



**HAL**  
open science

**Influence du pH, d'acides aminés et de diverses substances organiques sur la fongitoxicité du pyriméthanil, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fenpiclonil vis-à-vis de certaines souches de *Botrytis cinerea***

Pierre P. Leroux

► **To cite this version:**

Pierre P. Leroux. Influence du pH, d'acides aminés et de diverses substances organiques sur la fongitoxicité du pyriméthanil, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fenpiclonil vis-à-vis de certaines souches de *Botrytis cinerea*. *Agronomie*, 1994, 14 (8), pp.541-554. hal-02701384

**HAL Id: hal-02701384**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02701384>**

Submitted on 1 Jun 2020

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

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

# Influence du pH, d'acides aminés et de diverses substances organiques sur la fongitoxicité du pyriméthanol, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fenpiclonil vis-à-vis de certaines souches de *Botrytis cinerea*

P Leroux

INRA, centre de Versailles, unité de phytopharmacie et des médiateurs chimiques, route de Saint-Cyr,  
F78026 Versailles cedex, France

(Reçu le 7 juillet 1994 ; accepté le 2 novembre 1994)

**Résumé** — L'effet du pyriméthanol, du fenpiclonil, du captafol, du glufosinate et du cymoxanil sur l'élongation des filaments germinatifs des spores de *Botrytis cinerea* est étudié dans diverses conditions culturales du champignon. Si le fenpiclonil présente un niveau d'activité stable entre pH 3,6 et 7,3, en revanche les autres pesticides voient leur toxicité chuter dans des milieux acides (ex pyriméthanol) ou neutres à faiblement basiques (ex captafol, cymoxanil, glufosinate). L'adjonction d'extrait de levure, de peptone ou d'hydrolysate de caséine réduit notablement l'activité du pyriméthanol, du captafol, du glufosinate et du cymoxanil mais pas celle du fenpiclonil. Une analyse détaillée des acides aminés indique que ceux possédant un atome de soufre sont plus ou moins antagonistes du pyriméthanol, du cymoxanil, du glufosinate et du captafol. Si, pour les 3 premiers pesticides, cet effet protecteur pourrait être corrélé avec une inhibition de la biosynthèse d'acides aminés soufrés, en revanche, pour le captafol c'est une détoxification par les groupes thiols qui intervient. Parmi les autres acides aminés entraînant un net antagonisme il y a la glutamine vis-à-vis du glufosinate, la valine et la leucine vis-à-vis du pyriméthanol ou la glycine et la sérine vis-à-vis du cymoxanil. Les relations entre les effets protecteurs des acides aminés et le mode d'action de ces pesticides chez *B. cinerea* sont évoquées. Les implications de ces résultats dans l'élaboration de méthodes de surveillance de la résistance à certains nouveaux fongicides (ex fenpiclonil, pyriméthanol) sont également discutées.

**pourriture grise / pesticides / antagonisme / acides aminés / pyriméthanol**

**Summary** — Effect of pH, amino acids and various organic compounds on the fungitoxicity of pyrimethanol, glufosinate, captafol, cymoxanil and fenpiclonil in *Botrytis cinerea*. The inhibition of germ-tube elongation by pyrimethanol, fenpiclonil, captafol, glufosinate and cymoxanil was studied in *Botrytis cinerea* cultivated on various media. The activity of fenpiclonil was not influenced by pH (between 3.6 and 7.3) whereas that of the other pesticides was reduced either in acidic conditions (eg, pyrimethanol) or at pH values greater than 6 (eg, glufosinate, captafol, cymoxanil). The addition of yeast extract, peptone or casein-hydrolysate relieved pyrimethanol, glufosinate, cymoxanil and captafol inhibition but not that of fenpiclonil. A detailed study conducted with amino acids indicated that those containing sulphur were antagonistic towards pyrimethanol, cymoxanil, glufosinate and captafol. For the first 3 pesticides, this reversal could be related to an inhibition in the biosynthesis of sulphur-containing amino acids whereas for captafol it was probably due to its reaction with thiols. Among the other amino acids that exhibit alleviatory effects we can men-

*tion glutamine for glufosinate, valine and leucine for pyrimethanil or glycine, and serine for cymoxanil. The relationship between the antagonistic effects of amino acids and the biochemical mode of action of the tested pesticides in B cinerea are evoked. The consequences of the results upon the development of suitable methods for fungicide-resistance monitoring are also discussed.*

**grey mould / pesticide / antagonism / amino acid / pyrimethanil**

## INTRODUCTION

Le pyriméthanil est un fongicide récemment introduit en France pour combattre la pourriture grise de la vigne provoquée par *Botrytis cinerea*. Il appartient comme le mépanipyrin et le cyprodinil à la famille des anilino-pyrimidines (Maeno *et al*, 1990 ; Neumann *et al*, 1992 ; Bocquet *et al*, 1994). Le pyriméthanil affecte principalement l'élongation des filaments germinatifs, ce qui lui confère une action anti-pénétrante vis-à-vis de *B cinerea* (Neumann *et al*, 1992). Quant à la croissance mycélienne, elle est plus ou moins affectée selon la composition du milieu nutritif. Nous avons en particulier constaté que la toxicité du pyriméthanil est réduite en présence d'extrait de levure ou de peptone (Leroux, non publié). Ces observations préliminaires nous ont conduit à étudier l'effet de divers acides aminés sur la fongitoxicité du pyriméthanil vis-à-vis de l'élongation des filaments germinatifs de *B cinerea*. L'influence d'autres molécules organiques (notamment soufrées) et du pH a également été déterminée.

Une connaissance précise de l'effet de divers constituants du milieu de culture de *B cinerea* s'avère être indispensable dans le cadre d'études sur la variabilité de sensibilité de ce champignon au pyriméthanil. En effet, pour établir une ligne de base de la réponse des isolats naturels de *B cinerea* vis-à-vis de ce nouveau fongicide, il convient de disposer de méthodes de *monitoring* fiables. En outre, l'identification des acides aminés susceptibles de réduire la fongitoxicité du pyriméthanil peut orienter les recherches ultérieures sur le mode d'action biochimique de ce fongicide. C'est d'ailleurs par une telle démarche que les effets herbicides du glyphosate, du glufosinate, des sulfonilurées et des imidazolinones ont pu être corrélés avec une inhibition de la biosynthèse d'acides aminés (Scalla et Gauvrit, 1991). Parmi ces composés, seul le glufosinate, un inhibiteur de la glutamine synthase (Kocher, 1989), s'est avéré toxique pour *B cinerea* (Leroux, non publié) et nous avons donc choisi de l'inclure dans notre expérimentation. Par ailleurs, nous avons également testé :

- le cymoxanil, un fongicide dont la toxicité vis-à-vis de *B cinerea* est réduite en présence de sérine ou de glycine (Leroux *et al*, 1987) ;
- le captafol, un fongicide de la famille des chlorométhylmercaptans (dont d'autres représentants sont le captane, le folpel, la dichlofluanide et la tolylfluanide) détoxifié par la cystéine ou le glutathion (Corbett *et al*, 1984) ;
- le fenpiclonil, un phénylpyrrole particulièrement actif sur *B cinerea* (Leroux *et al*, 1992 ; Leroux et Fritz, 1993), susceptible d'interférer avec l'absorption de certains acides aminés (Jespers *et al*, 1993).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les essais sont conduits sur 5 souches de *B cinerea* isolées de vigne et présentant une sensibilité ou une résistance aux fongicides benzimidazoles (ex carben-dazime, bénomyl), phénylcarbammates (ex diéthofencarbe) et dicarboximides (ex iprodione, procymidone, vinchlozoline) (Leroux et Montcombe, 1993). Elles sont maintenues sur un milieu gélosé à base de malt (10 g de Cristomalt Difal et 12,5 g d'agar pour 1 l).

Le pyriméthanil, le glufosinate (sous forme acide), le cymoxanil, le captafol et le fenpiclonil sont des produits techniques titrant au minimum 93% de matière active (fig 1). Ils nous ont été fournis respectivement par Schering Agriculture (Gif-sur-Yvette) ; Hoechst AG (Marseille) ; Du Pont de Nemours SA (Paris), Chevron Services Company (Neuilly-sur-Seine) et Ciba Protection des plantes (Rueil-Malmaison). Les autres substances, notamment les acides aminés (série L), proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier) ou Prolabo (Paris).

