523

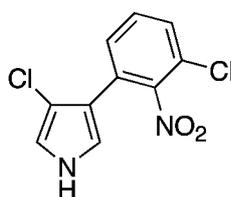
Résultats

Chapitre I

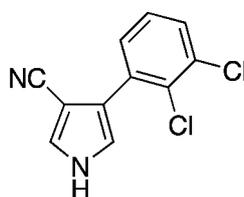
- ***Publication « Synthesis and phloem mobility of acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil», Pest Manag Sci, 2004, sous presse***
- ***Publication « Acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil: effect of adding a methyl group to the N-substituted chain on both systemicity and fungicidal activity », Pest Manag Sci, 2004, sous presse***

Chapitre I

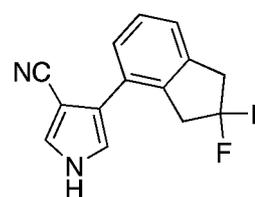
Voici un peu plus d'une décennie, la firme Ciba-Geigy (actuellement Syngenta) commercialisait deux fongicides appartenant à une nouvelle famille: les phénylpyrroles (Nyfeler et Ackermann, 1992). Le point de départ de ces nouveaux produits était la pyrrolnitrine, un métabolite secondaire produit par une bactérie vivant dans le sol « *Pseudomonas pirrocinia* » et doté de puissantes propriétés antifongiques. Ce composé est cependant instable à la lumière et il perd alors très rapidement ses propriétés biologiques. Deux composés plus stables que la pyrrolnitrine et conservant ses propriétés antifongiques ont alors été mis au point par Ciba-Geigy: le fenpiclonil et le fludioxonil.



Pyrrolnitrine



Fenpiclonil



Fludioxonil

Pour des raisons économiques, seul le fludioxonil reste commercialisé à l'heure actuelle. Il est efficace contre un grand nombre de champignons parasites des plantes cultivées. Ainsi, il est utilisé en pulvérisation foliaire contre la pourriture grise de la vigne (*Botrytis cinerea*). Sa principale utilisation concerne le traitement des semences où il est employé en association avec d'autres fongicides (tébuconazole, cyprodinil, difénoconazole, méfénoxam) pour lutter contre diverses maladies des céréales telles que la carie, les fusarioses, la septoriose ou encore l'helminthosporiose. Le mode d'action du fenpiclonil qui affecte le métabolisme glucidique (accumulation de polyols) fait l'objet de discussions (Jespers et Waard, 1995; Leroux, 1996; Pillonel et Meyer, 1997, Ochiai *et al.*, 2001; Leroux *et al.*, 2002).

Jespers ABK, de Waard M (1995) Effect of fenpiclonil on phosphorylation of glucose in *Fusarium sulphureum*. *Pestic Sci* **44**: 167-175

Leroux P (1996) Recent development in the mode of action of fungicides. *Pestic Sci* **47**: 191-197

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

Nyfeler R, Ackermann P (1992) Phenylpyrroles, a new class of agricultural fungicides related to the natural antibiotic pyrrolnitrin. in *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III*, ed by Baker Don R, Fenyes JG and Steffens JJ, American Chemical Society, Washington, USA, pp 395-404 (1992)

Ochiai N, Fujimura M, Motoyama T, Ichiishi A, Usami R, Horikoshi K, Yamaguchi I (2001) Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the *os-1* mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag Sci* **57**: 437-442

Pillonel C, Meyer T (1997) Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pestic Sci* **19**: 229-236

Ces composés sont connus comme n'étant pas systémiques : ils agissent par contact et sont légèrement pénétrants. Notre travail a donc consisté à modifier la structure de l'une de ces molécules en greffant une fonction acide carboxylique sur diverses positions, ceci afin d'exploiter le mécanisme de piégeage d'acide. La molécule qui a retenu notre attention pour ce travail est le fenpiclonil (alors encore commercialisé). Puisqu'il offrait davantage de possibilités pour les synthèses, notamment pour greffer une fonction acide carboxylique au niveau du cycle benzénique. Nos résultats sont rassemblés dans les deux publications qui suivent (dans la revue « Pest Management Science », sous presse).

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 Bashiardes¹ and Jean-Louis Bonnemain^{2*}

¹Laboratoire "Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles", Unité Mixte de Recherche CNRS 6514, 40, av du Recteur Pineau, 80022 Poitiers cedex, France

²Laboratoire "Transport des Assimilats", Unité Mixte de Recherche CNRS 6161, 40, av du Recteur Pineau, 80022 Poitiers cedex, France

Abstract A series of derivatives of the phenylpyrazole fungicide fenpiclonil was synthesized in which a carbonyl 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)pyrazole, exhibited some fungicidal activity on the pathogenic fungus *Botrytis lata*, and was then tested as a phloem-mobile pesticide in the *Rhizinus* 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 (generally pH 4–5.5) to that of the herbicide glyphosate.

© 2004 Society of Chemical Industry

Keywords: phenylpyrazoles; fenpiclonil; systemicity; phloem mobility; antifungal activity; *Botrytis 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.^{1–4} It also depends on the parameters of the plant vascular system.^{4,5,7}

Except for a few xenobiotic molecules (eg the nematocidal osanyl), 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 ¹⁴C-metazoxyl.^{13,15} Since metazoxyl 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 metazoxyl, 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 phenylpyrazole fungicide, developed by Ciba-Geigy (now Syngenta) for seed treatment in cereals.^{16,17} It is an analogue of the antifungal metabolite pyrothrin, which

* Correspondence to: Jean-Louis Bonnemain, Laboratoire "Transport des Assimilats", Unité Mixte de Recherche CNRS 6161, Université de Poitiers, 40, av du Recteur Pineau, 80022 Poitiers cedex, France
E-mail: j.l.bonnamain@univ-poitiers.fr

Contract/grant sponsor: Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux

(Received 12 December 2003; revised version received 13 February 2004; accepted 25 March 2004)

is produced by several *Pseudomonias*. It has very low oral toxicity for rats ($>5000 \text{ mg kg}^{-1}$). Various Ascomycota, Basidiomycota and Deuteromycota are sensitive to this fungicide.¹⁶ Although no longer commercialized, fenpicloral 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 fenpicloral. Compounds 7, 9, 11a and 11b were prepared from fenpicloral.

2.1.1 Synthesis of fenpicloral derivatives with an acidic function on the benzene ring (Fig 1, 4a-c)

2.1.1.1 *Aromatic amines (Fig 1, 1a-c)*. 3-Amino-benzoic 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 \approx 7) with aqueous sodium carbonate (250 g liter⁻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=COOCH₃, as an oil; yield: 91%; ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 3.84 (s, 3H, CH₃), 4.41 (large s, 2H, NH₂), 6.65–7.25 (m, 3H, C₆H₃); ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 51.70 (CH₃), 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)¹⁷

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 acylonitrile (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 \times 25 ml). The combined organic layers were washed with hydrochloric acid (6 M, 2 \times 20 ml) and water (2 \times 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; ¹H NMR (δ DMSO) δ (ppm): 3.39 (d, 2H, CH₂, γ 6.9 Hz), 5.30 (t, 1H, CH, γ 6.9 Hz), 7.15–8.20 (m, 4H, C₆H₄), 11.04 (s large, 1H, COOH); ¹³C NMR (δ DMSO) δ (ppm): 41.05 (CH₂), 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—CH₂), 167.34 (C=O).

2b, X=COOC₂H₅, Y=H; yield: 63%; oil; ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.39 (t, 3H, CH₃, γ 7.1 Hz), 3.61 (d, 2H, CH₂, γ 7.8 Hz), 4.35 (q, 2H, OCH₂, γ 7.1 Hz), 4.98 (t, 1H, CH, γ 7.8 Hz), 7.10–7.70 (m, 3H, H3, H4 and H5), 7.85–8.20 (m, 1H, H6); ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 13.96 (CH₃), 41.50 (CH₂), 42.39 (C(CN)(Cl)), 61.13 (OCH₂), 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=COOCH₃; yield: 83%; oil; ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 3.53 (d, 2H, CH₂, γ 7.7 Hz), 3.93 (s, 3H, CH₃), 4.78 (t, 1H, CH, γ 7.7 Hz), 7.20–7.65 (m, 2H, H4 and H5), 7.70–7.90 (m, 1H, H6); ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 40.66 (CH₃ and C(CN)(Cl)), 52.51 (CH₂), 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 cinnamionitriles (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 \times 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 cinnamionitrile 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; ¹H NMR (δ DMSO) δ (ppm): 6.25 (d, 1H, =CHCN, γ 16.7 Hz), 7.20–8.30 (m, 5H, C₆H₄ and CH=), 10.71 (s large, 1H, COOH); ¹³C NMR (δ DMSO) δ (ppm): 97.62 (=CHCN), 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=COOC₂H₅, Y=H; yield: 96%; oil; ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.40 (t, 3H, CH₃, γ 7.0 Hz), 4.37 (q, 2H, CH₂, γ 7.0 Hz), 5.78 (d, 1H, =CHCN, γ 16.6 Hz), 7.15–8.10 (m, 4H, C₆H₄), 8.28 (d, 1H, CH=, γ 16.6 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 13.78 (CH₃), 61.13 (CH₂), 98.45 (=CHCN), 117.43 (CN), 129.00 (C—COO), 126.82, 129.90, 130.55

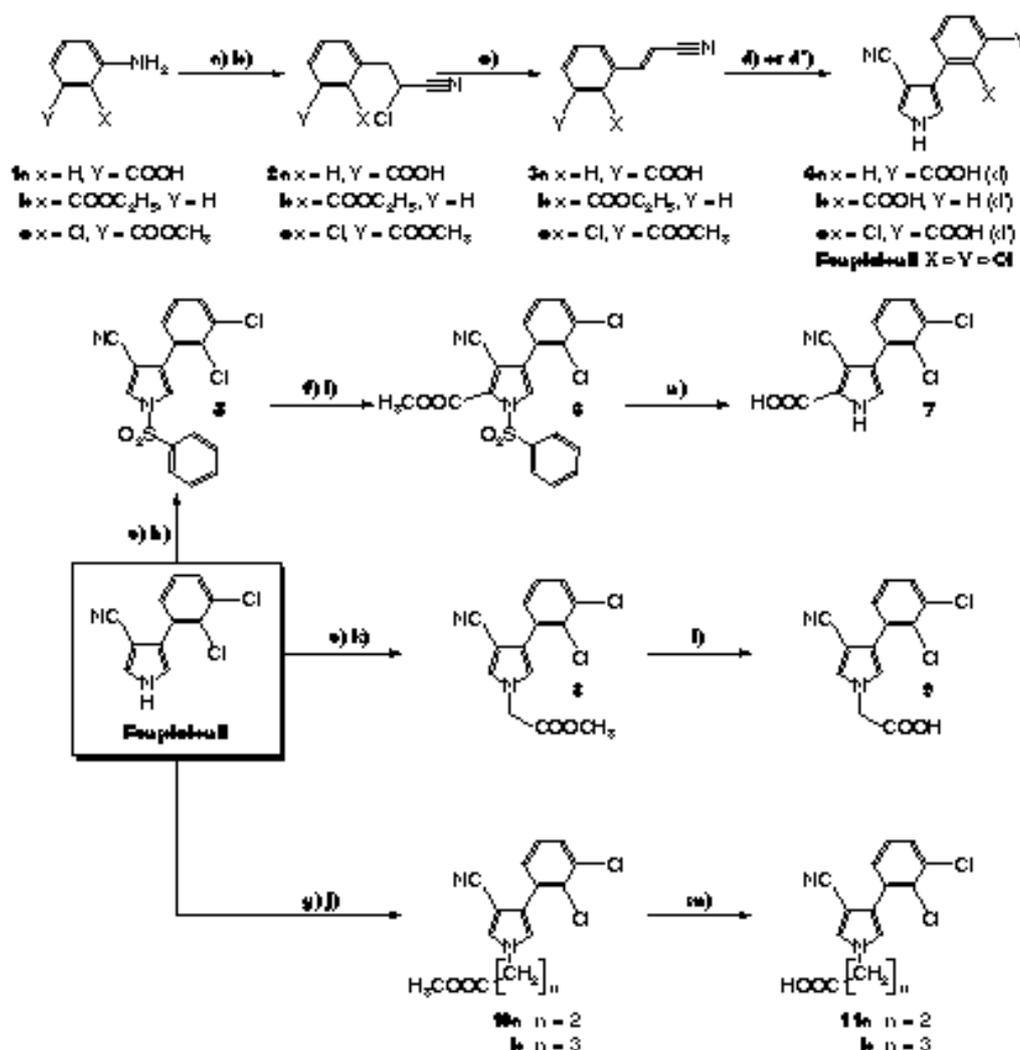


Figure 1. General reaction scheme: a) $\text{NaNO}_2/\text{CH}_3\text{COOH}$, HCl 12h, $\text{H}_2\text{O}/2\text{G}$ 1h, 0°C ; b) $\text{CH}_2=\text{CHCN}$ /acetone, 20°C then CuCl/HCl 12h, 60°C ; c) 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-6-ene (DBU)/THF/16h, 20°C ; d) tosylmethyl isocyanide (TosMIC), NaH 2.4 eq/diethyl ether, $\text{DMSO}/1\text{h}$, 20°C ; e) same as d) but NaH 3.6 eq/3h, 20°C then 2h, 34°C ; e), e) $\text{BuLi}/\text{THF}/3\text{h}$, 0°C ; f) $\text{LDA}/\text{THF}/1\text{h}$, -80°C ; g) CH_2OH , $\text{CH}_3\text{OH}/\text{DMF}/3\text{h}$, 20°C ; h) $\text{ClSO}_2\text{C}_6\text{H}_4/2\text{h}$, 0°C then 16h, 20°C ; i) COOCH_3 ; j) -80°C then 16h, -80°C to 20°C ; k) $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{COOCH}_3$, Na/DMF , $n = 2$, 24h, 100°C ; $n = 3$, 10h, 120°C ; l) $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{COOCH}_3/3\text{h}$, 0°C then 16h, 20°C ; m) $\text{LiI}/\text{DMSO}/18\text{h}$, reflux; n) NaOH 1.26h in water/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/1\text{h}$, 20°C then 1h, 100°C ; o) NaOH 8h in water/THF/ CH_3OH /reflux 48h.

and 132.19 (arom CH), 134.79 (C—CH=), 149.53 (CH=), 165.76 (C=O).

3c, $X = \text{Cl}$, $Y = \text{COOCH}_3$; yield: 68%; mp $66\text{--}76^\circ\text{C}$; ^1H 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 (=CHCN), 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, 1.17g, 6 mmol), anhydrous dimethyl sulfoxide (5.5 ml) and anhydrous diethyl ether (10 ml) was added dropwise a suspension of sodium hydroxide (0.34g, 14.4 mmol for **4a**, 0.50g, 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 (2M, pH 2.0) and then extracted with ethyl acetate ($3 \times 15\text{ ml}$). The ethyl acetate layers were combined, washed with water ($6 \times 20\text{ ml}$), dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated to give phenylpyrroles **4**.

4a, $X = \text{H}$, $Y = \text{COOH}$; yield: 65%; mp $236\text{--}246^\circ\text{C}$ decomp; ^1H 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; $^1\text{H NMR}$ (δ , DMSO) δ (ppm): 6.70–8.50 (m, 7H, H2, H5, C₄H₄ and NH or COOH), 11.76 (s large, 1H, NH or COOH); $^{13}\text{C NMR}$ (δ , DMSO) δ (ppm): 92.22 (C—CN), 116.89 (CN), 125.30 (C—C₄H₄), 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; $^1\text{H NMR}$ (δ , DMSO) δ (ppm): 6.80–8.05 (m, 5H, H2, H5 and C₄H₄), 10.10 and 11.98 (2s large, 2H, NH and COOH); $^{13}\text{C NMR}$ (δ , DMSO) δ (ppm): 92.55 (C—CN), 116.65 (CN), 122.53 (C—C₄H₄), 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 fungicidal derivative with an acidic function on the pyrazole ring (Fig 1, 7)

2.1.2.1 3-Cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-N-phenylsulfonamide (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; $^1\text{H NMR}$ (δ , acetone) δ (ppm): 7.30–8.30 (m, 10H, H2, H5, C₄H₄ and C₆H₅); $^{13}\text{C NMR}$ (δ , acetone) δ (ppm): 100.83 (C—CN), 114.43 (CN), 127.68 (C—C₄H₄), 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-phenylsulfonamide (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) dissolved 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 mmHg), 6 was obtained as an oil which slowly crystallized on standing; yield: 87%; mp 115–116°C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃) δ (ppm): 3.88 (s, 3H, CH₃), 7.15–8.20 (m, 9H, H5, C₄H₄ and C₆H₅); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃) δ (ppm): 52.62 (CH₃), 105.19 (C—CN), 112.25 (CN), 124.88 (C—C₄H₄), 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-Cyano-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrazole (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; $^1\text{H NMR}$ (δ , DMSO) δ (ppm): 7.10–7.90 (m, H5 and C₄H₄), 13.06 and 13.40 (s and large s, 2H, NH and COOH); $^{13}\text{C NMR}$ (δ , DMSO) δ (ppm): 96.96 (C—CN), 114.74 (CN), 125.60 (C—C₄H₄), 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 fungicidal derivatives (Fig 1, 9 and 11)

2.1.3.1 3-Cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-N-(1-methoxycarbonylmethyl)pyrazole 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; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃) δ (ppm): 3.76 (s, 3H, CH₃), 4.68 (s, 2H, CH₂), 6.93 (d, 1H, H5, \int 2.0 Hz), 7.15–7.50 (m, 4H, H2 and C₄H₄); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl₃) δ (ppm): 50.77 (CH₃), 52.68 (CH₂), 94.36 (C—CN), 115.34 (CN), 123.87 (C—C₄H₄), 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-Carbonylmethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrazole (9)^{22,24}. 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; ¹H NMR (δ, DMSO) δ (ppm): 4.88 (s, 2H, CH₂), 7.18 (d, 1H, H5, *J* 2.0 Hz), 7.25–7.85 (m, 4H, H2 and C₄H₉), 10.45 (large s, 1H, OH); ¹³C NMR (δ, DMSO) δ (ppm): 50.60 (CH₂), 92.40 (C—CN), 115.82 (CN), 122.23 (C—C₄H₉), 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-methoxycarbonyl)ethyl)pyrrole (10a) and 3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-N-(3-methoxycarbonyl)ethyl)pyrrole (10b)²⁵. A solution of sodium methoxide in methanol (300 g litre⁻¹, 2 ml) was added dropwise to a solution of fenpicloral (2.37 g, 10 nmol) 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-bromobutrate (for **10b**) (10 nmol) and sodium iodide (0.40 g, 2.7 nmol) 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; ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 2.80 (t, 2H, CH₂, *J* 6.4 Hz); 3.67 (s, 3H, OCH₃), 4.24 (t, 2H, NCH₂, *J* 6.4 Hz), 6.95 (d, 1H, H5, *J* 2.3 Hz), 7.05–7.50 (m, 4H, H2 and C₄H₉); ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 35.17 (CH₂), 45.37 (NCH₂), 51.73 (OCH₃), 93.35 (C—CN), 115.52 (CN), 123.51 (C—C₄H₉), 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; ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.85–2.50 (m, 4H, CH₂), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (t, 2H, NCH₂, *J* 6.6 Hz), 6.92 (d, 1H, H5, *J* 2.2 Hz), 7.05–7.55 (m, 4H, H2 and C₄H₉); ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 25.89 (CH₂), 30.01 (CH₂CO), 49.07 (NCH₂), 51.43 (OCH₃), 93.29 (C—CN), 115.58 (CN), 123.57 (C—C₄H₉), 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-carboxypropyl)-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 nmol) 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; ¹H NMR (CDCl₃ + δ, DMSO) δ (ppm): 2.80 (t, 2H, CH₂, *J* 6.5 Hz), 4.26 (t, 2H, NCH₂, *J* 6.5 Hz), 7.06 (d, 1H, H5, *J* 2.3 Hz), 7.15–7.70 (m, 4H, H2 and C₄H₉), 7.80 (large s, 1H, OH); ¹³C NMR (CDCl₃ + δ, DMSO) δ (ppm): 35.17 (CH₂), 45.41 (NCH₂), 92.49 (C—CN), 115.43 (CN), 122.83 (C—C₄H₉), 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; ¹H NMR (CDCl₃ + δ, DMSO) δ (ppm): 1.70–2.45 (m, 4H, CH₂), 4.05 (t, 2H, NCH₂, *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 C₄H₉); ¹³C NMR (CDCl₃ + δ, DMSO) δ (ppm): 25.86 (CH₂), 30.34 (CH₂CO), 48.81 (NCH₂), 92.01 (C—CN), 115.79 (CN), 122.56 (C—C₄H₉), 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 *Ecorypa lata*

2.2.1 Fungal-growth conditions

The strain of *Ecorypa 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 pith.

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-Duretlet (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, Tequipment, Tektronix UK, London, UK) and a chart recorder (Kipp and Zonen, Delft, The Netherlands).

2.3.3 Sap collection and analysis^{26,27}

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 exsudation. 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 pKa₁ (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 fenpiclorol and the various acidic derivatives at 100 µM concentration on

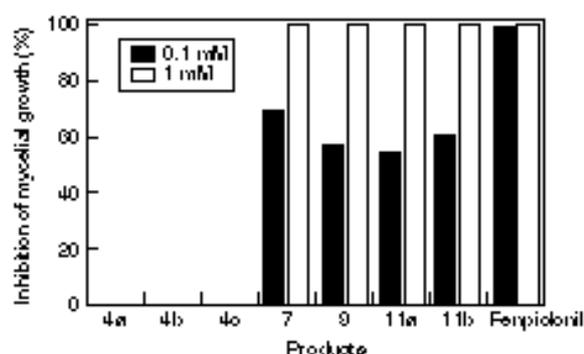


Figure 2. Short-term effect (7 days of culture) of fenpiclorol and its acidic derivatives on *Ectypa favae* mycelial growth (mean of six trials, SD were negligible).

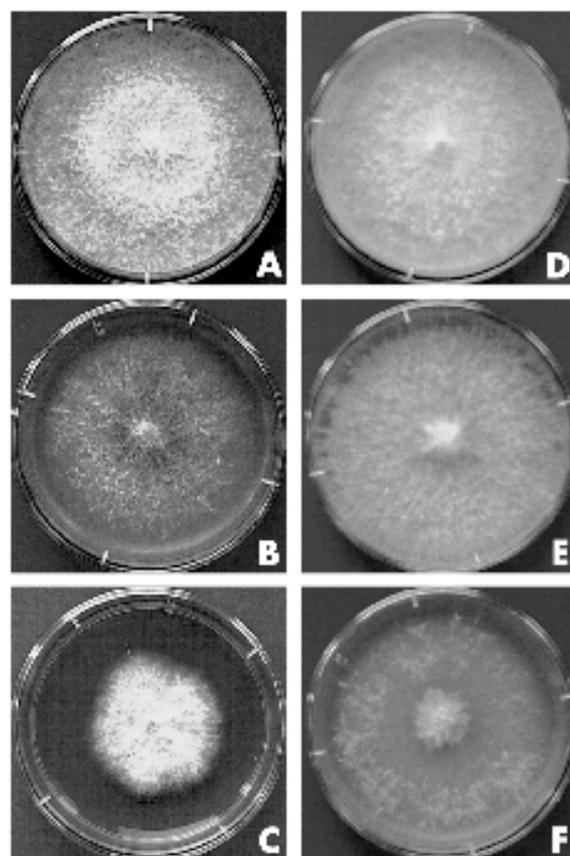


Figure 3. Long-term effect (21 days of culture) of fenpiclorol (A, B, C) and compound 9 (D, E, F) on *Ectypa favae* mycelial growth. The products were used at 0 µM (A, D), 10 µM (B, E) and 60 µM (C, F) concentration. Note the mycelium necrosis around the inoculum in B and F. The experiment was repeated six times with similar results.

the mycelial growth of *Ectypa* (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 fenpiclorol under our experimental conditions. Compound 9 at 50 µM concentration not only limited fungal growth (Fig 3)

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 solis* Schlecht, particularly into mycelial lipids.⁵⁰ 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 *B. 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.^{4,44} With the exception of a few products, including xenobiotics whose transport is carrier-mediated,⁵¹ much of the data on xenobiotic transport in plants fits well into these schemes.⁴⁴ Phloem mobility for fenpiclonil and its analogues was predicted using the Kleier map (Table 1, Fig 5).⁴ 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.

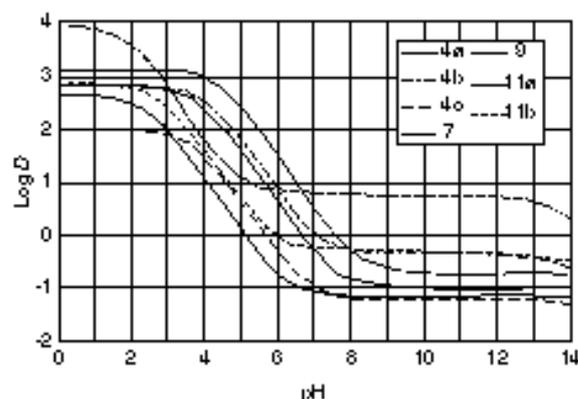


Figure 4. Dependence of log D of the various acidic derivatives on pH (calculated using ACD Log D v 7.0 software). The partition coefficient for dissociative mixtures, log D, is defined as follows:

$$\log D = \log \left(\frac{\sum a_i^{aq}}{\sum a_i^{org}} \right)$$

where a_i^{aq} 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	2.76	2.86
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

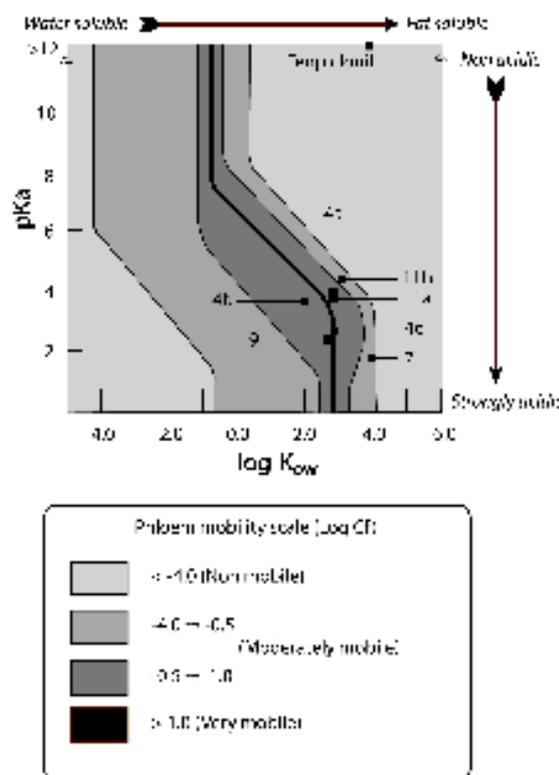


Figure 5. Prediction of phloem mobility of fenpiclonil and its acidic derivatives using the Kleier map (log CF as a function of log K_{ow} and pKa). Log K_{ow} and pKa were calculated using ACD Log D v 7.0 software (see Table 1). Plant parameters are given in Kleier.⁴

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.^{26,28,29} The castor bean is also very useful to study the phloem mobility of xenobiotics.^{6,29} 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.^{44,10} 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 $250 \mu\text{M}$ 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 fenpiclorol. Although this fungicide enhances the accumulation of tetraphenylphosphonium bromide (TPP^+) in *F. aschersonii* cells, it does not seem to affect the functioning of the plasma membrane. The increased accumulation of TPP^+ caused by fenpiclorol probably reflects changes in potentials over membranes of intracellular organelles rather than that of the plasma membrane.⁹⁰ Our results indicate that the *Ricinus* system is suitable for testing the phloem systemicity of fenpiclorol acid derivatives.

When *Ricinus* cotyledons were incubated in the presence of $250 \mu\text{M}$ fenpiclorol, the fungicide was not detected in the phloem sap.⁸⁷ 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).

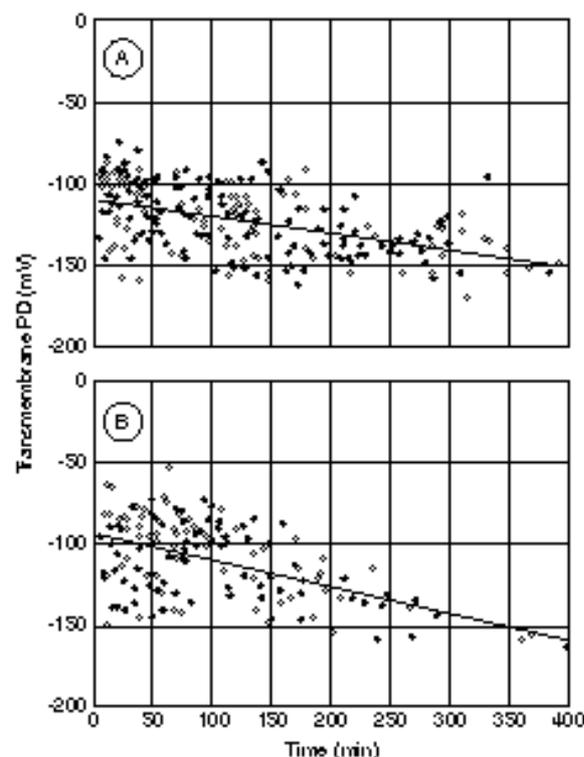


Figure 6. Effect of compound 9 on the transmembrane PD of subepidermal cells of *Ricinus* hook. A: control, the tissues were incubated in the standard medium (pH 6.0); B: treated set, the tissues were incubated in the same solution with compound 9 at $250 \mu\text{M}$ concentration. Linear regression was calculated with Kaleidagraph 3.5.6 software.

