

Etude de quelques caractéristiques physico chimiques du filtrat toxique de *Phoma sabdariffae* Sacc., agent pathogène de la roselle.

Nicaise A. LEPENGUE^{1*}, Isaac MOUARAGADJA¹, Bertrand M'BATCHI¹ & Séverin AKE²

¹Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM); Unité de Recherche Agrobiologie, Laboratoire de Phytopathologie, B.P. 901; Franceville, Gabon.

²Laboratoire de Physiologie végétale, Agrophysiologie, U.F.R. Biosciences ; Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

*Auteur pour les correspondances (E-mail: lepengue_nicaise@yahoo.fr)

Reçu le 21-06-2007, accepté le 17-03-2009.

Résumé

La roselle est une plante maraîchère de la famille des Malvaceae, principalement exploitée au Gabon pour des raisons alimentaires ou thérapeutiques. Cette plante est victime d'une sévère pourriture provoquée par un champignon Deutéromycète, *Phoma sabdariffae* Sacc., dont l'action repose sur l'excrétion de substances toxiques. Le présent travail a été conçu pour étudier quelques caractéristiques physico chimiques de ces productions toxiques. Les paramètres évalués étaient la thermosensibilité, la photosensibilité, la composition biochimique et le fractionnement chromatographique. Les résultats obtenus ont révélé que le filtrat toxique de *Ph. sabdariffae* se conservait relativement bien à 0°C, mais perdait sa toxicité aux températures élevées, devenant totalement inactif au delà de 50°C. Il est photosensible, riche en composés glucidiques, protéiques et phénoliques. Sa toxicité paraît uniquement liée aux composés phénoliques qui laissent découvrir après fractionnement chromatographique, 4 fractions, dont 2 actives, F1 et F4, avec des caractéristiques respectivement proches de celles de la brefeldine A et de la cytochalasine B.

Mots clés : *Phoma sabdariffae* Sacc., roselle, filtrat, polyphénols, fractions actives, Gabon.

Abstract

Physico chemical characteristics of Phoma sabdariffae Sacc. culture filtrate, a Jamaican sorrel pathogenic agent.

Jamaican sorrel is a Malvaceae plant, mainly cultivated in Gabon for diet or therapeutic reasons. This crop is attacked by *Phoma sabdariffae* Sacc., an imperfect pathogenic fungi who acts by producing toxic compounds. Objective of this work is studying the physico chemical characteristics of these toxic compounds. Measured parameters were temperature and luminosity sensibility, biochemical and chromatography content. The results show that *Phoma sabdariffae* Sacc. culture filtrate stays stable at 0 °C ; it is both thermosensible and photosensible, and contains glucidic, proteic and phenolic compounds. Its toxicity is due to the phenolic compounds that possess 2 actives fractions F1 and F4, with physico chemical characteristics close to those of brefeldine A and cytochalasine B.

Keywords: *Phoma sabdariffae* Sacc., Jamaican sorrel, filtrate, phenols, active fractions, Gabon.

1. Introduction

La roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) est une plante maraîchère de la famille des Malvaceae, principalement exploitée au Gabon pour des raisons alimentaires (sauce de cuisine, boisson) ou thérapeutiques (traitement antiscorbut, purgatif, émulsifiant...). Cette précieuse plante est victime d'une sévère attaque cryptogamique, occasionnée par *Phoma sabdariffae* Sacc., un Deutéromycète de la famille des Phomaceae (Mouaragadja et M'batchi, 1998). Des travaux de détermination des mécanismes d'action de ce champignon ont permis de conclure que celui-ci agissait par excrétion d'une ou plusieurs substances toxiques, diffusibles du point d'infection vers les autres parties de la plante hôte (Lépengué et al. 2007). Jusqu'à présent la nature, le nombre et la toxicité de ces substances n'ont pas encore été déterminés, de même que la composition générale du filtrat lui-même. C'est la raison pour laquelle notre laboratoire a initié une série de travaux sur la caractérisation biologique et physicochimique de ce filtrat toxique. Au niveau biologique, les résultats obtenus à ce jour ont permis de conclure que le filtrat de culture de *Ph. sabdariffae*, contenant des substances toxiques, était de nature non hôte-spécifique, susceptible de servir d'outil rapide et efficace de sélection génétique d'espèces résistantes de roselle. Il est actif aussi bien sur les plantes hôtes que non hôtes et sur quelques champignons pathogènes (Lépengué, 2008). Le présent travail a été proposé pour étudier les aspects physicochimiques de cette caractérisation. Les paramètres expérimentés sont : la thermosensibilité, la photosensibilité, la teneur en composés biochimiques et le fractionnement chromatographique du filtrat.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Les matériels végétal et fongique utilisés étaient respectivement constitués de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. Var. *sabdariffa*, Malvaceae), cultivar RV2, et de *Ph. sabdariffae*, un champignon imparfait de la famille des Phomaceae (Lépengué et al. 2007).

2.2. Méthodes

2.2.1. Culture des plantes de roselle

Des graines de roselle, cultivar RV2, préalablement désinfectées par trempage pendant 1 jour dans 1 litre d'hypochlorite de sodium, ont été ensemencées par lot de 4 unités, dans des pots de culture contenant de l'humus fertile (Lépengué, 2008). Les plantes ont quotidiennement été arrosées avec 1 litre d'eau distillée stérile (Distillateur Pyrex, de marque Jencons Autostill).