Le milieu de base («milieu glucose») est de l'eau gélosée glucosée (10 g glucose et 12,5 g agar pour 1 l d'eau désionisée) ; pour certains essais, du  $K_2HPO_4$  et du  $KH_2PO_4$  sont ajoutés à raison de 2 g/l pour chaque phosphate («milieu glucose-phosphate»). Ces milieux sont autoclavés à 115°C pendant 25 min ; leurs pH respectifs estimés à l'aide de papier dosatest (Prolabo, Paris) sont de l'ordre de 5,7 et 6,4. L'effet du pH sur la fongitoxicité des divers pesticides est analysé en mélangeant après autoclavage, volume à volume, de l'eau gélosée-glucosée (au double des concentrations précédentes) avec des tampons acide citrique/ $Na_2HPO_4$  (20/40 mM) ou  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$  (25/25 mM). Les essais sont conduits pour des valeurs de pH comprises entre 3,6 et 7,3.

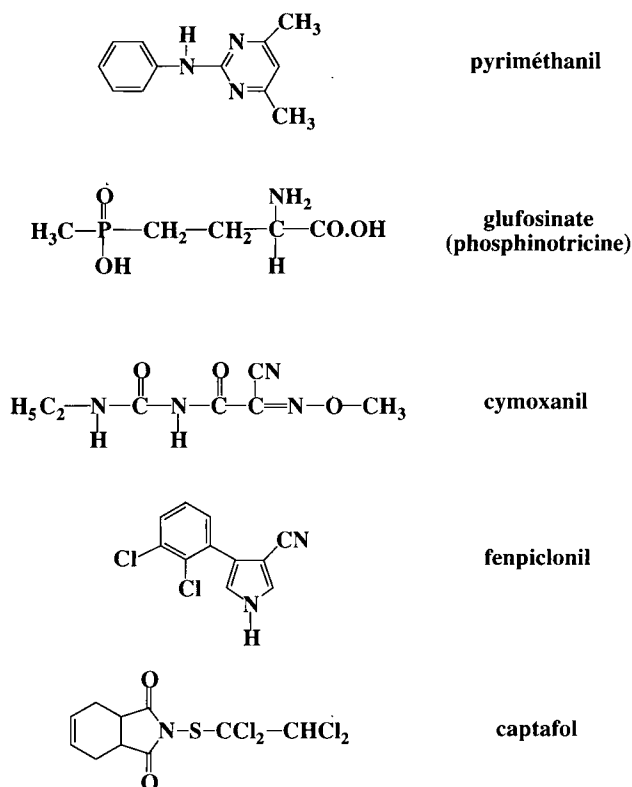


Fig 1. Structures chimiques des pesticides expérimentés sur *B cinerea*.

Les acides aminés et les divers composés étudiés, en solution ou en suspension dans un mélange éthanol/eau (1/1 ; V/V), sont incorporés aux milieux gélosés maintenus à 50°C. Les concentrations finales de ces substances sont comprises entre 0,25 et 1 mM. Quant aux pesticides testés, ils sont incorporés dans les milieux nutritifs sous forme de solutions éthanoliques. La teneur totale en éthanol est inférieure ou égale à 0,5%.

Après homogénéisation les milieux sont distribués dans des boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre (10 ml de milieu par boîte). Après refroidissement, chaque boîte de Petri est inoculée par 0,3 ml d'une suspension de conidies de *B cinerea* titrant 300 000 conidies/ml. L'incubation a lieu pendant 24 h, à 20°C et à l'obscurité, puis des observations sont réalisées au microscope optique. Elles portent sur la longueur des filaments germinatifs qui est mesurée à l'aide d'un micromètre oculaire sur 50 à 100 conidies par condition. Dans quelques essais les pourcentages de germination des conidies sont également estimés.

Ces notations permettent ensuite de déterminer les concentrations en pesticide inhibant de 50% l'élongation des filaments germinatifs de *B cinerea* (CI50). Par ailleurs, il est possible d'estimer les longueurs moyennes des filaments germinatifs pour les conditions ci-après :

Loo : longueur en absence de tout produit ;

Lop : longueur en présence du pesticide «p» seul ;

Lyo : longueur en présence de la substance «y» susceptible d'interférer avec les pesticides étudiés ;

Lyp : longueur en présence simultanée des produits «y» et «p».

$$\text{Les ratios : } \frac{100 \times \text{Lop}}{\text{Loo}} \text{ et } \frac{100 \times \text{Lyp}}{\text{Lyo}}$$

représentent respectivement les pourcentages relatifs d'élongation des filaments germinatifs en absence ou en présence de la substance «y» susceptible d'interférer avec la fongitoxicité de «p».

Une quantification de l'interaction entre les produits «y» et «p» est obtenue en calculant la différence :

$$I = \frac{100 \times \text{Lyp}}{\text{Lyo}} - \frac{100 \times \text{Lop}}{\text{Loo}}$$

L'échelle ci-dessous peut décrire le type d'interaction entre «y» et «p» :

N : neutralité ou absence d'interaction si I est compris entre -12,5 et + 12,5%

A+ : antagonisme faible si I est compris entre 12,5% et 25%

A++ : antagonisme moyen si I est compris entre 25% et 50%

A+++ : antagonisme élevé si I est supérieur à 50%

S : synergie si I est inférieur à -12,5%.

## RÉSULTATS

### Fongitoxicité du pyriméthanil, du glufosinate, du captafol, du fenpiclonil et du cymoxanil

Les composés les plus fongitoxiques (CI50 ≤ 2 µM) tant vis-à-vis de la germination des conidies que de l'élongation des filaments germinatifs sont le captafol, le fenpiclonil et le pyriméthanil. Toutes les souches étudiées présentent une sensibilité équivalente à ces 3 fongicides. Le glufosinate est beaucoup moins actif que les produits précédents ; ainsi les concentrations inhibant de 50% l'élongation des filaments germinatifs sont comprises entre 70 et 110 µM. Enfin le cymoxanil est sans effet sur la germination des conidies, mais il inhibe l'élongation des filaments germinatifs à des concentrations inférieures à 50 µM chez 3 des 5 souches étudiées (L, 6-173E et SV17H). La souche L étudiée antérieurement apparaît la plus sensible (Leroux *et al*, 1987) (tableau I).

Une observation microscopique rapide des filaments germinatifs permet de constater que le captafol, le glufosinate et le pyriméthanil n'entraînent pas de déformations particulières. En

**Tableau I.** Effet du pyriméthanol, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil, et du fenpiclonil, sur la germination des conidies et l'élongation des filaments de 5 souches de *B cinerea* inoculées à un milieu glucose.

Fongicides Effets étudiés	CI50 ( $\mu$ M) vis-à-vis des souches <sup>a</sup>				
	N [Sb, Rp, Sd] <sup>b</sup>	L [Rb, Sp, Sd]	6-173E [Rb, Rp, Sd]	SV17H [Sb, Rp, Rd]	6-85A [Rb, Rp, Rd]
<i>Pyriméthanol</i>					
Conidies	0,8	0,8	1,0	1,2	1,2
Filaments	0,35	0,30	0,35	0,40	0,40
<i>Glufosinate</i>					
Conidies	280	220	330	280	220
Filaments	80	80	110	70	70
<i>Captafol</i>					
Conidies	0,6	0,3	0,3	0,7	0,5
Filaments	0,08	0,06	0,06	0,10	0,08
<i>Cymoxanil</i>					
Conidies	>350	>350	>350	>350	>350
Filaments	>350	5	15	30	>350
<i>Fenpiclonil</i>					
Conidies	0,8	12	1,0	2,0	1,0
Filaments	0,08	0,13	0,13	0,25	0,13

<sup>a</sup> CI50 : concentrations inhibant de 50% la germination des conidies ou l'élongation des filaments germinatifs. <sup>b</sup> Souches sensibles [S] ou résistantes [R] aux fongicides benzimidazoles [b], phénylcarbamatés [p] ou dicarboximides [d].

revanche, le fenpiclonil provoque une forte ramification des filaments et, à des concentrations sub-léthales, ceux-ci peuvent éclater. Ces symptômes décrits antérieurement se retrouvaient également avec les fongicides dicarboximides (Leroux, 1991 ; Leroux *et al*, 1992). Quant au cymoxanil, il induit chez les 3 souches sensibles des déformations et des renflements des filaments germinatifs différents de ceux rencontrés avec des fongicides affectant les microtubules (ex carbendazime, diéthofencarbe) (Leroux et Gredt, 1989).

