

## Production et caractérisation chimique des toxines sécrétées par *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, agent causal du bayoud

R. El Fakhouri<sup>1</sup>, F. Lotfi<sup>1</sup>, My.H. Sedra<sup>2</sup> et H.B. Lazrek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Bio-organique, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech, Maroc.

<sup>2</sup> Laboratoire de phytopathologie, Centre régional du Haouz-Pré-Sahara, BP. 533 4000, Inra, Marrakech, Maroc

### Résumé

L'étude cinétique de sécrétion des toxines du *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, agent causal du bayoud, en relation avec la production des spores du parasite a été étudiée pendant une période de 14 jours. Cette étude a été réalisée sur deux milieux synthétiques : Czapeck et Richard. Le milieu Czapeck semble le plus favorable à la fois à la sporulation du champignon et à la sécrétion des toxines. De plus, l'analyse statistique par la comparaison des moyennes et écart-types montre une différence très nette de production dans ce milieu à partir du 4<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> jour.

Les résultats présentés et discutés dans cet article ont permis de mettre en évidence la présence de substances toxiques, autres que l'acide fusarique, dans le filtrat de culture du parasite, ainsi que les conditions optimales de leur sécrétion et leur nature.

**Mots clés :** *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, sporulation, toxines, peptide, bayoud, palmier dattier

### Abstract : Production and chemical characterization of toxins secreted by *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, causal agent of bayoud disease.

The kinetic study of toxins secreted by *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, causal agent of Bayoud disease, in relation with spores production was evaluated during a period of 14 days. This study was realized on two culture media : Czapeck and Richard. The Czapeck medium appears to be the most favorable for toxin production and sporulation. Furthermore, statistic analysis comparison has shown a difference production in this medium since the 4<sup>th</sup> and the 6<sup>th</sup> day.

The results given and discussed in this paper have shown the presence of toxic substances other than fusaric acid and have permitted the determination of optimum conditions for toxins secretion and their nature.

**Key words :** *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*, sporulation, toxins, peptide, bayoud, date palm

## ملخص : إنتاج و دراسة الخصائص الكيماوية للمواد السامة التي يفرزها الفطر المسبب لمرض البيوض

الفاخوري ر1،.الطفي ف1،. سدره م.ح2. و لزرق ح.ب1.

1:كلية سملاية، مراكش، المغرب.

2:المركز الجهوي للبحث الزراعي، مراكش، المغرب.

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم سرعة إنتاج إفرازات المواد السامة من طرف الفطر الطفيلي المسبب لمرض البيوض و علاقتها مع إنتاج بويضاته خلال 14 يوما على وسطين غذائيين مختلفين (كزاييك ريشار). أسفرت النتائج على اختيار وسط غذائي (كزاييك) الأكثر ملائمة لإفراز المواد السامة و تبوغ الفطر، خاصة ابتداء من اليوم الرابع و السادس من التجربة و على إيجاد مواد سامة فطرية جديدة زيادة على حامض الوزاريك. كما مكنت من ملاحظة العلاقة المباشرة بين تبوغ الفطر و قدرته على إفراز المواد السامة و معرفة طبيعتها.

**كلمات مفتاحية :** الفوزاريوم، اكسيسبوروم *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, المواد السامة الفطرية، البيبتيدات، مرض البيوض، نخيل الثمر

### Introduction

Le Bayoud, fusariose vasculaire causée par *fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), est sans doute la maladie la plus grave du palmier dattier en Afrique du nord. En dépit des mesures entreprises jusqu'à présent pour empêcher son extension, cette maladie a gagné toute la palmeraie marocaine puis progressé vers l'est pour atteindre les oasis du sahara occidental et central de l'Algérie.

Elle a détruit plus de 12 millions d'arbres au Maroc et plus de 3 millions en Algérie (Djerbi *et al.* 1985 ; Brac et Benkhalifa 1991). La recherche d'un moyen de lutte contre ce fléau permettant la reconstitution de la palmeraie constitue l'objectif primordial des recherches entreprises par l'Institut national de la recherche agronomique - Maroc depuis 1963. Des résultats récents en matière de sélection ont été rapportés par Sedra (1992 ; 1995).