2.2.2. Préparation du filtrat toxique

Des pycnides de *Ph. sabdariffae* ont été récoltées sur des plantes malades de roselle au champ, purifiées par 3 repiquages successifs sur milieu PDA (pomme de terre 220 grammes ; glucose 20 grammes ; agar 20 grammes), et clonées par culture monospore (Mouaragadja et M'batchi, 1998). Les masses sporales ont été prélevées des milieux de culture, broyées à l'ultraturax pendant 10 minutes à 15 000 tours/minute, et calibrées à 10^6 spores/ml à l'aide d'un hématimètre Malassez. Cinquante (50) ml de ce broyat ont été inoculés à 5 litres d'une solution de milieu nutritif Richards, et incubés en agitation continue (Agitateur-secoueur, Vibramax) pendant 20 jours à 28°C, en lumière alternée. Les milieux ont successivement été filtrés sur papier Wathman n° 2 et sur filtre millipore de 0,22 µm de diamètre. Un filtrat témoin a également été préparé, suivant le même protocole, à partir d'un milieu Richards non inoculé.

2.2.3. Mesure de la toxicité des filtrats de culture de *Ph. sabdariffae*

- Test biologique de flétrissement foliaire : Il a pour objectif de mesurer la toxicité d'une solution à partir du flétrissement d'une feuille soumise à son action (Ahoussou, 1989). Pour chacune de nos expériences, 120 feuilles (60 essais et 60 témoins) ont été étudiées selon les méthodes standardisées par Goodman (1960).
- Test de libération d'électrolytes : Il permet de mesurer la toxicité d'une solution par

la variation de sa conductivité à partir de la quantité de solutés libérés par un tissu foliaire soumis à son action (Lépengué, 2008). Pour chacune de nos expériences, 60 rondelles foliaires (30 essais et 30 témoins) ont été utilisées, et la conductivité mesurée à l'aide d'un conductivimètre de marque Jenway 3410 Analyser (Lépengué, 2008).

2.2.4. Etude de la thermosensibilité des filtrats

La thermosensibilité des filtrats de culture de *Ph. sabdariffae* a été étudiée aux températures élevées, puis aux températures basses. Pour l'étude aux températures élevées, 8 étuves de températures variant entre 25°C et 50°C ont été constitués, avec chacune 2 bouteilles contenant 5 litres de filtrat fongique (essai) ou vierge (témoin). Toutes les 15 minutes, 310 ml de chaque filtrat ont été prélevés, et leur toxicité mesurée par les tests biologiques de flétrissement foliaire et de libération d'électrolytes (Lépengué, 2008). Pour l'étude de détermination des températures de conservation (basses températures), 3 chambres phyto-troniques ont été calibrées à des températures de 0°C, 5°C et 10°C. La toxicité des filtrats a été mesurée tous les 10 jours par les tests de flétrissement foliaire et de libération d'électrolytes.

2.2.5. Etude de la photosensibilité des filtrats

La photosensibilité des filtrats a été étudiée en utilisant 3 étuves phytotroniques contenant chacune 2 bouteilles de 5 litres de filtrat fongique (essai) ou vierge (témoin), et réglées à des intensités lumineuses de 40 W, 100 W et 200 W. Une étuve témoin a été maintenue à l'obscurité. Le brunissement des filtrats a été mesuré tous les 10 jours au spectrophotomètre (Spectronic 301 Milton) par la variation de leur densité optique à 470 nm et à 725 nm, et leur toxicité déterminée par les tests biologiques de flétrissement foliaire et de libération d'électrolytes (Lépengué, 2008).

2.2.6 Analyse biochimique

L'analyse biochimique des filtrats fongiques a consisté à mesurer la teneur de ceux-ci en composés phénoliques, glucidiques et protéiques. Ces composés ont respectivement été dosés par les méthodes chimiques utilisant

l'acide chlorogénique à 470 nm, le phénol sulfurique à 490 nm, et le bleu de Coomassie à 540 nm (Lépengué, 1999). Dans chaque cas, 1 ml de chaque filtrat a été utilisé.

2.2.7 Analyse chromatographique

Cinq (5) litres de filtrat fongique ont été concentrés au 1/10^{ème} par lyophilisation (Lyophilisateur Virtis Sentry 3 L), puis extraits volume par volume dans une ampoule à décanter, avec de l'acétone. Le solvant organique a ensuite été évaporé au rotavapeur (rotavapor Buchi R 200). Le résidu sec obtenu a été repris dans 5 ml d'éthanol 80 %, et soumis au fractionnement chromatographique sur couche mince de silicagel fluorescent F 254 (Bousquet & Barbier, 1972). Le solvant de migration est constitué du mélange acétone-éthanol (9 : 1). Les bandes chromatographiques obtenues ont été visualisées sous lumière UV (longueur d'onde $\lambda = 254$ nm), découpées, éluées dans 5 ml de méthanol 80 %, et évaporés comme précédemment. Les résidus secs obtenus ont cristallisé à la suite d'un refroidissement brutal (choc thermique à 0°C). Les points de fusion de ces cristaux ont été mesurés à l'aide d'un banc chauffant de Köfler Heinzbank.