These data are consistent with the predictions made above (Fig 5). Furthermore, in the latter experiment, fenpiclorol, 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-phenylpyroles 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,⁹² 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

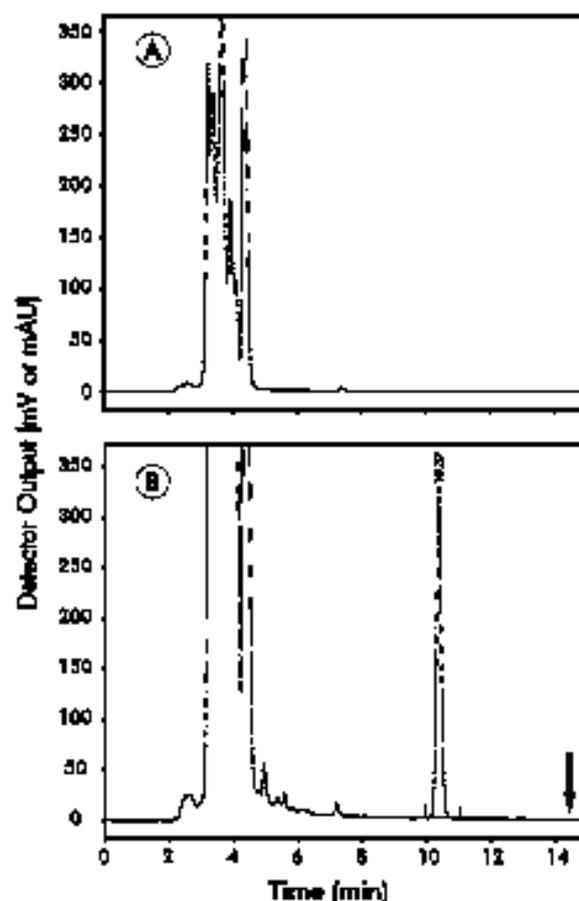


Figure 7. *Ricinus* sap analysis by HPLC. A: control, the cotyledons were incubated in the standard medium (pH 6.0); B: treated set, *Ricinus* cotyledons were incubated in the same solution with compound 9 (RT: 10.37 min) at $250 \mu\text{M}$ concentration. The arrow indicates the retention time of fenpiclorol.

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.^{1,4,6,10} 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)^{6,27} 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.²⁷

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

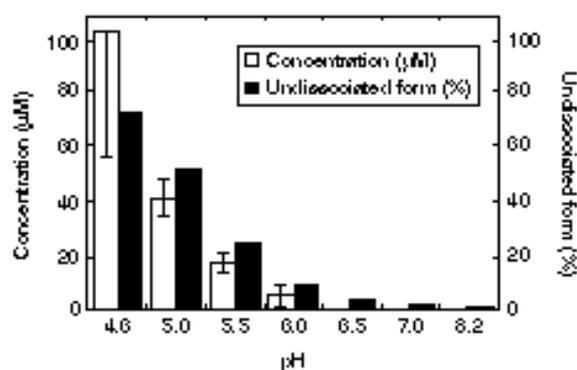


Figure 8. Concentration of compound 9 (applied at 250 µM concentration to the external solution) in phloem sap of *Ricinus* as a function of the pH of the incubation medium and the percentage of its undissociated form in this medium. The sap was collected during the third and fourth hours of incubation. Mean of eight sets of 3 plants (pH 4.0) or 3 sets of 3 plants (other pH values) \pm SD.

derivatives, particularly *N*-carboxymethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole (compound 9), received special attention because it exhibited some activity on *B. 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.

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 Kiefer DA, Ribben mobility of xenobiotics. I. Mathematical model testing the weak acid and intermediate permeability theories. *Plant Physiol* 36:605-610 (1966).
- 2 Hou FC, Kiefer DA and Melander WR, Ribben mobility of xenobiotics. II. Biometry testing of the unified mathematical model. *Plant Physiol* 36:611-616 (1966).
- 3 Baniaw RH, Chumbelani K and Ewari SA, Physicochemical aspects of phloem translocation of herbicides. *Weed Sci* 38:905-914 (1990).
- 4 Baniaw RH, Chumbelani K and Ewari SA, Molecular structure and properties of xenobiotics in relation to phloem translocation, in *Recent advances in phloem transport and molecular concentrations*, ed by Bannister JL, DeJong S, Lucas WJ and Dainty J. Quot Editions, Presses Académiques, Nantes, pp 333-340 (1991).
- 5 Guina E, Guibe A, Jhrak S and Neumann S, Retention of xenobiotics along the phloem path. *Plant Physiol* 107:11-16 (1995).

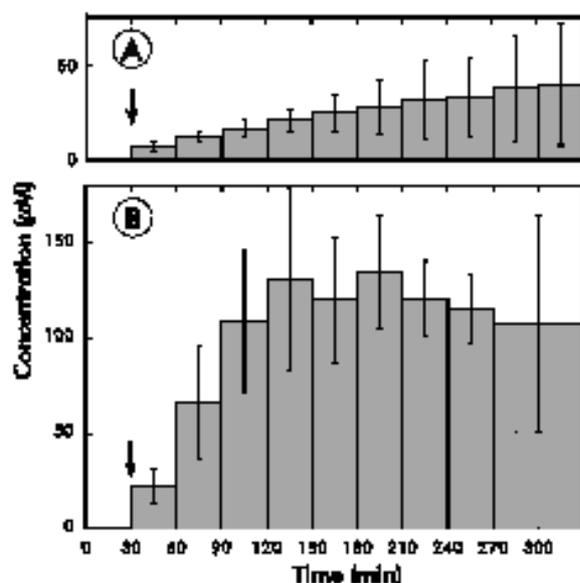


Figure 9. Time course of compound 9 concentration in phloem sap of *Ricinus*. At time 0, compound 9 at 250 µM concentration was added to the standard medium buffered at (A) pH 6.0 or (B) 4.0. The hook was covered at time 30 min (arrow). Mean of six sets of six plants \pm SD (A), mean of five sets of three plants \pm SD (B).

- 6 Kiser DA, Ganyani BT and Hou FC, The phloem mobility of pesticides. *Pestic Outlook* **8**:26-30 (1998).
- 7 Tyree MT, Peterson CA and Edgington LV, A simple theory regarding mobility of xenobiotics with special reference to the nematode, nemat. *Plant Physiol* **43**:367-374 (1973).
- 8 Nigam RLO, Borsilow RH, Briggs OG and Chinnabhai K, Ribonucleosylation of weak acids in *Ricinus communis*. *Plant Sci* **14**:119-129 (1967).
- 9 Borsilow RH and Chinnabhai K, Designing molecules for systemicity, in *Molecular and operations of transport process*, ed by Ashri RK and Clifford DR, Monograph 16, British Plant Growth Regulator Group, Bristol, pp 119-129 (1969).
- 10 Dehot S and Borsani JL, Absorption et migration des herbicides, in *Les herbicides, modes d'action et principes d'évaluation*, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, pp 51-77 (1991).
- 11 Kneif F and Bayer DE, Quantitative evaluation of the weak acid hypothesis as the mechanism for 2,4-D absorption by corn root protoplasts. *Mikro-Nachrichten Chemisch (J. Plant Sci)* **16**:168-170 (1991).
- 12 Chen L, Ortiz-Lopez A, Jung A and Bush DE, ANTI1, an anionic and neutral amino acid transporter in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **123**:1619-1620 (2001).
- 13 Edgington LV, Structural requirements of systemic fungicide. *Ann Rev Phytopathol* **19**:107-214 (1981).
- 14 Leroux P, Delonne R and Guilheron P, Evolution des produits phytosanitaires en usage agricole II—Les fongicides. *Phytoprotec* **5**:43-6-15 (2002).
- 15 Zaki AI, Zentgraf GA and Le Beau HM, Systemic translocation of ¹⁴C-labeled metribolyn in tomato, avocado and *Pisonia indica*. *Phytopathology* **71**:509-514 (1981).
- 16 Newill D, Nyfeler R and Sozzi D, CGA 142702: a novel fungicide for seed treatment, in *Seed Biology Crop Sci Conf—Seed Dis*, BCPC, Farnham, Surrey, UK, pp 65-72 (1996).
- 17 Nyfeler R and Ackemaun P, Phenylpyrazole, a new class of agricultural fungicides related to the natural antibiotic pyrenolitin, in *Synthesis and bioactivity of agrochemicals III*, ed by Baker DR, Farnes JO and Steffens JJ, American Chemical Society, Washington, DC, pp 395-404 (1992).
- 18 Ackemaun P, Nyfeler R, Leubert AJ, Newill D and Sozzi D, CGA 179206: a new phenylpyrazole fungicide for broad-spectrum disease control, in *Seed Biology Crop Sci Conf—Seed Dis*, BCPC, Farnham, Surrey, UK, p 399 (1996).
- 19 Ackemaun P, Elmerich J, Nyfeler R and Martin P, Milakolide mittel, Eur Pat appl EP 0 910 536 (1999).
- 20 Wolkeber D and Burdick W, 1-(aminomethyl)-5-(2-fluoro-5-chlorophenyl)-4-cyano-pyrazol-Derivate, Eur Pat EP 0 927 977 (1999).
- 21 Floyd JD and Smith DE, Method of controlling phytopathogenic fungi, Eur Pat appl EP 0 936 049 (1990).
- 22 Güllük GW, Kenny DJ, Davis DA, Sankier MG, Pekanni B, Burden TC, Sili MP, Okon ER and Belmont JJ, Synthesis and Dieckmann cyclization reactions of 4H-furo[3,4-b]indole. A regioselective Dieckmann synthesis of ellipticine. *J Org Chem* **57**:3696-3691 (1992).
- 23 Demu PDG, Halogenation of methyl glycolate with lithium iodide-dimethylformamide. *J Chem Soc* 6655 (1965).
- 24 McMurry JB and Wang GB, An improved method for the cleavage of methyl esters. *Synth Commun* **2**:369-394 (1972).
- 25 Van Reet G, Heeno J and Wals L, 1-(β-aryl)-methyl-1H-1,2,4-triazole and their Salze, Verfahren zu ihrer Herstellung und fungicide Mittel und pflanzenschutzgewerbliche Mittel, Ger Offen DE 2551560 (1976).
- 26 Goshori H, Sujan J, Meek JS and Dittner K, The synthesis and microbiological properties of acetylic amino-Propargyl glycine and 2-amino-5-methyl-pentynoic acid. *J Am Chem Soc* **76**:3464-3466 (1954).
- 27 Monroy G, Dehot S and Borsani JL, Energetics of fluorine uptake by root wall tissues of *Ricinus communis* L. *Plant Sci* **144**:176-185 (1984).
- 28 Müllnickel J, Oishi G, Schobert C and Konner E, Sucrose transport into the phloem of *Ricinus communis* L seedlings as measured by the analysis of sieve-tube exp. *Plant Sci* **177**:927-935 (1999).
- 29 Deking-Gunzler C, Chollet JF, Fischer M, Rocher F, Konner E and Borsani JL, Carrier-mediated uptake and phloem transport of a 550-Dalton chlorinated xenobiotic with an α-amino acid function. *Plant Physiol* **123**:1620-1632 (2001).
- 30 Jepsen MB, Davido LC and De Waud MA, Interference of the phenylpyrazole fungicide fenpropimol with membranes and membrane function. *Plant Sci* **44**:139-140 (1994).
- 31 Wright KM and Opalka RJ, Physicochemical properties alone do not predict the movement and compartmentation of fluorescent xenobiotics. *J Exp Bot* **45**:35-44 (1994).
- 32 Oishi G and Konner E, Ribose loading in *Ricinus* cotyledon sucrose pathway via the mesophyll and the apophloem. *Plant Sci* **137**:460-474 (1998).
- 33 Schobert C and Konner E, The differential transport of amino acids into the phloem of *Ricinus communis* L seedlings as shown by the analysis of sieve-tube exp. *Plant Sci* **177**:943-949 (1999).

Acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil: effect of adding a methyl group to the *N*-substituted chain on both systemicity and fungicidal activity

Jean-François Chollet ^{a 1}, Françoise Rocher ^{a 1}, Cyril Jousse ^{a b}, Céline Delétage-Grandon ^b, Georges Bashiardes ^a and Jean-Louis Bonnemain ^{b *}

^a *Laboratoire «Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles», Unité Mixte de Recherche CNRS 6514, 40, av. du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France*

^b *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 the *N*-carboxymethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole recently described. The phloem mobility of the new *N*-(1-carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole was comparable to that of the former compound, but was higher at external pH 5.0. Unlike the derivatives previously synthesized, it was comparable in its fungicidal activity to fenpiclonil against the pathogenic fungus *Eutypa lata*.

Keywords: phenylpyrroles, fenpiclonil, acidic derivatives, systemicity, phloem mobility, antifungal activity, *Eutypa lata*

* 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

¹ These authors contributed equally to the paper

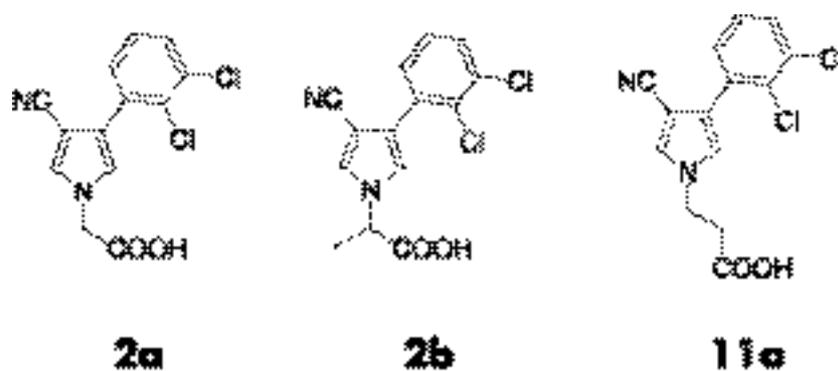


Figure 1. Acidic derivatives of fenpiclonil exhibiting a good profile for phloem systemicity.

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 moderate 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, it must be mentioned that 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*.⁴ This incompatibility between induced phloem mobility and biological activity also concerns, excepting at least one case², 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 are 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. It was shown that its concentration in the sieve tube sap was correlated to 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 Figure 4 in reference 5), taking into account the high percentage of its undissociated form at apoplastic pH values (pH 5.0 to 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 present paper describes the synthesis and biological properties of *N*-(1-carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole.

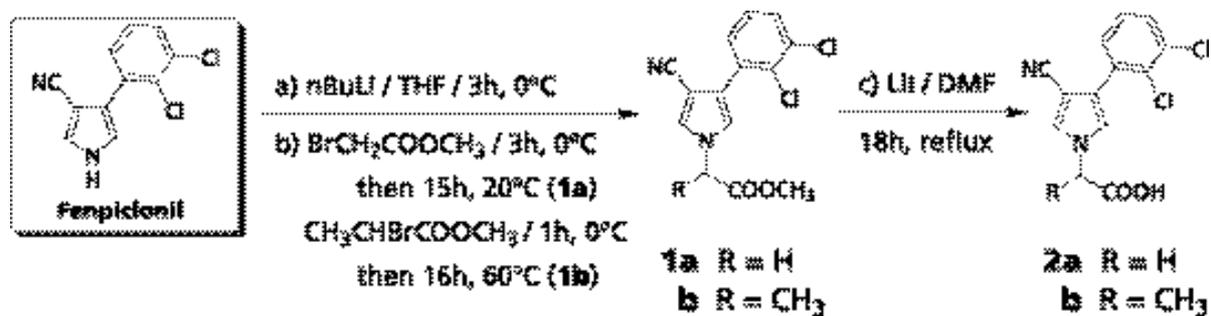


Figure 2. Reaction scheme for the synthesis of *N*-(1-carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole (compound **2b**).

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 previously described.⁵

2.1.1 Synthesis of 3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)-N-(1-methoxycarbonyl)ethylpyrrole (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 (6.6 ml of 1.6 M solution, 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 then 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 x 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.

1b. Yield: 90 %; **NMR** ¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.75 (d, 3H, CH₃, J 7.3 Hz), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 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 C₆H₃); **NMR** ¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 18.19 (CH₃), 52.92 (OCH₃), 57.61 (CH), 94.12 (C-CN), 115.52 (CN), 123.75 (C-C₆H₃), 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 (C₆H₃ 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 Synthesis of 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 x 100 ml). The organic phase was washed with water (3 x

40 ml), dried over anhydrous magnesium sulfate, and the solvents were 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 x 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 wavelength 218 nm).

2b. Yield: 52 %; mp 181°C; Log Kow = 2.98 and pKa = 2.53 (calculated using ACD Log *Dv* 8.0 software); **NMR** ¹H (d₆ DMSO) δ (ppm): 1.72 (d, 3H, CH₃, *J* 7.3Hz), 5.13 (q, 1H, CH, *J* 7.3Hz), 7.30-8.30 (m, 6H, H₂, H₅, C₆H₃, OH); **NMR** ¹³C (d₆ acetone) δ (ppm): 17.78 (CH₃), 57.16 (CH), 92.16 (C-CN), 116.00 (CN), 122.47 (C-C₆H₃), 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** (cm⁻¹): 3300-2500 (OH), 3130, 1410 (pyrrole), 3060, 1587, 810, 785, 715 (C₆H₃ 1',2',3'-trisubstituted), 2220 (CN), 1740 (C=O); **MS** (EI), *m/z*: 236, 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}

2.2.3 Sap collection and analysis

Cotyledons were incubated in a buffered solution supplemented with the fenciclonil 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 parameters⁵: at pH 4.5, citrate cannot be used as a buffer due to its chelating effect toward Ca⁺⁺; in absence of xenobiotics, a too acidic incubation medium (pH 4.0) inhibits phloem sap exudation whatever the buffer used. At pH 4.5, in

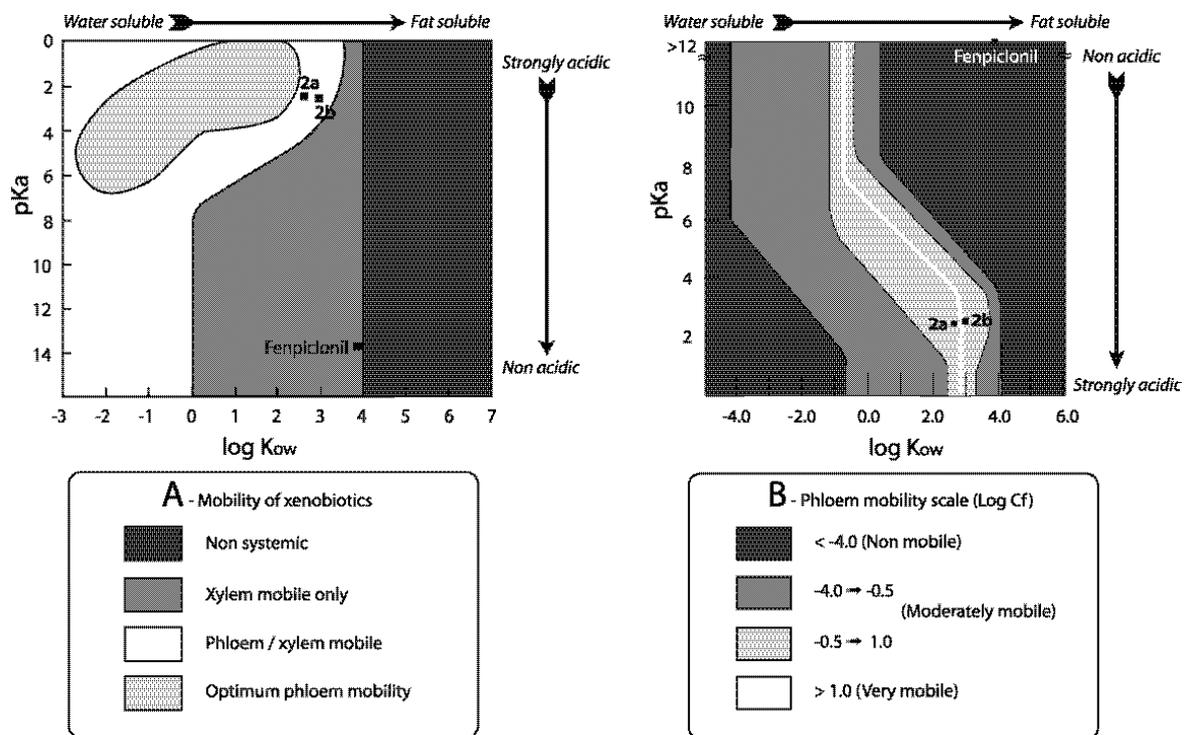


Figure 3. Prediction of phloem mobility of fenpiclonil and its two acidic derivatives using the model of Bromilow (A: mobility as a function of log K_{OW} and pKa) and the Kleier map (B: log Cf as a function of log K_{OW} and pKa; plant parameters are for a short plant⁶).

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 on *Eutypa lata*

2.3.1 Fungal-growth conditions

The effect of compound **2b** was studied on the strain (ELJFC 02) of *Eutypa lata* used previously.⁵ This pathogenic fungus, which destroys 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** ($\text{pK}_a = 2.53$, $\log K_{\text{OW}} = 2.98$) was predicted using the model of Bromilow¹¹ 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 of compound **2a** ($\text{pK}_a = 2.44$, $\log K_{\text{OW}} = 2.63$), the physicochemical properties of both acidic derivatives being nearly the same.

Before evaluating 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 membrane¹² 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 subepidermal cells of the hook was indeed close to -100 mV both in control (see Figure 6a of Ref. 5) and treated sets immediately after isolation of the upper part of the young plant (cotyle-

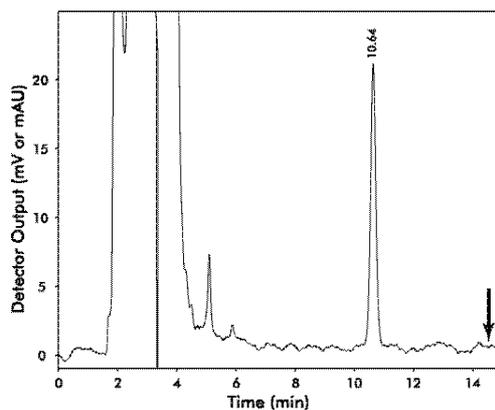


Figure 4. *Ricinus* sap analysis by HPLC. *Ricinus* cotyledons were incubated in the standard medium with compound **2b** (RT: 10.64 min) at 100 μM concentration. The arrow indicates the retention time of fenpiclonil.

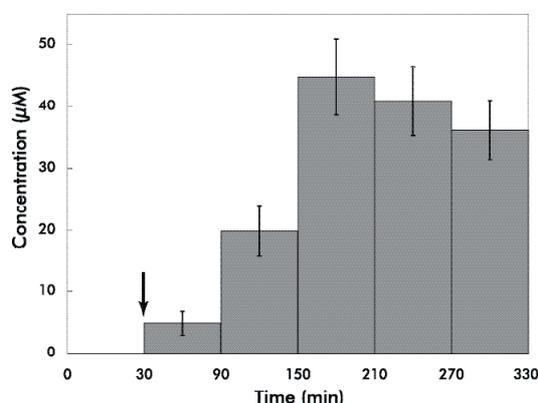


Figure 5. Time course of compound **2b** concentration in phloem sap of *Ricinus*. At time 0, compound **2b** (100 μM , final concentration) was added to the standard medium buffered at pH 5.0. The hook was severed at time 30 min (arrow). Mean of twelve plants \pm SE.

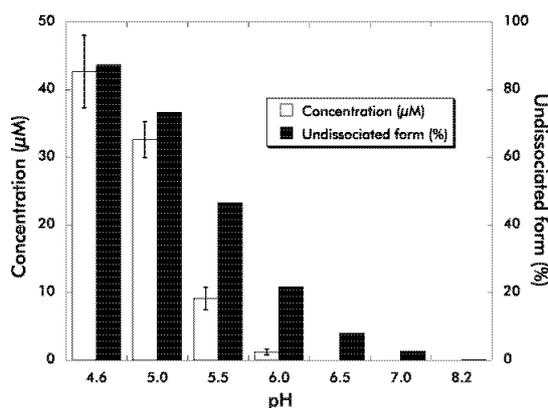


Figure 6. Concentration of compound **2b** (100 μM concentration in the external solution) in phloem sap of *Ricinus* as a function of the pH of the incubation medium and the percentage of its undissociated form at the apoplast/plasma membrane interface according to ACD log D v 8.0 software predictions. The sap was collected during the third and fourth hours of incubation. Mean 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) \pm SE.

dons and hook). However, hyperpolarization of transmembrane PD which usually takes place during ageing¹⁴ was weaker in the treated set than in the control (about -125 mV and -150 mV after 6 h of incubation respectively).

When cotyledons were incubated in acidic solution (pH 5.0) in presence of compound **2b** at $100\ \mu\text{M}$, this derivative was found in the phloem sap (Fig 4) and no fenpiclonil could be detected. This indicates that, just as compound **2a**⁵, compound **2b** is not degraded to the 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 percentage 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.^{16,17,18} 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 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 Ref. 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 compound **2b** phloem uptake occurs by diffusion of its lipophilic undissociated form which dissociates into poorly permeant anions into the phloem symplast, ie a mechanism elegantly demonstrated for herbicides in the eighties.^{21,22}

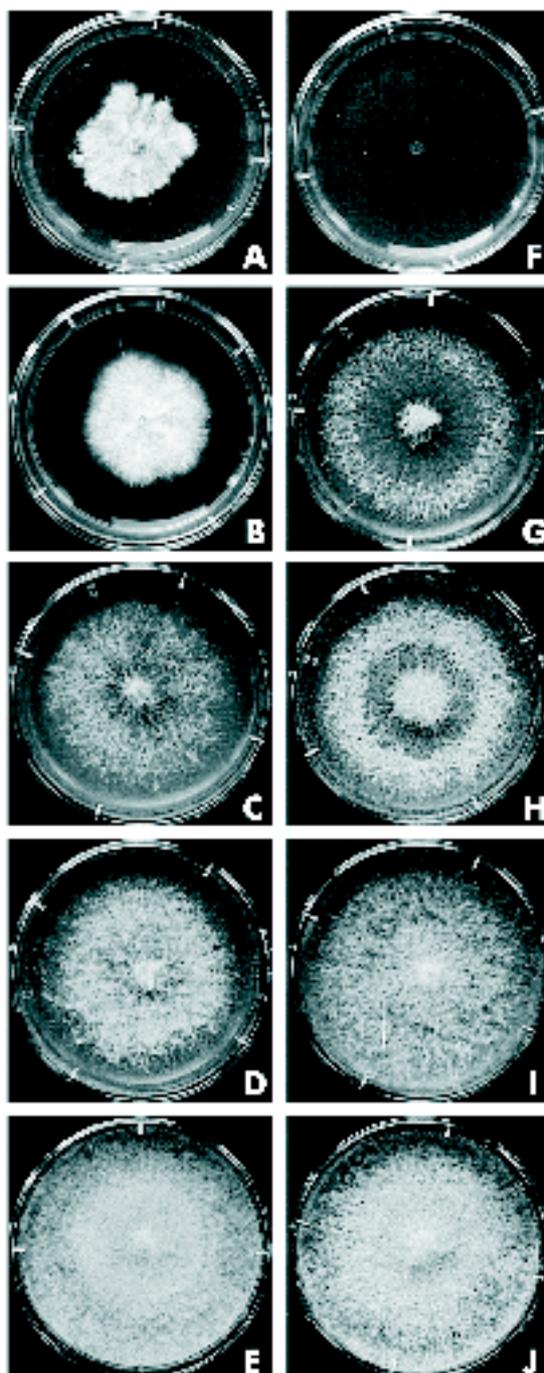


Figure 7. Long-term effect (21 days of culture) of fenpiclonil (A-E) and compound **2b** (F-J) on *Eutypa lata* mycelial growth. The products were used at 1 mM (A, F), 50 μ M (B, G), 10 μ M (C, H), 1 μ M (D, I) and 0 mM (E, J) concentrations. The experiment was repeated six times with similar results.

3.2 Biological activity of compound 2b

The fungicidal activities of fenpiclonil and compound **2b** on mycelial growth of *Eutypa lata* were compared using 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 μ M, the response of the mycelium was practically the same as that described at 1 mM (Fig 7B). *Eutypa lata* development was no longer totally inhibited by compound **2b** when used at 50 μ M, 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 or compound **2b** at 10 μ M (Fig 7C and H). However, the growth of the mycelial halo was less inhibited by contact with **2b**. Finally, at 1 μ M, fenpiclonil and the acidic derivative reduced the thickness of *Eutypa lata* mycelium (Fig. 7D and I) to a similar degree compared to 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 μ M, whereas compound **2b** still exhibits some fungistatic effect at 1 μ M. 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 Ref. 5), uptake of compound **2b** may be in theory 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 Figure 7 of this paper with Figure 3 of Ref. 5). The fungicidal activity of the *N*-substituted derivatives may also depend on their ability to release the parent compound in CH₃CN/H₂O (3/7) as suggested by Nyfeler and Ackermann.²³ Compound **2b** (as compound **2a**) is not degraded to fenpiclonil in 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 seventies to synthesize a phloem mobile fungicide from a non-mobile or apoplastic fungicide have discouraged further works in this research area. In the last two decades, except the 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 a biological effect almost similar at the lower concentrations (10 and 1 μ M) tested. In this case, the problem due to 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 a fundamental work on 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. *Ann 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* in press (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) Mc Murry JE et 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*. *Pest 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).