Comme dans la plupart des cas de fusarioses vasculaires, l'utilisation de variétés résistantes semble être la méthode la plus prometteuse. Néanmoins, l'étude des toxines reste délicate. Il peut exister une sécrétion simultanée de plusieurs toxines par le champignon, la formation d'un complexe non spécifique, ou la possibilité d'une synergie entre deux ou plusieurs composés toxiques (Korpinen et Ylimak 1972 ; petitprez *et al.* 1984). Il est connu que les toxines constituent un facteur important de l'arsenal chimique des parasites. L'acide fusarique est une toxine largement étudié chez les *fusarium oxysporum* pathogènes. Chez le *F.o.f.sp.albedinis*, très peu de travaux ont été consacrés à l'étude des toxines (Surico et Graniti 1977 ; Moukhliise 1987 et Sedra *et al.* 1993). L'existence de toxines spécifiques impliquées dans le pouvoir pathogène pourrait fournir un outil intéressant à utiliser dans les travaux de sélection de palmiers résistants au Bayoud. L'intérêt donné aux phytotoxines comme agent de sélection "*in vitro*" remonte aux travaux de Carlson (1973) avec le Tabac. Le travail le plus signifiant dans ce cadre est la sélection des tissus du maïs résistant au filtrat de culture d'*helminthosporum maydis* race T (Brettel *et al.* 1980)

Le choix des conditions de culture est l'un des aspects les plus importants de la production des toxines. Heitefuse *et al.*, en 1960 ont utilisé le milieu Richard pour le *fusarium oxysporum* f.sp.*conglutinans*. Certains auteurs ont préconisé le milieu Czapeck pour le *fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* (Kuo et Scheffer, 1964) et pour le *F.o.f.sp.albedinis* (Surico et Graniti 1977 ; Mokhlisse 1987).

L'objectif de ce travail est de comparer la production de toxines peptidiques du *F.o.f.sp.albedinis* sur deux milieux de culture à savoir : Czapeck et Richard, de déterminer la relation entre la sporulation du champignon, son aptitude à produire des toxines et d'étudier leur caractérisation partielle.

## Matériel et méthodes

### Effet des milieux de culture sur la sécrétion des toxines et la sporulation du parasite

Deux milieux de culture synthétiques Czapeck (2g de  $\text{NaNO}_3$  ; 1g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ; 0,5g  $\text{KCl}$  ; 0,5g  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0,1g  $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  et 30g de Saccharose dans 1000 ml d'eau distillée stérile à pH=4) et Richard (10g de  $\text{NaNO}_3$  ; 4g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ; 2,5g  $\text{MgSO}_4, \text{H}_2\text{O}$  ; 0,02g  $\text{FeCl}_3$  et 50g de Saccharose dans 1000 ml d'eau à pH=4) ont été comparés. Les milieux de culture ont étéensemencés par une suspension de 1ml de *F.o.f.sp.albedinis* (isolat 133) de concentration 15.000 conidies/ml. Dix erlens de 250 ml contenant chacun 150 ml de milieu liquide ont été utilisés par répétition. L'étude de la cinétique de sécrétion de toxines en relation avec la production des spores du parasite est étudiée pendant 14 jours. Les prélèvements sont effectués tous les deux jours dans des conditions aseptiques, leur concentration en spores/ml est estimée à l'aide de la cellule de Malassez. Les résultats obtenus sont analysés par la comparaison des moyennes et des écart-types.

### **Production du filtrat de culture**

L'isolat Foa. 133 utilisé a montré une grande agressivité dans les tests d'inoculation expérimentale (Sedra 1992). La production d'inoculum a été réalisée par des cultures monospores selon la méthode préconisée par Sedra et Djerbi (1985).

L'ensemencement du milieu a été réalisé à partir d'une suspension de spores prélevée d'une culture âgée de 7 jours. Les cultures sont ensuite placées pendant 8 jours sur une table d'agitation rotative de type Bolafite à raison de 80 tours/min et à  $27 \pm 3$  °C. Les cultures obtenues sont centrifugées à 6.000 tours/min, le surnageant ainsi obtenu constitue le filtrat de culture qui servira à toutes les études ultérieures.