#### **Effet du pH du milieu de culture**

Pour chaque pesticide, 1 à 3 concentrations, entraînant sur milieu glucose non tamponné (pH voisin de 5,7) des inhibitions de l'élongation des filaments germinatifs comprises entre 62% et 100% sont retenues (tableau II).

Lorsque le pH est inférieur à 4, une nette réduction d'activité du pyriméthanol est observée, alors qu'au contraire le glufosinate et le captafol présentent leur fongitoxicité maximale. Pour ces 2 pesticides l'activité la plus faible est observée soit en milieu légèrement acide pour le glufosinate, soit en milieu neutre ou légèrement basique pour

le captafol. Pour le cymoxanil, chez les 3 souches sensibles (L, 6-173E et SV17H), une diminution d'activité notable est constatée pour des pH supérieurs à 7. Quant au fenpiclonil sa fongitoxicité est peu affectée par le pH (tableau II).

#### **Effet de l'extrait de levure, de la peptone et de l'hydrolysate de caséine**

L'extrait de levure, la peptone et l'hydrolysate de caséine apportés à raison de 0,5 g/l ne modifient pas le pH du milieu glucose. Ils présentent un net antagonisme pour le pyriméthanol, le glufosinate et le captafol. Dans le cas du cymoxanil, les réactions dépendent des souches ; un antagonisme est régulièrement constaté chez les souches 6-173E et SV17H mais pas chez la souche L. Enfin, ces diverses substances sont neutres, voire légèrement synergiques pour le fenpiclonil (tableau III).

#### **Effet des acides mono aminés monocarboxyliques aliphatiques**

L'alanine appliquée à 1 mM a peu ou pas d'effet sur la fongitoxicité du pyriméthanol, du glufosina-

**Tableau II.** Effet du pH sur la fongitoxicité du pyriméthanil, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil, et du fenpiclonil, chez *B. cinerea*.

Milieux de culture <sup>a</sup>	pH	Pourcentages d'inhibition de l'élongation des filaments germinatifs en présence de <sup>b</sup>									
		Pyriméthanil			Glufosinate		Captafol		Cymoxanil		Fenpiclonil
		0,4	0,7	1	80	200	0,3	0,75	20	50	0,3
Tampon A	3,6	0	2	5	100	100	100	100	75	75	75
Tampon A	3,9	4	79	97	96	100	96	100	71	74	70
Tampon A	4,7	75	96	100	67	78	92	100	73	78	69
Glucose	5,7	80	95	100	55	80	92	100	71	77	70
Tampon A	5,8	85	98	100	25	60	77	100	78	81	69
Tampon B	5,8	80	97	100	40	70	80	98	72	80	65
Glucose-phosphate	6,4	74	90	100	45	80	65	95	73	83	74
Tampon B	6,8	88	100	100	44	77	15	32	61	80	75
Tampon A	6,9	81	98	100	36	70	5	12	35	64	75
Tampon B	7,3	85	100	100	57	87	10	7	10	39	78

<sup>a</sup> La composition des milieux de culture est précisée dans le chapitre *Matériel et méthodes*. Les tampons A et B correspondent respectivement à : acide citrique / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. <sup>b</sup> Pour le cymoxanil, les études portent sur les souches L, 6-173E et SV17H, alors que, pour les autres pesticides, elles concernent les 5 souches présentées dans le tableau I. Les concentrations des pesticides sont en µm.

te, du captafol, du fenpiclonil et du cymoxanil. En revanche, la glycine à 1 mM exerce un antagonisme faible à moyen vis-à-vis du cymoxanil (sur les 3 souches sensibles L, 6-173E et SV17H) et du pyriméthanil (tableau IV).

Les acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, isoleucine, valine) n'interfèrent pas avec l'activité du fenpiclonil et du captafol. En revanche, des effets antagonistes faibles à moyens sont observés avec la leucine à 1 mM vis-à-vis du

pyriméthanil et du glufosinate. La valine à 1 mM apparaît plus antagoniste que la leucine vis-à-vis du pyriméthanil, mais elle est neutre pour le glufosinate et légèrement antagoniste pour le cymoxanil. Les effets protecteurs de la valine sont également retrouvés dans un essai conduit sur milieu glucose-phosphate. Quant à l'isoleucine, elle a peu ou pas d'effets sur le glufosinate, le pyriméthanil et le cymoxanil (tableau IV et VI).

**Tableau III.** Effet de 0,5g/l d'extrait de levure, de peptone, et d'hydrolysate de caséine sur la fongitoxicité du pyriméthanil, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil, et du fenpiclonil, chez *B. cinerea* inoculé à un milieu glucose.

Substances testées	Interactions avec les pesticides <sup>a</sup>									
	Pyriméthanil			Glufosinate	Captafol		Cymoxanil <sup>b</sup>		Fenpiclonil	
	0,4	0,7	1	200	0,3	0,75	20	50	0,3	
Extrait de levure	A <sup>++</sup> -A <sup>+++</sup>	A <sup>++</sup> -A <sup>+++</sup>	A <sup>++</sup>	A <sup>+++</sup>	A <sup>++</sup>	N	A <sup>++</sup> /A <sup>+</sup>	A <sup>++</sup> /N	N	
Peptone	A <sup>++</sup>	A <sup>+</sup> -A <sup>++</sup>	A <sup>+</sup> -A <sup>++</sup>	A <sup>+++</sup>	A <sup>+</sup> -A <sup>++</sup>	N	A <sup>++</sup> /N	N/S	S-N	
Hydrolysate de caséine	A <sup>++</sup>	A <sup>++</sup>	A <sup>+</sup> -A <sup>++</sup>	A <sup>+++</sup>	A <sup>++</sup>	N-A <sup>+</sup>	A <sup>++</sup> /N	A <sup>+</sup> /N	S-N	

<sup>a</sup> Les modalités de détermination des interactions entre les pesticides et les substances testées sont précisées dans le chapitre *Matériel et méthodes*. [A: antagonisme qui peut être faible (A<sup>+</sup>), moyen (A<sup>++</sup>) ou élevé (A<sup>+++</sup>) ; N neutralité ; S synergie]. Pour le cymoxanil, les études portent sur les souches L, 6-173E, et SV17H, alors que, pour les autres pesticides, elles concernent les 5 souches présentées dans le tableau I. Les concentrations des pesticides sont en µM. <sup>b</sup> Les interactions avant la barre inclinée concernent les souches 6-173E et SV17H tandis que celles après concernent la souche L.

**Tableau IV.** Effet d'acides monoaminés monocarboxyliques aliphatiques sur la fongitoxicité du pyriméthanol du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fenpiclonil, chez *B cinerea* inoculé à un milieu glucose.

Acides aminés (1mM)	Interactions avec les pesticides <sup>a</sup>							
	Pyriméthanol			Glufosinate	Captafol		Cymoxanil	Fenpiclonil
	0,4	0,7	1	200	0,3	0,75	50	0,3
Alanine	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	N	N	N	N
Glycine	A <sup>+</sup> -A <sup>++</sup>	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	N	A <sup>++</sup>	N
Isoleucine	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	N	N	N	N
Leucine	A <sup>+</sup> -A <sup>++</sup>	A <sup>+</sup>	N-A <sup>+</sup>	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	N
Valine	A <sup>++</sup>	A <sup>+</sup> -A <sup>++</sup>	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	N-A <sup>+</sup>	N
Thréonine	N	N	N	N	N	N	N	N
Sérine	N	N	N	N	N	N	A <sup>+</sup> -A <sup>++</sup>	N
Homosérine	N-A <sup>+</sup>	N	N	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	N

<sup>a</sup> Les modalités de détermination des interactions entre les pesticides et les substances testées sont précisées dans le chapitre *Matériel et méthodes*. [A: antagonisme qui peut être faible (A<sup>+</sup>), moyen (A<sup>++</sup>) ou élevé (A<sup>+++</sup>) ; N neutralité ; S synergie]. Pour le cymoxanil, les études portent sur les souches L, 6-173E, et SV17H, alors que, pour les autres pesticides, elles concernent les 5 souches présentées dans le tableau I; Les concentrations des pesticides sont en µm.

