

RECHERCHE ET ANALYSE D'UN EFFET MUTAGENE DES EXTRAITS DE FEUILLES D'OLIVIER PARASITEES PAR LE CHAMPIGNON *CYCLOCONIUM OLEAGINUM* CAST.

Reçu le 27/10/2002 – Accepté le 21/09/2002

Résumé

Des propriétés mutagènes ont été observées sur la substance phytotoxique "A", dans des extraits de feuilles d'olivier contaminées par *Cycloconium oleaginum* et chez le mycélium de ce champignon, cultivé dans le milieu pour le système des souches de *Bacillus subtilis* M 45 *rec-*, *arg-*, *try-* et de *Bacillus subtilis* H 17 *rec+*, *arg-*, *try-*.

Une substance dont l'effet mutagène est plus considérable a été trouvée dans l'extrait du milieu de culture. Cette substance n'a pas été détectée de l'extrait des feuilles d'olivier contaminées.

Mots clés: Substance mutagène; Extrait de feuilles d'olivier ; *Cycloconium*

Abstract

Mutagenic properties were observed in the phytotoxic substance "A", in the extract from contaminated olive leaves and in the mycelium of this fungus developed in the medium using a bacterial system: *Bacillus subtilis* M 45 (*rec-*, *arg-*, *try-*) and *Bacillus subtilis* H 17 (*rec+*, *arg-*, *try-*). Another substance has this activity too, manifesting the mutagenic effect was found in the extract from *C.oleaginum* culture. This substance was not detected in the extract from contaminated leaves.

Key words: Olive leaf extract, Mutagenic effect, Phytotoxic substance, *Cycloconium*.

A. GUECHI

Laboratoire de Microbiologie
et de Phytopathologie
Faculté des Sciences
Université Ferhat Abbas
19000, Sétif, Algérie

L. GIRRE

Laboratoire de Pharmacognosie
et de Mycologie
U.F.R. des Sciences
Pharmaceutiques
Rennes I, France

Une substance phytotoxique appelée substance 'A' est produite par un champignon pathogène, le *C.oleaginum*, dans les milieux de culture et dans les feuilles d'olivier, dès le commencement de la maladie, au stade de la germination des spores sur les feuilles d'olivier [5,6,17]. La quantité de cette substance augmente avec la progression de la maladie. Cette progression est accompagnée par le développement d'une chlorose autour des colonies fongiques, ce que certains auteurs considèrent comme l'un des signes de la participation de toxines dans les maladies cryptogamiques des plantes [4,7,13]. La meilleure production de la substance A a été obtenue par culture du champignon sur un extrait liquide de malt [6,17].

Afin de comprendre le rôle de cette substance dans le développement de la maladie de l'œil de paon sur les feuilles d'olivier, nous déterminerons l'effet de la substance A, en utilisant un système de bactérie : *Bacillus subtilis rec+ et rec-*.

ملخص

تم ملاحظة خصائص الطافرات عند المادة A ، عند مستخلصات أوراق الزيتون المصابة بـ *Cycloconium oleaginum* Cast. و عند مسليوم هذا الفطر المزروع في وسط لنظام العزلات:

Bacillus subtilis M 45 (*rec-*, *arg-*, *try-*) and *Bacillus subtilis* H 17 (*rec+*, *arg-*, *try-*).

لقد وجدت مادة اخرى ذات تأثير طافر معتبر في مستخلص وسط الزرع. هذه المادة لم يتم التحري عليها من عند مستخلص أوراق المصابة.

الكلمات المفتاحية: مستخلص أوراق الزيتون، تأثير طافر، مادة ذات تأثير سام على النبات، *Cycloconium*

MATERIELS ET METHODES

Isolation et purification de la substance A

La substance A a été isolée à partir de 1 kg de feuilles d'olive contaminées par le champignon *C.oleaginum* et récoltées en avril 1999. Les feuilles, broyées, ont été traitées avec agitation dans 2 litres d'un mélange chloroforme et méthanol (2 : 1) pendant 30 min. L'extrait de feuilles coupées a été filtré et concentré à la température de 55°C sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 ml. Un précipité abondant s'est formé pendant la concentration et a été séparé par centrifugation après refroidissement à 4°C. Le surnageant a été concentré à nouveau jusqu'à l'obtention d'un volume de 2 ml; l'extrait concentré a été déposé sur un gel de silice 60 G (Merck) pré-étalé en couches minces de 2 mm d'épaisseur; les plaques ont été développées dans un solvant d'éluion contenant toluène, acétate d'éthyle et acide acétique (9 : 3 : 1)