### **Extraction**

Pour l'extraction des composés peptidiques à partir du filtrat de culture, nous avons appliqué la technique préconisée par Pringle et Scheffer (1963), à laquelle nous avons apporté des modifications. Pringle et Scheffer (1963) ; Wolpert et Dunkle (1980) travaillant sur les toxines sécrétées par *Periconia circinata* suggèrent que tous les composés peptidiques sont élués avec 10 % de la pyridine aqueuse. En travaillant sur le *F.o.f.sp.albedinis*, nous nous sommes rendus compte que d'autres fractions sont éluées respectivement avec 30 % et 50 % de pyridine aqueuse. Aucune fraction n'a été élue au delà de ce pourcentage. Les étapes d'extraction sont présentées sur la figure 1.

### **Caractérisation chimique des différentes fractions toxiques**

#### *Spectrophotométrie dans l'ultra-violet*

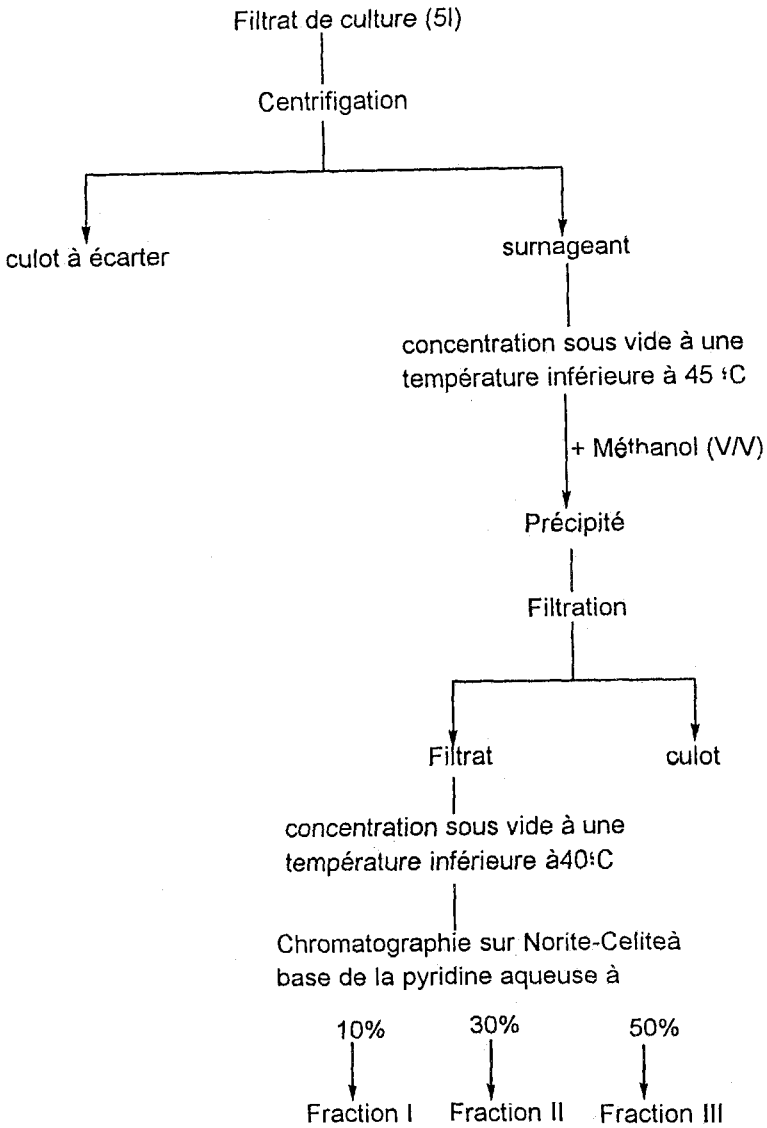
Les spectres ultra-violet sont effectués dans un spectrophotomètre UV-visible de type Shimatzu UV 190 à température ambiante. Le balayage est effectué de 320 à 210 nm. Le solvant utilisé est : eau bidistillée + 0.1 % d'acide trifluoroacétique (Tfa).