Parmi les acides aminés hydroxylés, seule la thréonine à 1 mM est neutre vis-à-vis de l'ensemble des pesticides étudiés. Avec la sérine à 1mM un antagonisme s'observe uniquement pour le cymoxanil (chez les 3 souches sensibles). Quant à l'homosérine, entre 0,5 et 1 mM, elle a un léger antagonisme vis-à-vis du pyriméthanol et du glufosinate mais demeure neutre pour le cymoxanil, le fenpiclonil et le captafol (tableau IV).

#### **Effet des acides dicarboxyliques et de leurs amides**

Le glutamate et l'aspartate appliqués à 0,5 mM sous leur forme libre entraînent une acidification du milieu glucose. Dans ces conditions, ils sont nettement antagonistes pour le pyriméthanol et entraînent une synergie vis-à-vis du glufosinate. Ces 2 acides aminés utilisés sous forme de sels ne modifient pas le pH du milieu glucose et ne possèdent plus d'effet protecteur notable vis-à-vis du pyriméthanol mais ils apparaissent antagonistes pour le glufosinate (tableau V). Des résultats similaires sont obtenus lorsque le glutamate et l'aspartate sont incorporés sous forme libre dans un milieu glucose-phosphate dont le pH est maintenu vers 6,4 (tableau VI). Quant au fenpiclonil, au captafol et au cymoxanil, leur fongitoxicité n'est pas affectée par ces 2 acides aminés (tableau V).

La glutamine (amide du glutamate) à 0,5 et 1mM apparaît très antagoniste pour le glufosinate alors qu'elle est sans effet vis-à-vis des 4 autres pesticides. L'asparagine (amide de l'aspartate) à 1 mM n'affecte pas notablement la fongitoxicité des 5 pesticides expérimentés (tableau V).

#### **Effet des acides aminés basiques**

La lysine, l'arginine et l'histidine utilisés à 1 mM sous leur forme libre alcalinisent le milieu glucose. Dans ces conditions, ils sont antagonistes pour le glufosinate, le captafol et le cymoxanil, neutres pour le fenpiclonil et légèrement synergiques vis-à-vis du pyriméthanol. Ces 3 acides aminés, sous forme de chlorhydrates, n'ont pas d'effets notables sur le pH du milieu glucose et sont dépourvus d'effet protecteur vis-à-vis des 5 pesticides expérimentés (tableau VII).

Parmi les précurseurs de l'arginine, l'ornithine (sous forme de chlorhydrate) et la citrulline à 1 mM ne modifient pas notablement le pH du milieu glucose et sont neutres vis-à-vis du cymoxanil, du glufosinate, du captafol et du fenpiclonil. Pour le pyriméthanol un effet protecteur est observé avec l'ornithine mais pas avec la citrulline (tableau VII). Cet antagonisme de l'ornithine est également retrouvé sur milieu glucose-phosphate (tableau VI).

**Effet d'acides aminés cycliques**

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryphophane) en mélange à 0,5 mM sont neutres pour le pyriméthanil, le captafol, le

fencliclonil et le cymoxanil mais faiblement antagonistes vis-à-vis du glufosinate (résultats non présentés). Étudiés séparément, seuls le tryphophane et la tyrosine exercent un effet protecteur sur le glufosinate. Quant à la proline elle demeure

**Tableau V.** Effet d'acides aminés dicarboxyliques et de leurs amides sur la fongitoxicité du pyriméthanil du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fencliclonil, chez *B. cinerea* inoculé à un milieu glucose.

Acides aminés <sup>a</sup> (0,5mM)	Interactions avec les pesticides <sup>b</sup>							
	Pyriméthanil			Glufosinate	Captafol		Cymoxanil	Fencliclonil
	0,4	0,7	1	200	0,3	0,75	50	0,3
Glutamate	A <sup>++</sup>	A <sup>+</sup>	N-A <sup>+</sup>	S	S-N	N	N	N
Glutamate, Na	N-A <sup>+</sup>	N	N	A <sup>+</sup>	N	N	N	N
Aspartate	A <sup>++</sup>	A <sup>+</sup>	N-A <sup>+</sup>	S	S-N	N	N	N
Aspartate, K	N	N	N	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	N
Glutamine	S-N	N	N	A <sup>+++</sup>	N	N	N	N
Asparagine	N	N	N	S-N	N	N	N	N

<sup>a</sup> Le glutamate et l'aspartate entraînent une acidification du milieu de culture (pH entre 4,5 et 4,8) tandis que les autres composés sont sans effet (pH voisin de 5,7 comme le milieu glucose seul). <sup>b</sup> Les modalités de détermination des interactions entre les pesticides et les substances testées sont précisées dans le chapitre *Matériel et méthodes*. [A: antagonisme qui peut être faible (A<sup>+</sup>), moyen (A<sup>++</sup>) ou élevé (A<sup>+++</sup>); N neutralité; S synergie]. Pour le cymoxanil, les études portent sur les souches L, 6-173E, et SV17H, alors que, pour les autres pesticides, elles concernent les 5 souches présentées dans le tableau I. Les concentrations des pesticides sont en µm.

**Tableau VI.** Effet d'acides aminés et de divers composés soufrés sur la fongitoxicité du pyriméthanil, du glufosinate, du captafol et du cymoxanil, chez *B. cinerea* inoculé à un milieu glucose-phosphate.

Composés testés <sup>a</sup>	Interactions avec les pesticides <sup>b</sup>							
	Pyriméthanil			Glufosinate	Captafol		Cymoxanil <sup>c</sup>	
	0,4	0,7	1	200	0,3	0,75	20	50
Valine	A <sup>++</sup>	A <sup>+</sup>	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	A <sup>+</sup>	N
Aspartate	N	N	N	A <sup>++</sup>	nt(c)	nt	nt	nt
Glutamate	N-A <sup>+</sup>	N	N	A <sup>++</sup> -A <sup>+++</sup>	nt	nt	nt	nt
Ornithine, HCl	A <sup>+</sup> -A <sup>+++</sup>	A <sup>+</sup>	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	N	N
Cystéine *	N-A <sup>+</sup>	N	N	A <sup>+++</sup>	A <sup>+++</sup>	A <sup>+++</sup>	A <sup>+</sup> -A <sup>+++</sup> /N	A <sup>+</sup> /N
Cystine	A <sup>+</sup>	N	N	A <sup>+++</sup>	N	N	N	N
Homocystéine *	A <sup>++</sup>	A <sup>+</sup>	N	A <sup>++</sup>	A <sup>+++</sup>	A <sup>+++</sup>	A <sup>+</sup> -A <sup>+++</sup> /N	A <sup>+</sup> /N
Homocystine	A <sup>+</sup> -A <sup>+++</sup>	N-A <sup>+</sup>	N	A <sup>+</sup> -A <sup>+++</sup>	N-A <sup>+</sup>	N	A <sup>+</sup> -A <sup>+++</sup>	N-A <sup>+</sup>
Méthionine	A <sup>++</sup>	A <sup>+</sup>	N	A <sup>+++</sup>	N	N	A <sup>+</sup> -A <sup>+++</sup>	N-A <sup>+</sup>
Glutathion-réduit	N	N	N	N	A <sup>+++</sup>	A <sup>+++</sup>	A <sup>+</sup> -A <sup>+++</sup> /N	A <sup>+</sup> /N
Dithiothréitol	N	N	N	N	A <sup>+++</sup>	A <sup>+++</sup>	A <sup>+</sup> -A <sup>+++</sup> /N	N

<sup>a</sup> Les composés marqués d'une étoile sont utilisés à 0,25 mM et les autres à 0,5 mM. Ils ne modifient pas le pH du milieu glucose-phosphate qui reste voisin de 6,4. <sup>b</sup> Les modalités de détermination des interactions entre les pesticides et les divers composés étudiés sont précisées dans le chapitre *Matériel et méthodes*. [A: antagonisme qui peut être faible (A<sup>+</sup>), moyen (A<sup>++</sup>) ou élevé (A<sup>+++</sup>); N neutralité; S synergie]. Pour le cymoxanil, les études portent sur les souches L, 6-173E, et SV17H, alors que, pour les autres pesticides, elles concernent les 5 souches présentées dans le tableau I. Les concentrations des pesticides sont en µm. <sup>c</sup> Pour la cystéine, l'homocystéine, le glutathion-réduit et le dithiothréitol les interactions avant la barre inclinée concernent les souches 6-173E et SV17H tandis que celles après concernent la souche L.