Chapitre II

- **Publication « Carrier-mediated uptake and phloem systemy of a 350-Dalton chlorinated xenobiotic with an α -amino acid function », *Plant Physiol*, 2001**

Résultats non publiés :

- **Synthèse et étude des propriétés biologiques de conjugués fongicide - acide aminé ou acide salicylique (ou analogue) - acide aminé**

Chapitre II

Une stratégie pour conférer la systémie phloémienne à des molécules peu perméantes ou à systémie xylémienne est de les coupler à un acide aminé, la fonction α -aminoacide demeurant libre. Cette démarche est basée sur la faible spécificité de certains membres du vaste groupe des transporteurs d'acides aminés (Chen et Bush, 1997; Fisher *et al.*, 1998; Delrot *et al.*, 2000), ces perméases étant capables de reconnaître et de manipuler pratiquement tous les acides aminés.

On peut aussi envisager de modifier, par addition d'une fonction α -aminoacide, les propriétés de transport et de distribution dans la plante de molécules à fonction acide carboxylique, et par conséquent déjà plus ou moins phloème mobiles. Cette dernière exploration purement fondamentale a été appliquée aux acides phénoxyalcanecarboxyliques dont certains représentants sont des herbicides (voir la publication qui suit, Delétage-Grandon *et al.*, 2001). Au cours de ce travail, dont le principal acteur était Céline Delétage-Grandon, notre tâche a consisté à mettre au point les manipulations avec le modèle ricin que nous avons ensuite largement exploité, puis à examiner i/ l'effet de quelques substrats sur l'absorption du conjugué 2,4D-[3 H]-Lys à 0,1 mM par des disques foliaires de fève ii/ l'effet d'inhibiteurs (CCCP et PCMBS) sur l'absorption du conjugué 2,4D-[3 H]-Lys à 0,1 mM par des disques foliaires de fève iii/ la mobilité de divers xénobiontes en comparaison avec celle du conjugué 2,4D-Lys, à l'aide du modèle ricin.

Ensuite, dans le cadre d'un travail personnel, nous avons étudié les propriétés biologiques, en particulier la systémie phloémienne et la capacité à libérer le produit initial, du conjugué alcool triazolique-acide aspartique déjà synthétisé au laboratoire (Dufaud *et al.*, 1994). Cette étude a ensuite été étendue à des conjugués acide salicylique (ou analogue)-acide aminé dont nous avons réalisé la synthèse.

Chen L, Bush DR (1997) LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in Arabidopsis. *Plant Physiol* **115**: 1127-1134

Delrot S, Atanassova R, Maurousset L (2000) Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochem Biophys Acta* **1465**: 281-306

Dufaud A, Chollet JF, Rudelle J, Miginiac L, Bonnemain JL (1994) Derivatives of pesticides with an α -amino acid function: synthesis and effect on threonine uptake. *Pestic Sci* **41**: 297-304

Fisher WN, André B, Rentsch D, Krolkiewicz S, Tegeder M, Breitkreuz K, Frommer WB (1998) Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci* **3**: 188-195

Carrier-Mediated Uptake and Phloem System of a 350-Dalton Chlorinated Xenobiotic with an α -Amino Acid Function¹

Céline Deléage-Grandon, Jean-François Chollet, Mireille Faucher, Françoise Rocher, Ewald Komor, and Jean-Louis Bonnemain*

Laboratoire de Physiologie et Biochimie Végétales (Unité Mixte de Recherche 6161, Centre National de la Recherche Scientifique), Université de Poitiers, 25 rue du Faubourg, St Cyprien, 86000 Poitiers, France (C.D.-G., M.F., F.R., J.-L.B.); Laboratoire de Synthèse Organique (Unité Mixte de Recherche 6514, Centre National de la Recherche Scientifique), Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers, France (J.-F.C.); and Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth, D-95440 Bayreuth, Germany (E.K.)

In a previous paper we have shown that ϵ -(phenoxyalkanoic acid)-L-lysine conjugates are potent inhibitors of amino acid transport systems and that it is possible to modulate the uptake inhibition by hydrophobic or hydrophilic additions in the 4-position of the aromatic ring (J.F. Chollet, C. Deléage, M. Faucher, L. Migoniac, J.L. Bonnemain [1997] *Biochem Biophys Acta* 1386: 331-341). In this report we demonstrate that ϵ -(2,4-dichlorophenoxyacetyl)-L-lysine (2,4D-Lys), one of the largest molecules of the series and one of the most potent inhibitors, is a highly permeant conjugate. Uptake of 2,4D-Lys by castor bean (*Vicia faba*) leaf discs is mediated by an active carrier system ($K_m = 0.2$ mM; $V_{max} = 2.4$ nmol cm⁻² h⁻¹ at pH 5.0) complemented by an important diffusive component. Among the compounds tested (neutral, basic, and acidic amino acids, amines, glutathione, and sugars), only the aromatic amino acids clearly compete with 2,4D-Lys. The conjugate accumulates in the vein network, is exported toward the growing organs, and exhibits a distribution pattern different from that of the herbicide moiety. However, over time 2,4D-Lys progressively splits into 2,4D and lysine. Analyses by high-performance liquid chromatography and liquid scintillation spectrometry of the phloem sap collected from the castor bean system, used as a systemic test, indicate decreasing capacities of 2,4D, 2,4D-Lys, and glyphosate, respectively, to move from the epidermal cell wall to the sieve element. Our results show that it is possible to design synthesis of large-size xenobiotics (approximately 350 D) with a lipophilic pole, exhibiting high mobility within the vascular system.

We have recently synthesized a new type of molecule by conjugation of an α -amino acid and a pesticide, the latter being a xenobiotic with a triazole motif or an auxinic herbicide. The structures of these molecules are fundamentally different from those of the in vivo conjugates. In the case of the in vivo formation of an auxin-amino acid conjugate, the hormone is covalently bonded by an amide bond between its carboxyl group and the α -amino function of the amino acid. By contrast, our synthetic conjugates are distinguished by their free amino acid function (Dufaud et al., 1994; Chollet et al., 1997). We showed first that some of these xenobiotics with a free α -amino acid function markedly inhibited Thr uptake by leaf tissues when applied at 1 mM conjugate against 1 mM amino acid. Thr uptake by minor veins was especially affected, contrarily to Suc loading, which remained unchanged (Dufaud et al., 1994). By contrast, other conjugates had only marginal or no

effect on Thr uptake under these experimental conditions.

It was consequently necessary to analyze the structure-activity relationship of this kind of conjugate (Chollet et al., 1997). Phenoxyalkanoic acids were chosen as xenobiotics because of the wide variety of products available. This allowed the synthesis of derivatives varying by the position of the amine and carboxyl functions, their octanol/water partition coefficient (K_{ow}), and their size. First, it was shown that as for the α -amino acid analogs (Li and Bush, 1992), stereochemistry is an important parameter in conjugate recognition. Second, hydrophobic or hydrophilic functions in the 4-position of the aromatic ring modify the biological activity of conjugates in terms of amino acid uptake inhibition. Chlorinated conjugates are highly potent inhibitors of neutral and acidic amino acid uptake at acidic pH and, to a lesser extent, of basic amino acid uptake. By contrast, some hydrophilic conjugates significantly inhibit amino acid influx only when they are present in concentrations 5 to 10 times greater. Third, for a similar K_{ow} the increase in size of derivatives may strengthen inhibitory activity. It appears that the amino acid transport systems, which include a large number of transporters (Fisher et al., 1998), are capa-

* This work was supported by Gha-Geigy (Novartis grant no. 78021), by the Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (grant nos 19 674/19, 675/19, and 676/19), and by the Conseil Régional du Poitou-Charentes.

¹ Corresponding author; e-mail jlbennemain@voila.fr; fax 33-5-49-55-76-94.

ble of recognizing a wide range of conjugates of various sizes and Kovs (Chollet et al., 1997).

Molecular recognition does not necessarily mean that conjugates with an α -amino acid function are taken up in plant cells via a specific carrier system of the plasma membrane, especially in the case of the large-sized chlorinated derivatives (>300 D). As a general rule the phloem mobility of pesticides is related to their physico-chemical properties and to plant parameters, especially phloem sap velocity and pH (Tyree et al., 1979; Kleier, 1988; Bromilow et al., 1991; Kleier et al., 1998 and refs therein). In brief, most are acidic (carboxylic) in nature (e.g. auxinic herbicides) or esters, i.e. acid precursors (e.g. phenoxypropionic acid derivatives). Weakly acidic compounds ($3 < pK_a < 7$) are, at least in part, in nonionic form in the phloem apoplast (pH of approximately 5). Once in the phloem sap (pH of approximately 8), the anionic form is trapped because of the membrane permeation difference between the nonionic and the anionic forms, and can be translocated at distance. No clear role was established for carrier involvement in the phloem transport of xenobiotics until the end of the 1980s (Bromilow et al., 1991). Only three compounds are well known to be transported by plasma-membrane carriers: phosphite (Barchi et al., 1989; Leconte, 1989) and glyphosate (Denis and Delrot, 1993) are handled by the phosphate carrier system, and paraquat is translocated by a diamine carrier (Hart et al., 1992). The common features of these molecules are that they are hydrophilic and of rather small M_r .

In this work we have examined whether larger-size xenobiotics, including lipophilic groups (such as various herbicides and fungicides), could be translocated by a plant carrier system. The chlorinated conjugate we chose was ϵ -(2, 4-dichlorophenoxyacetyl)-L-Lys (2,

4D-Lys; Fig. 1) for the following reasons: It is one of the largest molecules previously tested (349.2 D; Chollet et al., 1997); it is one of the most efficient inhibitors of the amino acid transport systems (Chollet et al., 1997); it can be obtained in a straightforward manner with satisfactory yield compared with other conjugates, thus allowing access to radiolabeled material; and in the event of phloem transport of this conjugate, its distribution in the whole plant could be compared with that of the available radiolabeled xenobiotic moiety (2, 4D). Furthermore, previous data (Dufaud et al., 1994) suggest that 2,4D-Lys is stable or poorly hydrolyzed in the apoplast.

RESULTS

Time Course Experiments and Localization of Uptake

When broad bean (*Vicia faba*) foliar discs were incubated in the presence of 0.1 mM 2,4D- 3 H-Lys, label uptake was roughly linear for at least 2 h (Fig. 2). This suggests that the labeled molecules enter the leaf cells and are not simply adsorbed on the cell walls and plasma membrane. Taking into account the water content of the leaf tissues (91% of fresh material) under our culture conditions, the concentration of label in the cells was equal to that of the incubation medium after 1 h. Qualitative approaches indicated that the conjugate was not immediately hydrolyzed after uptake (Fig. 3).

Autoradiographs of leaf tissues showed that labeled molecules were localized in mesophyll and veins (Fig. 4). The minor veins network was the most labeled tissue, suggesting a preferential uptake by veins. A similar picture was noted for amino acid uptake in broad bean foliar discs (Despeghel et al., 1980; Despeghel and Delrot, 1983; Chollet et al.,

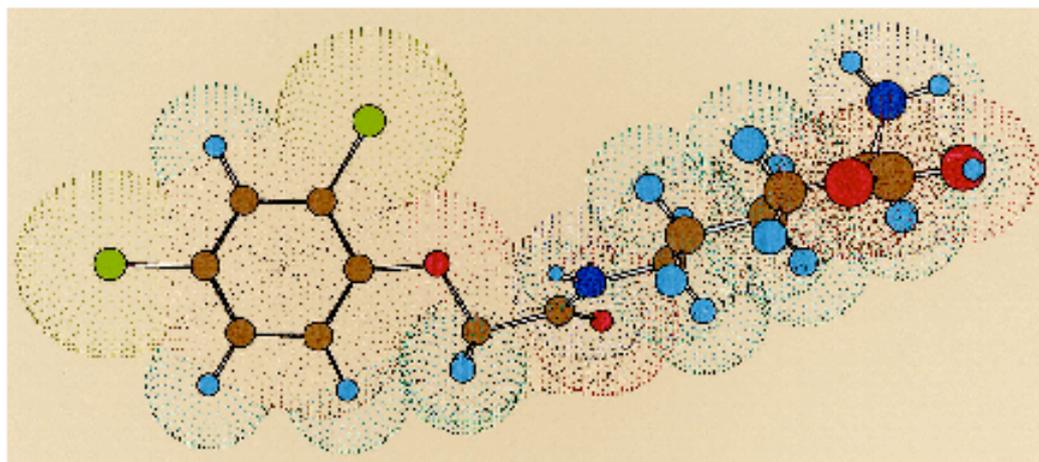


Figure 1. Three-dimensional structure of 2,4D-Lys conjugate (M_r, 349.2 D; Kovs, -1.05 for zwitterionic form, predicted by the ACD/LogD program) obtained using Chem3D Pro, energy minimization with PM3 parameters, and simulating presence of water. Atoms are denoted by spheres in the following colors: carbon in gray, hydrogen in cyan, chlorine in green, oxygen in red, and nitrogen in blue.

Delborge-Gonzalez et al.

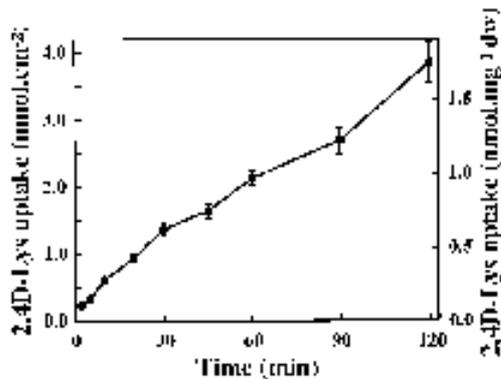


Figure 2. Time course of 0.1 mM 2,4-D-Lys uptake by broad bean leaf discs at pH 5.0.

1997). By contrast, Suc is accumulated more intensively in the veins (Delrot and Bonuennain, 1981; Chollet et al., 1997), whereas iprodione, a permeant but non-systemic xenobiotic, remains excluded from the veins (El Ibaoui et al., 1996).

Concentration Dependence of 2,4D-[³H]Lys Uptake

Uptake of 2,4D-[³H]Lys was measured after a 60-min incubation period (pH 5.0) for concentrations ranging from 0.03 to 2.5 mM. Higher concentrations were not used because of the limited water solubility of the conjugate. The data enabled a saturable component (between 0.03 and 0.25 or 0.5 mM, according to the sets) to be distinguished, suggesting that part of 2,4D-Lys uptake is carrier-mediated and a more or less linear component at higher concentrations (Fig. 5A). The apparent kinetic parameters deduced from Lineweaver-Burk plots (Fig. 6A) were $K_{m1} = 0.3$ mM and $V_{m1} = 7.1$ $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{h}^{-1}$. Fifty micromolar carbonylcyamide *m*-chlorophenylhydrazones (CCCP) practically abolished the saturable component observed at the lowest concentrations (Fig. 5B). After subtracting the passive component from the total amount of 2,4D-Lys absorbed, the kinetic parameters of phase 1 (Fig. 6B) were $K_{m1} = 0.16$ mM and $V_{m1} = 2.4$ $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{h}^{-1}$. Active uptake represents 53% of total influx at the lowest concentration (0.03 mM), 46% at 0.1 mM, and only 34% at 0.25 mM (Fig. 5B). In view of these results and the weak specific activity of labeled conjugate, we decided to operate at 0.1 mM concentration to study uptake properties of 2,4D-[³H]Lys by foliar tissues.

pH Dependence of 2,4D-Lys Uptake Comparison with Lys and 2,4D

Uptake of 0.1 mM 2,4D-[³H]Lys was sensitive to pH changes in the incubation medium (Fig. 7A). Maximal uptake rates were found to occur in the acidic pH range (pH 3.5–4.0). Experiments per-

formed using two different buffers at pH 6.5 (MES [2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid] and HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid]) and at pH 5.0 (MES and citrate-phosphate) showed that the nature of the buffer had no clear effect on the conjugate uptake. However, at pH 5.0 2,4D-Lys influx was slightly (10%), but significantly, reduced in presence of citrate-phosphate buffer.

By contrast, 0.1 mM [³H]Lys uptake was little dependent on the external pH and showed an apparent optimum at pH 5.0 with MES buffer (Fig. 7B). The citrate-phosphate buffer, which chelates calcium, reduced Lys uptake by 40% at this same pH value. Addition of CaCl_2 (5 mM) to the incubation medium partially restored Lys uptake. It should be noted that the rate of 2,4D-[³H]Lys influx is 3- to 6-fold faster than [³H]-Lys uptake depending on the pH values.

[¹⁴C]2,4D uptake, which was weak at basic or near neutral pH values, increased exponentially at acidic

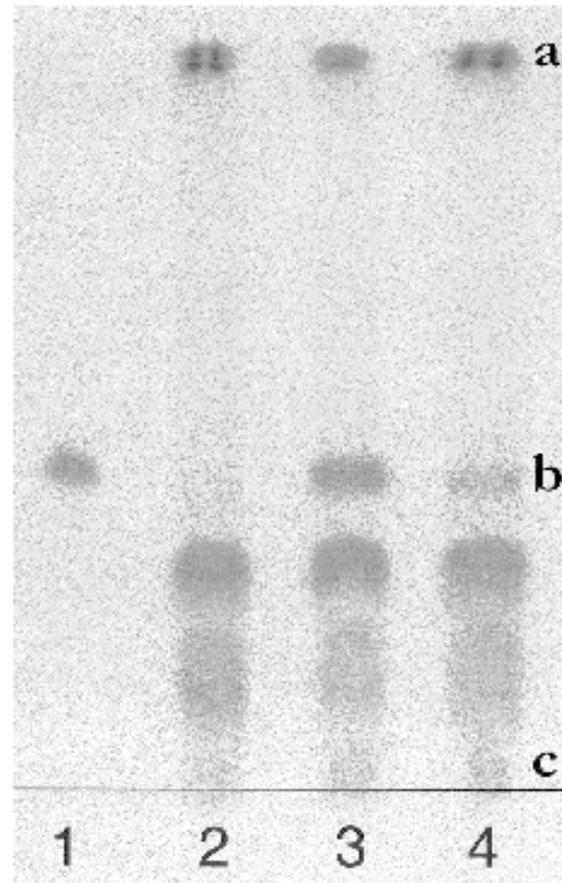


Figure 3. TLC of broad bean leaf tissue extracts. The plate was developed by ninhydrin. 1, 6.9 nmol 2,4D-Lys; 2, leaf tissues (control); 3, leaf tissues + 6.9 nmol 2,4D-Lys; 4, discs incubated for 6 h in a 1 mM 2,4D-Lys solution and then rinsed three times for 2 min each; a, Chlorophylls; b, 2,4D-Lys R_f ; c, Lys R_f .

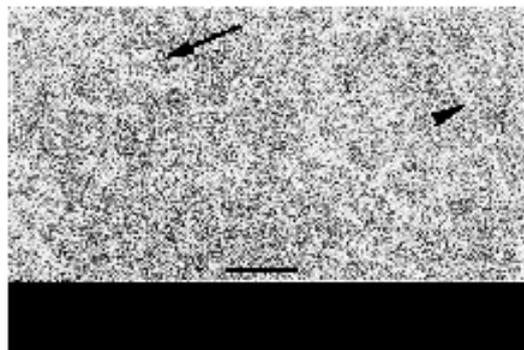


Figure 4. Autoradiograph of broad bean leaf tissues after uptake of 2,4-D-[³H]Lys. The tissues were incubated for 2 h in the presence of 0.5 mM 2,4-D-[³H]Lys, rinsed, frozen, freeze dried, and then exposed for 4.5 d to hyperfilm *BM*18. The radioactivity appears in white. The background of the film is shown at the bottom of the figure. Arrow, minor vein; arrowhead, middle vein. Scale bar = 1 mm.

pH (Fig. 7C). This is consistent with the reported uptake properties for this herbicide (Delrot and Boumerain, 1991 and refs. therein).

Effect of *p*-Chloromercuribenzenesulfonic Acid (PCMBS) and Substances Affecting the Transmembrane Electrical and pH Gradients on the Uptake of 2,4D-Lys, Lys, and 2,4D

PCMBS, a non- or slowly permeant thiol reagent, reduced 0.1 mM 2,4D-[³H]Lys, 0.1 mM [³H]Lys, and 0.1 mM [¹⁴C]2,4D uptake of 22%, 33%, and 14%, respectively, when used at a concentration of 1 mM (Table I). Ten micromolar CCCP induced a 20% inhibition of 0.1 mM 2,4D-[³H]Lys uptake by leaf discs (Table I). However, it did not significantly affect 0.1 mM 2,4D-[³H]Lys uptake by mesophyll protoplasts (8.98 ± 0.10 nmol 10^{-6} protoplasts 30 min⁻¹ in control, 8.17 ± 0.15 nmol 10^{-6} protoplasts

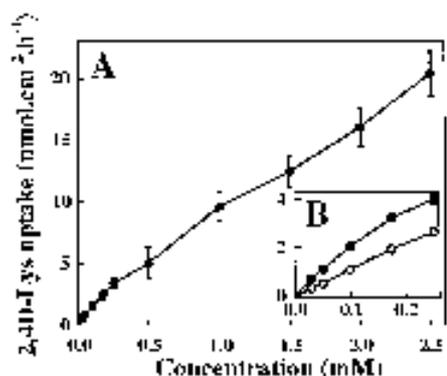


Figure 5. Concentration dependence of 2,4-D-Lys uptake (1-h incubation) by leaf tissues at pH 5.0. Each point was the mean of four sets of 12 discs (A) or 12 discs (B, complementary set). (●), Control; (○), 50 μ M CCCP. Vertical bars were not shown when smaller than the symbols.

Carrier-Mediated Loading of a 350-D Chlorinated Xenobiotic

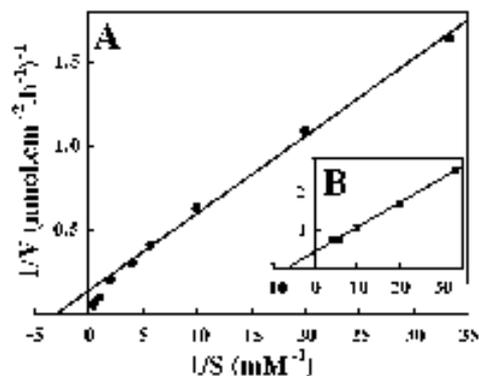


Figure 6. Lineweaver-Burk plots of 2,4-D-Lys uptake. A, Data from Figure 5A (●); B, data from Figure 5B after subtracting the CCCP-insensitive component; (■), active component. Using Eadie-Hofstee plots, the points corresponding to the highest concentrations (1.5, 2.0, and 2.5 mM) parallel the vertical axis.

30 min⁻¹ in treated sets, mean of three triplicates \pm SD). This suggests that the active uptake of conjugate occurs mainly in the veins. Ten micromolar CCCP inhibited uptake of [³H]Lys and [¹⁴C]2,4D by foliar discs in the same proportions (approximately 35%; Table I). However, 100 mM KCl clearly inhibits Lys uptake while stimulating 2,4D uptake by 20% (Table I). This latter particularly may be due, at least in part, to the pH dependent uptake of 2,4D. Massive influx of K⁺ into the cell induced dramatic depolarization of the transmembrane potential difference (PD), thus stimulating the plasma membrane H⁺-ATPase activity. As a consequence, transmembrane Δ pH may increase, promoting 2,4D trapping (Delrot and Boumerain, 1991). [³H] 2,4D-Lys uptake was less dependent to the transmembrane PD than the basic amino acid. The inhibitory effect of 100 mM KCl (about 10%) on the conjugate influx, not strictly significant in Table I ($P = 0.07$), was also observed in a complementary experiment (data not shown). It represented about 20% of the 50 μ M CCCP-sensitive component.

CCCP, which dissipates the proton motive force, is usually used at concentrations ranging from 10 to 50 μ M. Depending on the tissue, 20 to 80 μ M are required to abolish the active component of the transmembrane PD completely (Renault et al., 1989; Fleurat-Lessard et al., 1997). Fifty micromolar CCCP inhibited 0.1 mM [³H] 2,4D-Lys uptake by nearly 50% (46% in Fig. 5B; 48% in Table II). PCMBS is generally used at concentrations from 1 to 5 mM. Infiltration of broad bean leaf tissues with 2 mM PCMBS does not affect photosynthesis or the transmembrane PD for at least 3 h (Bourquin et al., 1990). At this latter concentration the thiol reagent reduced 0.1 mM 2,4D-Lys uptake by 38% (Table II). This represented about 75% of the 50 μ M CCCP-sensitive component. One or 2 mM PCMBS added to 50 μ M

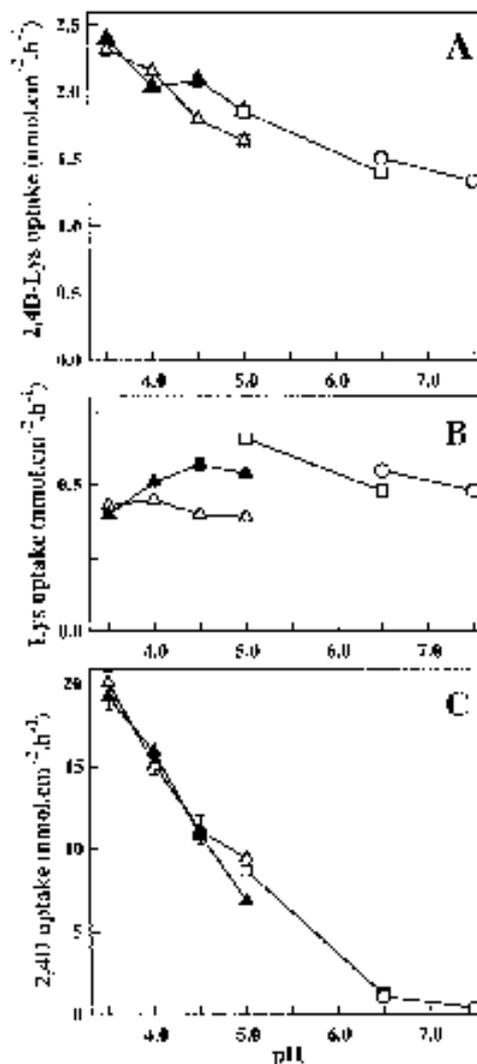


Figure 7. pH-dependence of 0.1 mM 2,4D-Lys (A), 0.1 mM Lys (B), and 0.1 mM 2,4D (C) uptake by broad bean leaf tissues. Three different buffers were used: (Δ) and (\blacktriangle) 10 mM citrate, 20 mM disodium phosphate for pH 3.5 to 5.0; (\square) 20 mM HEPES/NaOH for pH 5.0 and 6.5; and (\circ), 20 mM HEPES/NaOH for pH 6.5 and 7.5. (Δ) standard medium; (\blacktriangle) presence of 5 mM CaCl_2 in the preincubation and the incubation solutions. Each point is the mean of 24 discs \pm SE. Vertical bars were not shown when smaller than the symbols.

CCCP did not increase the inhibition induced by the protonophore alone (Table II). As a consequence, the decrease of 2,4D-Lys uptake observed in the presence of 1 or 2 mM PCMBs (Tables I and II) is not the result of an effect of this thiol reagent on phospholipid bilayer permeability. Its blocking effect on carriers—and especially on the system translocating the conjugate—cannot be seen when the transport systems are not operating due to a lack of energy.

Effect of Various Substrates on 0.1 mM 2,4D-³H]Lys Uptake

Several amino acids, a tripeptide (glutathione), a weak auxin (indole butyric acid), and two sugars (Glc and Suc) were tested against 0.1 mM 2,4D-³H]Lys. At the concentration of 1 mM the most competitive substances were Trp and Phe (Fig. 8A). These two aromatic amino acids inhibit the absorption of conjugate (0.1 mM) by 20%. This represents about 40% of the 50 μM CCCP-sensitive uptake component (Fig. 5B).

At 10 mM concentration Trp and Phe inhibited 0.1 mM 2,4D-Lys uptake by 35%, i.e. the major part (about 70%) of the CCCP-sensitive component. At a same concentration, glutathione (Table II) and other amino acids had only a marginal effect, except Arg, which reduced conjugate uptake by 20% (Fig. 8B). Glc and Suc, at 10 mM concentration, had no effect (Table III). This latter result indicates that the inhibition induced by the aromatic amino acids is not due to competition for the proton motive force.

Long-Distance Transport and Metabolism

Thirty minutes after the deposition of 2,4D-³H]Lys, ³H]Lys, or [¹⁴C]2,4D on leaves 4 and 5 (Fig. 9), labeled molecules were transported throughout the broad bean plants. However, the distribution of labeling was shown to be dependent on the nature of each of the molecules applied on these two exporting leaves (Table IV). In the case of 2,4D-³H]Lys deposition, the transport of labeled molecules toward the roots (root basis and root apical part) was greater than for the two other sets (³H]Lys and [¹⁴C]2,4D depositions). In a similar manner, transport to the expanding internode 9 was more pronounced, as was the label penetration in mature leaves L3 and L6. This triple specificity suggests that the 2,4D-³H]Lys conjugate moves mainly without hydrolysis during this short period. After 6 h of transport, 2,4D still showed a lesser capacity to penetrate to the roots and the young apical bud than the label from the other two substances. After 24 h, the herbicide was shown to accumulate in the young internodes, which elongated rapidly and curved (Fig. 10). The same phenomenon was observed, but to a lesser extent, when 2,4D-³H]Lys was applied to leaves L4 and L5 (Fig. 10). This suggests that the conjugate is progressively hydrolyzed, releasing 2,4D. Further experiments confirmed that this was indeed the case. Foliar discs were incubated for 1 h in a 1 mM 2,4D-Lys solution. The foliar apoplast was then washed three times for 2 min each with buffer and the discs were placed for 5 or 23 h in the dark in an atmosphere saturated with water. Extraction after these times in boiling ethanol provides, respectively, 1.19 ± 0.18 and 2.52 ± 0.50 $\mu\text{mol cm}^{-2}$ (means \pm SE, $n = 4$ sets of 12 discs) of 2,4D (HPLC analysis), whereas the quantity of 2,4D-Lys absorbed was 9.6 ± 1.1 $\mu\text{mol cm}^{-2}$ (means \pm SE, $n = 12$). Using this method the 2,4D-Lys

Table I. Effect of 1 mM PCNBS, 10 μM CCCP, and 100 mM KCl on 0.1 mM 2,4D-Lys, 0.1 mM lysine, and 0.1 mM 2,4D uptake by broad bean leaf discs

Means ± SE, n = 24. HS, Not significant. Asterisk indicates 0.05 > P > 0.01; triple asterisks indicate P < 0.001.