2.2.8 Analyse statistique

Toutes les expériences mentionnées dans cette étude ont été répétées 4 fois et soumises à une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test de Fisher au seuil de 5 % (Logiciel Statistica 6.0).

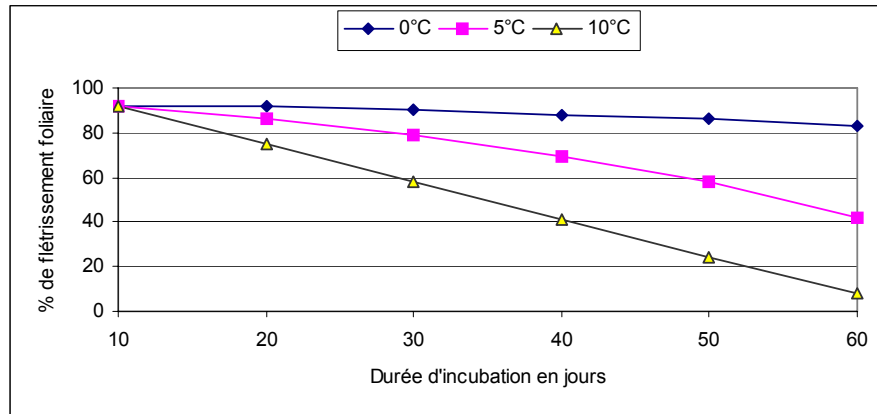
3 Résultats

3.1. Thermosensibilité du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae Sacc.*

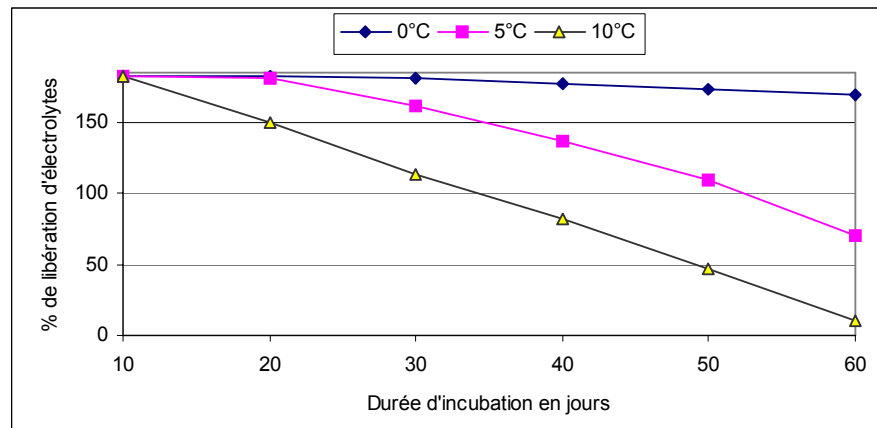
Pour déterminer la température de conservation du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae Sacc.*, celui-ci a été incubé à 0°C, 5°C et 10°C. Les résultats de ce travail ont révélé que ce filtrat fongique se conservait relativement bien à la température de 0 °C (Fig. 1 A & B). Les pertes d'activités étaient dans tous les cas inférieures à 10 %, après 2 mois de conservation. En revanche, les températures de 5°C et de 10°C ne convenaient pas à la conservation, car les filtrats perdaient plus de la moitié de leur toxicité, pour les mêmes durées de conservation.

Les résultats de l'étude du filtrat de culture de *Ph. sabdariffae* incubé aux températures élevées ont révélé que celui-ci était thermosensible (Fig. 2 A & B). Son seuil thermique d'intégrité était estimé à

50°C. Au-delà de cette température, le filtrat devenait totalement inactif. L'analyse statistique a montré que la perte de toxicité du filtrat provoquée par la température était significative au seuil de 5 %.



A



B

Figure 1 : Effet des basses températures sur la toxicité, mesurée en % de flétrissement foliaire (A) et de libération d'électrolytes (B), des filtrats de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc. incubés à l'obscurité.