**Tableau VII.** Effet d'acides aminés basiques sur la fongitoxicité du pyriméthanol, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fenpiclonil, chez *B cinerea* inoculé à un milieu glucose.

Acides aminés <sup>a</sup> (1mM)	Interactions avec les pesticides <sup>b</sup>							
	Pyriméthanol			Glufosinate	Captafol		Cymoxanil	Fenpiclonil
	0,4	0,7	1	200	0,3	0,75	50	0,3
Arginine	S	N	N	A+++	A+++	A+++	A+	N
Arginine, HCl	N	N	N	N	N	N	N	N
Lysine	S	N	N	A+++	A+++	A+++	A+	N
Lysine, HCl	N	N	N	N	N	N	N	N
Histidine	S	N	N	A++	A++-A+++	A+-A++	N-A+	N
Histidine, HCl	N	N	N	N	N	N	N	N
Ornithine, HCl	A+-A++	N-A+	N	N-A+	A-A+	N	N	N
Citrulline	N-A+	N	N	N-A+	N	N	N	N

<sup>a</sup> L'arginine, la lysine et l'histidine entraînent une alcalinisation du milieu de culture (pH voisin de 7,3 pour l'arginine et la lysine et de 6,5 pour l'histidine) tandis que les autres composés sont sans effet (pH voisin de 5,7 comme le milieu glucose seul). <sup>b</sup> Les modalités de détermination des interactions entre les pesticides et les substances testées sont précisées dans le chapitre *Matériel et méthodes*. [A: antagonisme qui peut être faible (+), moyen (A++) ou élevé (A+++); N neutralité; S synergie]. Pour le cymoxanil, les études portent sur les souches L, 6-173E, et SV17H, alors que, pour les autres pesticides, elles concernent les 5 souches présentées dans le tableau I. Les concentrations des pesticides sont en µm.

**Tableau VIII.** Effet d'acides aminés cycliques sur la fongitoxicité du pyriméthanol, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fenpiclonil, chez *B cinerea* inoculé à un milieu glucose.

Acides aminés (1mM)	Interactions avec les pesticides <sup>a</sup>							
	Pyriméthanol			Glufosinate	Captafol		Cymoxanil	Fenpiclonil
	0,4	0,7	1	200	0,3	0,75	50	0,3
Phénylalanine	N	N	N	N	N	N	N	N
Tyrosine	N	N	N	A+-A++	N	N	N	N
Tryptophane	N	N	N	A+	N	N	N	N
Proline	N	N	N	N	N	N	N	N

<sup>a</sup> Les modalités de détermination des interactions entre les pesticides et les substances testées sont précisées dans le chapitre *Matériel et méthodes*. [A: antagonisme qui peut être faible (A+), moyen (A++) ou élevé (A+++); N neutralité; S synergie]. Pour le cymoxanil, les études portent sur les souches L, 6-173E, et SV17H, alors que, pour les autres pesticides, elles concernent les 5 souches présentées dans les tableaux I et II. Les concentrations des pesticides sont en µm.

re neutre vis-à-vis des 5 pesticides étudiés (tableau VIII).

#### **Effet d'acides aminés soufrés et de molécules organiques à groupement thiol**

La méthionine, pour des concentrations comprises entre 0,25 et 1mM, entraîne un net effet protecteur vis-à-vis du glufosinate et du pyrimé-

thanol. Un léger antagonisme s'observe également pour le cymoxanil mais pas pour le fenpiclonil et le captafol (tableau IX). À 0,5 mM la cystathionine, un précurseur de la méthionine, est nettement antagoniste du glufosinate mais elle ne l'est que très légèrement pour le pyriméthanol (tableau IX).

La cystéine et l'homocystéine appliquées dans le milieu glucose sont sans effet sur le pH mais sont toxiques pour *B cinerea* même à 0,25 mM.

**Tableau IX.** Effet d'acides aminés soufrés et de divers composés à groupement thiol sur la fongitoxicité du pyriméthanol du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fenpiclonil, chez *B cinerea* inoculé à un milieu glucose.

Composés soufrés <sup>a</sup>	Interactions avec les pesticides <sup>b</sup>								
	Pyriméthanol			Glufosinate	Captafol		Cymoxanil		Fenpiclonil
	0,4	0,7	1	200	0,3	0,75	20	50	0,3
Cystéine*	A+++	A++	A+	A+++	A+++	A+++	A+-A+++	A+-A++	N
Cystine	A+-A+++	A++	A+	A+-A+++	N-A+	N	N-A+	N	N
Homocystéine*	A++	A+-A+++	A+-A++	A++++	A+++	A+++	A+-A++	A+	N
Homocystine	A++	A+-A++	A+	A++	N-A+	N	A+	N-A+	N
Méthionine	A++	A+	N-A+	A+-A+++	N	N	A+-A++	N-A+	N
Cystathionine	N-A+	N	N	A+-A+++	N	N	A+-A++	N-A+	N
Glutathion-réduit	A++	A++	N-A+	S-N	A+++	A+++	A+/N <sup>c</sup>	A+/N	S-N
2-Mercaptoéthanol	N	N	N	N	A+++	A+++	A+/N	A+-A+/N	N
Dithiothréitol	A++	N-A++	N-A+	S-N	A+++	A+++	nt <sup>d</sup>	A+/N	N

<sup>a</sup> Les composés soufrés marqués d'une étoile\* sont utilisés à 0,25 mM et les autres à 0,5 mM. Le glutathion-réduit entraîne une acidification du milieu de culture (pH voisin de 4,8) tandis que les autres composés sont sans effet (pH voisin de 5,7 comme le milieu glucose seul). <sup>b</sup> Les modalités de détermination des interactions entre les composés soufrés sont précisées dans le chapitre *Matériel et méthodes*. [A: antagonisme qui peut être faible (A+), moyen (A++) ou élevé (A+++); N neutralité; S synergie. Pour le cymoxanil, les études portent sur les souches L, 6-173E, et SV17H, alors que, pour les autres pesticides, elles concernent les 5 souches présentées dans le tableau I. Les concentrations des pesticides sont en µm. <sup>c</sup> Pour le glutathion-réduit, le 2-mercaptoéthanol, et le dithiothréitol les interactions avant la barre inclinée concernent les souches 6-173E et SV17H, tandis que celles après concernent la souche L. <sup>d</sup> nt; non testé.

Néanmoins, dans ces conditions, ces 2 acides aminés sont antagonistes pour le pyriméthanol, le glufosinate, le captafol et le cymoxanil (chez les 3 souches sensibles) (tableau IX). Testés dans un milieu glucose-phosphate, l'antagonisme de la cystéine vis-à-vis du pyriméthanol est fortement réduit mais pas celui de l'homocystéine (ces 2 composés soufrés sont peu toxiques pour *B cinerea* dans le milieu glucose-phosphate). En outre, l'effet protecteur de ces 2 acides aminés vis-à-vis du cymoxanil se maintient chez les souches 6-173E et SV17H mais disparaît chez la souche L (tableau VI). Quant à la cystine et à l'homocystine qui sont les formes oxydées de la cystéine et de l'homocystéine, elles sont bien tolérées par *B cinerea* quel que soit le milieu de culture. À 0,5 mM elles sont nettement antagonistes pour le pyriméthanol et le glufosinate mais pas pour le captafol. Avec le cymoxanil, quelles que soient les souches, l'homocystine est régulièrement antagoniste alors que ce n'est pas le cas pour la cystine (tableaux VI et IX). L'ensemble de ces acides aminés soufrés apparaît neutre pour le fenpiclonil (tableau IX).

Le glutathion-réduit affecte peu le développement de *B cinerea* bien qu'il possède comme la cystéine et l'homocystéine un groupement thiol.

À la différence de ces 2 aminés soufrés, le glutathion acidifie le milieu glucose et, à 0,5 mM, il est antagoniste pour le pyriméthanol et le captafol, synergique pour le glufosinate et neutre vis-à-vis du fenpiclonil. Avec le cymoxanil un effet protecteur s'observe chez les souches 6-173E et SV17H mais pas de la souche L (tableau IX). Dans le milieu glucose-phosphate, dont le pH est maintenu à 6,4, l'antagonisme du glutathion pour le pyriméthanol disparaît, alors qu'il se maintient pour le cymoxanil et le captafol (tableau VI). Le 2-mercaptoéthanol et le dithiothréitol sont des substances comportant des groupements thiols, sans analogie avec les acides aminés précédents; à des concentrations inférieures à 0,5 mM, ils n'acidifient pas le milieu glucose. Dans ces conditions, ces 2 composés sont antagonistes pour le captafol et le cymoxanil (uniquement pour les souches 6-173E et SV17H). Vis-à-vis du pyriméthanol, le dithiothréitol est nettement antagoniste sur milieu glucose alors que cet effet disparaît en présence de phosphates. Quant au 2-mercaptoéthanol, il ne présente aucune action protectrice. Enfin, la fongitoxicité du fenpiclonil et du glufosinate n'est pas réduite en présence de ces 2 composés soufrés (tableaux VI et IX).