Treatment	2,4D-Lys		Lys		2,4D	
	nmol cm ⁻² h ⁻¹	%	nmol cm ⁻² h ⁻¹	%	nmol cm ⁻² h ⁻¹	%
Control	1.43 ± 0.05	100.0	0.64 ± 0.02	100.0	6.35 ± 0.28	100.0
PCNBS	1.11 ± 0.03 ^{***}	77.6	0.43 ± 0.01 ^{***}	67.2	5.49 ± 0.22 [*]	86.4
CCCP	1.17 ± 0.02 ^{***}	81.8	0.42 ± 0.01 ^{***}	65.6	4.10 ± 0.21 ^{***}	64.6
KCl	1.30 ± 0.03 (HS)	90.9	0.39 ± 0.01 ^{***}	61.0	7.84 ± 0.39 [*]	123.5

amount could not be estimated by HPLC analysis because of interference with other extracted polar compounds.

We used the castor bean system to check the phloem mobility of 2,4D-Lys. This system enables phloem-mobile molecules (2,4D and glyphosate) to be distinguished from non-phloem-mobile molecules (ferpiclorol; Table V), and it may therefore be employed as a test for systems. Thus, it was confirmed that the 2,4D-Lys conjugate is indeed phloem-mobile and also that it becomes metabolized over time, since we also found 2,4D in the phloem sap (Fig. 11; Table V). However, the observed 2,4D/2,4D-Lys ratio (1.3) is probably over-estimated. In this regard peptidases liberated from sectioned tissues may hydrolyze the conjugate during the formation of phloem sap droplets. Under our experimental conditions the concentration of 2,4D-Lys is almost double in the phloem sap than in the incubation medium of the cotyledons. This result is halfway between that of 2,4D (7-fold) and that of glyphosate (0.2-fold) under the same conditions (Table V). Complementary experiments showed that systemy data are dependent on environmental conditions. Thus, when castor bean plants grew at room temperature (21 ± 2°C), the 2,4D-Lys concentration in phloem sap was 0.12 ± 0.04 mM (means ± SE, n = 10), with a smaller 2,4D/2,4D-Lys ratio (0.81).

The castor bean system was also used to determine whether 2,4D-Lys is an amphoteric xenobiotic, as suggested by the presence of label in the broad bean mature leaves L3 and L6 after a 30-min transport of 2,4D-Lys (Table IV). Under our experimental conditions 2,4D-Lys was present in the castor bean vascular sap at a low concentration (6.5 ± 4.5 μM, means ± SE, n = 5 sets of three to five plants), i.e. about

one-thirtieth of that found in the phloem sap (Table V). By contrast, no 2,4D was detected.

DISCUSSION

2,4D-Lys Uptake Does Not Need Previous Cleavage in the Apoplast But the Conjugate Is Progressively Hydrolyzed to Lys and 2,4D

Several enzymes involved in the hydrolysis of natural auxin conjugates and oligopeptides have been characterized in the last few years (Bartel and Pirsk, 1995; Martin and Slovic, 2000). In view of the large specificity of some of these enzyme systems, the metabolic fate of 2,4D-Lys needed some investigation.

Table II. Effect of 50 μM CCCP, 2 mM PCNBS, and 50 μM CCCP + 1 or 2 mM PCNBS on 0.1 mM 2,4D-Lys uptake by broad bean leaf discs

Means ± SE, n = 18; triple asterisks indicate P < 0.001.

Treatment	nmol cm ⁻² h ⁻¹	%
Control	1.42 ± 0.23	100
CCCP	0.74 ± 0.13 ^{***}	52.1
PCNBS	0.88 ± 0.14 ^{***}	62
CCCP + PCNBS (1 mM)	0.72 ± 0.13 ^{***}	50.7
CCCP + PCNBS (2 mM)	0.72 ± 0.16 ^{***}	50.7

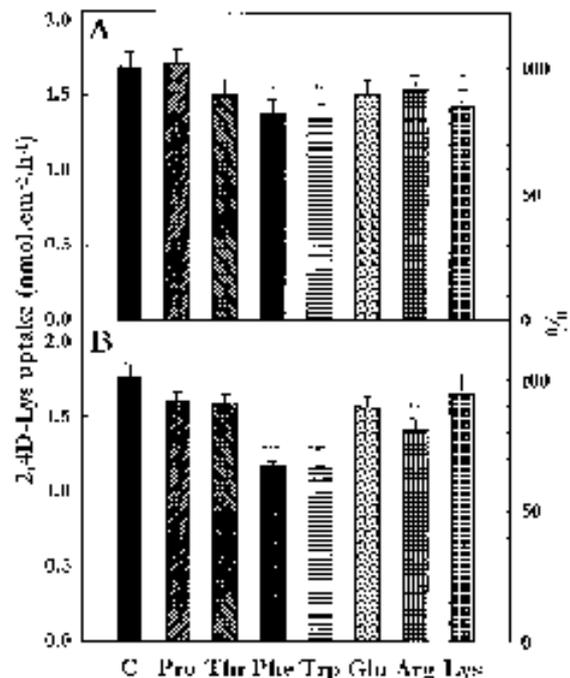


Figure 3. Effect of various amino acids at 1 mM (A) and at 10 mM (B) concentration on 0.1 mM 2,4D-Lys uptake by broad bean leaf discs at pH 5.0. It must be taken in mind that the active component of the conjugate influx is less than the one-half of the total uptake. Data are the mean of 24 discs ± SE. Asterisk, 0.05 > P > 0.01; double asterisks, 0.01 > P > 0.001; triple asterisks, P < 0.001.

Deléage-Guzulac et al.

Table III. Effect of 10 mM sugars, 10 mM glutathione, and 1 mM BA on 0.1 mM 2,4D-Lys uptake by broad bean leaf discs

Treatment	nmol cm ⁻² h ⁻¹	%
Control	1.75 ± 0.12	100.0
Glc	1.73 ± 0.11 (HS)	98.9
Suc	1.94 ± 0.10 (HS)	110.9
Control + dithiothreitol	1.54 ± 0.13	100.0
Glutathione + dithiothreitol	1.35 ± 0.12 (HS)	87.7
Control + 0.5% BOH	1.58 ± 0.07	100.0
Inoleic butyric acid + 0.5% BOH	1.82 ± 0.09 (HS)	115.0

The relative stability of 2,4D-Lys in the apoplast has been previously suggested (Dufaud et al., 1994). It was shown that 0.1 mM 2,4D inhibits in a non-specific manner, Thr and Suc uptake by leaf tissues after 1 h of incubation. However, under the same conditions, 2.5 mM 2,4D-Lys dramatically inhibits Thr uptake without affecting the influx of Suc. This result indicates that the conjugate is stable in the apoplast or is not sufficiently hydrolyzed to affect Suc uptake during this incubation period. In a similar manner, uptake properties of 2,4D-[³H]Lys show that the conjugate is taken up in an essentially unchanged form, at least in short-term experiments (1 h). In particular, the influx rate of 2,4D-[³H]Lys is 3- to 6-fold higher than that of [³H]Lys, depending on the pH of the incubation medium. Furthermore, the pH sensitivity of uptake clearly differs for the two compounds (Fig. 7, A and B).

However, the auxinic effect observed 24 h after deposition of 2,4D-Lys on mature leaves (Fig. 10) suggests that the conjugate is progressively hydrolyzed within the tissues to Lys and 2,4D. Analysis of castor bean phloem sap points out the ability of 2,4D-Lys to cross membranes and to enter the phloem and it clearly shows that plants possess an enzymatic system able to hydrolyze this atypical conjugate.

2,4D-Lys Uptake Involves Two Components, an Active Carrier-Mediated System and Diffusion

Analysis of the concentration-dependence of 2,4D-Lys uptake by leaf discs (Figs. 5 and 6) and the inhibitory effects of PCMBs (Table II) and some competitors demonstrate that part of this 350-D chlorinated conjugate influx is carrier-mediated. Furthermore, the inhibitory effect of CCCP (Fig. 5B; Table II), a protonophore that decreases the two components of the proton motive force, is consistent with the involvement of an active uptake system.

However, compared with natural substrate uptake by the same material (broad bean leaf discs), 2,4D-Lys influx exhibits two particularities. The first concerns diffusion, which clearly becomes the main component of the influx for external concentrations higher than 0.1 mM. The importance of the diffusive

component may be related to the structure of this polarized molecule (Fig. 1), which exhibits a highly lipophilic pole. By contrast, for 1 mM Suc, the CCCP-insensitive uptake by leaf tissues represents only 20% of the total uptake (Delrot and Bonnemain, 1981). Similar data were reported for Gly and Thr uptake (Despeghel et al., 1980; Despeghel and Delrot, 1983). The second particularity concerns the relatively high affinity of the transport system that manipulates 2,4D-Lys. The apparent K_m value at pH 5.0 (about 0.2 mM) is 10- to 20-fold lower than the K_m values reported for Suc, Gly, and Thr uptake in similar pH conditions (Despeghel et al., 1980; Delrot and Bonnemain, 1981; Despeghel and Delrot, 1983).

Like amino acids (Despeghel et al., 1980; Despeghel and Delrot, 1983), 2,4D-Lys penetrates into mesophyll and vascular tissues with a preferential accumulation in the vein network. By contrast, the dipeptide Gly-Gly seems weakly loaded in the minor veins (Jarnal et al., 1994). Furthermore, our data suggest that uptake of 2,4D-Lys from 0.1 mM solution is weakly, but significantly, decreased in the presence

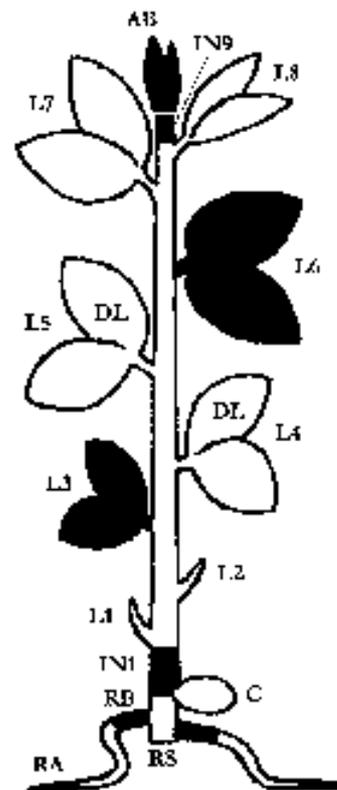


Figure 5. Long-distance transport of labeled molecules from the donor leaves (DL) L4 and L5. The organs selected (in black) for label distribution from 2,4D-[³H]Lys, [³H]Lys, and [¹⁴C]2,4D were the apical bud (AB), internode 9 (TN9), leaves 6 (L6) and 3 (L3), internode 1 (TN1), the basis (RB), and the apical part (RA) of the secondary roots. RS, Root system.

Table IV. Distribution of labeled molecules in broad bean tissues after deposition of 0.4 μmol [^3H]Lys, [^{14}C]2,4D, or 2,4D-[^3H]Lys on each of the mature leaves L4 and L5

The harvest of material takes place 30 min, 6 h, or 24 h after deposition. Results are expressed in nanomoles per gram of dry wt. Mean of three replicates \pm *se*. AB, Apical bud; IH1, internode 1; IH 9, internode 9; L3, leaf 3; L6, leaf 6; RA, root apex; RB, root basis (see Fig. 9). The dry wt. of AB, IH9, L6, L3, IH1, RB, and RA was, respectively, 30.6 \pm 2.0, 9.2 \pm 1.0, 164.7 \pm 5.6, 93.3 \pm 23.2, 44.5 \pm 2.9, 30.9 \pm 1.7, and 40.6 \pm 3.8 mg (means \pm *se*, *n* = 27, set 30 min).

Tissue	30 min			6 h			24 h		
	Lys	2,4D	2,4D-Lys	Lys	2,4D	2,4D-Lys	Lys	2,4D	2,4D-Lys
AB	1.0 \pm 0.6	0.8 \pm 0.7	1.2 \pm 0.9	39.9 \pm 4.7	2.9 \pm 1.1	74.1 \pm 18.0	132.8 \pm 10.4	115.8 \pm 57.4	124.5 \pm 20.2
IH 9	1.1 \pm 1.0	1.3 \pm 0.4	9.7 \pm 7.2	51.3 \pm 8.4	10.4 \pm 3.8	48.0 \pm 12.0	125.9 \pm 18.5	265.4 \pm 126.8	174.0 \pm 33.1
L6	2.4 \pm 1.1	3.7 \pm 2.1	9.2 \pm 4.3	1.5 \pm 1.5	0.8 \pm 0.1	5.2 \pm 1.1	4.1 \pm 1.0	4.4 \pm 3.5	9.0 \pm 1.4
L3	2.6 \pm 0.4	0.6 \pm 0.3	6.9 \pm 4.6	4.1 \pm 1.8	5.0 \pm 4.5	3.8 \pm 1.1	2.6 \pm 0.8	1.1 \pm 0.8	3.3 \pm 1.1
IH 1	0.6 \pm 0.1	4.4 \pm 4.3	1.9 \pm 1.9	6.9 \pm 0.6	9.8 \pm 4.2	7.1 \pm 3.0	7.4 \pm 0.8	96.7 \pm 40.7	33.5 \pm 23.5
RB	0.6 \pm 0.3	0.5 \pm 0.4	4.7 \pm 3.2	6.4 \pm 1.2	1.0 \pm 0.3	10.4 \pm 1.1	8.7 \pm 1.7	20.9 \pm 9.5	18.2 \pm 2.5
RA	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.5	6.1 \pm 2.7	6.8 \pm 1.5	1.5 \pm 1.1	9.3 \pm 2.2	19.5 \pm 2.3	10.4 \pm 6.3	35.6 \pm 6.6

of the citrate-phosphate buffer (Fig. 8A). However, considering the active component of the conjugate influx, the inhibition noted at pH 5.0 reaches about 20%. This decrease, presumably due to Ca^{2+} chelation by citrate, is completely reversed by the addition of 5 mM CaCl_2 in the incubation medium (Fig. 8A). The dependence of amino acid uptake on the buffers employed has been reported on in the past and it has been noted that neutral amino acid accumulation is affected by the citrate-phosphate buffer (Otsuoguchi and Rohlin, 1985), as well as by typical chelating agents like EGTA and EDTA (Rickauer and Tanner, 1986). Basic amino acid accumulation is also strongly inhibited by Ca^{2+} deficiency (Fig. 8B). By contrast, buffers and Ca^{2+} additions do not affect 2,4D uptake.

The pH dependence of 2,4D-Lys uptake is similar to that of γ -glutamyl-cysteinyl-Gly (GSH; Jarnai et al., 1996) and rather similar to that of neutral and acidic amino acids (Despeghel et al., 1990; Despeghel and

Delrot, 1993; Chollet et al., 1997), but differs from that of Gly-Gly, which is optimal at pH 6.0 (Jarnai et al., 1994).

Among Various Tested Substrates, Only Aromatic Amino Acids Clearly Inhibit 2,4D-Lys Uptake

In the 1980s, physiological data suggested that amino acid transport across the plasma membrane was mediated by a small number of distinct transport systems (Kirsch and Etherton, 1980; Wyse and Kornor, 1984). This would mean that practically all neutral amino acids are taken up by a single transport system exhibiting a very wide specificity. Later, transport studies with isolated membrane vesicles suggested that at least four amino acid transport systems, two neutral, one acidic, and one basic, are present in the plasma membrane (Li and Bush, 1990, 1991). In the last few years molecular approaches have permitted these initial results to be improved

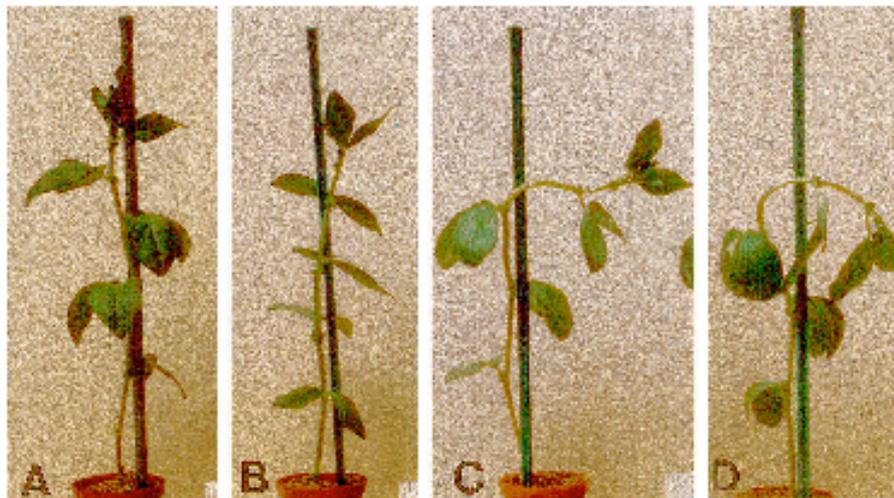


Figure 10. Broad bean plant reaction 24 h after the deposition of 0.4 μmol of Lys (B), 2,4D-Lys (C), and 2,4D (D) on each of the second and third bifoliate leaves (L4 and L5). A, Control.

Table V. *Ricinus* phloem sap analysis after soaking cotyledons in a solution containing various xenobiotics

Phloem sap collection started 2 h after the beginning of soaking and lasted for 2 h. Means \pm SE, n = 10. HD, Not detected. Asterisk indicates that phloem sap contains 2,4D at the concentration of 0.25 ± 0.04 μ M.

Xenobiotic	Inoculation Medium	Phloem Sap
	μ M	
2,4-D	0.10	0.70 ± 0.01
Glyphosate	0.10	0.02 ± 0.00
Perpicloril	0.10	HD
2,4D-Lys	0.10	$0.19 \pm 0.04^*$

and complemented. A large number of amino acid carrier genes have been identified in *Arabidopsis* (Chen and Bush, 1997; Fisher et al., 1998 and refs. therein). Based on sequence homology, these transporters are classified into two superfamilies, the amino acid-polyamine-choline facilitators and the amino acid transporters. The amino acid-polyamine-choline facilitators are subdivided into two families, the cationic amino acid transporters and the γ -aminobutyrate permease-related family. The ATP superfamily is comprised of the Lys and His transporters (LHTs), the Pro transporters, the putative auxin transporters (AUXs), and the amino acid permeases (AAPs), which exhibit a wide specificity for amino acids. The latter are classified as neutral and acidic amino acid transporters or as general amino acid transporters. Carriers from the oligopeptide transport systems must also be taken into consideration (Fig. 12).

As a consequence, the competitors we chose at the first step of our investigations were neutral amino acids (Pro, Thr, Phe, and Trp), basic (Lys and Arg) and acidic (Glu) amino acids and an auxin (IBA). GSH, a peptide with an α -amino acid function, was also tested. From our work there is no evidence that 2,4D-Lys uptake is mediated by an AUX carrier, as IBA does not compete with the conjugate (Table III). However, implication of an AUX carrier cannot be definitively discarded, taking in account the structural analogies between auxins and the conjugate.

In a similar manner, there is no evidence indicating a clear contribution of GSH transporters as well as Pro and basic amino acid transporters. Furthermore, our results show that although 2,4D-Lys acts as a potent competitor of Thr and Glu uptake (Chollet et al., 1997), the reverse is not true (Fig. 8). Among all the compounds we have tested, only Trp and Phe (Kov of approximately -1.4; Bronilow et al., 1991), which exhibit an hydrophobic side chain, clearly inhibit 2,4D-Lys uptake. It is known that these aromatic amino acids strongly compete for the Pro uptake mediated by several AAPs from *Arabidopsis* (Fisher et al., 1995) and by AAP2 from broad bean (Montamat et al., 1999). These initial results form a basis for studies using plant and yeast mutants to determine

the nature of the carrier(s) involved in 2,4D-Lys uptake.

2,4D-Lys Is a Phloem-Mobile Conjugate

That a xenobiotic enters a cell does not prove ipso facto its capacity to penetrate into the phloem. Thus, iprodione, which is taken up by mesophyll cells, remains excluded from the vein network (El Ibaoui et al., 1986). Many pesticides, particularly fungicides, are only penetrating. Among phloem-mobile xenobiotics, three are translocated by identified carrier systems: phosphite, paraquat, and glyphosate (Barchi et al., 1989; Leconte, 1989; Hart et al., 1992; Denis and Delrot, 1993; Fig. 12). Having demonstrated the capacity of 2,4D-Lys to penetrate foliar tissues it was advisable to explore whether this 3,5-D chlorinated xenobiotic was also phloem-mobile.

Complementary approaches conducted on broad bean plants, a species with a typical apoplastic phloem loading (Bourquin et al., 1990; Van Bel, 1993), and on *Ricinus*, a symplastic-apoplastic loader (Orlich and Konner, 1992), demonstrated that 2,4D-Lys was indeed phloem mobile (Table V). Under our experimental conditions 2,4D displayed the highest capacity of moving from the external medium to the sieve element followed by 2,4D-Lys and then glyphosate. The weak concentration of glyphosate found in phloem sap may be surprising in view of its well-



Figure 11. HPLC analysis of *Ricinus* phloem sap after dilution with pure water (1 + 9, v/v). Injection of a 20- μ L aliquot. For details, see Table V.

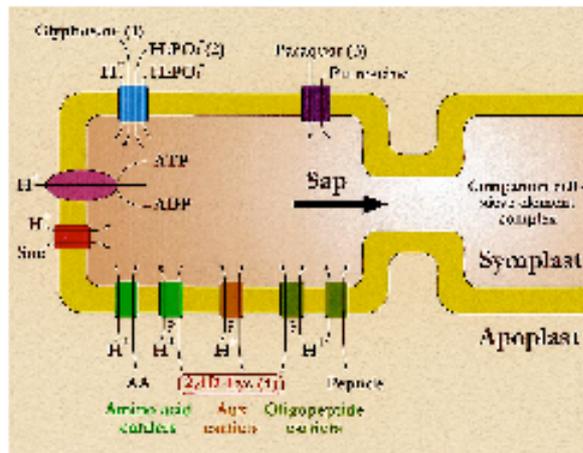


Figure 2. Possible carriers involved in the uptake of xenobiotics by the phloem tissue (apoplastic loading): 1, from Denis and Delrot, 1993; 2, from Leconte, 1983; 3, from Hart et al., 1992; and 4, this work (hypotheses). Carrier-mediated uptake of glyphosate, paraquat, and 2,4D-Lys is complemented by a diffusive component.

known systemic properties (Delrot and Bonnemaisin, 1991 and refs. therein) and to the permeability of the epidermis cell wall to hydrophilic molecules at this stage of development (Schobert and Korner, 1999).

Short-term experiments (Table IV, 30 min) also show that the distribution pattern of 2,4D-Lys in the whole plant is different from that of 2,4D. In particular, the conjugate is more widely distributed to the apical part of roots than the herbicide. Furthermore, they suggest that 2,4D-Lys penetrates quickly in the non-donor mature leaves via the vascular sap. The presence of the conjugate in the castor bean vascular sap clearly indicates that part of the conjugate exported toward the roots is recycled upward via the vessels. The 2,4D-Lys concentration in the vascular sap is low compared with that found in the phloem sap, but the relative importance of the vascular and phloem sap fluxes must also be taken into consideration.

In conclusion, our results show that in addition to a few plasma membrane carriers that handle small-sized hydrophilic xenobiotics as previously reported (Fig. 12), others can translocate relatively large xenobiotics (approximately 350 D) with a lipophilic moiety. Moreover, 2,4D-Lys is phloem mobile and exhibits a distribution pattern in the whole plant different from that of 2,4D, especially greater efficiency in reaching the apical part of the roots. Its gradual scission underlines the broad spectrum activity of peptidases. It is well known that phloem-mobile and ambimobile fungicides do not exist as yet. They could control plant vascular diseases such as dying arm disease on grapevines. In this regard we are now studying the structure-phloem mobility relationships of various conjugates including fungicide derivatives.

MATERIALS AND METHODS

Synthetic Methods

We have previously described the detailed synthesis of our conjugates (Chollet et al., 1997). In brief, three steps (Fig. 13) were required to make the linkage between the ϵ -amino group of Lys and the carboxyl group of 2,4D: selective blocking of the α -amino acid group of L-Lys with a copper salt; coupling of the ϵ -amino group of protected Lys with the phenoxycarbonylcarboxylic acid chloride using the Schotten-Baumann reaction; and selective deprotection of the α -amino acid group with EDTA. The 2,4D-Lys conjugate was obtained as white crystals in an overall yield of around 50%. Further purification can be achieved by recrystallization in water.

Synthesis of 2,4D- ^3H Lys was performed in a similar manner by incorporating 5 mCi of L-[4,5- ^3H]Lys (2.7–3.7 TBq mmol $^{-1}$, Amersham, France) to the medium at the time of the first step when blocking the α -amino acid group (Fig. 13). The specific activity of 2,4D- ^3H Lys obtained was 11 MBq mmol $^{-1}$, except for experiments reported in Table II (39 MBq mmol $^{-1}$).

Uptake Experiments

Plant Material

Broad bean (*Vicia faba* cv Agaudulce) plants were grown in a growth cabinet as described previously (Chollet et al., 1997). The experiments were performed on plants possessing four mature trifoliate leaves.

Uptake in Leaf Discs

Leaf discs (1.13-cm 2 surface) were obtained with a cork borer from the third and the fourth mature trifoliate leaves after the lower epidermis had been stripped off to facilitate exchange between the tissues and the incubation medium. They were then floated on a preincubation medium containing, except stated otherwise, 20 mM MES as buffer (pH 5.0), 250 mM mannitol, 0.5 mM CaCl $_2$, and 0.25 mM MgCl $_2$. After a 30-min preincubation period the discs were incubated in the same buffered solution containing, usually, 0.1 mM 2,4D- ^3H Lys with or without another product. Incubation was run under mild agitation on a reciprocal shaker at room temperature. At the end of incubation the disc apoplast was rinsed (three times for 2 min each) in a solution similar to the preincubation medium. Each disc was then digested in a mixture of perchloric acid (65% [w/w], 25 μL), hydrogen peroxide (35% [w/w], 50 μL), and Triton X-100 (1 g l $^{-1}$, 50 μL). The radioactivity was counted by liquid scintillation spectrometry (Packard Tri-carb 1900TR, Packard Instruments, Rungis, France). Furthermore, some discs were dry-ice frozen, lyophilized, and autoradiographed (hyperfilm βmax , Amersham).

Except for time dependence of 0.1 mM 2,4D- ^3H Lys uptake, the duration of incubation period was 1 h. In the case of kinetic measurement, the concentration range tested varied from 0.03 to 2.5 mM. To compare the influence of external pH on 0.1 mM 2,4D- ^3H Lys uptake, 0.1

Deloige-Guzulian et al.

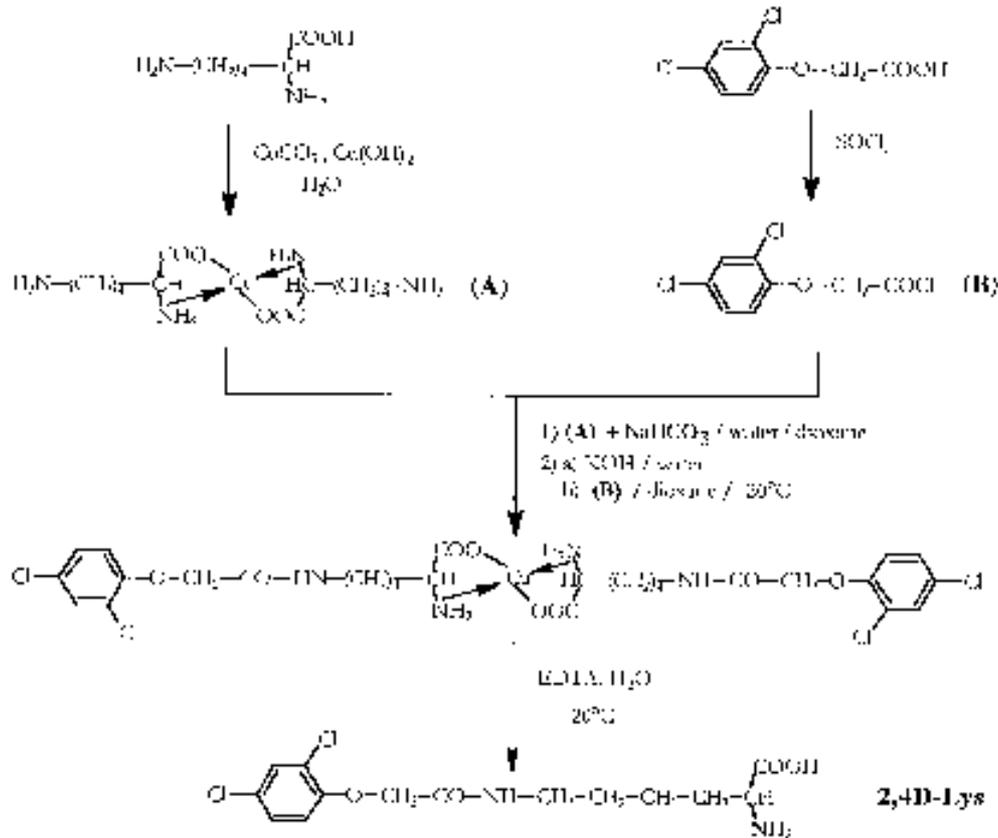


Figure 5. Reaction scheme for the synthesis of 2,4D-Lys.

max [^3H]Lys uptake, and [^{14}C]2,4D uptake, the buffers used were sodium citrate (10 mM)/disodium phosphate (20 mM) from pH 3.5 to 5.0, 20 mM MES/NaOH for pH 5.0 and 6.5, and 20 mM HEPES/NaOH for pH 6.5 and 7.5. [^{14}C]2,4D (0.44 GBq nmol^{-1}) was supplied by Sigma (France).