et ont été examinées sous la lumière ultra-violette à 366 nm. Une zone de gel de silice contenant une fluorescence bleue de la substance A a été séparée et extraite avec du méthanol. Après évaporation du méthanol, la substance a été solubilisée dans 1 ml de chloroforme, avant d'être soumise à un fractionnement par chromatographie sur couche mince (CCM) dans les systèmes : toluène-acétate d'éthyle-acide acétique (6 : 3 : 1) et benzène acide acétique (9 : 1). Le gel de silice contenant de la substance A a été gratté et extrait avec le méthanol.

L'extrait du mycélium est préparé à partir de 400 ml du mélange de milieu contenant le mycélium du *C.oleaginum*, obtenu après 10 mois de culture. L'extrait évaporé est solubilisé dans 1 ml de chloroforme. La substance A provient de 20 ml de l'extrait du milieu de culture déposé sur la plaque de silice et chromatographié dans les deux dimensions (1ère dimension : toluène-acétate d'éthyl-acide formique (5 : 4 : 1); 2ème dimension : benzène - acide acétique (9 : 1), la silice contenant la substance A a été grattée et extraite par du méthanol. Le méthanol a été concentré à 0.1ml. La quantité entière a été déposée sur le disque.

La silice déposée sur la gélose ensemencée par *Bacillus subtilis rec+ et rec-* correspond aux taches séparées dans le système n°1 toluène-acétate d'éthyl-acide formique (5 : 4 : 1) à partir de 20 µl de l'extrait du milieu de culture du *C.oleaginum*. Avant de récupérer la silice par grattage, la plaque a été maintenue sous un courant d'air froid pendant 20 minutes.

Test de mutagénicité

Plusieurs systèmes de bactéries ont été développés pour le dosage des substances mutagènes dans l'environnement [2, 3]. Tous ces tests sont basés sur l'observation que les souches bactériennes carencées en un ou plusieurs systèmes enzymatiques responsables de la réparation des dommages subis par leur AND, sont très sensibles aux agents qui effectuent ces modifications structurales et qui peuvent se manifester par l'effet mutagène.

Dans le programme de recherche de la mutagénicité dans l'environnement, il est recommandé d'utiliser le test de *rec* avec les souches de *Bacillus subtilis* M 45 *rec-*, *arg-*, *try-* et de *Bacillus subtilis* H 17 *rec+*, *arg-*, *try-* selon la méthode de Mazza [11,12,] qui consiste à déposer différentes concentrations des extraits des feuilles d'olivier saines, contaminées et le mélange de milieux de culture contenant le mycélium du *C. oleaginum* âgé de 10 mois, sur des disques de papier de 0.6 cm de diamètre préalablement stérilisé. Les disques sont ensuite déposés en boîtes de Pétri, sur la surface d'une gélose ensemencée par la souche *Bacillus subtilis rec-* et à la surface d'une autre gélose ensemencée par la souche *Bacillus subtilis rec+*. Les boîtes contenant ces géloses ensemencées sont placées à +4°C pendant 24 heures pour permettre aux substances de diffuser dans le milieu gélosé. Ces boîtes sont ensuite placées à 37° C pendant 24 heures.

La présence de la substance mutagène ou toxique sur le disque se manifeste par la formation d'une zone d'inhibition. Si le rapport des zones d'inhibition produites

par un même extrait, à une même concentration, sur le milieu ensemencé par la souche *rec-* et sur celui ensemencé par la souche *rec+*, est égal ou supérieur à 1.20, l'extrait est considéré comme ayant un effet mutagène positif [12]. Si le rapport des zones est inférieur à 1.20 ou égal à 1, l'extrait est considéré comme toxique pour *B. subtilis*.

RESULTATS

L'extrait des feuilles saines inhibe la croissance des souches *rec+* et *rec-* de la même manière. Le rapport de l'activité de cet extrait pour la souche *rec+* et pour la souche *rec-* est égal à 1 à partir d'une quantité de 30 µl de l'extrait déposé sur le disque.

Une plus faible quantité de l'extrait ne manifeste aucun effet. Une sensibilité identique pour chacune des souches, *rec-* ou *rec+*, vis-à-vis de l'extrait des feuilles saines met en évidence un effet toxique différent de l'effet mutagène.