#### *Hydrolyse acide*

Les fractions obtenues (I, II et III) sont hydrolysées sous vide à 150 °C dans une solution d'HCl 6N contenant 1 % de phénol pendant une heure, afin de stabiliser les tyrosines.

#### *Analyse des acides aminés*

Les solutions sont neutralisées avec environ 90 µl de soude 1N et 60 µl d'eau. La composition en acides aminés est déterminée grâce à un analyseur automatique Beckman 6300.

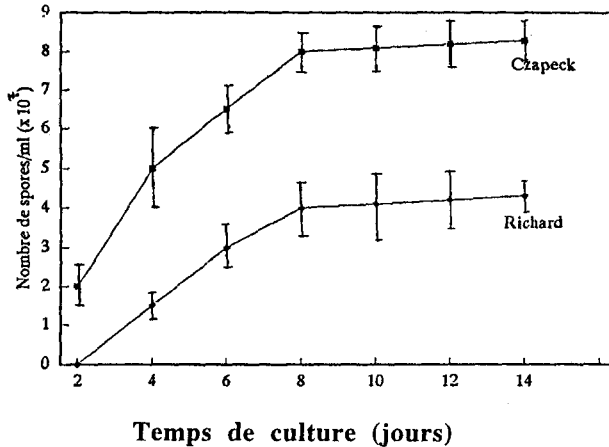


**Figure 1.** Schéma d'extraction et de fonctionnement de la toxine du *F.o.f.so.albedinis*

## Résultats et discussion

### Effet des milieux de culture sur la sporulation du parasite et les sécrétions de toxines

Les figures 2 et 3 montrent que le milieu Czapeck est plus favorable à la sporulation du champignon et à la sécrétion des toxines que le milieu Richard. Ce résultat concorde avec ce qui a été rapporté par Khomoto *et al.* (1979) sur les toxines de *Alternaria citri*. De plus, l'analyse des résultats montre une différence très nette de production pour le milieu Czapeck à partir du 4<sup>e</sup> et du 6<sup>e</sup> jour (Figure 2), ce résultat est proche de celui de Lemaire *et al.* (1984).



**Figure 2.** Sporulation du f.o.a dans les milieux de culture (Czapeck et Richard) en fonction du temps.

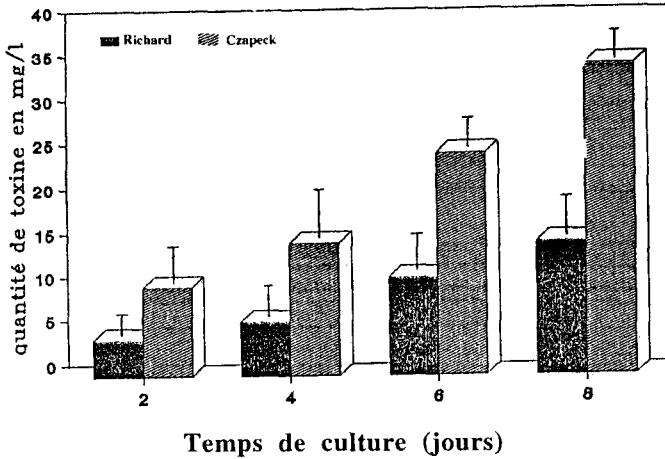
- Les milieux de culture ont été ensemencés par la même quantité de suspension du F.o.a.
- Les prélèvements sont effectués tous les deux jours;
- La concentration en spores/ml est estimée à l'aide d'une cellule de mallassez

Il est intéressant de constater qu'au 8<sup>e</sup> jour d'incubation, le maximum de la courbe de croissance correspond à la sécrétion élevée de toxines. La sécrétion serait donc directement liée à la sporulation du parasite. Mokhlisse (1987) et Hayachi (1990) travaillant respectivement sur l'acide fusarique et les toxines d'*Alternaria alternata* ont obtenu des résultats similaires. Le ralentissement important de la sporulation au delà du 8<sup>e</sup> jour pourrait être en relation avec l'augmentation du pH de milieu (Samson *et al.* 1981).

