Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 80 (1989)

Heft: 1

Artikel: Identification de métabolites secondaires phytotoxiques responsables de l'eutypiose, une maladie de la vigne = Identification of secondary phytotoxic metabolites inducing "Eutypiosis", a disease of the vine

Autor: Tabacchi, R.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-983589

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Trav. chim. aliment. hyg. **80**, 12–21 (1989)

R. Tabacchi, Institut de chimie de l'Université de Neuchâtel, Neuchâtel

Identification de métabolites secondaires phytotoxiques responsables de l'eutypiose, une maladie de la vigne

Identification of Secondary Phytotoxic Metabolites Inducing «Eutypiosis», a Disease of the Vine

Introduction

Depuis toujours, l'homme, dans l'exploitation des végétaux, a été confronté avec des ennemis naturels. Les insects prédateurs et les maladies d'origine diverses, causées par des micro-organismes qui attaquent les produits ou les plantes qui les produisent, sont des exemples classiques.

La vigne n'échappe pas à cette situation. Si, pour la plupart des maladies d'origine fongique, des moyens de lutte chimique existent, sont connus et utilisés avec succès, d'autres, telle que l'eutypiose, échappent à tout traitement et se manifestent à l'improviste, à un stade déjà tellement avancé, où aucune intervention humaine n'est plus possible. La mort du cep est inévitable et le risque de contagion très élevé.

Une lutte préventive à large spectre est aussi difficilement envisageable. De nouvelles maladies apparaissent chaque année. Récemment, au Tessin, est apparu le «black rot» (pourriture noire) qui attaque les grappes de Merlot.

Depuis une vingtaine d'années, dans les vignobles de Suisse romande, on observe un dépérissement et une mort rapide de ceps de Chasselas en production. Une étude du bois nécrosé a mis en évidence la présence de champignons, *Eutypa lata* étant l'espèce la plus fréquemment isolée. Ce champignon n'est pas spécifique à la vigne (d'où des difficultés de lutte). En Suisse, il a été en fait isolé la première fois sur l'abricotier, à Martigny en 1971 par *Carter* (1). La première relation entre ce champignon et la vigne a été faite en Australie en 1973, où la maladie a été appelée «dying arm disease» (maladie du bras mort). Durant les années suivantes, des périthèces du champignon ont été découverts dans le vignoble romand. Les isolements obtenus à partir de bois nécrosé (malade) ou d'ascospores donnent des cultures d'aspect identique à celles isolées d'abricotiers. Inoculées sur des branches de ceux-ci, ces cultures provoquent l'apoplexie typique. L'eutypiose (nom courant) est aujourd'hui largement répandue aux quatre coins du

monde. Elle a été identifiée en Australie, en Afrique du Sud, en Californie, au Mexique, ainsi qu'en Europe (France, Espagne, Bulgarie, Grèce, Italie).

En Suisse, *Eutypa lata* attaque essentiellement les cépages de Chasselas et de Grenache. En France, ce sont surtout des cépages du Bordelais qui sont très sensibles: Sémillon, Sauvignon blanc et Cabernet Sauvignon. En Suisse et en France, le Merlot est résistant, par contre en Californie il est aussi sensible.

La maladie et ses symptômes

Au printemps, les jeunes sarments (25–40 cm) ont une croissance chétive, rabougrie et les entre-noeuds sont très courts. Les feuilles sont nettement plus petites que la normale, chlorotiques, tantôt enroulées, tantôt déformées et déchiquetées. Les grappes ont un aspect quasi normal jusqu'à la floraison, mais sont ensuite victimes d'une forte coulure ou sèchent complètement. En coupant une corne (ou un cep malade), on observe une ou plusieurs nécroses provenant de blessures (plaie de taille ou accident mécanique). Un symptôme important est la formation de chancres autour des points de taille. L'attaque se fait de préférence sur des vieux ceps et n'est visible que sur des souches agées de 5–6 ans au minimum.

Le cycle du champignon débute par le bois infecté dans lequel des périthèces se forment et la production de spores débute. Ces spores sont répandues par le vent (temps humide!), arrivent sur les blessures de taille, où elles pénètrent dans le bois. Le champignon se développe et infecte le cep.

Les moyens de lutte sont restreints. En effet, de la diversité des hôtes (abricotier, vigne, raisinet) sur lequels la production de spores est possible, l'éradication de la maladie semble difficile. Un traitement chimique ne peut être envisagé, vu la longue durée de latence de la maladie. Seul peut être envisagé un traitement pour préserver les vaisseaux au moment de la taille. Un certain nombre de produits sont à l'essai. Le meilleur moyen de lutte reste ainsi la prévention qui consiste dans l'élimination des bois malades et morts. Si la dimension des souches le permet, comme en Californie, celles-ci peuvent être sauvées en éliminant la partie malade.

Isolé sur du matériel infecté, le champignon peut être facilement cultivé en boîte de pétri ou en milieu liquide. Après 3 semaines de culture, le mycélium est écarté, le filtrat isolé et extrait à l'éther. Une analyse par HPLC montre la complexité de ce milieu.