L'extrait des feuilles contaminées par *C. oleaginum* inhibe la croissance de la souche *rec-* de façon plus importante que celle de la souche *rec+*. Le rapport des zones d'inhibition est égal à 2 ou 2.6. De la même manière, l'extrait du milieu de culture et du mycélium du *C.oleaginum* influence la croissance des souches *rec-* et *rec+* (Tab.1). Ces résultats montrent que c'est le champignon qui est responsable de l'effet mutagène des extraits de feuilles contaminées et du milieu de culture.

Pour confirmer ou infirmer la responsabilité de la substance A dans cet effet, elle est isolée par C.C.M. bidimensionnelle à partir de 20 µl de l'extrait du mélange de milieu de culture contenant le mycélium (Fig.1). L'effet mutagène de la substance A ainsi purifiée est inférieur à celui de l'extrait entier.

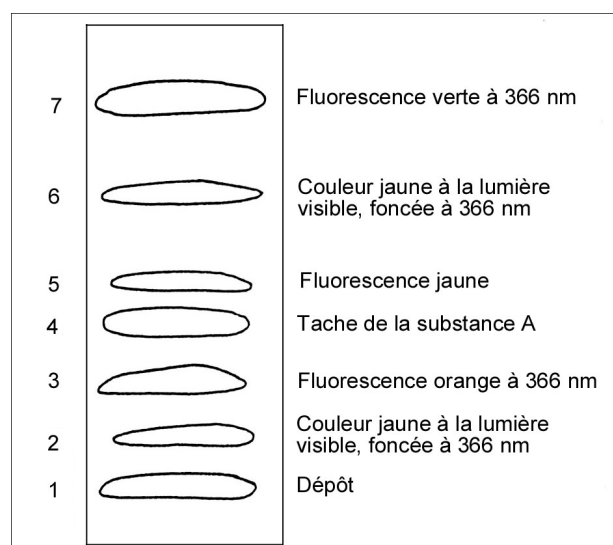


Figure 1 : Chromatogramme sur couche mince de silice de l'extrait de mélange du milieu de culture et du Mycelium du *Cycloconium Oleaginm*.

Système d'éluion : Benzène-Acide acétique (9;1) révélation: 366 et 254 nm.

La silice de 7 taches différentes est grattée et la moitié de chaque tache est déposée sur une boîte de pétri ensemencée avec le *Bacillus Subtilis rec+* ou *rec-*. Les taches 4 et 5 manifestent l'effet mutagène pour le *Bacillus subtilis*. La tache 7 manifeste un effet inhibiteur identique pour les souches *rec+* et *rec-*.

Matériel examiné	Quantité déposée sur le disque (µl)	Zone d'inhibition (mm) du <i>Bacillus subtilis</i>		Activité relative rec- / rec+
		H 17 rec+, Arg-, tryp-	M 45 rec, arg-, tryp-	
Extrait de feuilles saines	10	0	0	Non mesurable
	30	1	1	1
	60	2	2	1
Extrait de feuilles contaminées	10	0	0	Non mesurable
	30	2	4	2
	60	3	8	2.6
Extrait des milieux de culture contenant le mycélium	5	0.5	1	2
	10	1	2	2
	20	2	4	2
Substance A purifiée	20	1.5	2	1.3
Silice avec la substance A	Correspond à 20 µl de l'extrait de mycélium	1.5	2	1.3
Silice avec la substance jaune (n°5) (figure 1)	"	2	3	1.5
Silice avec la substance n° 7 (figure 1)	"	2	2	1
Silice du point de dépôt (figure 1)	"	0	0	Non mesurable
Silice du front du chromatogramme	"	0	0	Non mesurable
Extrait de milieu nonensemencé par le <i>Cycloconium oleaginum</i>	"	0	0	Non mesurable

Tableau 1: Activité mutagène de la substance 'A' des extraits de feuilles d'olivier et du mélange de milieu de culture contenant le mycélium de *Cycloconium oleaginum* âgé de 10 mois, pour *Bacillus subtilis* H17 rec+, arg-, tryp- et *Bacillus subtilis* M45 rec-, arg-, tryp-.