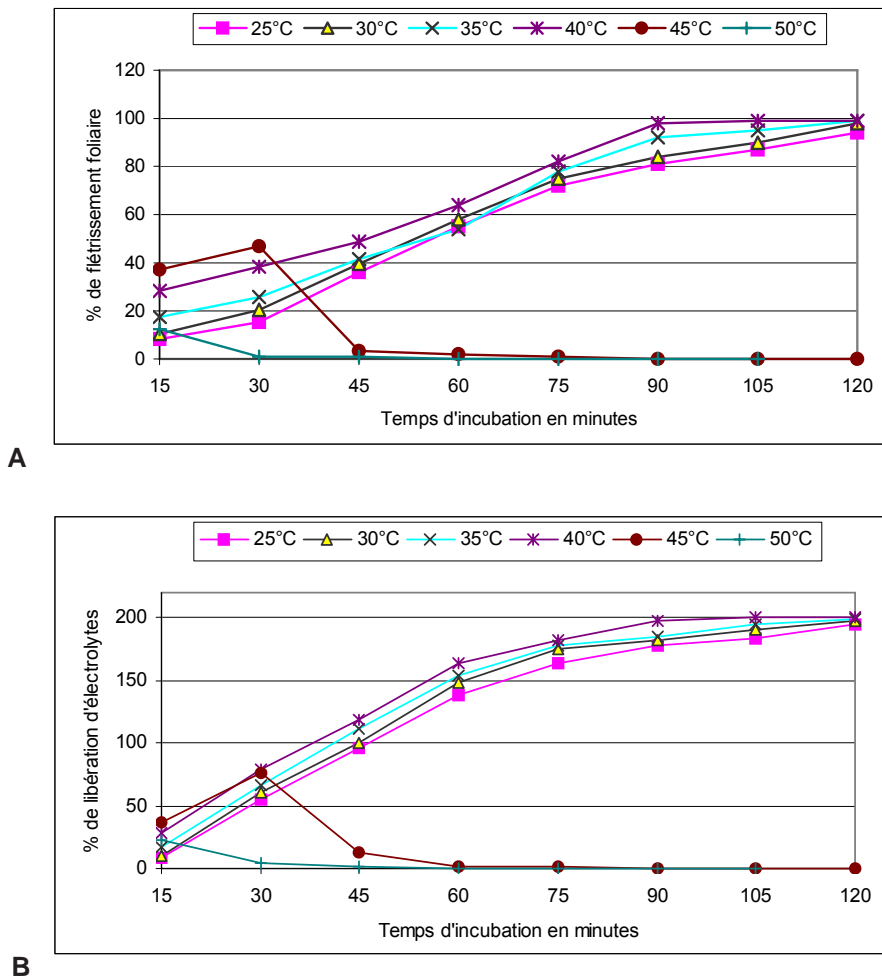


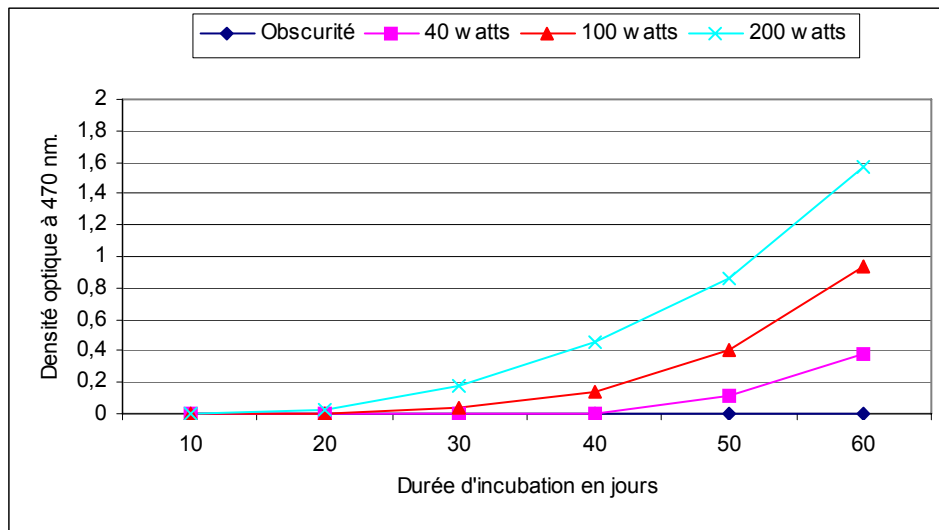
Figure 2 : Effet des températures élevées sur la toxicité du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae Sacc.*, mesurée en % de flétrissement foliaire (A) et de libération d'électrolytes (B), à l'obscurité.

3.2. Photosensibilité du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae Sacc.*

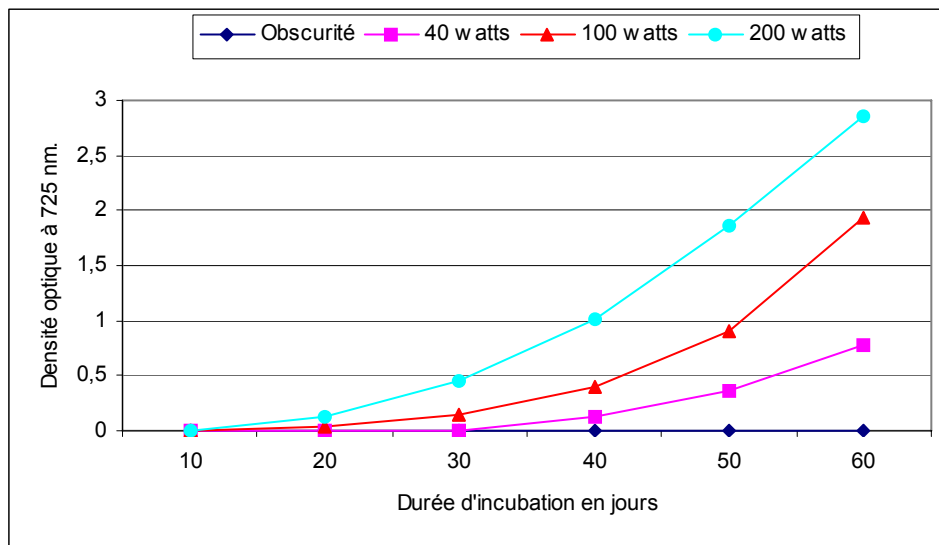
Les résultats de cette étude ont montré que le filtrat de culture de *Ph. sabdariffae* était photosensible, puisqu'il brunissait à la lumière (Fig. 3 A & B). Ces brunissements étaient proportionnels à l'intensité lumineuse, et à la durée d'exposition des échantillons. Les plus grandes valeurs de densité optique (DO) étaient notées au 60^{ème} jour d'exposition à l'intensité lumineuse de 200 W. Les filtrats témoins conservés à l'obscurité n'ont pratiquement pas brunis.