Méthodologie

Afin de contrôler les effets toxiques du champignon, des milieux de culture, des fractions séparées et enfin des substances isolées, il a fallu développer des tests biologiques.

Il est évident que le test le plus fidèle est l'inoculation du matériel dans des ceps, des plants ou des parties de vigne.

La durée du test est cependant impérative, la nature travaille lentement mais au laboratoire il faut des résultats très rapides. Nous avons ainsi développé en collaboration avec des biologistes, les tests suivants:

– Plantules de tomates «Bonny best» (environ 200 mg, deux feuilles), sur lesquelles un jugement visuel du flétrissement est établi et ensuite quantifié par la perte de poids pendant 4 heures.

– Plantules de vigne provenant de culture in vitro ou parties de vigne (feuilles, inflorescences) sur lesquelles on observe les symptômes de la maladie.

– Protoplastes isolés de feuilles, dont on évalue la survie, en présence de milieu toxique ou de toxine, pendant 20 heures.

Analyse du filtrat

Après 3–4 semaines de culture en milieu liquide, le filtrat est séparé du mycélium par filtration, év. traité à l'éthanol pour éliminer les sucres, et extrait à l'éther après ajustement du pH à 5,3. C'est en fait cette valeur qui permet l'obtention d'un extrait brut très actif.

Par chromatographie (colonne ouverte, MPLC, HPLC sémipréparative), d'abord des fractions, ensuite des composés purs ont pu être isolés. Les tests d'activité sont toujours conduits parallèlement.

L'identification des différents composés a nécessité la mise en oeuvre de toutes les méthodes spectroscopiques: IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, MS et MS-MS, rayons-X, ainsi que des techniques classiques de dérivatisation.

Parmi les composés isolés (3) (fig. 1 et 2) nous n'indiquons ici que les plus intéressants du point de vue de l'activité biologique ou de la structure.

Une remarque générale s'impose: nous avons travaillé sur des milieux de culture obtenus par des souches différentes isolées en Suisse et en France. Si, qualitativement, les différents milieux de culture se ressemblent, quantitativement, des différences, parfois notables existent.

Nous avons ainsi constaté que l'agressivité d'une souche dépend de la présence de molécules ayant la structure phénylacétylénique. D'autre part, la perte d'agressivité se traduit par la présence de quantités importantes de melleines.

Lors des premières analyses, nous avons effectivement isolé de la 3-O-méthylmelleine et l'hydroxy-4-O-méthyl-melleine. Ces composés, bien connus comme phytotoxiques (dans la septoriose du blé par exemple, avec la septorine, et chez deux champignons de la pomme), ne montrent pas de toxicité dans nos tests.

Nous avons aussi isolé un chromène et des pentahydrobenzopyranone-4, des benzofuranes et des analogues insaturés. Parmi les composés acétyléniques (*1–12*), le dérivé portant la fonction aldéhyde (*3*) (eutypine) est de loin le plus actif à tous les tests. Pour les protoplastes, il montre encore une phytotoxicité à une concentration de 13 μg/l.