Une analyse complémentaire a été effectuée pour détecter, éventuellement, dans l'extrait du mélange du milieu, une autre substance présentant un effet mutagène pour *Bacillus subtilis*. L'extrait de ce mélange est séparé par C.C.M. monodimensionnelle. Sept taches différentes sont observées à 254 et 366 nm (Fig.1). Après l'évaporation complète des solvants organiques de la plaque de silice, les taches ont été grattées, divisées en deux parties et déposées sur deux boîtes de Pétriensemencées par *Bacillus subtilis*, rec+ et rec- respectivement. L'effet mutagène a été observé non seulement pour la substance A mais aussi pour la substance de Rf légèrement supérieur (numérotée 5) et qui donne une fluorescence jaune à 254 et 366 nm (Tab.1).

La substance ayant le R.f. le plus élevé (substance numérotée 7) et qui présente une fluorescence verte inhibe la croissance des souches rec+ et rec- de la même manière. Elle est donc toxique et non pas mutagène. Les autres substances n'influencent pas la croissance de ces souches.

DISCUSSION

Les propriétés des extraits de feuilles contaminées, celles du milieu de culture et celles de la substance A

purifiée vis-à-vis des souches de *Bacillus subtilis* peuvent témoigner également en faveur de caractère toxique de la substance A.

Les résultats de plusieurs travaux, [10,12,15] montrent que les souches de *Bacillus subtilis* rec+ et rec- sont capables de détecter des substances endommageant l'acide déoxyribonucléique (ADN) et causant ainsi des mutations qui peuvent provoquer un dysfonctionnement du métabolisme intermédiaire et, éventuellement, une transformation des cellules normales en cellules cancéreuses. Il a été montré que les souches du *Bacillus subtilis* rec+ et rec-, sont sensibles aux substances endommageant l'ADN, sans leur métallisation préalable par des enzymes microsomaux du foie des animaux d'expériences [2, 3].

D'après ces résultats, l'effet mutagène que nous avons mis en évidence dans des extraits de feuilles contaminées par ce parasite, vis-à-vis du *Bacillus subtilis*, est très important.

L'effet mutagène de la substance A et celui de l'aflatoxine B1 ont été comparés (Fig.2). La mutagénicité de cette mycotoxine s'est manifesté à partir d'une concentration de 100 mg par disque. L'effet de cette forte concentration de l'aflatoxine B1 correspond à peu près à l'effet mutagène de la substance A obtenu à partir de 8 ml du milieu de culture du *Cycloconium oleaginum*, le champignon s'étant développé sur ce milieu pendant 10 mois.

Cet extrait a été séparé par C.C.M. dans le système n°1 toluène-acétate d'éthyl-acide formique (5 :4 :1). Sept substances sont détectables par leur fluorescence ou leur coloration en lumière UV. Elles ont toutes été soumises à l'analyse de la mutagénicité vis-à-vis du *Bacillus subtilis*. Cette analyse a mis en évidence que la substance A n'est pas la seule substance de cet extrait à posséder un effet mutagène. Il existe, en effet, une autre substance dont l'effet mutagène est encore plus considérable. Cette substance émet une fluorescence jaune sous UV et aucune coloration en lumière visible. Par ces caractères, elle ressemble à beaucoup de substances habituellement présentes dans les extraits de feuilles saines; c'est sans doute pour cette raison que nous ne l'avons pas isolé dans les extraits de feuilles contaminées et doit contribuer à son effet mutagène. L'observation de l'effet supérieur de l'extrait de feuilles contaminées par rapport à l'effet de la substance A, purifiée à partir d'une même quantité de cet extrait, renforce cette hypothèse. De même, l'effet mutagène de la substance A, purifiée à partir de l'extrait du milieu de culture, a été jugé plus faible que celui de l'extrait entier. L'effet inhibiteur de l'extrait du mycélium vis-à-vis de souche *Bacillus subtilis*, n'est pas uniquement dû aux deux substances mutagènes précédemment évoquées.