Les résultats de ce travail ont également

révélé que le brunissement des filtrats de culture de *Ph. sabdariffae* suite aux radiations lumineuses était accompagné d'une perte progressive de leur toxicité (Fig. 4 A & B). Cette perte était proportionnelle à l'intensité lumineuse, et à la durée d'incubation des échantillons. Au 60^{ème} jour d'incubation, les filtrats exposés à 40 W conservaient encore plus de 30 % de leur toxicité initiale, alors que ceux soumis aux radiations de 200 W étaient devenus totalement inactifs. L'analyse statistique a indiqué que l'effet des intensités lumineuses sur la perte de toxicité des filtrats de culture de *Ph. sabdariffae* était significatif au seuil de 5 %.

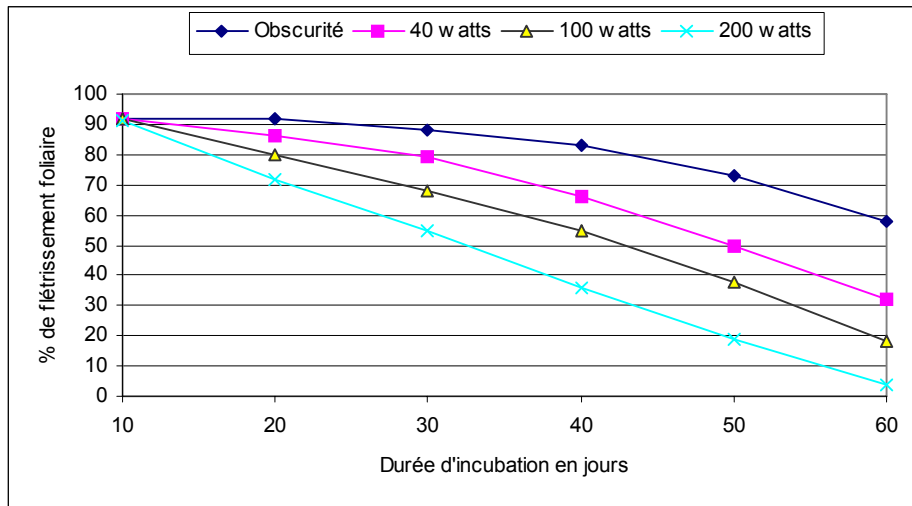


A

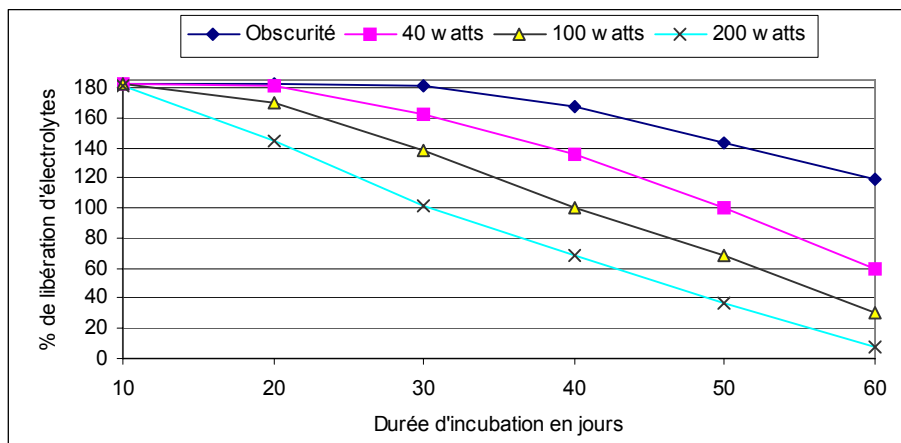


B

Figure 3 : Brunissement du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc., mesurée en densité optique, aux longueurs d'onde de 470 nm (A) et 725 nm (B), après incubation à différents éclairages lumineux, à la température de 10 °C.



A



B

Figure 4 : Effet des différentes intensités lumineuses sur la toxicité du filtrat culture de *Phoma sabdariffae* Sacc., mesurée en % de flétrissement foliaire (A) et de libération d'électrolytes (B), à la température de 0 °C.