### Caractérisation partielle des toxines sécrétées

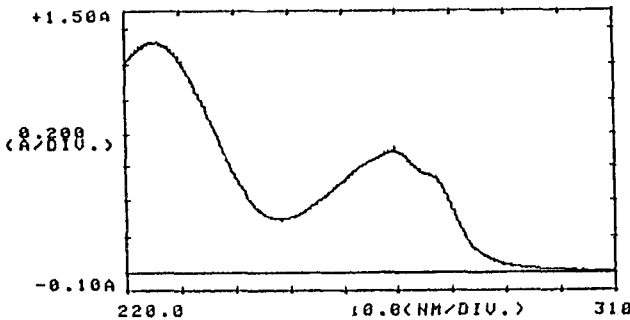
Les spectres d'absorption UV enregistrés pour les trois fractions sont tous identiques et seul celui de la fraction I est représenté (Figure 4). Ces spectres révèlent la présence de deux bandes d'absorption dont les maximums sont situés à 225 nm et 270 nm. Ces deux bandes sont caractéristiques pour les structures peptidiques. L'absorption à 270 nm prouve l'existence d'au moins un des acides

aminés aromatiques: tyrosine, phénylalanine et tryptophane, alors que celle de 225 nm est due principalement aux liaisons peptidiques (Plummer D.P., 1989).



**Figure 3.** quantité de la toxine sécrétée par la Foa. "133" sur les milieux synthétiques en fonction du temps.

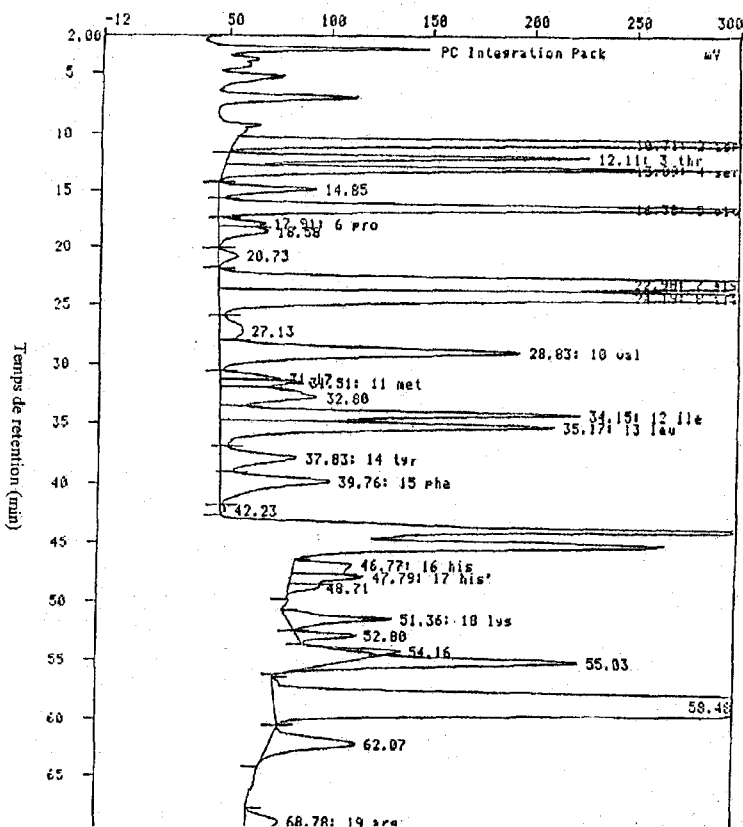
- Les milieux de culture ont étéensemencés par la même quantité de suspension du F.o.a. (15.000 conidies/ml)
- L'extraction de la toxine est réalisée tous les deux jours selon la technique de Pringle et Scheffer (1963).
- Quantité moyenne suivie de l'écart-type
- Trois répétitions par



**Figure 4.** Spectre d'absorption UV de la fabrication F1 dans "eau bidistillée + 0,1 % de TFA

Les résultats des spectres d'absorption concordent avec ceux d'analyse d'acide aminé. En effet, le chromatogramme d'analyse de la fraction I (Figure 5) révèle la présence de 16 acides aminés dont l'acidité glutamique, acide aspartique, alanine, arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine,

sérine, thréonine et valine. Pour les fractions 2 et 3, les teneurs relatives en acides aminés varient d'une fraction à l'autre ( Figures 6 et 7).