The metabolic fate of molecules absorbed by foliar tissues was examined in a first approach by thin layer chromatography (TLC). Broad bean leaf discs were incubated for 6 h in a standard solution containing 1 mM 2,4D-Lys.

The disc apoplasts were then rinsed (three times for 2 min each) and each disc was then put in 10 mL of boiling 80% (w/v) ethanol. After extraction, ethanol was evaporated under vacuum and the residue was dissolved in 1 mL of 80% (w/v) ethanol. A 100- μL portion was deposited on a TLC plate (Silica gel 60, Merck, Rahway, NJ), and migration was effected in butanol:acetic acid:water (8:2:2; v/v). After 3 h, the solvent front reached about 10 cm; the migration was stopped and the plate was developed using 0.2% (w/v) ninhydrin.

Table VI. Chromatographic data for tested products

Product	Co-eluent			Delivery $\mu\text{L min}^{-1}$	Detection UV nm	Retention Time min
	Time min	Water + TFA 0.1%	CH_3CN			
2,4D	4:00	50	50	0.8	202	11
	4:15	50	50			
	4:30	50	50			
2,4D-Lys	4:00	70	30	0.8	202	7 (30 min for 2,4D)
	4:35	60	40			
	4:45	70	30			
Fenpicloril	4:00	40	60	0.8	215	8.5
	4:20	40	60			
	4:40	40	60			

Uptake in Protoplasts

The third and fourth bifoliate broad bean leaves were used to prepare the protoplasts. After peeling the lower epidermis of the leaves, leaf pieces were cut and incubated for 90 min on a medium containing 500 mM mannitol, 0.25 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 0.2% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 0.1% (w/v) bovine serum albumin, 2% (w/v) cellulase Onozuka R-10 (KALYS, Roubaix, France) 0.5% (w/v) pectolyase macrozyme R-10 (KALYS), and 20 mM MES/NaOH (pH 5.6). At the end of incubation the protoplast suspension was recovered and centrifuged for 9 min at 200g in a tube containing 1 mL of 100% (w/v) Percoll (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), 500 mM mannitol, and 20 mM MES/NaOH (pH 5.5). The supernatant was removed and the protoplasts were mixed with the 100% (w/v) Percoll. Five milliliters of 25% (w/v) Percoll solution and 4 mL of 5% (w/v) Percoll solution were carefully added to this protoplast suspension and this gradient was centrifuged for 6 min at 200g. Only the protoplasts sedimenting at the 5%/25% (w/v) interface were used for the uptake experiments.

Uptake experiments were started by adding one volume of protoplast suspension to one volume of incubation medium containing 2,4D-³H]Lys 0.2 mM with or without (control) OSCP 20 μM. At selected times 400-μL aliquots of the incubation medium were sampled and overlaid on 500 μL of silicone oil. Uptake experiments were terminated by sedimenting the protoplasts through the silicone oil at 2,000g for 1 min in a microfuge (M11, Beckman Instruments, Fullerton, CA). The tip of the tubes containing the protoplasts was cut and deposited in a scintillation vial with 4 mL of Ecolite (ICN, Pharmaceuticale France SA, Orsay, France). The radioactivity was measured by liquid-scintillation counting.

Long-Distance Transport

These experiments were performed on broad bean plants possessing four mature bifoliate leaves. After a gentle application of 1% (w/v) Tween 80 on the upper epidermis, 200 μL of 2,4D-³H]Lys 2 mM, [³H]Lys 2 mM, or [¹⁴C]2,4D 2 mM were smeared on the second and third bifoliate leaves, i.e. 0.4 μmol on each leaf. The plants were harvested 30 min, 6 h, or 24 h after the labeled molecule deposit. Then they were dry-ice frozen, lyophilized, and the radioactivity of selected organs (Fig. 9) was counted by liquid-scintillation spectrometry.

*Tests of Specificity**Plant Material*

Seeds of castor bean (*Ricinus communis* cv Sanguineus) were obtained from Vilmafin (La Menitôt, France). The seeds were placed in humid cotton for 48 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.

Plant Physiol Vol. 125, 2001

Sap Collection and Analysis

Five days after sowing, the endosperm of seedlings was carefully removed without bending or crushing the cotyledons (Kallauwael et al., 1989). These organs were then incubated in buffer solution containing 20 mM MES (pH 5.0), 0.25 mM MgCl₂, and 0.5 mM CaCl₂ supplemented with 0.1 mM 2,4D-Lys, 0.1 mM 2,4D, 0.1 mM [¹⁴C]glyphosate, or 0.1 mM fenpiclonil. Two hours later the hypocotyl was severed in the hook region for phloem excision. The phloem sap was collected from the upper part of hypocotyl for 2 h and was stored in ice until analysis. To reduce evaporation, the sap collection was performed in Plexiglas microcassinet that was laid out with wet filter paper.

The phloem sap was analyzed by liquid scintillation spectrometry (¹⁴C]glyphosate) and by HPLC after dilution in pure water (2,4D-Lys, 2,4D, and fenpiclonil). We employed reversed phase chromatography using a Discovery C16 RP-amide column (Supelco, Bellefonte, PA) according to the procedure practiced in Table VI.

On the other hand, vascular sap was collected for 45 min from the basal part of hypocotyl and was analyzed by HPLC without dilution.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Prof. G. Bashiradeo for his helpful assistance in reading the manuscript. We are grateful to Dr. G. Robin and H. Kahlil for advice and help.

Received July 25, 2000; returned for revision September 26, 2000; accepted November 30, 2000.

LITERATURE CITED

- Bashiradeo G, Salmann F, Bonpey G (1989) Characterization of phosphate uptake in two *Phytosthera* spp. and its inhibition by phosphate. Arch Microbiol 151: 54-58
- Bastel B, Flak GR (1995) HLR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. Science 268: 1745-1748
- Bonpey G, Bonnemain JL, Dehot S (1990) Inhibition of loading of ¹⁴C assimilate by *p*-chloromercuribenzenesulfonic acid: localization of the apoplastic pathway in *Vitis* f. *sativa* Plant Physiol 92: 97-102
- Boudillon RH, Chambardain K, Evans AA (1991) Molecular structure and properties of xenobiotics in relation to phloem translocation. In: JL Bonnemain, S Dehot, WJ Lucas, J Dainty, eds. Recent Advances in Phloem Transport and Assimilate Compartmentation. Academic Press, Nantes, France, pp 336-340
- Chen L, Fack DR (1997) LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in Arabidopsis. Plant Physiol 113: 1127-1134
- Chollet JF, Deléage C, Faucher JM, Huguier L, Bonnemain JL (1997) Synthesis and structure-activity relationship of some pesticides with an amino acid function. Biochem Biophys Acta 1376: 331-341

1631

- Dehot S, Bonnemais JL (1981)** Involvement of protons as a substrate for the sucrose carrier during phloem loading in *Vicia faba* leaves. *Plant Physiol* **67**: 560-564
- Dehot S, Bonnemais JL (1991)** Absorption et migration des herbicides. In: R. Scalla, ed. *Les Herbicides, Mode d'Action et Principes d'Utilisation*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, pp 51-77
- Denk JB, Dehot S (1993)** Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. *Physiol Plant* **97**: 569-575
- Despeghel JP, Dehot S (1983)** Energetics of amino acid uptake by *Vicia faba* leaf tissue. *Plant Physiol* **71**: 1-6
- Despeghel JP, Dehot S, Bonnemais JL, Fessou J (1980)** Etude du mécanisme de l'absorption des acides aminés par les tissus foliaires de *Vicia faba* L. *CR Acad Sci (Paris)* **290**: 609-614
- Dufawi A, Chollet JF, Rudelle J, Hgblac L, Bonnemais JL (1994)** Derivatives of pesticides with an α -amino acid function: synthesis and effect on thionine uptake. *Pest Sci* **41**: 297-304
- El Dwaoui H, Dehot S, Fessou J, Bonnemais JL (1986)** Uptake and release of a phloem-mobile (glyphosate) and a non-phloem-mobile (iprodione) xenobiotic by broad bean leaf tissue. *Physiol Vég* **23**: 431-442
- Fisher WH, André E, Reisch D, Krollwicz S, Tegeder M, Truchmann K, Frommer WB (1996)** Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci* **3**: 188-195
- Fisher WH, Kwart H, Hummel S, Frommer WB (1995)** Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **270**: 16315-16320
- Fleuret-Lecaand F, Fouché-Pillon S, Leloux C, Bonnemais JL (1997)** Distribution and activity of the plasma membrane H^+ -ATPase in *Mimosa pudica* L. in relation to ionic fluxes and leaf movements. *Plant Physiol* **113**: 747-754
- Hart JJ, Difonazo JL, Linscott DL, Kochian LV (1992)** Transport interactions between pinnaled and poly-amines in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiol* **99**: 1400-1405
- Jamal A, Chollet JF, Dehot S (1994)** Proton-peptide co-transport in broad bean leaf tissue. *Plant Physiol* **106**: 1023-1031
- Jamal A, Frommshel R, Manthoua E, Dehot S (1996)** Characterization of glutathione uptake in broad bean leaf protoplasts. *Plant Physiol* **111**: 1145-1152
- Kallbach J, Orllich G, Schober C, Komor E (1989)** Sucrose transport into phloem of *Rizinus communis* L. seedlings as measured by the analysis of sieve-tube sap. *Planta* **177**: 327-335
- Khanabé TB, Esherton E (1980)** Electrical evidence for different mechanisms of uptake for basic, neutral and acidic amino acids in oat coleoptiles. *Plant Physiol* **65**: 1085-1089
- Kleber DA (1988)** Phloem mobility of xenobiotics. I. Mathematical model unifying the weak acid and intermediate permeability theories. *Plant Physiol* **86**: 808-810
- Kleber DA, Grayson BT, Hsu FC (1998)** The phloem mobility of pesticides. *Pest Outlook* **9**: 26-30
- Lecand F (1989)** Etude des propriétés du transport des métabolites du Phosétyl-Al et de l'Atazine chez les plantes supérieures en relation avec l'aptitude à la systémie de ces molécules. PhD thesis, Université de Poitiers, Poitiers, France
- LIEC, Fuch DR (1990)** ApH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves: I Evidence for carrier-mediated, electrogenic flux through multiple transport systems. *Plant Physiol* **93**: 268-277
- LIEC, Fuch DR (1991)** ApH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves: II Evidence for multiple aliphatic, neutral amino acid symports. *Plant Physiol* **96**: 1338-1344
- LIEC, Fuch DR (1992)** Structural determinants in substrate recognition by proton-amino acid symports in plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves. *Arch Biochem Biophys* **293**: 519-526
- Manthoua E, Slovic JP (2000)** Purified γ -glutamyl transpeptidase from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol* **123**: 1417-1426
- Montamat F, Mansouset L, Tegeder M, Frommer W, Delrot S (1999)** Cloning and expression of amino acid transporters from broad bean. *Plant Mol Biol* **41**: 259-268
- Orlich G, Komor E (1992)** Phloem loading in *Rizinus cotyledons*: sucrose pathway via the mesophyll and the apophem. *Planta* **187**: 460-474
- Ostelo-Oyam H, Rovha G (1985)** Effect of glycine on dark- and light-induced pulvinal movements and modifications of proton fluxes in the pulvinae of *Mimosa pudica* during glycine uptake. *Planta* **161**: 404-408
- Renault S, Despeghel-Cavacha C, Bonnemais JL, Dehot S (1989)** The proton electrochemical transmembrane gradient generated by the transfer cells of the haustorium of *Polytrichum formosum* and their use in the uptake of amino acids. *Plant Physiol* **90**: 913-920
- Ridauer M, Tanner W (1986)** Effects of Ca^{2+} on amino acid transport and accumulation in roots of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* **82**: 41-46
- Schober C, Komor E (1989)** The differential transport of amino acids into the phloem of *Rizinus communis* L. seedlings as shown by the analysis of sieve-tube sap. *Planta* **177**: 342-349
- Tyree MT, Peterson CA, Edgerton LV (1979)** A simple theory regarding anisimotility of xenobiotics with special reference to the nematocite, oxanil. *Plant Physiol* **63**: 367-374
- Van Bel AJE (1993)** Strategies of phloem loading. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 253-281
- Wyse RE, Komor E (1984)** Mechanism of amino acid uptake by sugarcane suspension cells. *Plant Physiol* **76**: 865-870

- ***Synthèse et étude des propriétés biologiques de conjugués fongicide - acide aminé ou acide salicylique (ou analogue) - acide aminé***

1 - SYNTHÈSE DE DIFFÉRENTS CONJUGUÉS AVEC DES AMINOACIDES

1.1 - Synthèse d'un conjugué acide salicylique-lysine

La synthèse de ce conjugué est décrite dans le manuscrit à soumettre pour publication présenté à la fin de ce mémoire.

Les principaux pKa calculés (logiciel ACD logD) pour cette molécule sont les suivants :

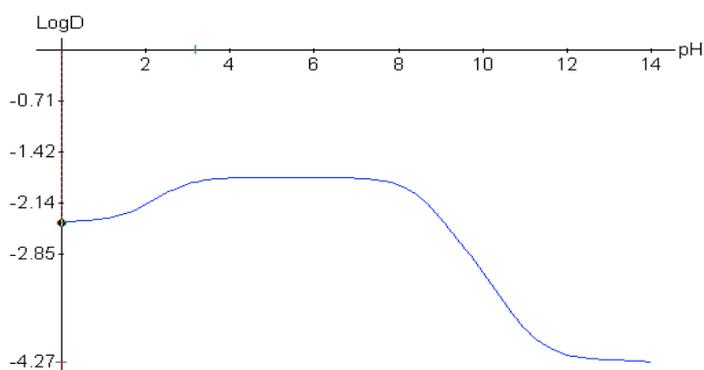
$$pK_{a1} = 2,52 \pm 0,24 \text{ (fonction -COOH)}$$

$$pK_{a2} = 8,52 \pm 0,30 \text{ (groupement -OH sur cycle benzénique)}$$

$$pK_{a3} = 9,76 \pm 0,16 \text{ (fonction -NH}_2\text{)}$$

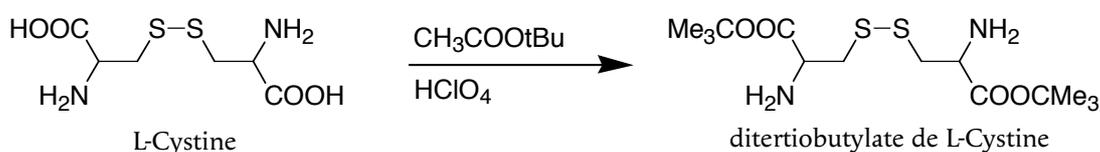
Ceci, complété par le calcul du coefficient de partage octanol/eau en fonction du pH (log D) (Fig. 1), nous indique que cette molécule est relativement hydrophile et qu'aux pH physiologiques, elle se trouve sous forme de zwitterion.

Figure 1. Représentation graphique du log D en fonction du pH pour le conjugué acide salicylique-lysine.



1.2 - Synthèse d'un conjugué acide salicylique-cystéine

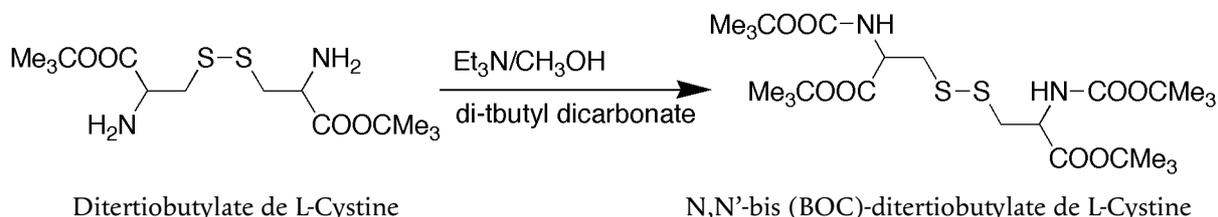
1.2.1 - Première étape: blocage de la fonction acide carboxylique de la cystine



Dans un flacon en verre épais de 1 l, on introduit 40 mmol (9,61 g) de L-cystine que l'on dissout dans 0,176 mol (29,4 g) d'acide perchlorique à 60 %. Après dissolution complète de la cystine, 250 ml d'acétate de tertibutyle sont ajoutés. Le flacon est ensuite bouché hermétiquement afin d'éviter la perte d'isobutylène qui se forme *in situ*. Après deux heures d'agitation pour obtenir une solution homogène, celle-ci est laissée à température ambiante pendant 7 à 8 jours, durée pendant laquelle le produit de réaction cristallise. La solution est placée pendant 24 heures à -20 °C pour parachever le processus de cristallisation. Les cristaux

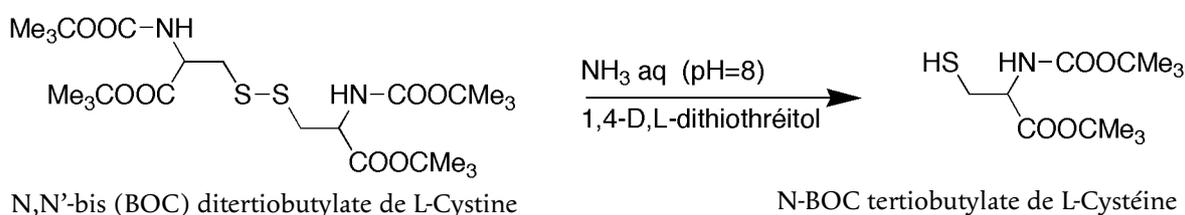
obtenus sont lavés avec 190 ml d'éther puis dissous dans 50 ml d'eau et 40 ml d'une solution saturée de NaHCO_3 sont ajoutés progressivement. Finalement, le produit est extrait par 3 fois 50 ml de dichlorométhane. Après évaporation du solvant, on obtient 6,38 g de ditertiobutylate de L-Cystine (huile incolore). Le rendement de cette réaction est de 45 %.

1.2.2 - Deuxième étape: blocage de la fonction amine



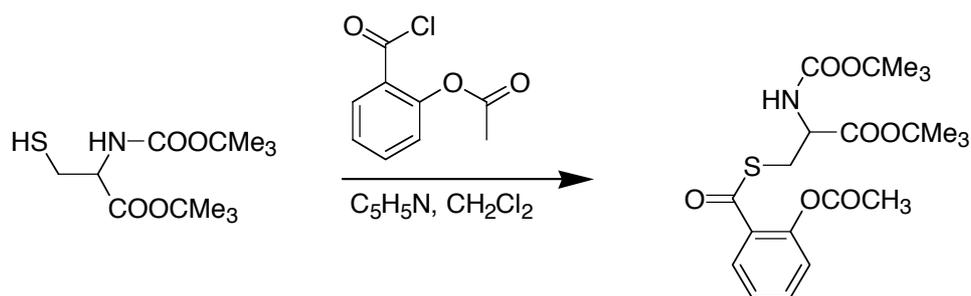
Dans une fiole piriforme de 250 ml, on introduit 5 mmol de ditertiobutylate de L-cystine (1,79 g) et 5,7 ml de triéthylamine en solution dans 50 ml de méthanol. On additionne ensuite 29,7 mmol de ditertiobutyl dicarbonate (6,49 g) en solution dans 4 ml de méthanol. Le mélange est porté au reflux durant 5 minutes puis évaporé à sec. Le résidu est repris par HCl N (46 ml) puis extrait par l'acétate d'éthyle (3 x 35 ml). Après séchage sur MgSO_4 , le solvant est évaporé. L'huile obtenue cristallise lentement (1 ou 2 jours). Les cristaux sont triturés avec du pentane (≈ 20 ml) puis filtrés. On obtient ainsi le N,N'-bis (BOC)-ditertiobutylate de L-Cystine (rendement: 45 %, F = 93,5 - 94,5 °C).

1.2.3 - Troisième étape: coupure du pont disulfure



Dans un ballon de 50 ml, 1 g (1,81 mmol) de N,N'-bis (BOC)-ditertiobutylate de L-Cystine est dissous dans 16 ml d'éthanol absolu préalablement saturé en azote. Le pH est amené à 8,0 avec NH_3 aq 30 %. On ajoute ensuite 0,56 g (3,63 mmol) de 1,4-DL-dithiothréitol (DTT). L'agitation est maintenue 1 heure à température ambiante et en atmosphère saturée en azote, puis le pH est amené à 1,0 avec HCl 1 N. Le solvant est évaporé, puis le résidu est repris dans 40 ml d'éther, lavé cinq fois avec 24 ml d'HCl 0,25 N et une fois avec 24 ml d'eau. La phase organique est évaporée à sec. On obtient 1,5 g d'une huile incolore qui cristallise rapidement en longues aiguilles incolores. Les analyses en RMN sont en accord avec la structure du N-BOC tertibutylate de L-Cystéine. Le rendement de cette réaction est de 85 %.

1.2.4 - Quatrième étape: formation d'une liaison thioester entre l'acide acétylsalicylique et le produit de la troisième étape



N-BOC tertibutylate de L-Cystéine

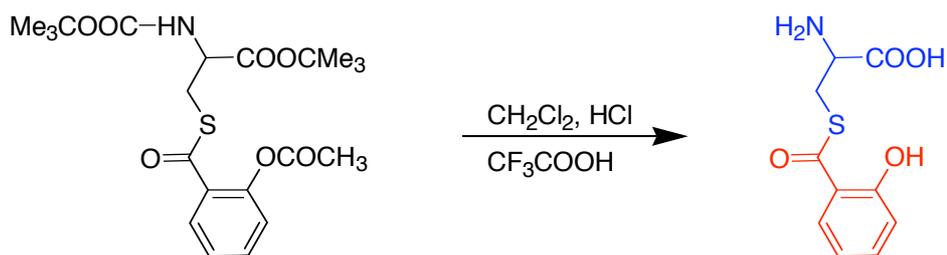
N-BOC-S-(2'-acétoxybenzoyl)-tertbutylate de L-Cystéine

Dans un ballon de 50 ml, 1,5 g (5,41 mmol) de N-BOC tertibutylate de L-Cystéine est dissous dans 10 ml de CH_2Cl_2 et 1,28 g (16,22 mmol) de pyridine sont ajoutés. Le milieu est placé en atmosphère azotée. Simultanément, 2,15 g (10,81 mmol) de chlorure d'acide acétylsalicylique sont dissous dans 10 ml de CH_2Cl_2 . Ces deux solutions sont mélangées et agitées pendant 5 heures à température ambiante et sous azote. Le mélange est ensuite dilué avec 30 ml de CH_2Cl_2 et la phase organique est lavée 2 fois avec 50 ml d'HCl 0,5 N puis une fois avec 50 ml d'eau. Après séchage à sec de la phase organique, on obtient 3,86 g d'une huile incolore. Une analyse en RMN nous a montré que ce mélange n'est pas un produit pur: il reste du chlorure d'acide acétylsalicylique. Nous devons donc nous en séparer en réalisant une chromatographie sur colonne.

Nous avons tout d'abord mis au point la séparation de nos produits en chromatographie sur couche mince. L'éluant retenu est un mélange de pentane:acétate d'éthyle (2:1). Les rapports frontaux sont les suivants: 0,74 pour le produit attendu et 0,38 pour le chlorure d'acide acétylsalicylique.

Nous purifions ensuite le produit sur une colonne de 150 g de silice. Le solvant est un mélange 2:1 de pentane:acétate d'éthyle. Ce sont les premières fractions collectées qui contiennent le produit attendu. Après avoir évaporé le solvant, nous avons obtenu 1,79 g de produit huileux incolore. Des analyses en ^1H -RMN et ^{13}C -RMN sont en accord avec la structure du N-BOC-S-(2'-acétoxybenzoyl)-tertbutylate de L-Cystéine. Le rendement de la réaction est finalement de 75 %.

1.2.5 - Cinquième étape: déblocage des fonctions acide α -aminé et hydroxyle



N-BOC-S- (2'-acétoxybenzoyl) tertibutylate de L-Cystéine

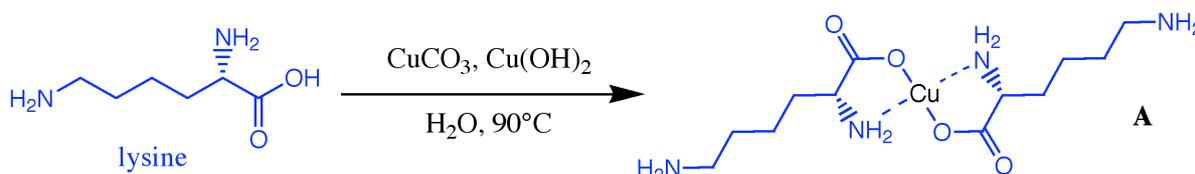
Conjugué acide salicylique-L-Cystéine

Dans un ballon de 100 ml, le N-BOC-S-(2'-acétoxybenzoyl)-tertiobutylate de L-Cystéine (1,79 g - 4,07 mmol) est dissous dans 14 ml de CH_2Cl_2 et 28 ml d'acide trifluoroacétique (TFA) sont ajoutés pour libérer la fonction acide α -aminé. Après une agitation de 23 heures à température ambiante, la solution est concentrée à sec sans chauffage et le résidu est repris avec 17 ml d'HCl 1 N afin d'ôter le groupement acétyle. Après 72 heures d'agitation à température ambiante, la solution est diluée avec 9 ml d'HCl 1 N. La phase aqueuse est lavée 3 fois avec 35 ml de CH_2Cl_2 puis placée pendant deux heures à -80°C avant d'éliminer l'eau par lyophilisation. Au préalable, nous avons constaté lors de multiples essais qu'une évaporation d'HCl 1 N avec chauffage provoque une réaction supplémentaire qui aboutit à la cyclisation du produit, formant une thiazoline. On obtient finalement 1,02 g de cristaux blancs (rendement: 90,3 %). Ceux-ci contiennent encore des traces de thiazoline; celle-ci est éliminée par des lavages successifs des cristaux à l'éther. Les analyses en ^1H -RMN et ^{13}C -RMN sont en accord avec la structure attendue. Le point de fusion de ce composé est de 183 - 188°C .

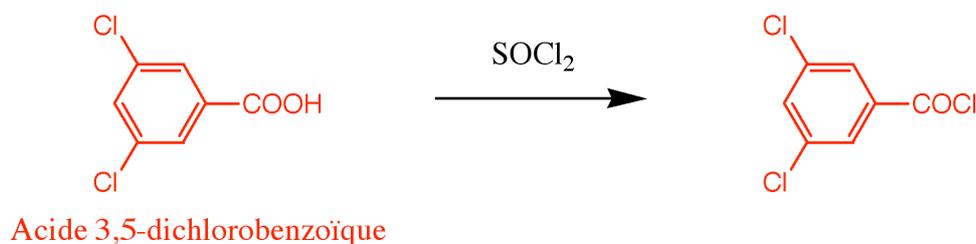
Le conjugué obtenu n'est stable qu'en milieu très acide (vérifié par CLHP). Il se dissocie rapidement aux pH biologiques, trop rapidement pour être intéressant. Le conjugué acide 3,5-dichlorobenzoïque - cystéine que nous avons également synthétisé est totalement instable. Ces résultats négatifs sont rapportés pour souligner que l'obtention de conjugués avec une fonction α -amino acide libre est loin d'être évidente, avec deux causes possibles d'échec: l'impossibilité de débloquent la fonction α -aminoacide ou encore l'obtention d'un produit instable.

1.3 - Synthèse d'un conjugué acide 3,5-dichlorobenzoïque-lysine

1.3.1 - Première étape: blocage de la fonction aminoacide de la lysine et synthèse du chlorure de l'acide 3,5-dichlorobenzoïque

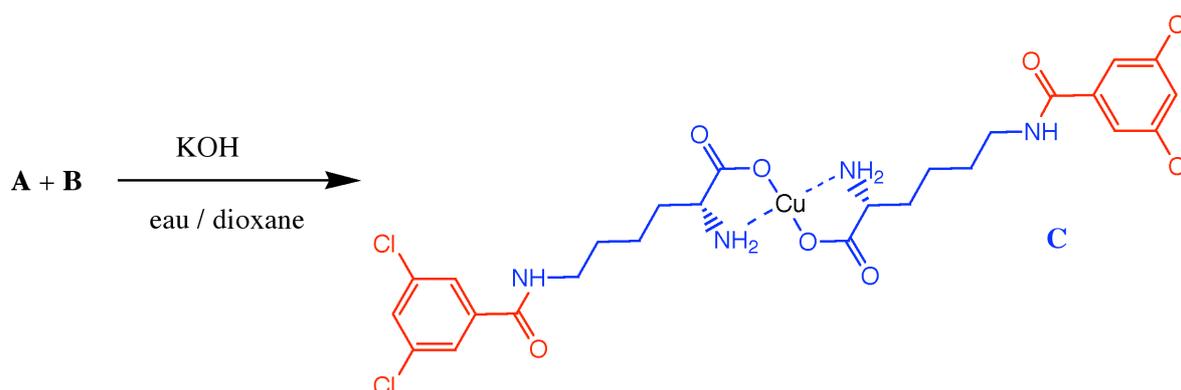


Dans un ballon à deux tubulures de 250 ml, on introduit le chlorhydrate de lysine (8 mmol; 1,46 g), le carbonate de cuivre (11,4 mmol; 2,52 g) et 100 ml d'eau déminéralisée. Le mélange est porté à 80 - 90°C durant 2 heures tout en agitant efficacement (agitateur magnétique). Après filtration sur verre fritté et rinçage sur le filtre avec de l'eau, le milieu est concentré à 10 ml à l'aide d'un évaporateur rotatif.