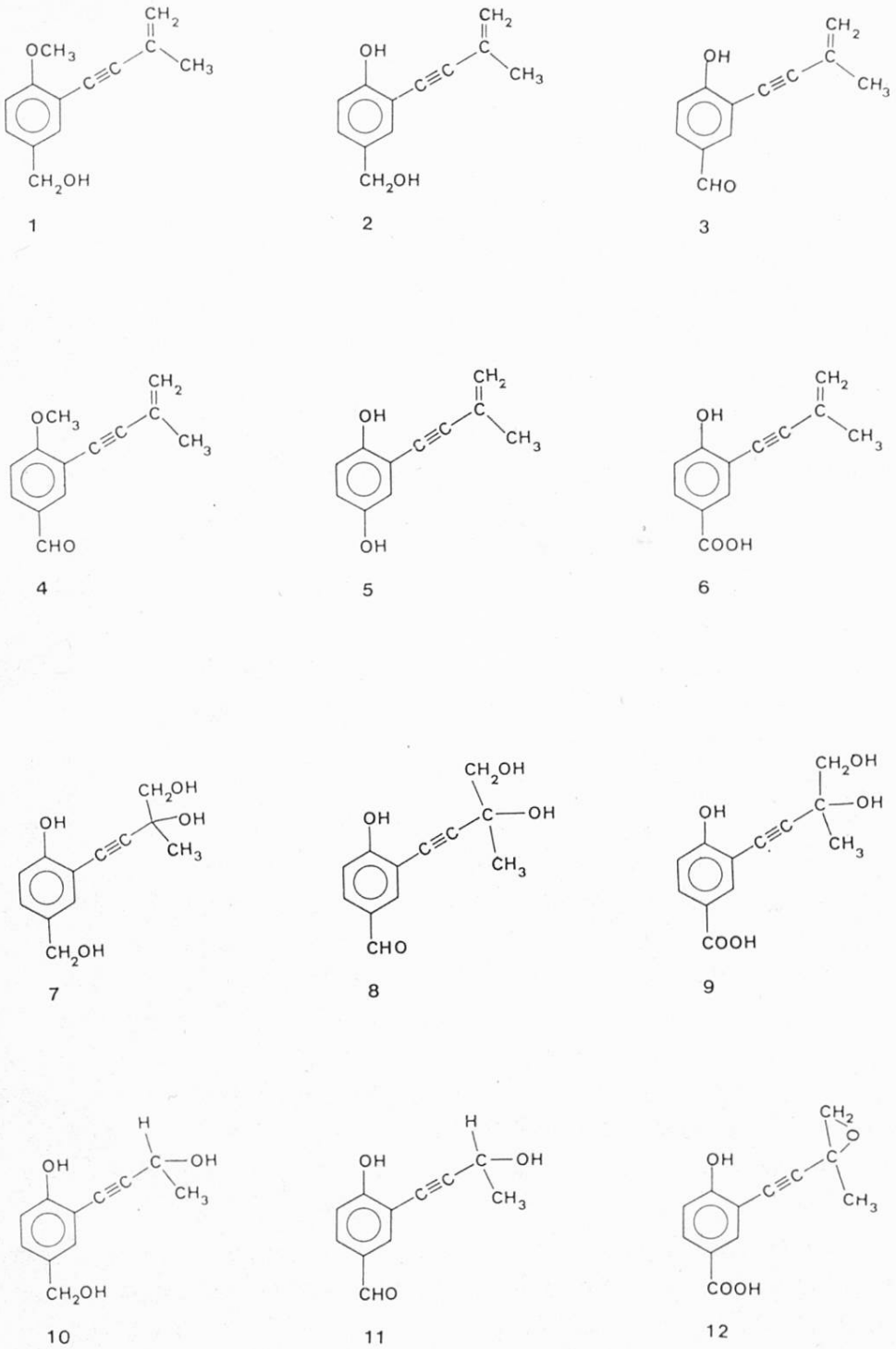

Fig. 1. Composés acétyléniques isolés du milieu de culture d'Eutypa lata

Relevons que cette structure, comportant deux extrémités polaires ou facilement polarisables, séparées par un «spacer» apolaire, est idéale pour pouvoir se placer entre des membranes et bloquer ainsi des centres actifs.

La frustulosine, un métabolite secondaire de *Stereum frustulosum*, présentant des groupes fonctionnels identiques à ceux de nos composés aromatiques, à sa-