**Figure 5.** Chromatogramme d'analyses des acides aminés de la fraction brute I

Pour avoir une idée sur la structure des peptides des trois fractions, nous les avons testées avec la ninhydrine. Le résultat du test était négatif et aucune coloration n' a été observée, ce qui laisse penser que les fractions ne contiennent pas d'amine (NH<sub>2</sub>) terminale libre (Bains *et al.* 1987). Par contre, la réaction était positive après hydrolyse acide des fractions peptidiques. La présence des acides aminés couplée avec la réaction négative de la ninhydrine des toxines non hydrolysées suggèrent que les toxines sont des polypeptides cycliques ou que leurs chaînes terminales sont bloquées.

Nous avons constaté que dans les trois fractions, il y a absence de cystéine, de cystine, d'asparagine, de tryptophane et de glutamine, par contre, il y a abondance des acides aminés aliphatiques tels que la glycine, la valine et l'isoleucine. Il est



donc fort probable que ces acides aminés aliphatiques soient la partie déterminante de l'activité toxique de ces polypeptides, hypothèse qui reste à vérifier.

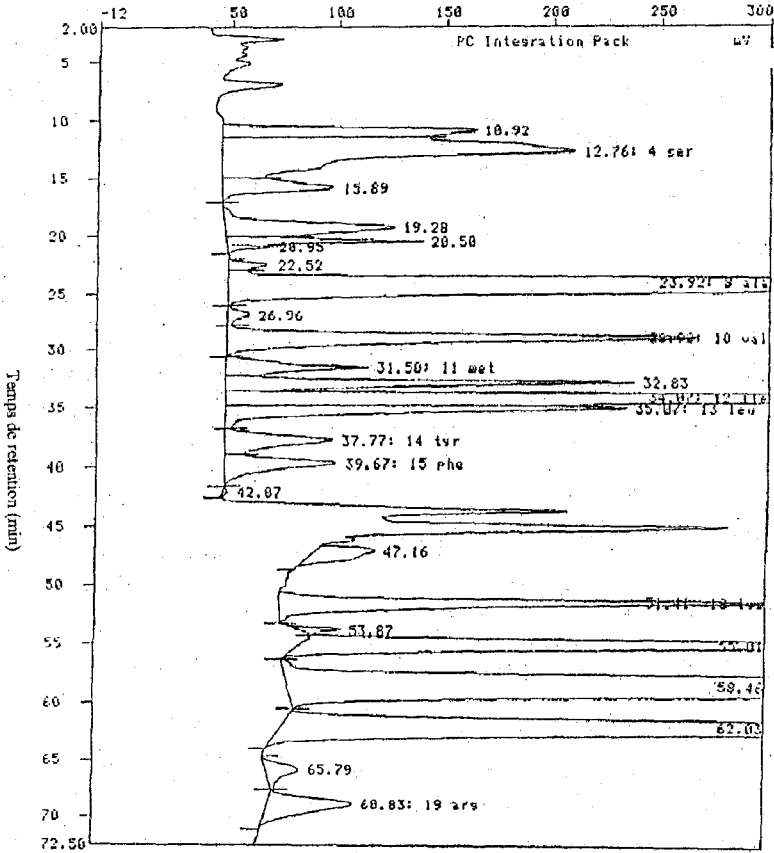


Figure 6. Chromatogramme d'analyses des acides aminés de la fraction brute II

## Conclusion

Cette étude a montré que le milieu Czapeck est très favorable aussi bien pour la sporulation du champignon que pour la sécrétion des toxines dans les huit premiers jours d'incubation. De plus, elle a permis de mettre en évidence l'existence de substances toxiques de nature peptidique autres que l'acide fusarique dans le filtrat de culture du parasite.