En effet, une autre substance, émettant une fluorescence

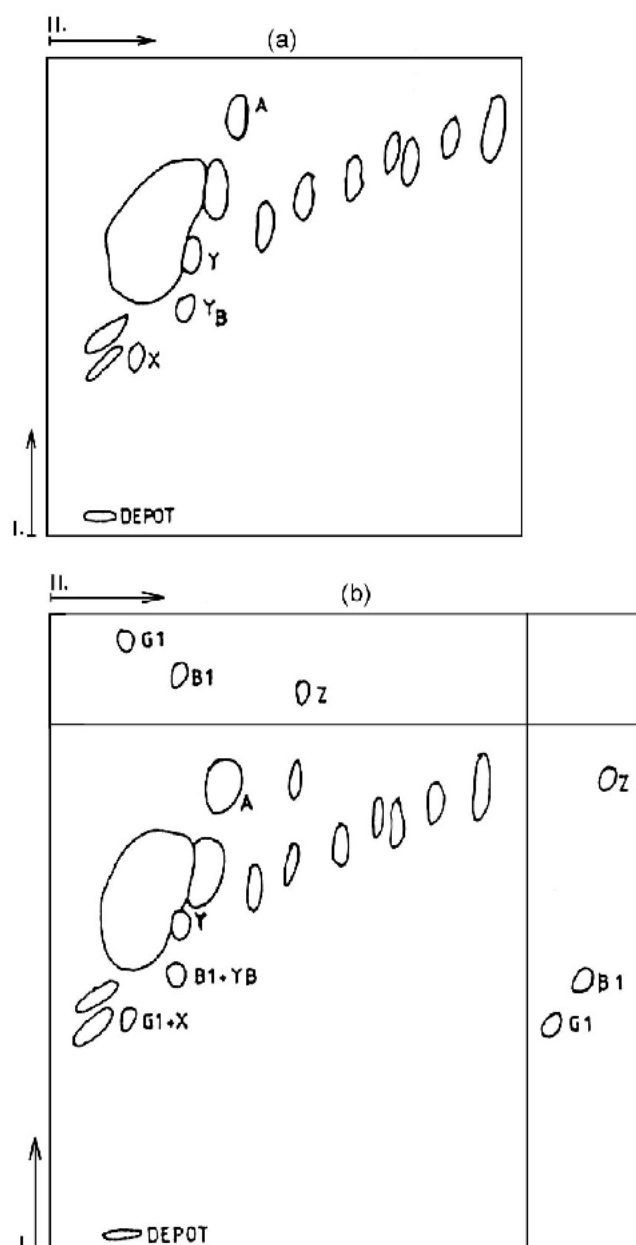


Figure 2 : Chromatogrammes bidimensionnels de l'extrait de feuilles contaminées, récoltées en avril 1999. (a) sans standards internes, (b) avec des standards internes et externes d'aflatoxines (B1 et G2) et avec la zéaralénone (Z), symboles : A = tache de la substance A, Y = tache de même Rf que l'aflatoxine B1 dans le système I et II.

Systèmes chromatographiques :

Dans la direction I : Toluène-Acétate d'éthyle-Acide formique (5 :4 :1),

Dans la direction II : Benzène- Acide acétique (9 :1).

verte à 366 nm, a été également décelée par C.C.M. (substance 7, figure 1). Cette substance semble être présente dans le mycélium de la majorité des champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Elle inhibe d'une façon identique la croissance de *Bacillus subtilis* rec+, et de *Bacillus subtilis* rec-. Elle n'a donc pas d'effet mutagène. Sa présence dans l'extrait du mycélium contribue à son effet inhibiteur, à la fois vis-à-vis de la souche rec+, et de la souche rec- (Tab.1).

Dans l'extrait des feuilles contaminées, des substances

phénoliques peuvent également avoir un rôle de défense et permettre à la plante de survivre en présence de nombreux champignons pathogènes répandus dans son environnement. Parmi ces substances, il existe des constituants propres à la plante saine et d'autres synthétisés par la plante après sa contamination par les micro-organismes pathogènes : il s'agit des phytoalexines [9,13,14]. Ces dernières représentent la réponse de la plante à la blessure causée par le parasite [4,9] et doivent donc inhiber la croissance de certains micro-organismes. L'effet inhibiteur de la croissance de *Bacillus subtilis* rec+ et rec-, provoqué par l'extrait de feuilles contaminées, est supérieur à celui de l'extrait de feuilles saines. Cette différence peut être causée non seulement par la présence de la substance A et d'autres substances inhibitrices trouvées dans l'extrait du milieu de culture, mais aussi, également, par des phytoalexines.

CONCLUSION

Un effet inhibiteur de la croissance du *Bacillus subtilis* rec+ et rec- par l'extrait de feuilles saines a été observé. Cet extrait a inhibé les deux souches de façon identique, ce qui indique que les substances toxiques de cet extrait ne réagissent pas avec l'ADN de ces bactéries mais qu'elles endommagent leur processus métabolique par un autre mécanisme biochimique [8,16]. Cet effet inhibiteur de l'extrait de feuilles saines peut être provoqué par des substances phénoliques présentes dans ces feuilles.