**Tableau X.** Effet du pyridoxal- phosphate et du  $\delta$ -aminolévulinate, HCl sur la fongitoxicité du pyriméthanol, du glufosinate, du captafol, du cymoxanil et du fenpiclonil chez *B cinerea*.

Milieu de culture <sup>a</sup> Composés testés (0,5 mM)	Interaction avec les pesticides <sup>b</sup>								
	Pyriméthanol			Glufosinate	Captafol		Cymoxanil		Fenpiclonil
	0,4	0,7	1	200	0,3	0,75	20	50	0,3
<i>Glucose</i>									
Pyridoxal-phosphate	A <sup>++</sup> -A <sup>+++</sup>	A <sup>++</sup> -A <sup>+++</sup>	A <sup>+</sup>	S	N	N	N	N	N
$\delta$ -aminolévulinate, HCl	A <sup>++</sup> -A <sup>+++</sup>	A <sup>++</sup>	N-A <sup>+</sup>	S-N	N	N	N	N	N
<i>Glucose-phosphate</i>									
Pyridoxal-phosphate	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	N	N	N	N	nt <sup>c</sup>
$\delta$ -aminolévulinate, HCl	N-A <sup>+</sup>	N	N	N	N	N	N	N	nt <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Le pyridoxal-phosphate et le  $\delta$ -aminolévulinate, HCl entraînent une acidification du milieu glucose (pH entre 4,8 et 5,0 au lieu de pH 5,7) mais ils sont sans effet sur le pH du milieu glucose-phosphate (pH voisin de 6,4). <sup>b</sup> Les modalités de détermination des interactions entre les pesticides et les substances testées sont précisées dans le chapitre *Matériel et méthodes*. [A: antagonisme qui peut être faible (A<sup>+</sup>), moyen (A<sup>++</sup>) ou élevé (A<sup>+++</sup>); N neutralité; S synergie]. Pour le cymoxanil les études portent sur les souches L, 6-173E, et SV17H, alors que, pour les autres pesticides, elles concernent les 5 souches présentées dans le tableau I. Les concentrations des pesticides sont en  $\mu$ M. <sup>c</sup> nt : non testé.

### Effet de coenzymes et de diverses autres substances

La thiamine, la thiamine-pyrophosphate, la riboflavine, l'acide folique, l'ascorbate, l' $\alpha$ -tocophérol acétate ne présentent pas d'effet protecteur notable vis-à-vis des 5 pesticides étudiés (résultats non présentés). En revanche, le pyridoxal-phosphate et le  $\delta$ -aminolévulinate (sous forme de chlorhydrate) à 0,5 mM sont nettement antagonistes du pyriméthanol dans les essais sur milieu glucose où ces composés induisent une diminution du pH (tableau X). Cet effet protecteur disparaît ou est réduit dans le milieu glucose-phosphate dont le pH est maintenu vers 6,4 (tableau VI). Les autres pesticides ne sont pas affectés par ces 2 substances (tableau X).

### DISCUSSION

Les effets antagonistes de l'extrait de levure ou de la peptone vis-à-vis du pyriméthanol, de la glutamine vis-à-vis du glufosinate, de la glycine ou de la sérine vis-à-vis du cymoxanil ou des substances comportant un groupement thiol vis-à-vis du captafol, observés dans cette expérimentation sur *B cinerea*, sont concordants avec les résultats obtenus antérieurement dans d'autres conditions (Corbett *et al*, 1984 ; Leroux *et al*, 1987 ;

Kocher, 1989 ; Leroux et Fritz, 1993 ; Leroux, non publié). Ceci suggère que la méthodologie que nous avons développée sur conidies de *B cinerea* est fiable. Toutefois, même s'il y a de nombreux exemples où une relation directe existe entre le mode d'action d'un pesticide et la nature des substances antagonistes (ex herbicides sulfonilurées ou imidazolidinones/acides aminés à chaîne ramifiée) (Powell et Rees, 1989), il y a aussi des situations où ces interactions ne concernent pas le site d'action primaire (ex fongicides antioïdium de la famille des aminopyrimidines) (Hollomon, 1984). En outre, il arrive qu'un apport exogène d'une substance dont la biosynthèse est bloquée ne soit pas antagoniste (ex glyphosate/acides aminés aromatiques chez certaines plantes) (Powell et Rees, 1989). Ces diverses observations indiquent donc que les résultats obtenus lors d'essais d'antagonistes doivent être interprétés avec précaution et complétés par des études biochimiques et enzymatiques.

Le captafol appartient au groupe des fongicides multi-sites (Leroux, 1991) susceptibles d'inhiber de nombreuses enzymes comportant des groupements thiols. Ce type d'interaction n'étant pas spécifique, l'adjonction de substances présentant un groupement thiol dans le milieu de culture entraîne une réduction notable de fongitoxicité (Corbett *et al*, 1984). Nous avons effectivement observé un effet protecteur

avec la cystéine, l'homocystéine, le glutathion-réduit, le 2-mercaptoéthanol et le dithiothréthol. L'absence d'antagonisme par la cystine ou l'homocystine (formes oxydées de la cystéine et de l'homocystéine) confirme bien que la présence du groupe thiol est indispensable pour la détoxification du captafol (Lukens, 1971). Par ailleurs, la forte chute de fongitoxicité observée en cas d'augmentation du pH soit par l'intermédiaire d'un tampon phosphate, soit par l'utilisation d'acides aminés basiques (ex arginine, histidine, lysine) résulte probablement de l'instabilité du captafol en milieu basique (Worthing et Hance, 1991).

Chez *Fusarium sulphureum* le fenpiclonil est susceptible d'inhiber l'absorption d'acides aminés neutres (ex glycine, phénylalanine), basiques (ex lysine) ou acides (ex aspartate) (Jespers *et al*, 1993). Comme ces divers acides aminés sont dépourvus d'effet antagoniste dans nos conditions expérimentales, il semble exclu que chez *B cinerea* un lien existe entre le mode d'action du fenpiclonil et ces composés. Par ailleurs, l'absence d'effet protecteur des produits à groupement thiol exclut toute action de type multi-site qui aurait pu expliquer la non-germination des conidies. Enfin, par rapport à des études antérieures où l' $\alpha$ -tocophérol entraînait un net antagonisme (Leroux *et al*, 1992 ; Leroux et Fritz, 1993), il s'avère que, dans les essais sur conidies de *B cinerea*, cet antioxydant ne possède pas d'effet protecteur vis-à-vis du fenpiclonil. Ce résultat suggère donc que la fongitoxicité du fenpiclonil n'implique pas la production de formes actives d'oxygène et, par voie de conséquence, l'induction de peroxydations lipidiques. Les études biochimiques conduites par Jespers (1994) sur *F sulphureum* confirment l'absence d'effet sur les lipides et cet auteur pense que l'effet primaire du fenpiclonil se situe au niveau du métabolisme glucidique. La cible pourrait être une protéine membranaire associée au transport du glucose lors de sa phosphorylation (Jespers, 1994). Au vu des similitudes existant entre ce phénylpyrrole, les dicarboximides et certains pesticides «aromatiques» (ex dichlobenil, tolclofos-méthyl, ...), il est possible d'envisager un mode d'action biochimique commun à tous ces composés (Leroux *et al*, 1992 ; Leroux et Fritz, 1993).