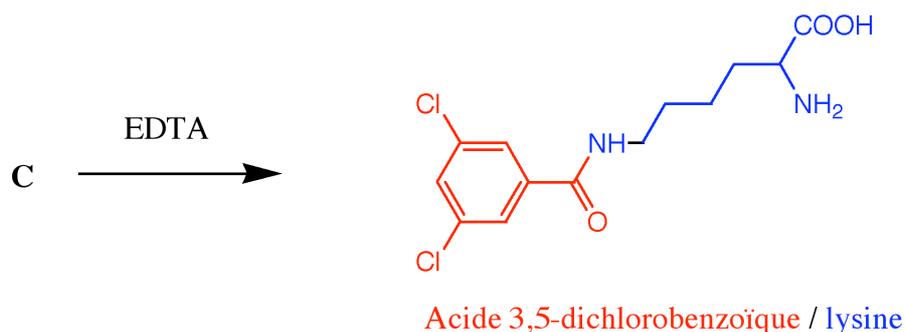
Simultanément, la synthèse du chlorure de l'acide 3,5-dichlorobenzoïque est réalisée. Dans un monocol de 50 ml, on introduit l'acide 3,5-dichlorobenzoïque (26,8 mmol; 5,12 g), le chlorure de thionyle SOCl_2 (134 mmol; 15,94 g; 9,8 ml) et le tétrachlorure de carbone (6 ml). Le mélange est porté au reflux ($\sim 70^\circ\text{C}$) grâce à un bain-marie jusqu'à ce que l'on n'observe plus de dégagement gazeux (débit-mètre à bulle surmontant le réfrigérant). Après évaporation à sec, le résidu est repris par 30 ml de dichlorométhane anhydre puis on évapore de nouveau de manière à enlever par entraînement toutes les impuretés volatiles. L'opération est renouvelée une fois. Le chlorure obtenu est utilisé tel quel.

1.3.2 - Couplage du sel cuprique de lysine et du chlorure de l'acide 3,5-dichlorobenzoïque



Dans un ballon à trois tubulures de 100 ml, on introduit le complexe cuprique de la lysine (4 mmol / 10 ml eau), NaHCO_3 en solution 1 N (8,4 ml soit 8,4 mmol) et du dioxane distillé sur SnCl_2 (16 ml). Le milieu est refroidi aux environs de -5°C . On additionne ensuite deux solutions composées pour l'une de KOH aqueuse (26,8 mmol; 2,31 g de produit à 85 % / 6 ml eau) et pour l'autre du chlorure d'acide préparé ci-dessus dans le dioxane (26,8 mmol de chlorure / 20 ml de dioxane). L'addition se fait en 6 fois séparées chacune de 20 minutes en mettant d'abord la potasse puis le chlorure. Le milieu est laissé dans le bain de glace durant la nuit. Le précipité est filtré sur un verre fritté de porosité 3 puis il est lavé à l'eau avant d'être séché sous vide. On obtient 3,8 mmol de complexe soit un rendement de 95 %.

1.3.3 - Déblocage du complexe cuprique



Le complexe cuprique obtenu est pulvérisé au mortier. Une solution d'EDTA disodique (NaHCO_3 9,8 mmol; 0,82 g / EDTA 5 mmol; 1,46 g / 19 ml eau) est ajoutée aux cristaux en agitant vivement. Le milieu est chauffé à 90 °C et l'agitation est poursuivie jusqu'à décoloration des cristaux (4 h). Après refroidissement et filtration sur verre fritté, les cristaux sont lavés par 400 à 500 ml d'eau désionisée. La purification est effectuée par recristallisation (dissolution dans 400 ml d'eau bouillante puis filtration à chaud et repos au réfrigérateur la nuit). Les cristaux sont séchés sous vide poussé à 80 °C. On obtient 0,5 g de produit soit un rendement de 20 % (réaction non optimisée). Le point de fusion est de 214-217 °C, température à laquelle la molécule se décompose.

RMN ^1H (dppm, $\text{D}_2\text{O} + \text{Na}_3\text{PO}_4$): 1,2-1,9 (m, 6H, 3CH_2 Lys); 3,0-3,5 (m, 3H, N-CH_2 et $^*\text{CH}$); 5,0 (s, 4H, NH, NH_2 , COOH); 7,0-7,7 (m, 3H, C_6H_3).

L'acide 3,5-dichlorobenzoïque et son conjugué avec la lysine peuvent être analysés par CLHP en utilisant une colonne Supelco Discovery[®] RP-amide C16 25 cm x 4,6 mm et une détection UV à 205 nm. L'élution se fait dans les conditions suivantes:

- Acide 3,5-dichlorobenzoïque
 - Mélange éluant eau + 0,1 % TFA / acétonitrile (30 % / 70%); débit 0,8 ml / min^{-1}
 - Temps de rétention \approx 8 min
- Conjugué acide 3,5-dichlorobenzoïque - Lysine
 - Mélange éluant eau + 0,1 % TFA / acétonitrile (70 % / 30%); débit 0,8 ml / min^{-1}
 - Temps de rétention \approx 8,3 min
- L'acide 3,5-dichlorobenzoïque et son conjugué avec la lysine peuvent être détectés simultanément en effectuant le gradient suivant:

- Mélange éluant eau + 0,1 % TFA / acétonitrile; débit 0,8 ml / min^{-1}

Temps (min)	Eau + 0,1 % TFA (%)	Acétonitrile (%)
0	70	30
35	40	60
50	70	30

- Temps de rétention

Conjugué acide 3,5-dichlorobenzoïque-lysine \approx 8 min

Acide 3,5-dichlorobenzoïque \approx 32 min

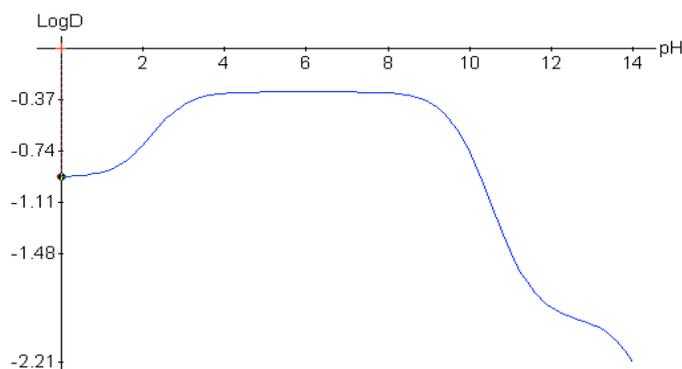
Les principaux pKa calculés (logiciel ACD logD) pour cette molécule sont les suivants :

$$pK_{a1} = 2,52 \pm 0,24 \text{ (fonction -COOH)}$$

$$pK_{a2} = 9,87 \pm 0,13 \text{ (fonction -NH}_2\text{)}$$

Ceci, complété par le calcul du coefficient de partage octanol/eau en fonction du pH (log D) (Fig. 2), nous indique que cette molécule est sous forme de zwitterion aux pH physiologiques. La présence des deux atomes de chlore a réduit l'hydrophilie par rapport au conjugué acide salicylique - lysine.

Figure 2. Représentation graphique du log D en fonction du pH pour le conjugué acide 3,5-dichlorobenzoïque-lysine.



2 - PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

2.1 - Conjugué alcool triazolique-acide aspartique

Nous avons étudié les propriétés biologiques d'un conjugué associant le 1-(4-chlorophényl)-2-[(1H)-1,2,4-triazol-1-yl] éthanol (« alcool triazolique ») avec l'acide aspartique (Dufaud *et al.*, 1994).

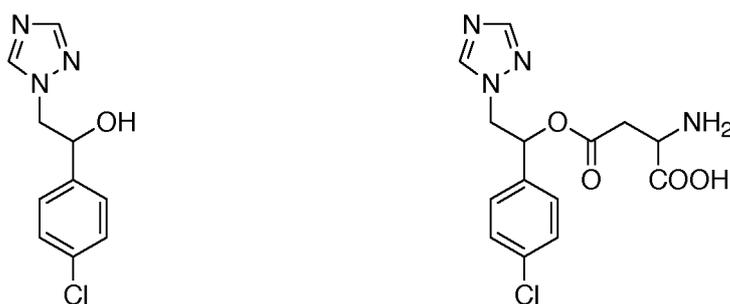
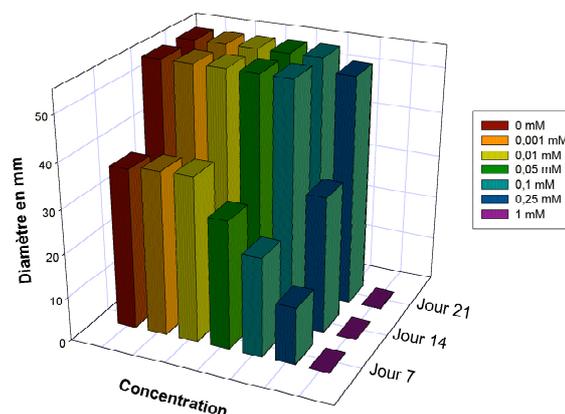


Figure 3. 1-(4-Chlorophényl)-2-[(1H)-1,2,4-triazol-1-yl] éthanol et son conjugué avec l'acide aspartique

Les propriétés fongicides potentielles de l'alcool triazolique, un intermédiaire de synthèse, ont été examinées sur la croissance de *Eutypa lata* cultivé *in vitro* (Fig. 4).

Figure 4. Croissance du champignon *Eutypa lata* au bout de 7, 14 et 21 jours de culture en présence de 1-(4-chlorophényl)-2-[(1H)-1,2,4-triazol-1-yl] éthanol à 7 concentrations différentes (0-0,001-0,01-0,05-0,1-0,25-1 mM, de gauche à droite). Chaque colonne est la moyenne de 5 cultures.



L'alcool triazolique est sans effet sur la croissance de *E. lata* pour des concentrations égale ou inférieures à 0,01 mM. À 0,05 mM, il réduit la surface du mycélium d'environ 37 % au bout de 7 jours de culture. Compte tenu du faible diamètre des boîtes (55 mm), l'effet de cette concentration sur la croissance radiale du champignon n'a pu être estimé par la suite (14^e et 21^e jours). En présence d'alcool triazolique 0,25 mM, la croissance est sérieusement affectée après une semaine de culture et à 1 mM, le champignon ne se développe pas.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la systémie phloémienne de ces deux composés. Dans nos conditions expérimentales, l'alcool triazolique n'a pas été détecté dans la sève libérienne lorsque les cotylédons de ricin incubent dans une solution contenant ce xénobionte (tampon HEPES, pH 5,0) selon le protocole déjà décrit (voir chapitre « Matériel & Méthodes »). Ces résultats suggèrent que ce produit n'est pas phloème-mobile dans ces conditions d'application (Tableau I).

Tableau I. Systémie et métabolisme du 1-(4-Chlorophényl)-2-[(1H)-1,2,4-triazol-1-yl] éthanol et de son conjugué avec l'acide aspartique. La sève phloémienne est collectée pendant les 3^e et 4^e heures d'incubation. Moyenne \pm ES, $n \geq 10$.

Solution d'incubation	Sève libérienne		Facteur de concentration	Métabolisme apparent = Métabolite/Produit initial
	Produit initial (mM)	Métabolite (mM)		
Alcool triazolique (1,00)	Non détecté	Non détecté	-	-
Alcool triazolique - acide aspartique (1,00)	0,24 \pm 0,065	Alcool triazolique 0,06 \pm 0,01	0,30 \pm 0,06	0,25

En revanche, nos résultats mettent en évidence que le conjugué alcool triazolique-Asp est phloème-mobile. Le facteur de concentration (conjugué et son métabolite) est voisin de 0,3. Le conjugué alcool triazolique-Asp est hydrolysé en libérant le produit initial et avec un métabolisme apparent de 0,25 (Tableau I). Le conjugué alcool triazolique - acide aspartique se comporte donc comme un profongicide pouvant libérer le produit actif notamment au sein même du phloème. Il faut toutefois noter qu'il ne peut avoir d'intérêt pratique compte tenu des faibles propriétés antifongiques de l'alcool triazolique, mais il peut servir de modèle dans la conception de futures prodrogues.

2.2 - Conjugué acide salicylique-lysine

Nous avons effectué un test de systémie à l'aide du modèle ricin. Après une préincubation de 2 heures par trempage des cotylédons dans une solution tamponnée à pH 5,0 (MES) contenant 0,1 mM de conjugué acide salicylique-lysine (AS-Lys), l'hypocotyle est coupé au niveau de la crosse et les cotylédons sont de nouveau immergés dans une solution fraîche de conjugué (tampon MES, pH 5,0). La sève phloémienne est collectée chaque heure durant 5 heures. Le lot était constitué de 9 ricins et les exsudats des 9 plantules ont été réunis à chaque prélèvement.

Les résultats sont consignés dans le tableau II.

Tableau II. Systémie et métabolisme du conjugué acide salicylique-lysine

Temps (h)	Conjugué Acide salicylique-Lysine (mM)	Acide salicylique (mM)
1	0,287	0
2	0,305	0
3	0,332	0
4	0,247	0
5	0,276	0

De cette étude, nous pouvons conclure :

- Le conjugué acide salicylique-lysine est systémique phloémien. Le facteur de concentration est d'environ 3 fois. Il pénètre très rapidement dans le phloème et la concentration semble constante pour les temps étudiés.

- On ne retrouve pas d'acide salicylique dans la sève phloémienne. Nous avons donc deux possibilités : soit il n'y a pas coupure de la liaison amide, soit il y a coupure et l'acide salicylique formé est aussitôt métabolisé et compartimenté. En effet, il est connu que le turn over de l'acide salicylique est rapide chez les plantes. Compte tenu de la forte capacité de l'acide salicylique à s'accumuler dans le phloème (voir publication à soumettre dans le chapitre suivant), il est vraisemblable que le conjugué AS-Lys soit relativement stable au sein de la plante.

2.3 - Conjugué acide 3,5-dichlorobenzoïque-lysine

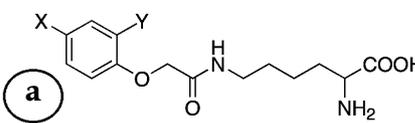
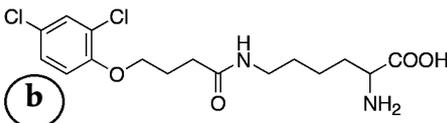
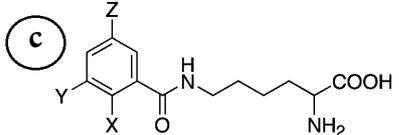
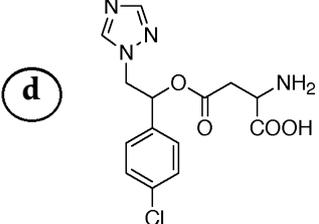
Lorsque les cotylédons de ricins sont placés dans une solution (tampon MES, pH 5,0) contenant le conjugué acide 3,5-dichlorobenzoïque-lysine à la concentration de 0,1 mM, nous retrouvons celui-ci dans la sève phloémienne à une concentration moyenne de 0,12 mM \pm 0,04 (moyenne de 17 échantillons \pm ES). Nous avons également noté la présence d'une faible quantité d'acide 3,5-dichlorobenzoïque dans la sève phloémienne (3 μ M \pm 0,7 μ M soit 2,5 % du total), ainsi qu'un métabolite non identifié. La collecte de sève a lieu, comme précédemment, lors des 3^e et 4^e heures d'incubation.

2.4 - Comparaison avec des conjugués herbicide-acide aminé

Ces différents résultats peuvent être comparés avec ceux que nous avons obtenus avec d'autres conjugués déjà synthétisés au laboratoire. Ces derniers résultent du couplage d'un herbicide de la famille des acides phénoxyalcanecarboxyliques avec la lysine (Chollet *et al.*, 1997).

Les structures de l'ensemble des conjugués étudiés sont rappelées dans le tableau III.

Tableau III. Structure des conjugués étudiés. Quatre groupes peuvent être distingués : a) les dérivés de l'acide phénoxyacétique b) les dérivés de l'acide phénoxybutyrique c) les dérivés de l'acide benzoïque d) un dérivé d'un alcool triazolique

STRUCTURE DE BASE	n°	X	Y	Z	Acide RCOOH initial
	A	H	H	-	Acide phénoxyacétique
	B	Cl	H	-	Acide 4-chlorophénoxyacétique
	C	Cl	Cl	-	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
	D	NH ₂	H	-	Acide 4-aminophénoxyacétique
	E	-	-	-	Acide 2,4-dichlorophénoxybutyrique
	F	OH	H	H	Acide salicylique
	G	H	Cl	Cl	
	H	-	-	-	1-(4-Chlorophényl)-2-[(1H)-1,2,4-triazol-1-yl] éthanol

Ces dérivés ont été étudiés en les appliquant sur les cotylédons de ricins à 0,1 mM sauf le conjugué triazolique qui a été utilisé à 1 mM. Le pH était de 5,0.

Les résultats que nous avons obtenus sont résumés dans la figure 5.

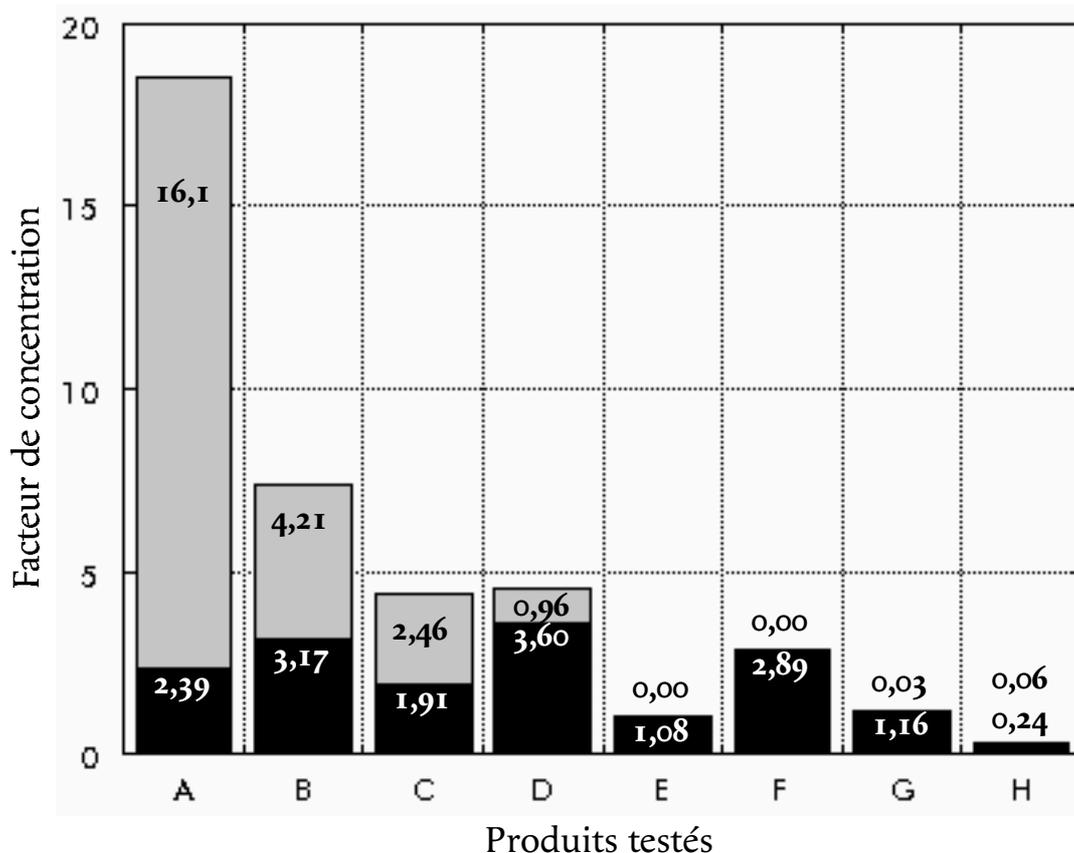


Figure 5. Systémie et métabolisme de conjugués de type xénobionte-acide aminé. Les résultats sont exprimés sous forme du facteur de concentration = $[\text{conjugué}_{\text{sève}}] + [\text{métabolite}_{\text{sève}}] / [\text{conjugué}_{\text{solution incubation}}]$. Les conjugués sous forme inchangée sont représentés en noir et leur métabolite (produit initial) en gris

L'acide phénoxyacétique-lysine (**A**) est retrouvé dans la sève phloémienne où sa concentration atteint 0,24 mM dans nos conditions expérimentales. Il faut surtout noter que l'on retrouve une quantité énorme d'acide phénoxyacétique dans la sève (1,6 mM soit un métabolisme apparent = Métabolite / Produit initial = 6,75), ce qui signifie que la plante métabolise le conjugué par activité enzymatique clivant le composé **A** au niveau de la liaison peptidique. Le facteur de concentration (conjugué sève + métabolite sève / conjugué solution incubation) est de 18,5 : c'est de loin le plus élevé de tous les conjugués testés.

L'acide 4-chlorophénoxyacétique-lysine (**B**) est également un conjugué très nettement phloème-mobile puisqu'il est présent dans la sève libérienne à une concentration de 0,32 mM et le métabolite correspondant, c'est-à-dire l'acide 4-chlorophénoxyacétique, est présent également (0,42 mM). Le facteur de concentration est de 7,38 ce qui est moins élevé par rapport au dérivé non chloré. Il en est de même pour le métabolisme apparent de **B** dans la plante (1,33).

L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique-lysine (**C**, 2,4-D-Lys) est présent dans la sève libérienne. Ce conjugué dichloré dont la masse moléculaire est voisine de 350 D est donc phloème mobile. Dans nos conditions expérimentales, sa concentration atteint 0,19 mM. Par ailleurs, la sève contient aussi du 2,4-D (0,25 mM). Le facteur de concentration est inférieur aux dérivés précédents: il est de 4,37. Il est également inférieur à celui du 2,4-D (7)(Delétage-Grandon *et al.*, 2001). Il est toutefois intéressant de noter qu'en dépit du métabolisme, le conjugué est plus concentré dans la sève libérienne que dans la solution d'incubation.

Le fait que le 2,4-D-Lys soit scindé en deux pour libérer le 2,4-D dans la plante signifie que ce conjugué se comporte comme un pro-herbicide que la plante transforme en herbicide actif. Le conjugué présente l'intérêt d'être distribué de manière différente que le 2,4-D dans la plante, l'apex racinaire devenant une cible évidente (Delétage-Grandon *et al.*, 2001). Le métabolisme apparent dans le cas du 2,4-D-Lys est de 1,29 dans nos conditions expérimentales, soit sensiblement voisin du conjugué B.

L'acide 4-aminophénoxyacétique-lysine (**D**) est le composé le plus concentré sous forme inchangée dans la sève phloémienne (0,36 mM). En revanche, il est moins métabolisé que les conjugués précédents: on ne retrouve que 0,1 mM d'acide aminophénoxyacétique soit un métabolisme apparent de 0,27. Le facteur de concentration est comparable au dérivé dichloré (4,56).

En ce qui concerne l'acide 2,4-dichlorophénoxybutyrique-Lys (**E**), la systémie phloémienne est moins marquée, le facteur de concentration étant de 1,1. Contrairement aux conjugués testés précédemment, **E** n'est pas clivé dans les tissus par activité d'une peptidase, comme dans le cas des autres conjugués acide phénoxyacétique-Lys. Ajoutons que nous n'avons pas noté la présence de 2,4-D qui aurait pu résulter du métabolisme oxydatif du 2,4-DB.

Le conjugué Alcool triazolique - acide aspartique (**H**) est le composé le moins systémique: appliqué à 1 mM sur les cotylédons, on en retrouve 0,24 mM dans la sève libérienne. Bien que faiblement détecté (0,06 mM), le fongicide de départ est cependant présent dans la sève avec un métabolisme apparent (activité d'une estérase) de 0,25.

Les conjugués acide salicylique-lysine (**F**) et acide 3,5-dichlorobenzoïque lysine (**G**) ont une systémie assez comparable aux autres dérivés étudiés avec des facteurs de concentration respectivement de 2,89 et 1,19. Toutefois, contrairement aux conjugués dérivant des acides phénoxyacétiques, ils ne libèrent pas ou que faiblement le produit de départ, tout au moins dans nos conditions expérimentales. L'emplacement de la liaison amide (CO-NH) dans ce type de molécules est donc primordial afin d'avoir une bonne libération du produit initial. Les structures de type $C_6H_5-O-CH_2-CO-NH-CH_2-$ semblent donc les plus favorables pour que la coupure enzymatique ait lieu.

3 - CONCLUSION

De cette étude, nous pouvons donc conclure que :

- Tous les conjugués de type xénobionte-acide aminé (avec la fonction α -aminoacide libre) que nous avons synthétisés et qui sont stables sont phloème mobiles, quoiqu'à des degrés divers. Ces associations étant de structure, de masse et de lipophilie variables, cela signifie que les perméases reconnaissant la fonction α -aminoacide sont peu spécifiques.

- En revanche, les hydrolases pouvant libérer la matière active au sein des tissus végétaux sont beaucoup plus spécifiques : seules certains motifs, notamment celui que l'on retrouve dans les dérivés de type acide phénoxyacétique-lysine (Aryl-O-CH₂-CO-Lys), sont favorables ainsi que les dérivés à fonction ester. Ceci est à prendre en considération pour la conception de futurs profongicides.

Chollet JF, Delétage C, Faucher M, Miginiac L, Bonnemain JL (1997) Synthesis and structure-activity relationships of some pesticides with an α -amino acid function. *Biochem Biophys Acta*, **1336**: 331 - 341.

Delétage-Grandon C, Chollet JF, Faucher M, Rocher F, Komor E and Bonnemain JL (2001) Carrier-mediated uptake and phloem system of a 350 D chlorinated xenobiotic with an α -amino acid function. *Plant Physiol*, **125**: 1620-1632

Dufaud A, Chollet JF, Rudelle J, Miginiac L, Bonnemain JL (1994) Derivatives of pesticides with α -aminoacid function: synthesis and effect on threonine uptake. *Pestic Sci*, **41**: 297-304.

Chapitre III

- ***Manuscrit à soumettre « Evaluation of the Ricinus phloem capacity to accumulate exogenous salicylic acid »***

Chapitre III

Il est maintenant bien connu que l'acide salicylique (AS), l'acide jasmonique et l'éthylène sont des signaux impliqués dans la réponse des plantes aux agents pathogènes (Durand-Tardif et Pelletier, 2003). On a déjà eu l'occasion de souligner dans le chapitre « historique » de ce mémoire, que l'AS est un élément important dans l'induction de la résistance systémique acquise. Des expériences élégantes ont permis de démontrer que l'AS synthétisé dans la feuille infestée par un pathogène est transporté à longue distance dans le phloème (Shulaev *et al.*, 1995; Mödlers *et al.*, 1996). Les rares dosages d'AS endogène dont on dispose, en particulier ceux concernant la sève phloémienne (Métraux *et al.*, 1990), ne permettent pas de savoir si l'AS possède la propriété de s'accumuler véritablement dans le phloème et cela est d'autant plus délicat que le turn-over métabolique de cette molécule est rapide. On sait seulement que les propriétés physicochimiques de cette molécule-signal sont compatibles, comme nous l'avons déjà mentionné, avec une bonne mobilité phloémienne via le mécanisme de piégeage d'acide (Yalpani *et al.*, 1991).

C'est la première raison pour laquelle nous nous sommes proposée d'étudier les propriétés du chargement phloémien de l'AS en utilisant le modèle Ricin. L'autre motivation, qui entre dans le cadre de notre démarche générale, est liée à la caractérisation récente d'un groupe de transporteurs d'acides monocarboxyliques dans les cellules animales. Ceux-ci manipulent l'AS, mais aussi des « drogues » de structure plus complexe et de masse moléculaire beaucoup plus importante, comme la provastatine (Tsuji et Tamai, 1996; Enerson et Drewes, 2003).

Durand-Tardif M, Pelletier G (2003) Apport de la biologie moléculaire et cellulaire et de la génétique à la protection des plantes. *C R Biologies* **326**: 23-35

Enerson BE, Drewes LR (2003) Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *J Pharm Sci* **92**: 1531-1544

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 on the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006

Mödlers W, Buchala A, Métraux JP (1996) Transport of salicylic acid in Tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. *Plant Physiol* **112**: 787-792

Shulaev V, Leon J, Raskin I (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell* **7**: 1691-1701

Tsuji A, Tamai I (1996) Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm Res* **13**: 963-977

Yalpani N, Silverman P, Wilson TM, 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

Phloem loading of exogenous salicylic acid

Corresponding author : Jean-Louis Bonnemain, Laboratoire «Transport des Assimilats», Unité Mixte de Recherche CNRS 6161, 40 avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers CEDEX, France

Tel 33.5.49.45.49.24

fax 33.5.49.45.39.65

e-mail jl.bonnemain@voila.fr

Evaluation of the Ricinus phloem capacity to accumulate exogenous salicylic acid

Françoise Rocher, Jean-François Chollet, and Jean-Louis Bonnemain*

Laboratoire “Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles” (UMR 6514, CNRS), Université de Poitiers, 40 avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France (F.R., J.F.C.)