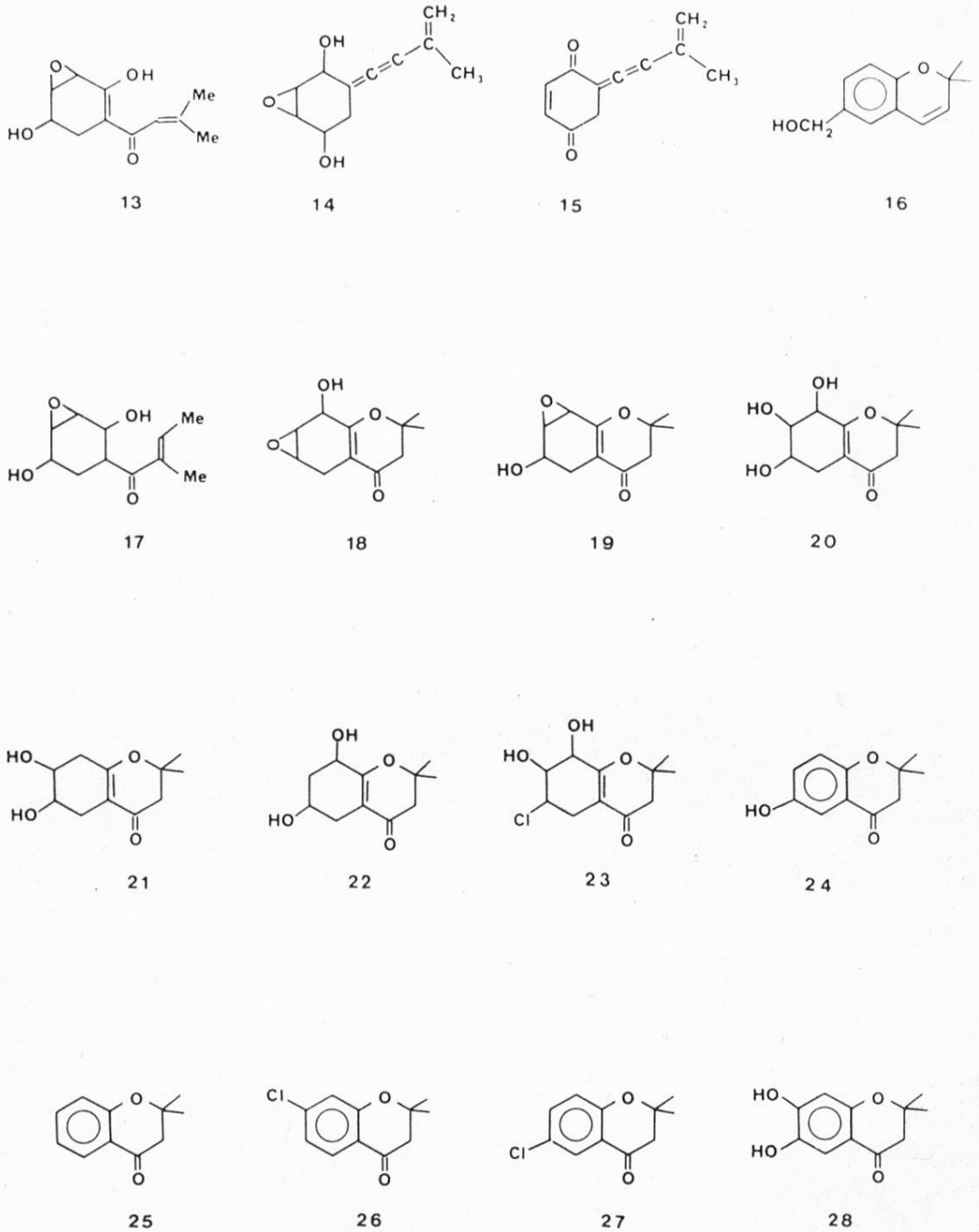

Fig. 2. Composés divers isolés du milieu de culture d'Eutypa lata

voir phénol, aldéhyde, ainsi que la chaîne isopentène-3-yle, a été isolée par *Nair* (4). Ce métabolite présente aussi une forte activité antibiotique vis-à-vis de bactéries diverses (*Staphyllococcus aures, Bacillus subtilis, Bacillus mycoides*).

Relevons enfin que presque tous les composés identifiés sont originaux. Du point de vue de la structure, un produit abondant (3—4 mg), le vinyl-allène (*14*) portant des groupes époxy et hydroxy, est le premier représentant d'une nouvelle famille de composés naturels. Sa structure a été confirmée par rayons-X et actuellement nous sommes en train d'en réaliser la synthèse, car il entre bien dans une corrélation biogénétique des différents composés isolés d'*Eutypa*. D'autre part, il semble posséder des propriétés antibiotiques intéressantes.

Au vu de ces résultats, nous avons en effet essayé de trouver des relations biogénétiques. Cette démarche a une certaine importance d'une part pour comprendre le mécanisme d'action, d'autre part pour envisager des moyens de lutte contre la maladie.

Pour le frustulosinol, *Nair* (4) envisage sa formation à partir d'une double source: la chaîne latérale provenant de l'acide mévalonique, tandis que le reste de la molécule dériverait de l'acide shikimique. Cette hypothèse nous semble tout à fait valable, la différente substitution du noyau aromatique nous suggère aussi la voie acétate mévalonate (que nous retrouvons par exemple pour la partie champignon chez les lichens).

Une étude comportant des marquages isotopiques, dans le dessein de confirmer la biogénèse des différents métabolites, est en cours.

Notre travail analytique a aussi été complété par une importante partie synthétique.

En effet, si nous connaissons les conséquences de l'eutypiose, si nous connaissons à la limite, les toxines, nous ne savons rien sur le mécanisme d'action. Celui-ci est un problème qui intéresse énormément les biochimistes et les phytophatologistes. Pour une telle étude, il faut cependant une quantité relativement importante de molécule active. D'autre part, les spécialistes, dans l'obtention de plants par culture de tissus, vont essayer d'obtenir des espèces résistantes en inoculant de la toxine. Nous avons ainsi réalisé la synthèse totale des principaux composés acétyléniques.

Un dernier problème que nous devons résoudre est la transposition des résultats analytiques du milieu de culture au matériel végétal.

Nous avons ainsi analysé du bois malade, des feuilles, des inflorescences et de la sève afin de retrouver la molécule toxique, des autres composés, ou des métabolites des molécules que nous avons identifiés dans le milieu de culture.

Dans le bois, dont il est assez facile de disposer de matériel (ceps morts), nous avons trouvé une hydroxy-méthyl-melleine. Ce résultat est surprenant car on a remarqué que des vieilles souches ne produisent plus que de la melleine.

Dans la sève montante et dans les inflorescences par contre, nous avons pu mettre en évidence la présence d'eutypine.

Pour faire des analyses de ce type, en évitant au maximum les manipulations (extractions, purifications, évaporations de solvants), on doit disposer d'une technique analytique très sensible. C'est ainsi que nous avons fait recours à la MS en tandem.

L'étude détaillée par MS-MS de l'eutypine (dont le spectre MS est représenté à la fig. 3) nous a permis d'abord d'établir son mécanisme de fragmentation.

La structure de certains ions a été confirmée par l'analyse des spectres de collision d'analogues synthétiques.