Pour la substance A et pour une autre substance de l'extrait du milieu de culture du *C. oleaginum*, un effet mutagène a été mis en évidence. Il s'est manifesté par une grande inhibition de la croissance de la souche rec- par rapport à la souche rec+. Cet effet mutagène est causé par la réaction chimique de ces substances avec le matériel génétique des cellules [1,15]. La dégradation ou l'inhibition de ce matériel génétique peut conduire à des dérégulations du métabolisme intermédiaire de la cellule dont certaines conséquences secondaires peuvent se manifester, par exemple, par la dégradation des chlorophylles, donc par le développement de la chlorose, autour des colonies du *C. oleaginum*, responsable de la chute des feuilles d'olivier [4,7].

RÉFÉRENCES

- [1]- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D., "Basic genetic mechanisms". In: Molecular biology of cell, Garland publishing Inc. New York and London., (1983), pp. 199-250.
- [2]- Ames B.N., "A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens". In : Sutton HE. Harris M (eds.), Effects of environmental contaminants New York: Academic Press, (1972), pp. 57-66.
- [3]- Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E., "An improved bacterial test for the detection and Classification of mutagens and carcinogens", Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 70, (1979), pp. 782-86.
- [4]- Durbin R.D., "Host specific toxin: Recognition and specificity factor in plant disease", Tottari University Japan, 1: (1989), pp. 135-142.
- [5]- Guéchi A., Abdelatif W. et Girre L., "Facteurs influençant la

- germination des conidies du champignon *Spilocaea oleaginea* agent de l'œil de paon de l'olivier", *Arab. J. Plant. Protection*, 9 (2), (1991), pp. 88-94 .
- [6]- Guéchi A., Yahiaoui R., Lukasova E., Girre L., "Mise en évidence d'un métabolite secondaire substance A produit par la *Cycloconium oleaginum* champignon pathogène de feuilles d'olivier", *Rev. Univ. Sci. Technol.*, Université de Constantine, Algérie, 2, (1991), pp. 1-39.
- [7]- Guéchi A. and Abdelatif W., "Some biological characteristics of *Spilocaea oleaginea* the causal agent of olive leaf spot", *Arab. J. Pl Prot.*, 12 (2), (1994), pp. 92-98.
- [8]- Howard-Flanders P., "DNA repair", *Ann. Rev. Biochem.*, 37, (1968), pp. 175-200.
- [9]- Ingham J.L., "Phytoalexins and other natural products as factors in plant disease resistance", *Bot. Rev.*, 38, (1972), pp. 343-424.
- [10]- Kada T., Hirono K. and Shirasu Y., "Screening of environmental chemical mutagens by rec assay system with *Bacillus subtilis*. In *Chemical Mutagens*", Principles and Methods of their Detection. F. de Serres et H. O. Hoare Eds. Vol.6, New York, (1980), pp. 149-173.
- [11]- Mazza, G., "*Bacillus subtilis* rec assay test with isogenic strains", *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, (1982), pp.177-184.
- [12]- Mazza, G., "Rapid assay for detection of microorganisms producing DNA-Damaging metabolites", *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, (1983), pp. 1949-1952.
- [13]- Patil S.S., Tam L.Q. and Sakai W.S., "Mode of action of the toxin from *Pseudomonas phaseolicola*. I. Toxin specificity, chlorosis and ornithine accumulation", *Plant Physiol.*, 49, (1972), pp. 803-807.
- [14]- Singh R.S., "Introduction to Principle of plant pathology", X Oxford and IBH Publishing Co. PVT. LTD. New Delhi, Bombay, Calculata, 1984.
- [15]- Stark A., "Mutagenicity and carcinogenicity of mycotoxins: DNA binding as a possible mode of action", *Ann. Rev. Microbiol.*, 34, (1980), pp. 225-262.
- [16]- Watson J.D., "Les origines virales du cancer. In : *Biologie moléculaire du gène*", Ed. Inter Paris, (1978), pp. 641-690.
- [17]- Yahiaoui R., "Etude des caractéristiques structurales et biologiques d'une phytotoxine produite par le *Cycloconium oleaginum* champignon parasite des feuilles d'*olea europaea* L.", Thèse de magister de l'Université de Sétif, (1991), pp. 1-138. □