3.3. Dosage de quelques composés biochimiques du filtrat de culture de *Ph. sabdariffae*

Les résultats des dosages biochimiques des composés du filtrat de culture de *Ph. sabdariffae* ont été résumés à la Fig. 5. Leur analyse a révélé que ce filtrat fongique était relativement riche en composés glucidiques, protéiques et phéno-

liques, avec des teneurs respectives de 41,7 ; 35,8 et 13,4 mg/g de matière fraîche. Ces teneurs étaient au moins 6 fois plus élevées que celles des filtrats témoins. Il est à noter que les composés phénoliques étaient totalement absents dans les filtrats témoins. L'analyse statistique a indiqué que la différence des teneurs entre les filtrats fongiques (essais) et vierges (témoins) était significative à 5 %.

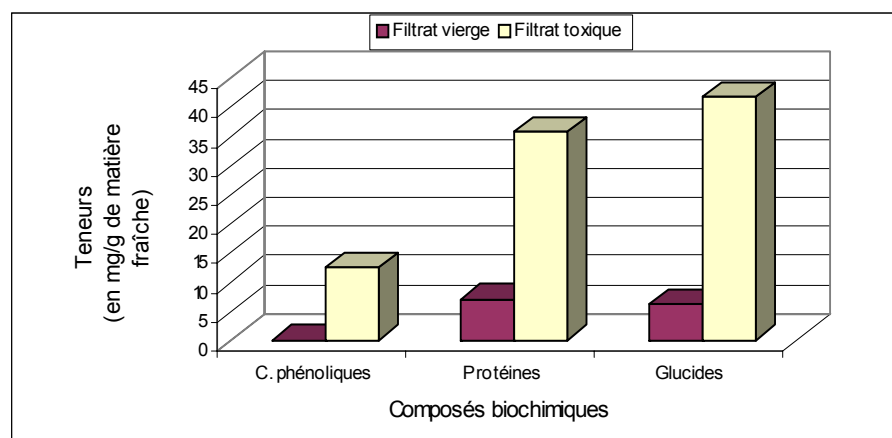


Figure 5 : Teneur de quelques composés biochimiques des filtrats de culture vierge (témoin) et toxique (essai) de *Phoma sabdariffae* Sacc.

3.4. Analyse chromatographique du filtrat de culture de *Ph. sabdariffae*

Le fractionnement chromatographique du filtrat de culture de *Ph. sabdariffae* a révélé que celui-ci était constitué de 4 fractions distinctes, avec des rapports frontaux (R_f) de : F1 = $0,12 \pm 0,03$; F2 = $0,39 \pm 0,02$; F3 = $0,44 \pm 0,03$ et F4 = $0,51 \pm 0,06$. Deux (2) de ces fractions se sont montrées particulièrement actives. Ce sont les fractions

F1 et F4, avec des points de fusion (P_f) respectifs de 201 ± 3 °C et 219 ± 3 °C.

3.5. Dosage biochimique des fractions actives

Le dosage biochimique des fractions actives F1 et F4 a révélé que celles-ci étaient essentiellement constituées de composés phénoliques, avec des teneurs respectives de 2,9 et de 1,8 mg/g de matière (Fig. 6).

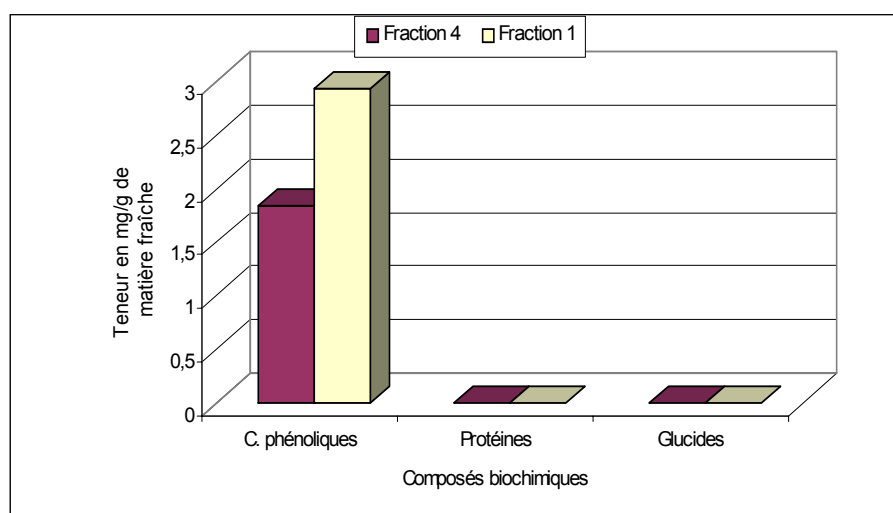


Figure 6 : Teneur de quelques composés biochimiques des fractions actives du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc.