Nous avons ensuite analysé par la même méthode les extraits des échantillons atteints par de l'eutypiose. Ces analyses ont bien prouvé la présence d'eutypine. En effet, bien que le courant total de ionisation (fig. 4) soit très complexe et ne permette pas de distinguer des pics spécifiques dans la région d'élution de l'eutypine, la MS-MS sur m/z 186, 185 (descendants) (fig. 5), 157 et 128 (descendants et

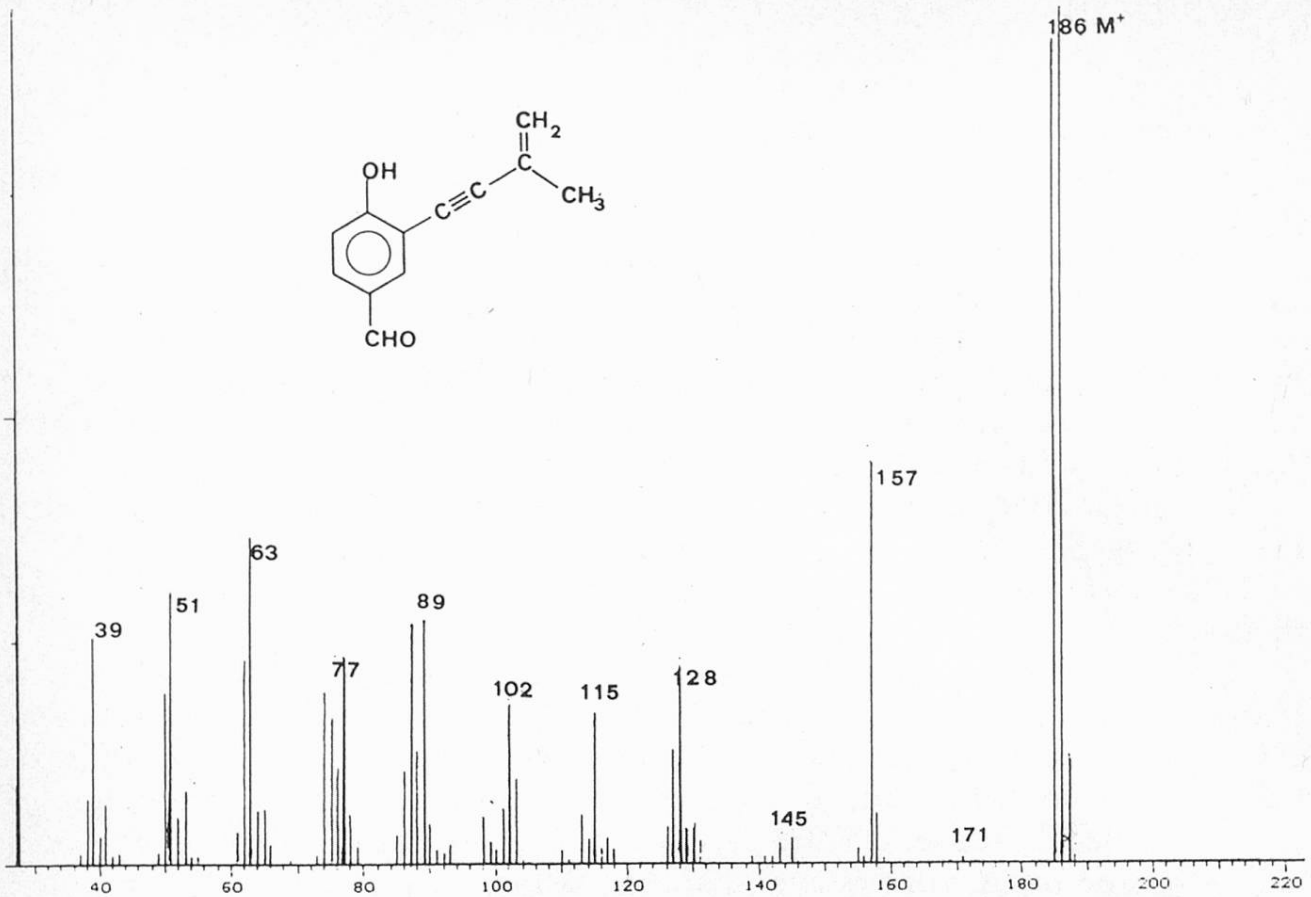

Fig. 3. Spectre de masse de l'eutypine

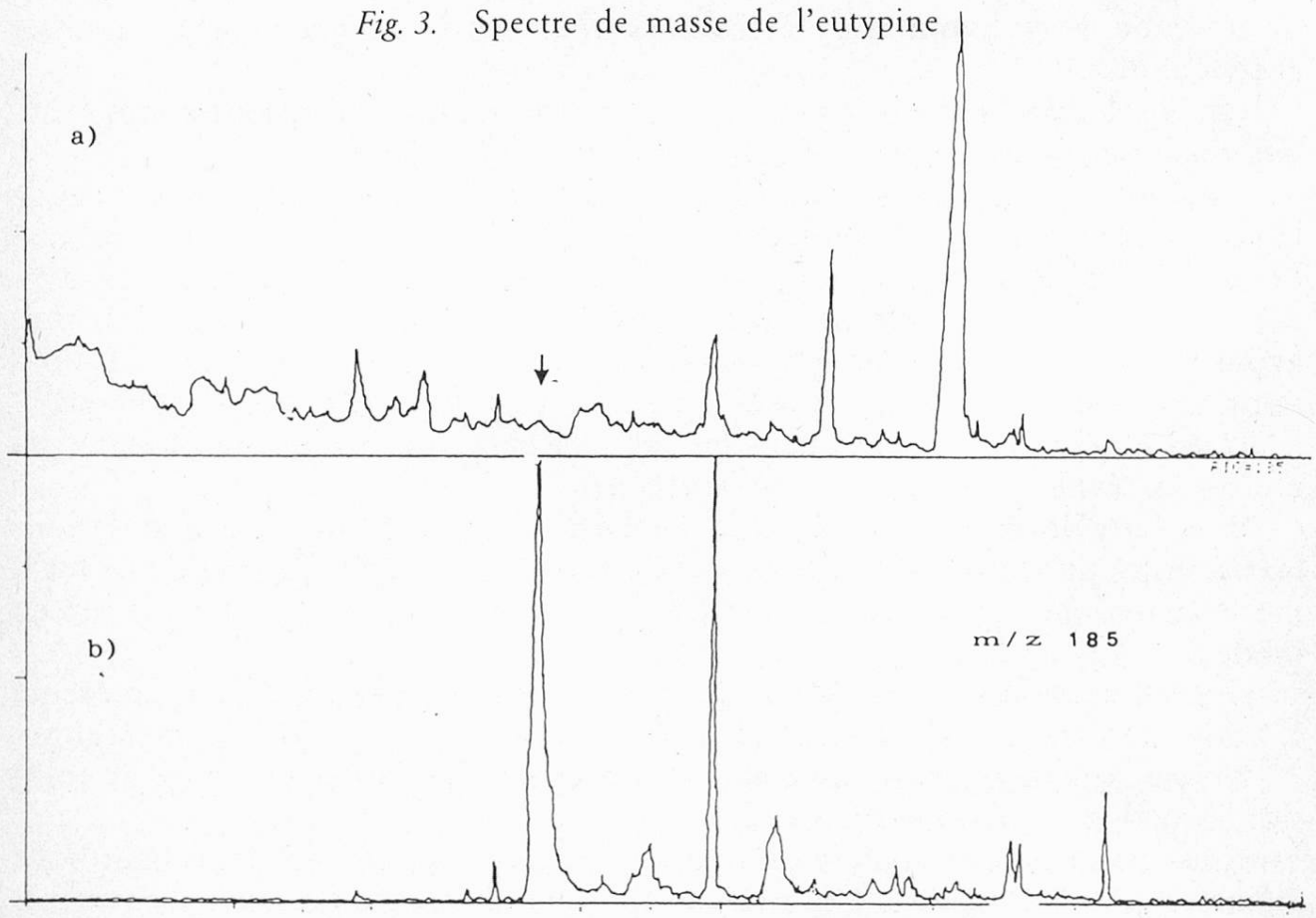

Fig. 4. Chromatogramme (GC) de l'extrait de sève
a) courant ionique total
b) ion 185