Les études réalisées jusqu'à maintenant tant sur *B cinerea* (Leroux *et al*, 1987) que sur *Phytophthora infestans* (Zyogas et Davidse, 1987) indiquent que le cymoxanil inhibe la biosynthèse des acides nucléiques mais que ce processus ne semble pas constituer la cible primaire de ce fongicide. Chez *B cinerea* la fongitoxicité

du cymoxanil implique une activation intracellulaire ; le (ou les) métabolite(s) actif(s) est (sont) probablement instable(s) car le principal produit de transformation du cymoxanil décelé est la glycine (Leroux *et al*, 1987). Par ailleurs, en milieu basique le cymoxanil est susceptible d'être détoxifié à la suite d'une cyclisation qui ne semble pas intervenir lors du processus d'activation mentionné précédemment (Cherton *et al*, 1993). Cette détoxification explique, comme pour le captafol, les baisses d'activité du cymoxanil observées notamment en présence d'acides aminés basiques. Dans les essais sur spores nous confirmons que la sérine et la glycine sont antagonistes chez toutes les souches de *B cinerea* sensibles au cymoxanil (Leroux *et al*, 1987). Ces 2 acides aminés étant susceptibles de dériver des mêmes voies biosynthétiques (Pateman et Kinghorn, 1976), une inhibition entre le glycérate (ou le phosphoglycérate) et la sérine peut être envisagée. Le cymoxanil et certains de ses métabolites ayant des structures voisines de la glycine ou de la sérine, on pourrait aussi imaginer que ces 2 acides aminés réduisent soit la pénétration cellulaire du cymoxanil soit son activation. Quant à l'effet protecteur des acides aminés soufrés, notamment la méthionine, l'homocystéine et la cystéine, il pourrait résulter d'une inhibition des cystathionases (Pateman et Kinghorn, 1976) par le cymoxanil. Il convient de noter que pour certains de ces acides aminés, comme d'ailleurs pour d'autres substances comportant des groupements thiols (ex glutathion-réduit) ainsi que l'extrait de levure, la peptone ou l'hydrolysate de sérine, l'antagonisme vis-à-vis du cymoxanil ne concerne pas toutes les souches de *B cinerea*. En effet la souche L, la plus sensible, présente un spectre d'antagonisme moins étendu que les souches 6-173E et SV17H. Une étude détaillée du comportement du cymoxanil (pénétration, cinétique de transformation, caractérisation des métabolites) chez diverses souches ainsi que de l'effet sur la biosynthèse d'acides aminés soufrés, de la sérine ou de la glycine doit être entreprise afin notamment de déterminer si la cible primaire du cymoxanil (ou de ses métabolites) est une enzyme impliquée dans la biosynthèse d'acides aminés.

Les inhibiteurs de la glutamine synthase, notamment le glufosinate, sont des analogues du glutamate capables de se fixer irréversiblement sur le site catalytique de l'enzyme. Par ailleurs, une compétition entre le glufosinate et le glutamate ainsi que d'autres acides aminés est également constatée lors de l'absorption cellulaire (Kocher, 1989). Dans ces conditions, la toxicité

du glufosinate est susceptible d'être réduite par des apports exogènes de glutamine ou de glutamate. Si la glutamine est effectivement très antagoniste du glufosinate, en revanche le glutamate, ainsi que l'aspartate ne le sont que dans des milieux voisins de la neutralité. En fait il s'avère que toute acidification du milieu de culture de *B cinerea* (induite par ces 2 acides aminés utilisés sous forme libre ou par un tampon citrate/phosphate) augmente notablement la fongitoxicité du glufosinate. On se retrouve donc dans une situation voisine de celle reportée avec le cymoxanil ou le captafol pour lesquels la fongitoxicité diminue quand le pH augmente. Toutefois le glufosinate étant stable, c'est plutôt une moindre absorption qui expliquerait sa baisse de fongitoxicité quand le pH augmente (Bush et Langston-Unkefer, 1987 ; Kocher, 1989). La plupart des acides aminés soufrés, c'est-à-dire la méthionine, la cystéine, l'homocystéine et la cystathionine, sont nettement antagonistes du glufosinate. L'absence d'effet notable de l'homosérine et de la thréonine permet d'exclure une similitude d'action avec l'acide 2-amino-4-oxo-5-hydroxypentanoïque, un inhibiteur de l'homosérine déshydrogénase expérimenté comme un antifongique en médecine vétérinaire et humaine (Yamaguchi *et al*, 1990). Une inhibition de l'homosérine transacétylase ou de la cystathionine- $\gamma$ -synthase par le glufosinate pourrait en revanche être envisagée. Des acides aminés aromatiques présentent chez *B cinerea* un léger effet antagoniste, jamais signalé antérieurement avec le glufosinate, mais décrit chez les bactéries, les algues et les plantes supérieures pour le glyphosate (Powell et Rees, 1989); cet inhibiteur de la 5-énol pyruvyl shikimate-3-phosphate synthétase s'est avéré non toxique pour *B cinerea* (Leroux, non publié).

Le pyriméthanil apparaît très toxique pour les conidies de *B cinerea* tant vis-à-vis de leur germination que de l'élongation des filaments germinatifs. L'absence de déformations de ces derniers semble indiquer que ce fongicide ne possède pas d'effet direct ou indirect sur les membranes et parois cellulaires. Ces observations ainsi que l'absence de résistance croisée avec divers autres fongicides anti-botrytis excluent notamment un effet du pyriméthanil au niveau des microtubules, de la biosynthèse des stérols ou des phospholipides. Comme pour le captafol, le cymoxanil ou le glufosinate, la fongitoxicité du pyriméthanil varie en fonction du pH du milieu de culture. Toutefois à la différence de ces 3 pesticides, cette anilinoypyrimidine est plus active à pH élevé. Le pyriméthanil étant stable (Milling,

comm pers), une réduction de sa pénétration dans le mycélium, en milieu acide, liée à une protonation de l'amine explique probablement la réduction de fongitoxicité aux pH faibles. Un tel phénomène est également observé pour des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols comme l'imazalil ou le fenpropimorphe qui comportent un atome d'azote susceptible d'être protoné (Leroux, non publié). En conséquence, les effets protecteurs induits par le glutathion-réduit, le pyridoxal-phosphate ou le  $\delta$ -aminolévulinate résultent principalement d'une baisse de pH du milieu de culture. Il est possible que pour les mêmes raisons ces 2 dernières substances entraînent un antagonisme vis-à-vis des aminopyrimidines anti-*oïdium* (ex éthyrimol) dont la cible est l'adénosine-déaminase (Hollomon, 1984). Toutefois, étant donné le rôle essentiel que jouent le pyridoxal-phosphate comme cofacteur au cours de diverses étapes de la biosynthèse des acides aminés ou le  $\delta$ -aminolévulinate comme précurseur des porphyrines, il conviendrait de déterminer si le pyriméthanil peut interférer directement ou indirectement avec ces substances. Concernant le glutathion-réduit ainsi que des composés à groupement thiol comme le 2-mercaptoéthanol ou le dithiothréitol, leur effet protecteur limité vis-à-vis du pyriméthanil semble exclure une action multi-site du type de celle observée avec le captafol. Quant aux études conduites avec des acides aminés qui n'induisent pas d'acidification du milieu de culture, il s'avère que ceux qui entraînent une réduction notable de la fongitoxicité du pyriméthanil comportent soit une chaîne ramifiée, soit un atome de soufre. Dans le cas des acides aminés à chaîne ramifiée dérivant du pyruvate, si la valine et la leucine apparaissent plus ou moins antagonistes, en revanche l'isoleucine est neutre vis-à-vis du pyriméthanil. Un mode d'action similaire aux herbicides sulfonylurées (ex chlorsulfuron) ou imidazolinones (ex imazaquine), c'est-à-dire une inhibition de l'acéto-hydroxyacide synthétase (Singh *et al*, 1989 ; Schloss, 1989), pourrait être envisagé pour le pyriméthanil. Toutefois, l'absence d'effet protecteur de l'isoleucine vis-à-vis de ce fongicide (alors que cet acide aminé est antagoniste des herbicides précédents) et l'insensibilité de *B cinerea* aux sulfonylurées (Leroux, non publié) semblent exclure une action du pyriméthanil au niveau de l'acéto-hydroxyacide synthétase. Parmi les acides aminés dérivant de l'aspartate, l'homocystéine, la cystéine (et leurs formes oxydées homocystine et cystine) ainsi que la méthionine apparaissent antagonistes vis-à-vis du pyriméthanil, alors que la thréonine, la cystathionine

et l'homosérine ont peu ou pas d'effet. Ces observations suggèrent que le pyriméthanil pourrait inhiber la voie de biosynthèse des acides aminés soufrés au niveau des cystathionases et/ou de l'acétyl homosérine sulfydrylase (Pateman et Kinghorn, 1976). Les études conduites avec le cyprodinil, un analogue structural du pyriméthanil, fournissent des indications similaires (Bocquet *et al*, 1994 ; Pillonel, comm pers). Des études biochimiques de l'effet des anilopyrimidines sur les profils en acides aminés du mycélium de *B cinerea* et sur les enzymes cibles potentielles de ces fongicides sont nécessaires pour déterminer si l'action primaire se situe effectivement au niveau de la biosynthèse des acides aminés et si une ou plusieurs enzymes sont touchées. Il convient de signaler que des travaux récents indiquent que le pyriméthanil comme le mépanipirim empêchent l'excrétion de diverses enzymes lytiques (ex cutinases, pectinases, cellulases, lipases, protéases), ce qui expliquerait l'activité anti-pénétrante de ces anilopyrimidines (Neumann *et al*, 1992 ; Miura *et al*, 1994). La question se pose de savoir s'il existe ou non une relation entre ces effets et des perturbations de la biosynthèse d'acides aminés.