3.6. Tests de toxicité des fractions actives

Pour mesurer la toxicité des fractions actives F1 et F4, du filtrat de culture de *Ph. sabdariffae*, des analyses comparatives ont été effectuées avec le filtrat brut, à l'aide des tests biologiques de flétrissement foliaire et de libération d'électrolytes. Les résultats de cette étude ont montré que la fraction F1 était légèrement plus toxique que la

fraction F4 (Fig. 7 A & B). Mais pour les 2 fractions, les activités biologiques moyennes de flétrissement foliaire et de libération d'électrolytes étaient nettement supérieures à celles du filtrat brut. A la 30^{ème} minute par exemple, ces activités étaient environ 5 fois plus élevées que celles du filtrat brut. L'étude statistique a indiqué des différences de toxicité entre les fractions actives et le filtrat brut significatives au seuil de 5 %

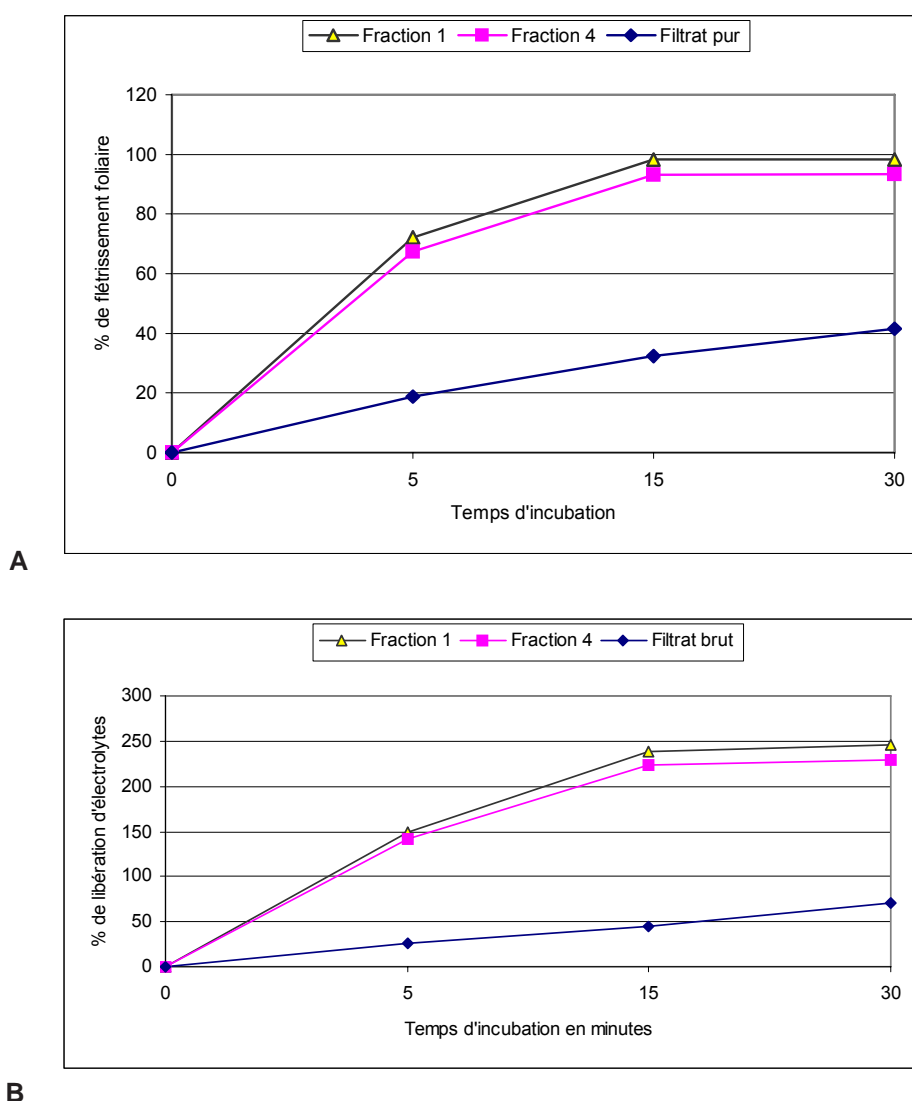


Figure 7 : Toxicité des fractions actives du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc., mesurée en % de flétrissement foliaire (A) et de libération d'électrolytes (B), à la température de 25 °C.

4. Discussion

Les résultats de cette étude ont montré que le filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc. se conservait relativement bien à la température de 0°C. Au delà de cette température, il perdait progressivement sa toxicité et devenait totalement inactif au delà de 50°C. Ces résultats suggèrent que les températures élevées provoquent l'altération de molécules constitutives de ce filtrat toxique. Il peut s'agir d'une détoxification des composés toxiques à proprement dit, ou de celle de composés secondaires, conduisant à l'inactivation du filtrat. En effet, au cours de la pathogenèse, de nombreux agents pathogènes excrètent parallèlement aux toxines, de nombreux composés inactifs, soupçonnés jouer un rôle de stabilisateurs ou de facteurs aggravants de la maladie (Daly & Knoche, 1982). La dégradation de ces composés modifie l'équilibre du milieu et perturbe l'activité biologique des toxines. De tels phénomènes ont été rapportés chez *Phoma tracheiphila*, agent pathogène des Citrus (Nachmias et al., 1977). Les résultats de ce travail ont également montré que les radiations lumineuses provoquaient le brunissement du filtrat de culture de *Ph. sabdariffae*, suivi d'une sévère perte d'activités toxiques. Ces résultats suggèrent que le filtrat contient vraisemblablement des composés phénoliques. Cette hypothèse est confirmée par les résultats biochimiques. Ce brunissement serait lié à la dégradation des polyphénols en composés complexes tels que les coumarines ou les flavonoïdes, comme rapporté chez le bananier plantain (Lépengué, 1999). Ces produits de dégradation auraient des principes actifs altérés par la formation des chélats, des méthylations ou des liaisons thiols et amines, conduisant à la perte de leur toxicité (Heller, 2002). L'étude biochimique a révélé que *Ph. sabdariffae* excrétait au cours de sa culture, de nombreuses substances glucidiques, protéiques et phénoliques. Ces résultats suggèrent, à priori, que toutes ces excréctions participent à la toxicité du filtrat. L'analyse des fractions actives, après chromatographie sur couche mince, nous suggère de circonscrire l'action toxique aux seuls composés phénoliques. Les composés glucidiques et protéiques dans ce cas peuvent être considérés comme facteurs secondaires. L'analyse chromatographique a révélé que le filtrat de culture de *Ph. sabdariffae* renfermait 4 fractions