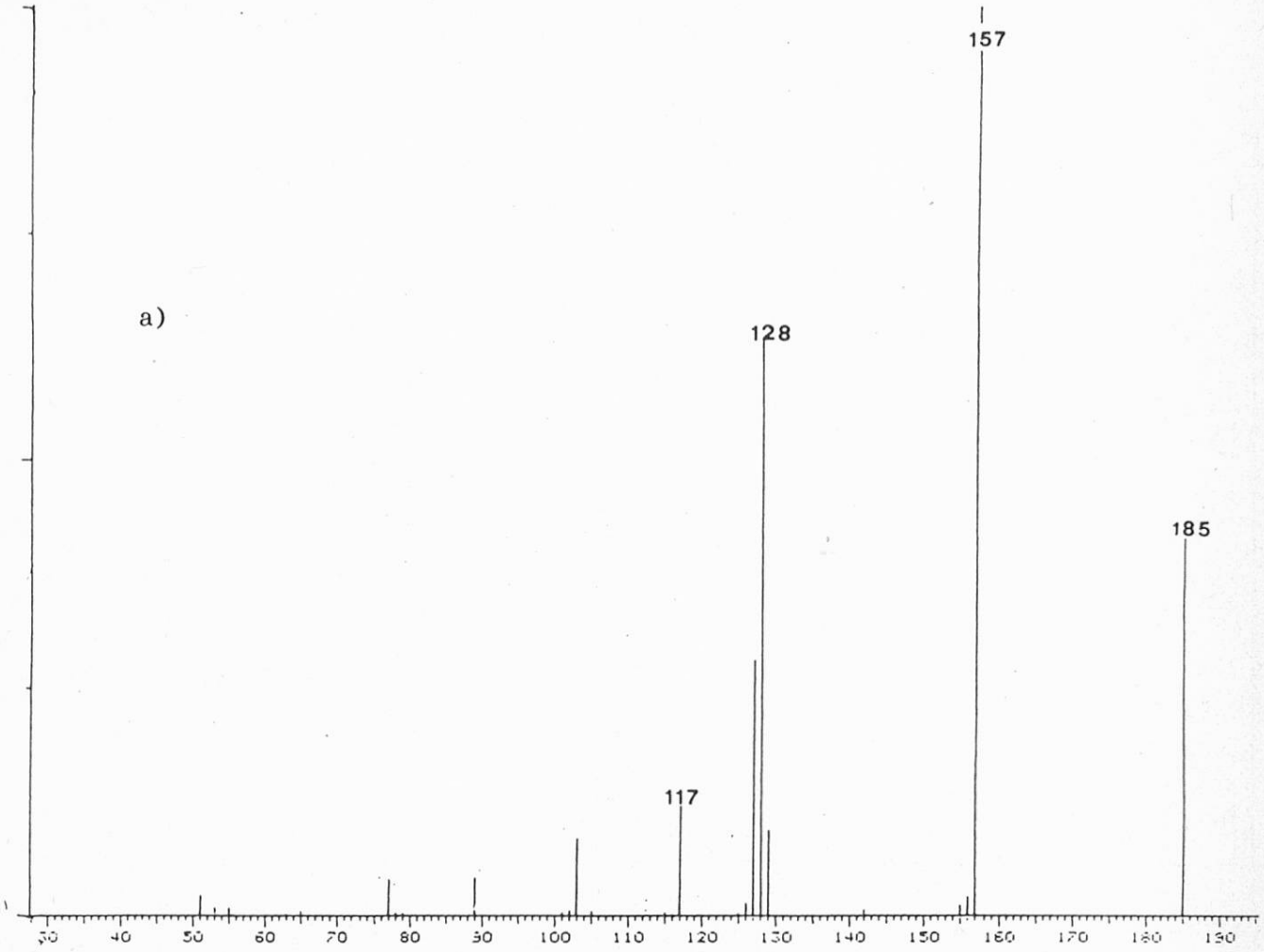

Fig. 5. Spectre MS-MS des déscendants de m/z 185
a) du produit naturel

parents) donne des spectres parfaitement identiques à ceux obtenus sur le composé naturel avec une sensibilité estimée à environ une centaine de pg.

Un travail tel que celui que nous avons effectué se distingue de celui de recherche d'une substance active, dans une plante par exemple, où le but est d'isoler, d'identifier, éventuellement dans un deuxième temps, de synthétiser ce principe actif.

Ici nous nous intéressons à un problème plus complexe: nous devons connaître non seulement quelles sont les molécules biologiquement actives mais comment elles se forment et quel est leur mode d'action, leur métabolisme, leur comportement dans la plante. Ceci dans le but de trouver des moyens de lutte contre la maladie. Dans le cas de l'eutypiose, il semble bien qu'il sera extrêmement difficile d'éradiquer la maladie car elle est présente sur plusieurs hôtes. A notre point de vue, tout ce qu'on peut faire contre cette maladie est la prévention par des moyens empêchant la formation et la propagation des spores, et à un stade plus avancé, la formation des molécules toxiques, ou, à la limite, en favorisant leur dégradation (oxydation par exemple).