La méthode d'extraction, la spectrophotométrie ultra-violet et les méthodes d'analyse d'acides aminés nous ont permis de déterminer la nature et la composition en acides aminés des composés peptidiques contenus dans chacune des fractions extraites du filtrat de culture du *F.o.f.sp.albedinis*.

Il nous semble intéressant, en raison de la différence de la composition en acides aminés existante entre ces polypeptides de déterminer la structure de ces composés qui sont déterminants de la toxicité du *F.o.f.sp.albedinis*. D'autre part, il sera utile d'étudier le degré de toxicité et la spécificité de ces peptides vis-à-vis du tissu du palmier dattier.

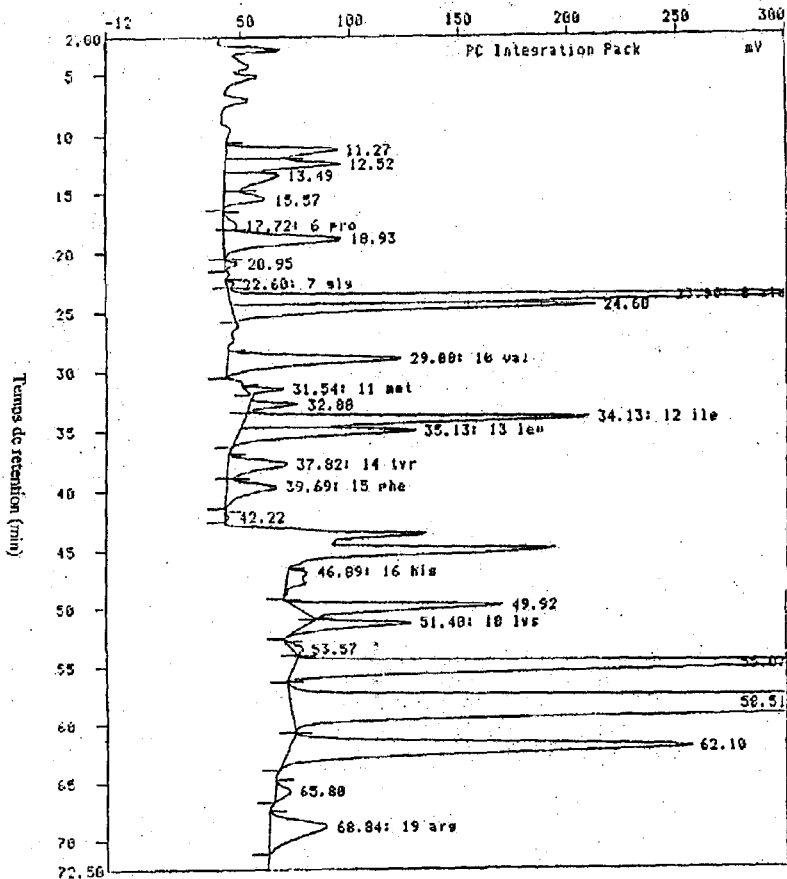


Figure 7. Chromatogramme d'analyses des acides aminés de la fraction brute III

### Références bibliographiques

Bains P.S. et Tewari J.P. (1987). Purification, chemical characterization and host-specificity of the toxin produced by *Alternaria brassicae*. *Physiol. and molecular plant pathology*, **30**, 259-271.

Brac de la Perriere R.A. et Benkhalifa A. (1991). Progression de la fusariose du palmier dattier en Algérie. *Sécheresse* **2**, 119-128.

Carlson P.S. (1973). Methionine sulfoximine resistant mutant of Tobacco. *Science* 180, 1366-1368.

Brettell R.I.S., Thomas E. et Ingam D.S. (1980). Reversion of Texas male-sterile cytoplasm maize in culture to give fertile T-toxine resistant plants. *Theor. appl. genet.* 58, 55-58

Djerbi M. (1988). Les maladies du palmier dattier. F.A.O. Proj. reg. lutt. contre bayoud. RAB/84/018. Alger. 125pp.

Djerbi M., Sedra My.H. et El Idrissi M.A. (1985). Caractéristiques culturales et identification du fusarium oxysporum f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud, Anal. inst. natn. rech. agro. Tunisie, N1,1-8.