phénoliques, dont 2 actives, F1 et F4. La caractérisation formelle de ces molécules nécessite une étude supplémentaire en techniques de chromatographie liquide haute performance (HPLC) et de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire (RMN). En tenant compte de l'ensemble des résultats déjà obtenus à ce jour, quelques suggestions peuvent être formulées. En effet, les caractéristiques biologiques (toxicité, spécificité, spectre d'action) et physico-chimiques (R_f , point de fusion, teneur) des fractions actives, F1 et F4 de ce filtrat toxique, les apparentent respectivement à la brefeldine A ($R_f = 0,52$; $P_f = 203^\circ\text{C}$) et la cytochalasine B ($R_f = 0,14$; $P_f = 223^\circ\text{C}$), deux toxines également rencontrées chez de nombreuses espèces du genre *Phoma* (Suzuki et al., 1972). L'étude de la biotoxicité des fractions actives F1 et F4 a révélé que leurs activités biologiques étaient nettement supérieures à celles du filtrat brut. Ces résultats confirment l'idée que l'action toxique de *Ph. sabdariffae* repose sur l'excrétion de substances phénoliques, dont l'activité semble indépendante de la présence des autres composés sécrétés (glucides et protéines).

5. Conclusion

Le filtrat de culture de *Ph. sabdariffae* est relativement riche en composés glucidiques, protéiques et phénoliques. Mais sa toxicité paraît uniquement liée aux derniers cités, dont le chromatogramme laisse découvrir 2 fractions actives F1 et F4, avec des caractéristiques physico-chimiques respectivement proches de celles de la brefeldine A et de la cytochalasine B. Des études ultérieures de caractérisation structurale moléculaire en chromatographie liquide haute performance (HPLC), en résonance magnétique nucléaire (RMN) ou en infra rouge (IR) devraient permettre d'éprouver cette hypothèse.

Références citées

- Ahoussou N., 1989. *Etude de l'antrachnose de l'igname (Dioscorea alata) provoquée par Colletotrichum gloeosporioides*. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences naturelles, Spécialité Biologie végétale, Univ. de Provence, Aix-Marseille I. 100 pp.

- Bousquet J.F. & Barbier M., 1972. Sur l'activité phytotoxique de trois souches de *Phoma exigua* et la présence de la cytochalasine B (ou phomine) dans leur milieu de culture. *Phytopath. Z.*, 75 : 365-367.
- Daly J.M. & Knoche H.W., 1982. The chemistry and biology of pathotoxins exhibiting host-selectivity. *Plant Pathol.*, 1 : 83-138.
- Goodman R.N., 1960. Colletotrin : a toxin produced by *Colletotrichum fuscum*. *Phytopathology*, 50: 325-327.
- Heller R., Esnault R., & Lance C., 2002. *Physiologie végétale. Développement*. 6^e édition de l'Abrégé, édition Dunod, Paris, 294 pp.
- Lépengué A.N., 1999. *Etude des corrélations entre les caractères organoleptiques et biochimiques des bananes plantain entreposées aux températures élevées*. Rapport de DEA, Agrophysiologie, UFR Biosciences, Univ. de Cocody Abidjan, 68 pp.
- Lépengué A.N., 2008. *Contribution à la protection de la roselle contre la pourriture engendrée par Phoma sabdariffae Sacc. et Trichosphaeria sp. au Gabon. Etude des mécanismes d'action fongiques phytotoxiques*. Thèse de Doctorat d'Université, Agrophysiologie, spécialité Phytopathologie, Univ. de Cocody-Abidjan, 294 pp.
- Lépengué A.N., M'batchi B., & Aké S., 2007. Étude de l'activité respiratoire de différents cultivars de roselle traités au filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc. *Annales de l'Université Marien N'gouabi*, 8 (4) : 79-85.
- Mouaragadja I. & M'batchi B., 1997. Etude et identification de la pourriture de l'oseille de Guinée au Gabon. *Fruits*, 53 (1): 57-68.
- Nachmias A., Barash I., Solez Z., & Strobel G.A., 1977. Purification and characterization of a phytotoxin produced by *Phoma tracheiphila*, the causal agent of Mal secco disease of Citrus. *Physiol. Plant Pathol.*, 10 : 147-157.
- Suzuki H., Tanaka H., Aoki K., & Tamura T., 1970. Ascotoxin (decumbin) a metabolite of *Ascochyta imperfecta* Peck. *Agric. Biol. Chem.* (Tokyo), 34 : 395-413.