Laboratoire “Transport des Assimilats” (UMR 6161, CNRS), 40 avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers cedex, France (J.L.B.)

This work was supported by the Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux

Corresponding author : Jean-Louis Bonnemain, fax 33.5.49.45.39.65; e-mail jl.bonnemain@voila.fr

ABSTRACT

The potential of *Ricinus* phloem to accumulate exogenous salicylic acid (SA) was evaluated by HPLC analysis of phloem sap collected from the severed apical part of the seedlings. Time course experiments indicated that SA is transported to the root system via the phloem and redistributed in very small amounts via the xylem. Phloem loading of SA at 1, 10 or 100 μM was dependent on pH of the cotyledon incubating solution and the accumulation in the phloem sap was the highest (about 10-fold) at the most acidic pH values tested (pH 4.6 and 5.0). The analogue 3,5-dichlorobenzoic acid which is predicted to be poorly mobile according the models of Bromilow and Kleier also accumulated in the phloem (about 4-fold). Competition experiments indicated that 100 μM gallic acid, which did not affect the transmembrane proton gradient, inhibited 10 μM SA phloem loading by about 25%. These data rise 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 matured 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 Kúć, 1979; Guedes et al, 1980). Interest in the role of salicylic acid (SA) in disease resistance started from the observation that application of exogenous SA or acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus (TMV) in tobacco (White, 1979) and is highly effective in inducing pathogenesis-related (PR) genes (White et al, 1987). A few years later, it was shown that development of SAR in 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 cucumber mature leaves with either tobacco necrosis virus (TNV) 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 of 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. The role of SA in disease resistance was further supported using transgenic tobacco plants expressing the bacterial *nahG* gene encoding salicylate hydrolase, which degrades SA into catechol. These plants are unable to accumulate SA and to express SAR (Gaffney et al, 1993).

Phloem transport of SA from the inoculated leaves to the systemically protected tissues is at the present time clearly supported. The first strong evidence has come from an *in vivo* labelling with $^{18}\text{O}_2$ of the salicylic acid 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 -labelled 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 to cucumber cotyledons inoculated with TNV. Labelled SA was detected in the phloem and in the upper uninoculated leaf before the

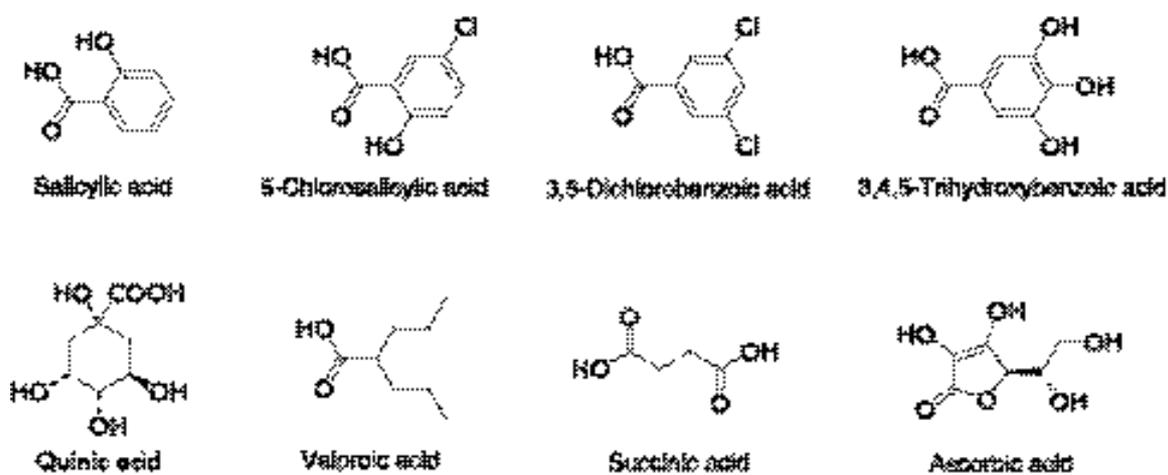


Figure 1. Chemical structures of salicylic acid (SA), SA analogues and other acidic compounds used in this work.

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, the upper leaf also produced more SA. Finally, recent data suggest that the pattern of SAR induction within the *Arabidopsis* rosette is not confined to the pattern of phloem allocation of ^{14}C -sucrose or ^{14}C -SA from a donor leaf (Kiefer and Slusarenko, 2003). All these data are discussed in relation to the nature of the primary long-distance signal which triggers SAR, ie SA or another signal (Vernooij et al, 1994; Ryals et al, 1996, Van Loon, 1997; Durner et al, 1997; Métraux, 2001).

The membrane transport of SA is well documented in animal cells contrary to plant cells. It was studied in detail using the human adenocarcinoma cell line, Caco-2 cells which possess intestinal epithelia like properties. The transcellular transport of SA across Caco-2 cells occurs via a pH-dependent and carrier-mediated transport mechanism specific for monocarboxylic acids (Takanaga et al, 1994; Tsuji et Tamai, 1996). These and other data lead to the characterization of a monocarboxylate transporter in animal cells (Garcia et al, 1994; Enerson and Drewes, 2003).

The purpose of the present work was to assess, using the *Ricinus* system, the potential of the phloem to load SA from the apoplast comparatively to various endogenous molecules and xenobiotics, and to specify the mechanism(s) involved in this process.

RESULTS AND DISCUSSION

Predicting phloem mobility of SA and analogues

Two models based on the physicochemical properties of molecules, more precisely their lipophilicity (assesses as 1-octanol/water partition coefficient $\log K_{ow}$) and pKa values, are currently used to predict the systemicity of xenobiotics and natural ionisable compounds (Kleier, 1988; Bromilow et al, 1991; Kleier, 1994). Much of the data on xenobiotics transport fits well into these schemes, except for compounds translocated by a carrier system (Wright and Oparka, 1994). These two models were used to predict the mobility of SA and analogues (Fig. 1). The physicochemical properties of SA ($\text{pKa} = 3.01$, $\log K_{ow} = 2.06$) make it well suited for long-distance phloem transport (Yalpani et al, 1991). Using the mathematical model of Kleier, gallic acid (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid) ($\text{pKa} = 4.33$, $\log K_{ow} = 0.91$) and 5-chlorosalicylic

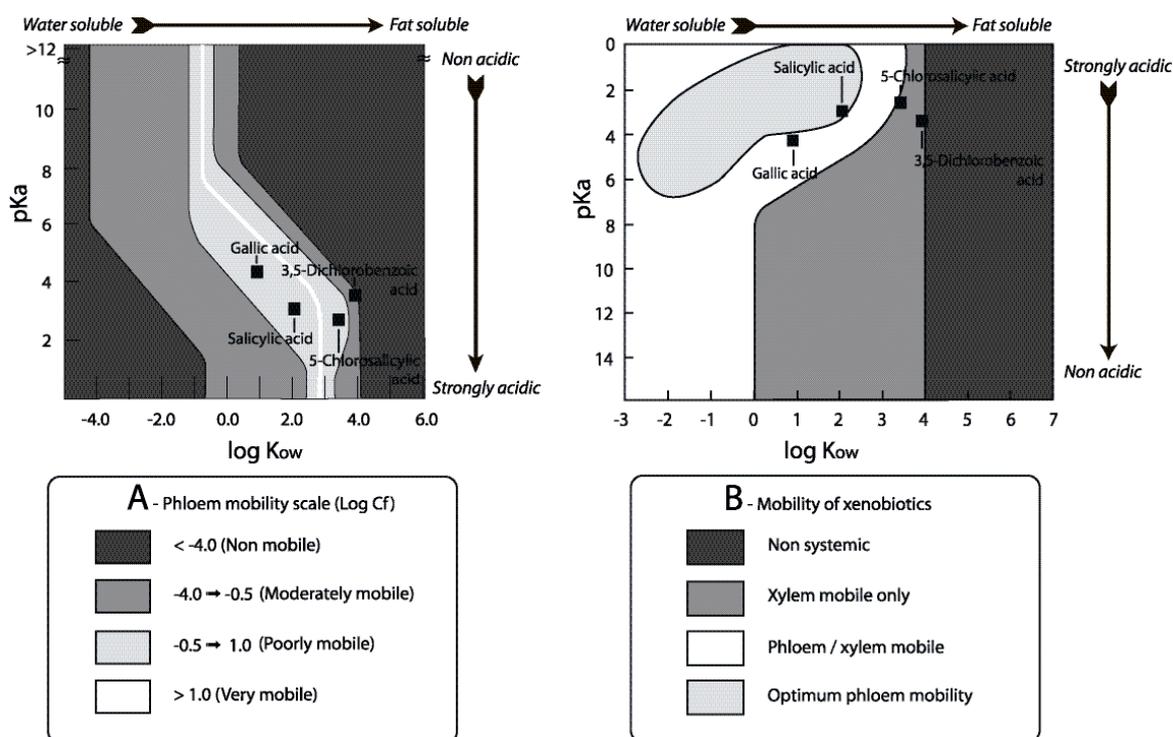


Figure 2. Prediction of phloem mobility of SA and its analogues using the Kleier map ($\log C_f$ as a function of $\log K_{ow}$ and pKa , plant parameters are for a short plant (Kleier, 1994)) (A), and the model of Bromilow (degrees of mobility as a function of $\log K_{ow}$ and pKa) (B). $\log K_{ow}$ and pKa were calculated using ACD Log D v 8.0 software.

acid ($pK_a = 2.64$, $\log K_{ow} = 3.42$) could also be predicted to be phloem mobile, while 3,5-dichlorobenzoic acid ($pK_a = 3.46$, $\log K_{ow} = 3.92$) was situated near the area of the non mobile molecules (Fig. 2A). Similarly, according to the model of Bromilow and coworkers, three degrees of mobility could be noted. SA and gallic acid were situated near the area of optimum phloem mobility, 5-chlorosalicylic acid near the group of the molecules mobile only in the xylem, and 3,5-dichlorobenzoic acid on the line between the areas of the apoplastic and the non-mobile products (Fig. 2B).

Endogenous SA levels in the phloem and xylem saps exudated from severed seedlings

To evaluate the potential of phloem to trap exogenous SA from the incubation medium, it was previously necessary to measure the endogenous SA levels in the phloem sap exported by *Ricinus* cotyledons. Endogenous SA concentration did not exceed basal level ($<1\mu\text{M}$). Very low values ($\approx 0.5\mu\text{M}$) were also noted in the phloem sap of cucumber (control set) (Métraux et al, 1990). Endogenous SA concentration in the xylem sap exudated 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, in agreement 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), 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). As 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 more especially from the cotyledons epidermis when these organs are incubated in a solution. However in the latter case, exogenous SA molecules must also cross the plasma membrane. In this paper, the term “SA phloem loading” does not discriminate between the various possible sites of transmembrane SA uptake. Nevertheless, taking into account the rapid

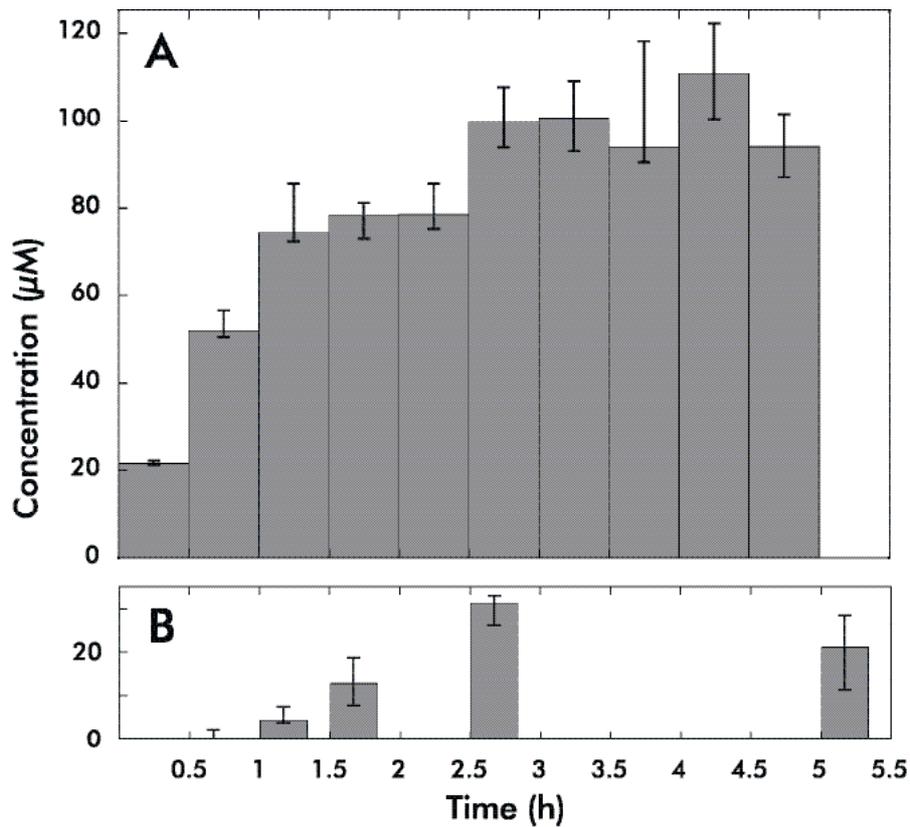


Figure 3. A. Time course of SA concentration in phloem sap of *Ricinus*. Cotyledons were soaked in a buffered medium (pH 4.6) containing $10\mu\text{M}$ SA. Medians \pm quartiles, n = 8. **B.** Time course of SA concentration in xylem sap of *Ricinus*. Cotyledons were soaked in a buffered medium at (pH 4.6) containing $100\mu\text{M}$ SA. Medians \pm quartiles, n = 8.

metabolic turn-over of SA, only a part of SA molecules moving via the symplastic route can probably reach the sieve tubes.

When cotyledons were incubating in an acidic solution (pH 4.6) in presence of SA at $10\mu\text{M}$, the molecule quickly accumulated in the phloem sap. Its concentration increased sharply for about 1.5h before reaching a rising plateau and was then about 10-fold that of the incubation medium (Fig. 3A). Therefore in the further experiments, the sap was collected when SA levels plateaued, ie from 2 to 4 hours after the beginning of cotyledon incubation. The potential of phloem to accumulate exogenous SA is discussed thereafter.

In parallel, the presence of exogenous SA in the xylem sap collected from the basal part of the hypocotyl was investigated. However during the first two hours of transport, SA concentration was so low that it could not be quantified. Consequently, a complementary experiment was done using cotyledon incubation solution with SA at $100\mu\text{M}$. Under these conditions, exogenous SA was clearly found in the xylem sap exudated by root pressure. Despite the precaution to reduce phloem contamination (see material and methods), phloem contamination by diffusion of SA molecules from the severed sieve tubes could not be discarded. However, time courses of SA phloem and xylem loading were clearly different, xylem sap enrichment occurring with a delay of about 1h (compare Fig. 3A and B, times 0.5, 1 and 1.5h). The highest SA concentration found in the xylem sap exudated by root pressure was about one third that of the incubation medium and about one thirtieth that of the phloem sap under our experimental conditions. This indicates that part of SA molecules translocated in the phloem to the root is redistributed to the foliage via the xylem. Our data contribute to explain why endogenous SA and main SA metabolite concentrations remain very low in roots after pathogen inoculation of a leaf in the middle part of tobacco and why endogenous SA accumulation may not be limited to young leaves situated directly above the inoculated leaf (Shulaev et al, 1995). Similarly, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) exported from leaves in the middle part of broad bean shows a lesser capacity to accumulate in the apical part of the root system comparatively to Lys and particularly to ϵ -(2,4-dichlorophenoxyacetyl)-L-Lys (2,4D-Lys), a synthetic conjugate with an α -amino acid function, especially in short time experiments (6h) (Delétage-Grandon et al, 2001).

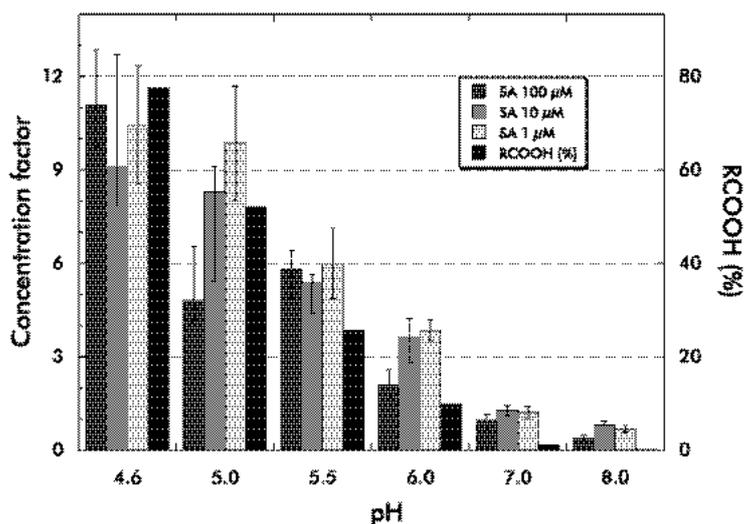


Figure 4. Concentration factor of SA (added to the incubation solution at 1, 10 or 100 μ M) in phloem sap of *Ricinus* as a function of the pH of the incubation medium and percentage of SA undissociated form at the interface apoplast / plasma membrane. The sap was collected during the third and fourth hours of incubation. The concentration factor is the ratio $[SA]_{\text{sap}} / [SA]_{\text{medium}}$. RCOOH (%) is calculated using ACD Log D v 8.0 software.

Table I. *Ricinus* phloem sap analysis after soaking cotyledons in a buffered solution (pH 5.0) containing various compounds. Phloem sap collection started 2 hours after the beginning of soaking and lasted 2 hours. Means \pm SE, $n \geq 10$, except for 3,5-dichlorobenzoic acid ($n = 6$)

Compounds	Incubation medium (μ M)	Phloem sap (μ M)
Salicylic acid	1	11 \pm 1
Salicylic acid	10	79 \pm 8
Salicylic acid	100	567 \pm 57
3,5-Dichlorobenzoic acid	100	370 \pm 84
2,4-D	100	700 \pm 10
[14 C] Glyphosate	100	18 \pm 1
<i>N</i> -Carboxymethyl-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl) pyrrole	250	42 \pm 7
[14 C] Sucrose	100	2136 \pm 168
Phenylalanine	100	2192 \pm 27

pH dependence of SA phloem loading

SA levels in the phloem sap was dependent on the pH of the incubation medium whatever the SA concentration in this medium (1, 10 or 100 μ M) (Fig. 4). Higher concentrations 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 lowest (<1-fold) at alkaline pH values. However SA phloem loading was not clearly related to the calculated percentage of the undissociated form of the molecule at the apoplast/plasma membrane interface. It was higher than the values predicted by ACD Log D v 8.0 software from pH 5.5 to 8.0. At this latter pH value, SA was in theory present only under its undissociated form, ie the non permeant form through the phospholipidic layer. A residual uptake of SA and other monocarboxylic acids at neutral and alkaline pH values was also mentioned in animal cells (Tsuji et al, 1990; Simanjuntak et al, 1990; Takanaga et al, 1994). By contrast, data from systemicity tests using the *Ricinus* system indicate that acidic derivatives of the fungicide fenpiclonil are taken up only under their undissociated form in agreement with the ion-trap mechanism (Chollet et al, 2004).

Measurement of SA accumulation in the phloem sap and comparison with other natural compound and xenobiotics

At pH 5.0, ie a pH value close to that of the phloem apoplast, at least in apolastic loaders (Delrot et al, 1980), SA concentration factor in the phloem sap varied from 6 to 11-fold according to the SA levels (1, 10 and 100 μ M) in the incubation solution (Table I). These values were lower than those noted (21 or 22-fold) for sucrose and phenylalanine which are taken up by specific carrier systems (Lemoine, 2000; Chen et al, 2001), much higher than those reported (0.2-fold) for glyphosate (Delétage-Grandon et al, 2001) and acidic derivatives of fenpiclonil (Chollet et al., 2004) but similar to that of 2,4D. Interestingly, 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). Finally, 3,5-dichlorobenzoic acid, the most lipophilic compound among SA analogues tested in this work, was found to be clearly phloem mobile (Fig. 5), contrary to the model predictions (Fig. 2). Its concentration in the phloem sap was close to 4-fold that of the incubation medium (Table I). These data may rise the hypothesis according to which this SA analogue, and consequently SA, are taken up by a carrier system, in addition to the ion-trap mechanism already mentioned (Yalpani et al, 1991).

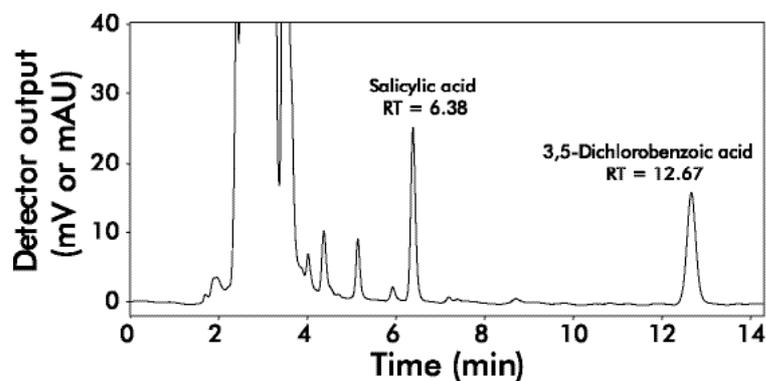


Figure 5. HPLC profile of *Ricinus* phloem sap. Cotyledons were incubated in a buffered solution (pH 4.6) containing 10 μ M SA and 100 μ M 3,5-dichlorobenzoic acid.

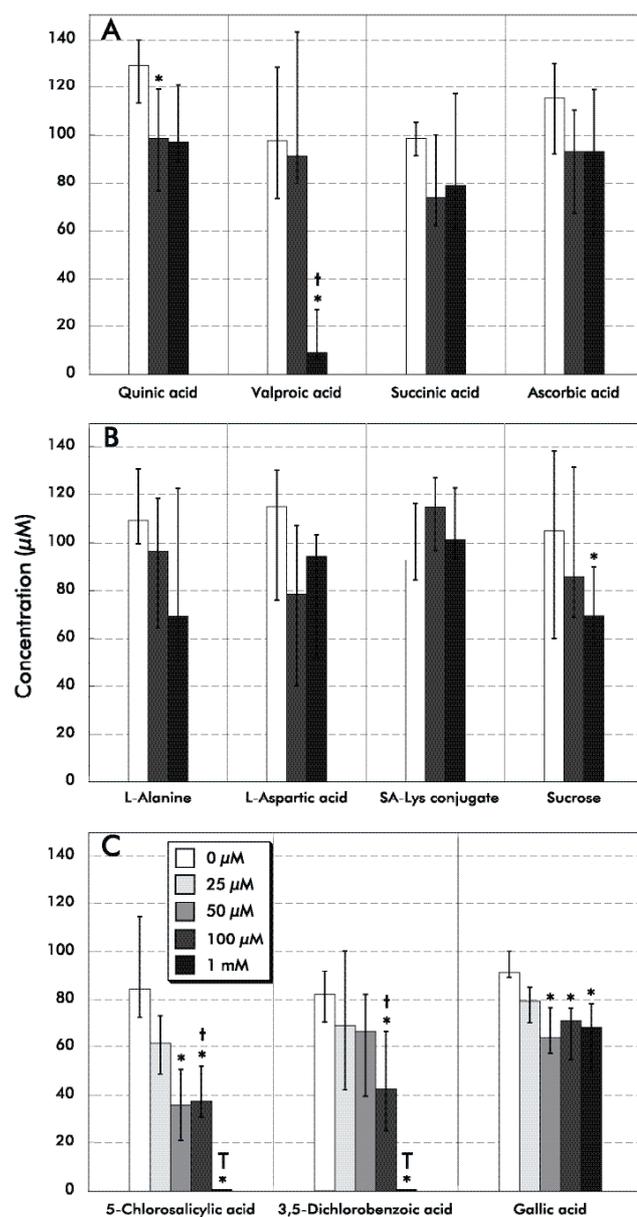


Figure 6. Competition experiment. Cotyledons were soaked in a buffered solution (pH 4.6) containing 10 μ M SA and a mono- or di-carboxylic acid (**A**), amino acids or sucrose (**B**) and SA analogues (**C**) at various concentration. The sap was collected during the third and fourth hours of incubation. Medians \pm quartiles, $7 \leq n \leq 29$; *: significant, $P \leq 0.05$ (Kruskal-Wallis test); †: slightly toxic; T: highly toxic.

Competition experiments

About fifty years ago, data from this kind of experiment were the starting point of an alternative to the hypothesis that monocarboxylic acid drugs diffuse through the intestinal brush-border membrane in the undissociated form (Brodie and Hogben, 1957). It was shown that the pH-dependent transport of acetic acid, SA or nicotinic acid across intestinal brush-border membrane vesicles or Caco-2 cells is inhibited by various monocarboxylic acids. The inhibition was the highest at the most acidic values tested. By contrast, dicarboxylic acids such as succinic acid and acid amino acid do not affect monocarboxylic acid uptake (Tsuji et al, 1990; Simanjuntak et al, 1990, Takanaga et al, 1994). It was concluded that the transport of monocarboxylic acid across the brush-border membrane results mainly in a proton-gradient dependent carrier-mediated mechanism (Tsuji et al, 1990; Takanaga et al, 1994). Fourteen members of the monocarboxylate cotransporter family are now identified in animal cells (Enerson and Drewes, 2003). On this ground, the compounds we used as competitors of SA phloem loading were monocarboxylic acids, a dicarboxylic acid, neutral and acid amino acids and sucrose. Under our experimental conditions, succinic acid, L-aspartic acid, L-alanine and SA-Lys did not affect significantly phloem loading of SA at $10\mu\text{M}$ (Fig. 6A and 6B). Similarly, L-ascorbic acid which is translocated from source leaves to sink tissues *via* the phloem (Franceschi and Tarlyn, 2002) did not clearly compete with SA (Fig. 6A). A marginal effect was noted with $100\mu\text{M}$ quinic acid and 1mM sucrose (Fig. 6A and 6B). A dramatic inhibition occurred with valproic acid at 1mM (Fig. 6A) but a slight sign of toxicity was noted at this concentration (change in the color of phloem sap). Similarly, under our experimental conditions, the inhibition induced by 5-chlorosalicylic acid and 3,5-dichlorobenzoic acid seemed to be correlated at least in part with a toxic effect of these chlorinated analogues. However, gallic acid from $50\mu\text{M}$ to 1mM reduced SA phloem loading by about 25% respectively without any sign of toxicity (Fig. 6C). These data suggest that some SA analogue may compete with SA for a plasma membrane carrier system.

To make sure of the specificity of the effect of gallic acid on SA membrane transport, complementary experiments were conducted with *Ricinus* cotyledon. During the third and fourth hours of incubation, ie under similar condition to those of sap collection, ^{14}C -Sucrose uptake was dramatically inhibited by $50\mu\text{M}$ of 5-chlorosalicylic acid but remained similar to

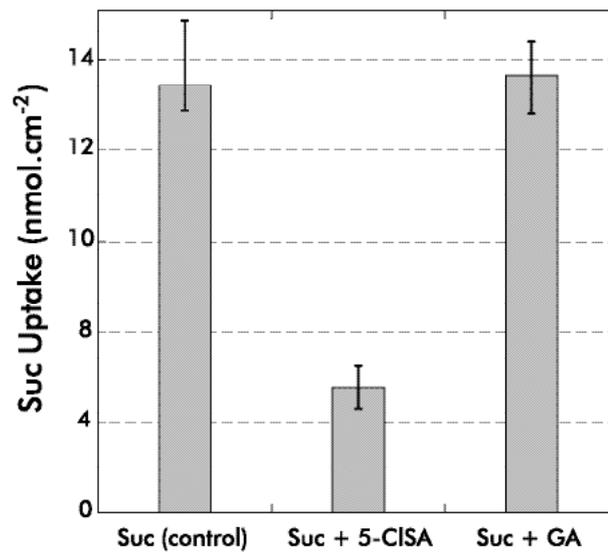


Figure 7. Uptake of 100 μ M ¹⁴C-sucrose by *Ricinus* cotyledon during the third and fourth hours of incubation (pH 4.6), in absence (control) or in presence of 50 μ M 5-chlorosalicylic acid or 100 μ M gallic acid added at time 0. Medians \pm quartiles, n = 13.

that of the control in presence of 100 μ M gallic acid (Fig. 7). This indicates that gallic acid does not affect under our experimental conditions the transmembrane gradients (Δ pH and $\Delta\Psi$) which energize or maintain solute uptake. Comparatively, the inhibition of SA phloem loading in presence of 100 μ M gallic acid supports the hypothesis of a competition between the two aromatic monocarboxylic acids for a same carrier system.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Castor bean seeds (*Ricinus communis* L. cv Sanguineus), obtained from Ball-Ducrettet (Margencel, France) were placed in humid cotton-wool for 24h at 27°C \pm 1°C prior to sowing in wet vermiculite. Seedlings were grown in a humid atmosphere (80% \pm 5%) at 27°C \pm 1°C.

Sap collection and analysis

Six days after sowing, the endosperm of seedlings was carefully removed (Kallarackal et al, 1989). The cotyledons were then incubated in buffer solution containing 0.25mM MgCl₂ and 0.5mM CaCl₂. The buffers used were MES (pH 5.0, 5.5 and 6.0) and HEPES 20mM (pH 4.6, 7.0 and 8.0). Buffers containing citrate could not be used at acidic pH due to their chelating effect toward Ca²⁺. Due to the weak buffer properties of HEPES around pK_{a1} (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 buffer solution was complemented with SA or/and another product as described in “Results and Discussion”.