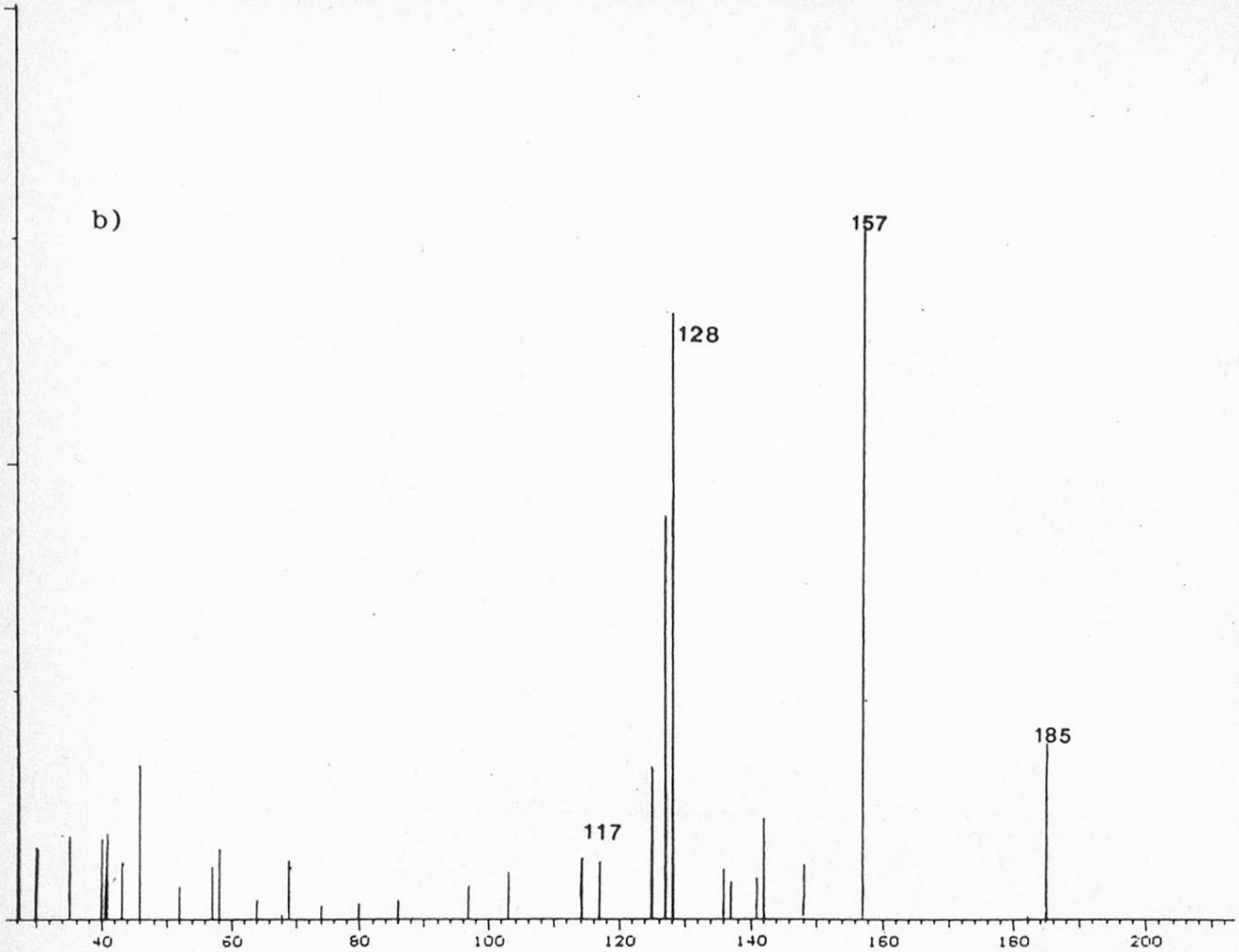

Fig. 5. Spectre MS-MS des déscendants de m/z 185
b) de la sève

Nous entrons évidemment ici dans un domaine où le chimiste seul ne peut plus agir, et seulement par une collaboration interdisciplinaire on pourra trouver une solution effective au problème.

Remerciements

Nous remercions le Fonds national suisse de la recherche scientifique pour l'appui financier (requête 2.043-0.86), Messieurs les Dr *J.-M. Renaud, G. Tsoupras, S. Claude* MM. *P. De Angelis, T. Zesiger* (Université de Neuchâtel), ainsi que le Prof. *J. Fallot,* Mme le Dr *P. Tey-Rulh* et Melle *I. Philippe* (ENSAT, Toulouse) pour leur précieuse collaboration.

Résumé

La composition chimique du milieu de culture d'*Eutypa lata*, le champignon responsable de l'eutypiose, a été étudiée.

Le composé le plus phytotoxique – l'eutypine = hydroxy-4-(méthyl-3-butène-3-ynil-1)-3-benzaldéhyle – a été identifié par GC-MS-MS dans la sève et les inflorescences de la vigne malade.

Zusammenfassung

Die chemische Zusammensetzung des Kulturmediums von *Eutypa lata*, des für die Eutypiose verantwortlichen Pilzes, wurde untersucht. Die am stärksten phytotoxische Verbindung – Eutypin = 4-Hydroxy-3-(3-methyl-3-buten-1-ynyl)-benzaldehyd wurde durch GC-MS-MS im Saft und im Blütenstand der kranken Rebe identifiziert.

Summary

The chemical composition of the culture medium of *Eutypa lata*, the fungus responsible for the eutypiosis, is described. The most phytotoxic compound – eutypine = 4-hydroxy-3-(3-methyl-3-buten-1-ynyl)-benzaldehyde has been detected by GS-MS-MS in the rising sap and the inflorescences of infected vines.

Riassunto

La composizione chimica di un mezzo di coltura d'*Eutypa lata*, il fungo responsabile dell'eutipiosi, è stata studiata.

Il composto maggiormente fitotossico – l'eutipina = idrossi-4-(metil-3-buten-3-inil-1)-3-benzaldeide – è stato identificato tramite la GC-MS-MS nella linfa e nelle inflorescenze della vigna.

Bibliographie

1. *Carter, M. V.* and *Bolay, A.:* Eutypa dieback of apricot is prevalent in Switzerland. Phytopathol. **75**, 187–9 (1972).
2. *Bolay, A.* et *Moller, W. J.: Eutypa armeniacae* Hansf. et Carter, agent d'un grand dépérisement de vignes en production. Rev. Suisse vitic., arboric et hortic **9**, 241–251 (1977).
3. *Tsoupras, G., de Angelis, P., Zesiger, T.* and *Tabacchi, R.:* Biologically-active natural acetylenes from the culture medium of *eutypa lata*. In: G. Lam, H. Breteler, T. Arnason and L. Hansen (ed.), Bioactive molecule, vol. 7, Chemistry and biology of naturally-occuring acetylenes and related compounds (NOARC), p. 93–100. Elsevier, Amsterdam 1988.
4. *Nair, M.S.R.* and *Anchel, M.:* Frustulosinol, an antibiotic metabolite of *Stereum frustulosum*; Revised structure of frustulosin. Phytochemistry **16**, 390 (1977).

Prof. R. Tabacchi
Institut de chimie de l'Université
de Neuchâtel
Avenue de Bellevaux 51
CH-2000 Neuchâtel