El Fakhouri R. (1993). Identification et étude de la toxicité des différents constituants peptidiques des toxines sécrétées par le *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Marrakech-Maroc.

Hayashi N., Tanabe K., Tsuge T., Nishimura S., Kohmoto K. et Otani H. (1990). Determination of host-selective toxin production during spore germination *Alternaria alternata* by high-performance liquid chromatography.. *Phytopathology*, 80, 1088-1091.

Heitefuse R., Stahmann M.A. et Walker J.G. (1960). Purification of host-specific toxins produced by *Fusarium oxysporum*. f.sp. *conglutinans* *Phytopathology*, 50,371-375.

Khomoto K., Scheffer R.P. et Whitside J.O. (1979). Host-selective toxins from *Alternaria citri*. *Phytopathology*, 69, 667-671.

Korpinen E.E. et Ylimaki A., (1972). *Annals agricultures fermiae*, 11, 308.

Kuo M.S. et Scheffer R.P., (1964). Evaluation of fusaric acid as a factor in development of fusarium wilt. *Phytopathology*, 54, 1041-1044.

Lemaire J.M., Glandard A. Laterrat H. Connus M. et Blanchard D. (1984). Mise en évidence d'une toxine chez *Pyrenochaeta lycopersici* Scheneider et Gerlach, agent des racines liégeuses ou Corky-root de la tomate et du Melon. *Rev. cytol. biol. végét. bot.*, 7, 193-204.

Mokhlisse N., (1987). Contribution à l'identification et étude de la toxicité des différents constituants de la toxine sécrétée par le *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Marrakech-Maroc.

Petitprez M., Gelie B. Albertini L. et Barrault G. (1984). Actions biologiques des phytotoxines de *Exserohilum turcicum*. *Rev. cytol. Biol. vég.* 7, 271-277.

Plummer D.T., (1989). An introduction to practical biochemistry, P: 134-135, third edition, Mc Graw-hill, Paris.

Pringle R.B. et Scheffer R.P. (1963). Purification of the selective toxin of *Periconia circinata*. *Phytopathology*, 53, 785-787.

Samson R.P., Hoekstra E.S. et Van oorschoot C.A.N., (1981). Introduction to food borne Fungi "Ed, centraalbureau voorschimmel cultures baarn."

Sedra My.H. et Djerbi M. (1985). Mise au point d'une méthode rapide et précise d'identification "in vitro" du *Fusarium oxysporum* f.sp.albedinis, agent causal du Bayoud. *Ann. inst. nat. rech. agro.* Tunisie 58, 2, 1-12.

Sedra My.H., EL Fakhouri R. et Lazrek H.B. (1993). Recherche d'une méthode fiable pour l'évaluation de l'effet des toxines du *Fusarium oxysporum* f.sp.albedinis sur le palmier dattier. *Al Awamia*, 82, 89-103.

Sedra My.H. (1992). Variabilité dans le pouvoir pathogène des isolats et souches de *Fusarium oxysporum* f.sp.albedinis, agent causal de la fusariose vasculaire (Bayoud) du palmier dattier. Séminaire sur les "Intéactions plantes-micro-organismes". IFS-Orstom, Dakar, 17-22 / 2/ 1992, Sénégal, 204-213.

Sedra My.H. (1992). Evaluation and selection of the resistant good cultivars and clones of the date palm to the bayoud disease. Arab Society for plant protection. American univerty of beirut-Lebanon. (en arabe) ; 10 (2), 155-160.

Sedra .M.H. (1995). Triage d'une collection de génotypes de palmier dattier pour la résistance au bayoud causé par *Fusarium oxysporum* f.sp.albedinis. *Al Awamia*, 90, 9-18.

Surico G. et Graniti A., (1977). Prodizione di tossine da *Fusarium oxysporum* .f. sp. albedinis. *Phytopathologia Medéiteranea* 16,30-33.

Wolpert T.J. et Dunkle L.D. (1980). Purification and partial characterization of host-specific toxins produced by *Periconia circinata*. *Phytopathology*, 70, 872-876.