At the end of the experiment, the hypocotyl was severed in the hook region. The phloem sap and the xylem sap were collected from the upper part and the basal part of hypocotyl respectively. Before, the basal section was gently wiped with absorbing paper in order to trap some phloem sap from severed sieve-tubes and to minimize xylem sap contamination. The saps were then analyzed immediately or were stored at –80°C until analysis.

Saps were analyzed by HPLC after dilution with pure water. We employed reverse-phase chromatography using a Discovery C16 RP-amide column (length 250mm, internal diameter 4,6mm) (Supelco, Bellefonte, PA), eluting with water containing 0.1% trifluoroacetic acid and

acetonitrile (1:1) (flow 0.8 ml min⁻¹) connected to a photodiode array detector (236 nm). Results were processed with PC 1000 software v3.5 from Thermo Electron SA (Coutabœuf, France).

Uptake experiments

Ricinus cotyledons were floated on a preincubation medium buffered with 20mM HEPES (pH 4.6) and containing 0.5mM CaCl₂, and 0.25mM MgCl₂ without (control) or with (treated sets) 50μM 5-chlorosalicylic acid or 100μM gallic acid. After a 2 h-preincubation period, the cotyledons were incubated in the same solutions with 100μM [¹⁴C]-sucrose. Incubation was run under mild agitation on a reciprocal shaker at 27°C ± 1°C. After a 2h-incubation period, the cotyledons were rinsed (three times for 2 min) in a solution similar to the preincubation medium but without acidic compounds. Tissues were then digested during 15 hours at 55°C in a mixture of perchloric acid (65% (w/w); 25μL), hydrogen peroxide (33% (w/w); 50μL), and Triton X-100 (1g L⁻¹; 50μL). After cooling to room temperature, samples were homogenized and counted for radioactivity using 4mL of a water-miscible scintillation cocktail (Ecolite + from ICN, Costa Mesa, CA, USA) with a Packard Tri-carb 1900TR (Packard Instruments, Rungis, France).

Chemicals

The compounds to be added to incubation solutions were from Acros Organics France (Noisy-le-Grand, France) (L-alanine, L-ascorbic acid, L-aspartic acid, 5-chlorosalicylic acid, gallic acid, quinic acid, salicylic acid, succinic acid, valproic acid, 4-morpholinoethanesulfonic acid [MES], 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine]ethanesulfonic acid [HEPES]) or from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France) (3,5-dichlorobenzoic acid, sucrose, sucrose-UL-¹⁴C).

Synthetic method

ε-*N*-Salicyloyl-lysine (SA-Lys conjugate) was synthesized according to Moll and Stauff, 1985. L-lysine monohydrochloride (0.12mol, 21.92g) was dissolved in aqueous sodium hydroxide (35%, 250mL). Next, phenyl salicylate (0.10mol, 21.42g) was added portionwise

and the mixture was then stirred and warmed to 70°C for 2h. After cooling to 0°C, the mixture was acidified (pH \approx 2) with sulfuric acid (2M). At room temperature, phenol was extracted from the mixture with diethylether (200mL). After cooling to 5°C, the mixture was filtered on a sintered disc filter funnel and the resulting powder was crystallized from water (500mL) and dried under reduced pressure at 120°C with a Kugelrohr apparatus. ϵ -*N*-Salicyloyl-lysine was obtained as a white powder (mp 247-251°C) and its purity was verified using HPLC (Discovery C16 RP-amide column 250 x 4.6mm [Supelco, Bellefonte, PA], eluting with acetonitrile + water containing 1mL L⁻¹ trifluoroacetic acid [22+78 by volume], flow 0.8mL min⁻¹, RT: 6.9 min).

RMN ¹³C (ppm, D₂O + Na₃PO₄) : 25,4 (CO-NH-C-C-C); 31,4 (CO-NH-C-C); 36,8 (CO-NH-C-C-C-C); 41,5 (CONH-C); 58,6 (CH); 116,5; 124,7; 132,2; 136,3 (CH aromatiques); 121,1 (C-CO-NH); 171,5 et 173,1 (CO)

RMN ¹H (ppm, D₂O + Na₃PO₄) : 1,3 - 1,8 (m, 6H, CO-N-C-(CH₂)₃-); 3,31 (t, J 6Hz, 1H, *CH); 3,35-3,45 (m, 2H, CO-N-CH₂-); 4,95 (s, 2OH, NH₂); 6,6-7,9 (m, 4H, CH aromatiques).

Physicochemical properties

Physicochemical properties (pKa, LogP, percentage of non-dissociated form) of salicylic acid and other ionisable molecules were calculated using ACD LogD v8.0 software from Advanced Chemistry Development, Inc. (Toronto, Canada).

Statistics

Statistical tests were computed using StatXact v6.0 software from Cytel Software Corporation, (Cambridge, MA, USA).

LITERATURE CITED

- Antognoni F, Forralé 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
- Brodie BB, Hogben CA** (1957) Some physico-chemical factors in drug action. *J Pharm Pharmacol* **9**: 345-380
- Bromilow RH, Rigitano RLO, Briggs GG, Chamberlain K** (1987) Phloem translocation of non-ionised chemicals in *Ricinus communis*. *Pest Sci.* **19**:85-99
- 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, pp 332-340
- 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**: 000-000
- 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 alpha-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
- Durner J, Shah J, Klessig DF** (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **2**: 266-274
- Enerson BE, Drewes LR** (2003) Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters : implication for drug delivery. *J Pharm Sci* **92**: 1531-1544
- Franceschi VR, Tarlyn NM** (2002) L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiol* **130**: 649-656
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessman H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*: 754-756
- Garcia C, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson GW, 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, Kúc 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
- Jenns A, Kúc J** (1979) Graft transmission of systemic resistance of cucumber to anthracnose induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. *Phytopathology* **69**: 753-756
- 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 Pest 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
- Lemoine R** (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 246-262
- 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
- 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 on the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006
- Mölders W, Buchala A, Métraux J** (1996) Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. *Plant Physiol* **112**: 787-792
- Moll F, Stauff D** (1985) Interactions between acetylsalicylic acid and lysine in solution. *Arch Pharm* **318**: 120-127
- Orlich G, Komor E** (1992) Phloem loading in *Ricinus* cotyledons: sucrose pathways via the mesophyll and the apoplasm. *Planta* **187**: 460-474
- Ross AF** (1966) Systemic effect of local lesion formation. *In* JD eds, ed, *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, 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
- Schobert C, Grossmann P, Gottschalk M, Komor E, Pecsvaradi A, Nieden V** (1995) Sieve tube exudate from *Ricinus communis* L seedlings contains ubiquitin and chaperones. *Planta* **196**:205-210

- Shulaev V, León J, Raskin I** (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell* **7**: 1691-1701
- Simanjuntak MT, Tamai I, Terasaki T, Tsuji A** (1990) Carrier-mediated uptake of nicotinic acid by rat intestinal brush-border membrane vesicles and relation to monocarboxylic acid transport. *J Pharmacobiodyn* **13**: 301-309
- 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
- Tsuji A, Simanjuntak MT, Tamai I, Terasaki T** (1990) pH-dependent intestinal transport of monocarboxylic acids: carrier-mediated and H(+)-cotransport mechanism versus pH-partition hypothesis. *J Pharm Sci* **79**: 1123-1124
- 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, Kessman 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* **8**: 1809-1819
- White R, Rybicki EP, von Wechmar MB, Dekker JL, Antiniw JF** (1987) Detection of PR-1 type proteins in Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Gramineae and Solanaceae by immunoblotting. *J Gen Virol* **68**: 2043-2048
- White RF** (1979) Acetyl salicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* **99**: 410-412
- 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

Conclusion générale

Conclusion générale

« In particular, the discovery of fungicides that are translocated downward in the phloem to control root-invading pathogens is sorely needed » (Edgington, 1981); «Further improvement in the efficiency of disease control, particularly of root and vascular diseases but also of fungi infecting new growth, could be achieved with the use of fungicides mobile in the phloem of plants » (Smith et al, 1995).

Ces propos soulignent l'intérêt de disposer de fongicides à systémie phloémienne pour faire face à des problèmes spécifiques rencontrés en phytopathologie et révèlent en même temps l'absence de progrès dans ce domaine. Ils attirent aussi l'attention sur la nécessité d'y insérer des bases fondamentales. C'est ce constat qui a orienté nos recherches. Notre travail a permis de dégager les points suivants :

LE LOGICIEL ACD LOGD, LES MODÈLES DE KLEIER ET DE BROMILOW ET LE MODÈLE VÉGÉTAL RICIN : TROIS OUTILS COMPLÉMENTAIRES POUR LA PRÉDICTION ET L'ÉVALUATION DE LA SYSTÉMIE LIBÉRIENNE DES XÉNOBIONTES

Évaluer précisément la mobilité phloémienne des xénobiontes n'est pas considéré comme chose facile. Au cours de notre travail, nous avons mis en place une stratégie de prédiction et d'évaluation de la systémie phloémienne en utilisant trois outils complémentaires et qui constituent le fondement méthodologique de notre travail :

- Le logiciel ACD log D suite (actuellement en version 8.0) qui permet de déterminer, pour les composés ionisables, le coefficient de partage octanol/eau en fonction du pH (log D). Il est également aisé de déterminer, pour un pH donné, le pourcentage de forme dissociée ou non de la molécule étudiée, et ce pour une interface milieu organique/milieu aqueux simulant une membrane biologique et son environnement extérieur. Nous avons ainsi pu établir, pour les dérivés acides du fenpiclonil, de bonnes corrélations entre le pourcentage de forme non ionisée d'une molécule à un pH donné et la quantité de cette dernière pénétrant par diffusion dans le phloème. Le fait que cette corrélation soit moins bonne pour l'acide salicylique semble en accord avec notre hypothèse selon laquelle son chargement phloémien n'est pas dû uniquement au mécanisme de piégeage d'acide.

- Nous avons employé deux modèles prédictifs de la mobilité des xénobiontes dans la plante. Ces deux modèles utilisent les propriétés physico-chimiques de molécules ionisables (coefficient de partage octanol/eau de la forme neutre (log K_{ow}) et coefficient de dissociation dans l'eau (pKa)). Le modèle de Bromilow, basé sur des faits expérimentaux, est complémentaire du modèle de Kleier qui résulte de calculs mathématiques prenant en compte divers paramètres structuraux et physicochimiques des tissus conducteurs et des

membranes, ainsi que la taille des plantes étudiées. Bien que de conception très différente, ces deux modèles amènent à des prédictions sensiblement identiques. En reportant, sur ces modèles, les paramètres $\log K_{ow}$ et pK_a estimés grâce au logiciel ACD log D suite, nous pouvons prédire par exemple si une molécule ionisable a la possibilité de pénétrer dans le phloème par un processus de diffusion ou si elle n'est que xylème mobile. Il faut noter toutefois que ces deux modèles ne s'adressent pas à un franchissement de la membrane plasmique par des transporteurs. À cet égard, l'absence de convergence entre les prédictions de faible mobilité réduite au xylème de l'acide 3,5-dichlorobenzoïque et son accumulation mesurée dans le phloème a retenu particulièrement notre attention.

- Le modèle ricin que nous avons adapté à l'étude de la systémie des xénobiontes permet ensuite de quantifier l'aptitude d'une molécule à pénétrer dans le phloème et par là même d'effectuer la quantification de la systémie phloémienne. Il permet aussi d'évaluer l'ambimobilité des molécules puisqu'on peut collecter séparément et facilement la sève xylémienne et la sève phloémienne. Ces sèves peuvent ensuite être injectées directement dans un chromatographe après une simple dilution dans l'eau et sans effectuer l'étape de purification d'échantillon toujours longue et parfois coûteuse. Un autre avantage de ce modèle (qui est opérationnel après 6 jours de culture) est que l'on peut étudier en même temps, dans certains cas, la systémie et le métabolisme d'une molécule (scission hydrolytique des conjugués xénobiontes-acides aminés) (Fig 1).

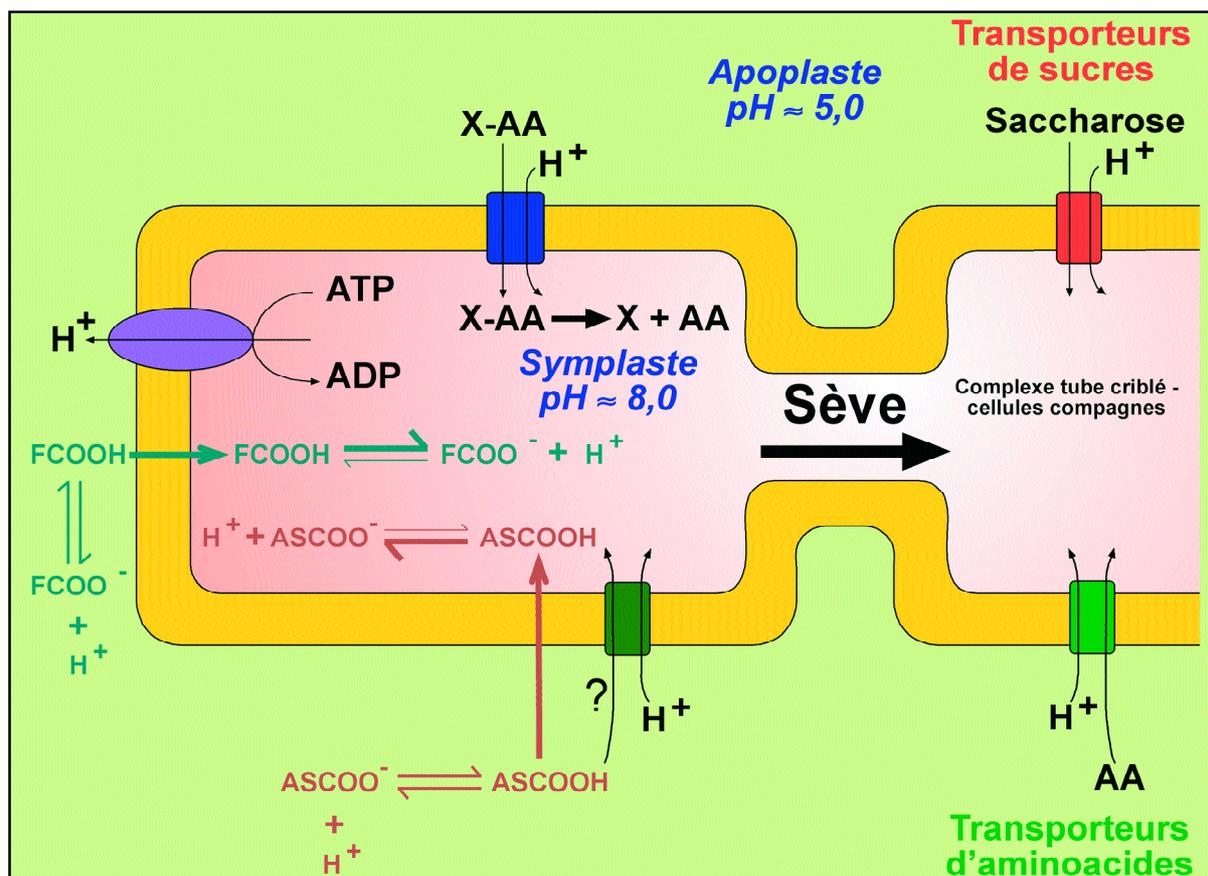


Figure 1. Mécanismes de l'influx, dans le complexe conducteur du phloème, de xénobiontes et de molécules naturelles impliquées dans la défense des plantes. F: fenciclonil; X-AA: conjugué xénobionte-acide aminé (X: acides phénoxyalcanecarboxyliques, alcool triazolique); AS: acide salicylique

PEUT-ON RÉSOUDRE L'INCOMPATIBILITÉ ENTRE ACTIVITÉ BIOLOGIQUE ET SYSTÉMIE PHLOÉMIENNE ?

Il s'agit d'une question soulevée à maintes reprises, notamment par Kleier *et al.* (1998). On a déjà eu l'occasion de souligner que les rares tentatives connues de modifications de fongicides pour leur conférer la systémie phloémienne s'étaient soldées par des échecs ou des demi-échecs : la plupart du temps, les molécules obtenues étaient certes mobiles mais avaient perdu leurs propriétés fongicides ou alors elles conservaient une bonne activité biologique mais la mobilité obtenue était décevante. Activité biologique et systémie semblent difficiles à concilier. Dans ce travail, nous avons montré qu'il était possible de conserver les propriétés antifongiques de la molécule initiale tout en conférant une bonne mobilité phloémienne à une structure qui au départ en était totalement dépourvue, ceci en misant sur la stratégie profongicide.

L'APPROCHE PROFONGICIDE PHLOÈME MOBILE, UNE STRATÉGIE À DÉVELOPPER CHEZ LA PLANTE

Les prodrogues sont depuis longtemps utilisées dans le domaine médical. Un exemple classique est celui de la pivampicilline ou de la bacampicilline qui sont des proantibiotiques stables dans le milieu acide stomacal et qui libèrent ensuite dans le sang l'antibiotique actif, à savoir l'ampicilline. En revanche, cette approche n'a pratiquement pas été développée pour la mise au point de fongicides phloème mobiles. À l'opposé de notre démarche, le fosétyl-Al, un activateur indirect des réactions de défense, est l'un des aboutissements particulièrement heureux de la méthode de synthèse en aveugle.

Nous avons opté pour la stratégie des profongicides à systémie phloémienne avec les dérivés acides N-substitués du fenciclonil sur la base des travaux de Nyfeler et Ackerman (1992). Toutefois, il convient maintenant de préciser si le N-(1-carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole est réellement un profongicide phloème mobile ou un fongicide maintenant nanti de cette propriété.

Nous avons montré qu'une telle approche peut être développée chez la plante, avec les associations de type pesticide-acide aminé. Les conjugués étudiés sont de taille et de lipophilie variables mais cela n'entrave pas le franchissement de la membrane plasmique et leur transport à longue distance dans le phloème. En effet, les conjugués sont tous, à des degrés divers, manipulés et transportés par des perméases du plasmalemme. En revanche, les enzymes qui assurent la scission de ces conjugués pour libérer le produit initial sont relati-

vement spécifiques. Il faudra donc en tenir compte pour la conception de futures molécules. Dans l'état actuel de nos connaissances, l'enchaînement aryl-O-CH₂-CO-NH-CH₂ semble favorable à la scission enzymatique. L'exemple du conjugué alcool triazolique-acide aspartique montre, par ailleurs, que ce conjugué est aisément scindé suite à une activité estérasique.

LES FONGICIDES ET LES CONJUGUÉS QUE NOUS AVONS SYNTHÉTISÉS, AINSI QUE LES ACTIVATEURS DE DÉFENSE ÉTUDIÉS PÉNÈTRENT DANS LE PHLOÈME SELON DIVERSES VOIES

Une des principales étapes limitantes pour l'obtention de xénobiontes mobiles dans le phloème est le franchissement de la membrane plasmique en particulier celle du complexe cellule compagne-cellule criblée. Nous avons montré, dans ce travail, que plusieurs voies peuvent être empruntées :

- Les molécules comportant une fonction acide carboxylique dans leur structure (les dérivés du fenpiclonil que nous avons synthétisés) franchissent la membrane plasmique grâce à un processus de diffusion. Ils demeurent ensuite dans le phloème par le mécanisme de piègeage d'acide et sont entraînés par le courant de sève phloémienne (Fig. 1).

- Nous avons également mis en évidence que la synthèse de molécules leurrant les perméases qui reconnaissent la fonction α -aminoacide était une stratégie tout à fait envisageable pour le franchissement de la membrane plasmique du complexe conducteur (Fig. 1). Le fait le plus remarquable est que tous les conjugués synthétisés sont manipulés, certes à des degrés divers, par des transporteurs. Il nous reste à préciser le type de perméases impliqué. Les effets compétiteurs observés entre les acides aminés aromatiques et certains de nos conjugués suggèrent que ces diverses molécules sont manipulées par les mêmes perméases. Pour préciser ce point, ce travail sera poursuivi en étudiant l'absorption de conjugués tritiés par des mutants de levure exprimant le transporteur ANT1 responsable de l'accumulation des acides aminés aromatiques.

- Les médicaments acides (dont l'aspirine), de structure et de masse moléculaire très variables, sont manipulés dans la cellule animale par des transporteurs d'acides monocarboxyliques. Ceci nous a conduit à nous intéresser au transport de l'acide salicylique, une molécule signal importante impliquée dans la mise en place de la résistance systémique acquise. De plus, des analogues de synthèse sont utilisés pour la protection des cultures. Les propriétés physicochimiques de l'AS sont certes compatibles avec une bonne systémie phloémienne via le mécanisme de piégeage d'acides (Yalpani *et al.*, 1991) (Fig 1). Toutefois, outre les deux points rappelés à l'instant (l'absence de corrélation entre le pourcentage de forme non dissociée de l'AS et la systémie phloémienne aux pH proches de la neutralité ; la discordance entre les prédictions de non-mobilité et le constat d'une mobilité phloémien-

ne avérée d'un analogue de l'AS), l'effet compétiteur de l'acide gallique (molécule non phytotoxique à la dose utilisée) sur l'influx de l'AS dans le phloème suggère que cette dernière molécule pénètre aussi dans le complexe conducteur via un système de transporteurs (Fig 1). Cette hypothèse mérite évidemment d'être examinée.

Edgington LV (1981) Structural requirements of systemic fungicides. *Ann Rev Phytopathol* **19**: 107-124

Kleier DA, Grayson BT, Hsu FC (1998) The phloem mobility of pesticides. *Pesticide Outlook* **9**: 26-30

Nyfelner R, Ackermann P (1992) Phenylpyrroles, a new class of agricultural fungicides related to the natural antibiotic pyrrolnitrin. In DR Baker, JG Fenyes, JJ Steffens, eds, *Synthesis and chemistry of agrochemicals*, Ed American Chemical Society Washington, DC Vol III

Smith PH, Chamberlain K, Sugars JM, Bromilow RH (1995) Fungicidal activity of N-(2-cyano-2-methoximinoacetyl)amino acids and their derivatives. *Pestic Sci* **44**: 219-224

Yalpani N, Silverman P, Wilson TM, 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

Table des illustrations

Historique

Figure 1. Réaction d'incompatibilité et place des luttes génétique et chimique	8
Figure 2. Substances multi-sites	10
Figure 3. La phosphorylation oxydative	11
Figure 4. Inhibiteurs du complexe III mitochondrial	12
Figure 5. Découplants de la phosphorylation oxydative	12
Figure 6. Inhibiteur de la production d'ATP	13
Figure 7. Inhibiteurs de la NADH cytochrome c réductase	13
Figure 8. Inhibiteur de la peroxydation des lipides	13
Figure 9. Voies de biosynthèse des stérols chez les champignons	14
Figure 10. Inhibiteurs de la 14 α -déméthylase	15
Figure 11. Inhibiteur de la 3-cétoréductase	15
Figure 12. Substances agissant sur la formation des parois cellulaires	15
Figure 13. Substance agissant au niveau des protéines G	16
Figure 14. Substances agissant sur la transduction de signaux osmotiques	16
Figure 15. Inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine	16
Figure 16. Inhibiteurs de la formation des microtubules et des divisions cellulaires	17
Figure 17. Inhibiteurs du complexe II mitochondrial	18
Figure 18. Inhibiteurs du complexe III mitochondrial	18
Figure 19. Perturbateur de la perméabilité membranaire	19
Figure 20. Inhibiteurs de la 14 α -déméthylase	19
Figure 21. Inhibiteurs de la $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -isomérase et de la Δ^{14} -réductase	20
Figure 22. Inhibiteurs de la synthèse d'ARN	21
Figure 23. Inhibiteur de la synthèse d'ADN	21
Figure 24. Inhibiteur de la biosynthèse de méthionine	21
Figure 25. Substances affectant l'assemblage de la β -tubuline	22
Figure 26. Métabolisme du fosétyl-Al	22
Figure 27. L'acide salicylique et des analogues fonctionnels	23
Figure 28. Site d'action de l'acibenzolar-S-méthyl (CGA 245704) dans la voie de transduction de signal de la RSA	24
Figure 29. Spectre d'action de l'activation de la RSA par l'acibenzolar-S-méthyl (ASM) vis-à-vis de maladies du tabac	24
Figure 30. Le probénazole et ses métabolites	25

Figure 31. Les différents types de systémie	26
Figure 32. Schématisation de la circulation des sèves chez le végétal	27
Figure 33. Reconstitution de la structure des tubes criblés (TC) et des cellules compagnes (CC) dans <i>Vicia faba</i>	28
Figure 34. Diffusion simple, diffusion contrôlée par un canal, transport le long du gradient de concentration assuré par un transporteur et transport actif primaire	30
Figure 35. Les deux catégories de transport secondaire	31
Figure 36. Vue schématique de plasmodesmes simples	31
Figure 37. Mécanismes du transport de nutriments à travers la membrane plasmique du complexe tube criblé-cellule compagne et de quelques xénobiontes	34

Matériel et méthodes

Tableau 1. Choix des tampons utilisés	39
Figure 38. Les étapes du test de mobilité phloémienne chez le ricin	40

Résultats

Figure 1. Représentation graphique du log D en fonction du pH pour le conjugué acide salicylique-lysine.	104
Figure 2. Représentation graphique du log D en fonction du pH pour le conjugué acide 3,5-dichlorobenzoïque-lysine.	110
Figure 3. 1-(4-Chlorophényl)-2-[(1H)-1,2,4-triazol-1-yl] éthanol et son conjugué avec l'acide aspartique	110
Figure 4. Croissance du champignon <i>Eutypa lata</i> au bout de 7, 14 et 21 jours de culture en présence de 1-(4-chlorophényl)-2-[(1H)-1,2,4-triazol-1-yl] éthanol	111
Tableau I. Systémie et métabolisme du 1-(4-Chlorophényl)-2-[(1H)-1,2,4-triazol-1-yl]-éthanol et de son conjugué avec l'acide aspartique. La sève phloémienne est collectée pendant les 3 ^e et 4 ^e heures d'incubation. Moyenne \pm ES, n \geq 10.	111
Tableau II. Systémie et métabolisme du conjugué acide salicylique-lysine	112
Tableau III. Structure des conjugués étudiés.	113
Figure 5. Systémie et métabolisme de conjugués de type xénobionte-acide aminé	114

Conclusion

Figure 1. Mécanismes de l'influx, dans le complexe conducteur du phloème, de xénobiontes et de molécules naturelles impliquées dans la défense des plantes.	146
---	-----

Résumé

L'agriculture a besoin de fongicides ayant la propriété d'être transportés par le phloème pour contrôler des pathogènes vasculaires et racinaires. Jusqu'à présent, les tentatives de modulation structurale de fongicides pour les rendre phloème mobiles ont généralement eu comme conséquence une perte d'activité biologique.

La première approche de notre travail reprend la stratégie utilisée avec succès pour le développement d'herbicides auxiniques. Nous avons choisi comme molécule modèle le fenpiclonil en raison de la possibilité d'ajouter un groupe acide carboxylique en divers sites de la molécule. L'un de ces dérivés, le N-(1-carboxyéthyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophényl)pyrrole possède une mobilité phloémienne modérée et montre une activité fongicide contre une souche d'*Eutypa lata* comparable à celle du fenpiclonil.

La deuxième stratégie a consisté à synthétiser des propesticides mobiles dans le phloème en greffant un acide aminé à divers xénobiontes ou à des composés naturels impliqués dans la défense des plantes. Ces conjugués avec une fonction α -aminoacide sont manipulés par des perméases de la membrane plasmique et sont nettement phloème mobiles. Toutefois, les enzymes qui peuvent libérer le composé initial peuvent être plus spécifiques que le système de transport.

Enfin, la capacité du phloème de ricin à charger l'acide salicylique (AS) a été étudiée pour deux raisons : 1- l'AS est une molécule signal importante impliquée dans la résistance systémique acquise 2- dans les cellules animales, l'AS est manipulé par un système de transport qui manipule aussi des médicaments de taille importante. L'AS s'accumule fortement dans le phloème et est ambimobile. Quelques résultats conduisent à l'hypothèse de l'intervention d'un système de transporteurs dépendant du pH et contribuant au chargement phloémien de l'AS, outre le phénomène de piégeage d'acide.

Mots clés : systémie, phloème, *Eutypa lata*, *Ricinus communis*, phénylpyrrole, fenpiclonil, conjugués xénobionte - α -aminoacide, acide salicylique

Summary

The development of fungicides that are translocated in the phloem to control root and vascular diseases has long been needed. Attempts to derivatize fungicides to make them phloem mobile have generally had the discouraging consequence of decreasing or suppressing their biological activity.

In this work, the first approach to this problem was similar to the successful strategy used in the development of acidic herbicides. 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. One of these derivatives, N-(1-carboxyethyl)-3-cyano-4-(2,3-dichlorophenyl)pyrrole exhibits a moderate phloem mobility and a fungicidal activity against a strain of *Eutypa lata* comparable to that of the parent compound.

The second strategy was to synthesize phloem mobile propesticides by adding an amino acid to various xenobiotics or natural compounds involved in plant defense. These conjugates, with an α -amino acid function, are translocated by plasma membrane permeases and clearly move in the phloem. However, the enzymes which may release the parent compounds may be more specific than the carrier system.

Finally, the capacity of *Ricinus* phloem to load salicylic acid (SA) was investigated for two motives: 1- SA is an important signal molecule involved in the acquired systemic resistance in plants, 2- in animal cells, SA is manipulated by a carrier system which also translocates drugs of larger size. SA strongly accumulates in the phloem and is ambimobile. In addition to the ion trap mechanism, some data rise the hypothesis of a pH dependent carrier system involved in SA phloem loading.

Keywords: systemicity, phloem, *Eutypa lata*, *Ricinus communis*, phenylpyrrole, fenpiclonil, xenobiotic - α -amino acid conjugates, salicylic acid