Étant donné qu'il est difficile de prévoir le risque de résistance pour de nouvelles matières actives, il est donc nécessaire de disposer d'une méthode fiable pour caractériser les variations de sensibilité au sein des populations de *B cinerea*. Au vu des résultats obtenus sur les effets fongitoxiques du fenpiclonil et du pyriméthanil, il s'avère que la situation est différente entre ces représentants de 2 nouvelles familles de fongicides anti-botrytis : les phénylpyrroles et les anilopyrimidines. En effet, pour le fenpiclonil, l'absence de variation de fongitoxicité en fonction du milieu de culture doit permettre une transposition des méthodes de « monitoring » pratiquées avec les benzimidazoles, les phénylcarbammates ou les dicarboximides à partir de conidies collectées en conditions non stériles sur des végétaux pourris (ex baies de raisin) (Leroux et Clerjeau, 1985). En revanche, pour le pyriméthanil, nous avons montré qu'en utilisant le même protocole (milieu glucose inoculé par une suspension de conidies collectées non stérilement) les réponses variaient d'un échantillon à un autre en absence de tout phénomène de résistance (Leroux, non publié). Dans ces conditions, d'autres méthodes d'estimation de la sensibilité de *B cinerea* vis-à-vis du pyriméthanil doivent être recherchées, en vue d'une utilisation pour un « monitoring » de routine.

## RÉFÉRENCES

- Bocquet G, Sylvestre M, Speich J (1994) Le cyprodinil, fongicide céréales. *Phytoma* 458, 53-55
- Bush DR, Langston-Unkefer PJ (1987) Tabtoxinine- $\beta$ -lactam transport into cultured corn cells. *Plant Physiol* 85, 845-849
- Cherton JC, Convert O, Fritz R, Leroux P, Cassier P (1993) Study on the metabolism of the fungicide cymoxanil in 2 strains of the fungus *Botrytis cinerea* and in locust *Locusta migratoria* or lobster *Homarus americanus* haemolymphs. III. *In situ* monitoring by H-NMR. *Spectroscopy* 11, 21-35
- Corbett JR, Wright K, Baillie AC (1984) *The biochemical mode of action of pesticide*. Academic Press, Londres, 382 p
- Hollomon DW (1984) Antifungal activity of substituted 2-aminopyrimidines. *Mode of action of antifungal agents* (Trincy APJ, Ryley JF, eds), British mycological Society, Cambridge, Royaume-Uni, 185-205
- Jespers ABK (1994) Mode of action of the phenylpyrrole fungicide fenpiclonil in *Fusarium sulphureum*. Thèse, Wageningen, 129 p
- Jespers ABK, Davidse LC, de Waard MA (1993) Biochemical effects of the phenylpyrroles fungicide fenpiclonil in *Fusarium sulphureum* (Schlechtj). *Pestic Biochem Physiol* 45, 116-129
- Kocher H (1989) Inhibitors of glutamine synthetase and their effects in plants. *Prespects for amino acid biosynthesis inhibitors in crop protection and pharmaceutical chemistry* (LG Copping, J Dalziel, AD Dodge, eds), BCPC monograph n°42, 173-182
- Leroux P (1991) Modes d'action biochimique des fongicides à usages agricoles. *3<sup>e</sup> Conférence internationale sur les maladies des plantes, Annales ANPP*, 79-96
- Leroux P, Clerjeau M (1985) Resistance of *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola* to fungicides in French vineyards. *Crop Prot* 4, 137-160
- Leroux P, Fritz R (1993) Studies on the antifungal activity of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl. *Proc 10th international symposium on systemic fungicides and antifungal compounds* (H Lyr, C Polter, eds), Ulmer, Stuttgart, Allemagne, 91-97
- Leroux P, Fritz R, Despréaux D (1987) The mode of action of cymoxanil in *Botrytis cinerea*. *Pesticide Science and biotechnology, 6th Congress of pesticide Chemistry* (R Greenhalgh, TR Roberts, eds), Blackwell, Oxford, Royaume-Uni, 191-196
- Leroux P, Gredt M (1989) Negative cross-resistance of benzimidazole-resistant strains of *Botrytis cinerea*, *Fusarium nivale* and *Pseudocercospora herpotrichoides* to various pesticides. *Neth J Plant Pathol* 95 (sup 1), 121-127
- Leroux P, Lanen C, Fritz R (1992) Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl against *Botrytis cinerea* and *Fusarium nivale*. *Pestic Sci* 36, 255-261

- Leroux P, Montcomble D (1993) Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne. Passé, présent, futur. *Phytoma* 450, 27-30 et 451, 23-27
- Lukens RJ (1971) Chemistry of fungicidal action. *Molecular biology biochemistry and biophysics*, n°10, Springer-Verlag, Berlin, Allemagne, 136 p
- Maeno S, Miura I, Masuda K, Nagata T (1990) Mepanipyrim (KIF-3535), a new pyrimidine fungicide. *Brighton Crop Prot Cong Pests Dis*, 415-422
- Miura I, Kamakura T, Maeno S, Hayashi S, Yamaguchi I (1994) Inhibition of enzyme secretion in plant pathogens by mepanipyrim, a novel fungicide. *Pestic Biochem Physiol* 48, 222-228
- Neumann GL, Winter EH, Pittis JE (1992) Pyrimethanil, a new fungicide. *Brighton Crop Prot Conf Pests Dis* 395-402
- Pateman JA, Kinghorn JR (1976) Nitrogen metabolism. *The filamentous fungi, vol II. Biosynthesis and metabolism* (JE Smith, DR Berry, eds), Edward Arnold, Londres, 159-237
- Powell KA, Rees SB (1989) Screening techniques for amino-acid biosynthesis inhibitors. *Prospects for amino-acid biosynthesis inhibitors in crop protection and pharmaceutical chemistry* (LG Copping, J Dalziel, AD Dodge, eds), BCPC monograph n°42, 31-39
- Scalla R, Gauvrit C (1991) Mécanismes d'action phytotoxique des autres familles d'herbicides. *Les herbicides : mode d'action et principes d'utilisation*. R Scalla, ed), INRA, Paris, 115-191
- Schloss JV (1989) Origin of the herbicide binding site of aceto-lactate synthase. *Prospects for amino acid biosynthesis inhibitors in crop protection and pharmaceutical chemistry* (LG Copping, J Dalziel, AD Dodge, eds), BCPC monograph n°42, 147-152
- Singh BK, Newhouse KE, Stidham MA, Shanen DL (1989) Acetyohydroxyacid synthase-imidazolinone interaction. *Prospects for amino-acid biosynthesis inhibitors in crop protection and pharmaceutical Chemistry* (LG Copping, J Dalziel, AD Dodge, eds), BCPC monograph n°42, 87-96
- Worthing CR, Hance RJ (1991) *The pesticide manual*, (9<sup>e</sup> edition). BCPC, Farnham, 1141 p
- Yamaguchi M, Yamaki H, Shinuda T, Togo Y, Suzuki H, Nishumura T, Yamaguchi H (1990) The mode of antifungal action of (S)-2-amino-2-oxo-5-hydroxypentanoic acid, RI-331. *J Antibiot* 43, 411-416
- Zyogas BN, Davidse LN (1987) Studies on the mechanism of action of cymoxanil in *Phytophthora infestans*. *Pestic Biochem Physiol* 29, 89-96