

Nouvelles propriétés antifongiques de plantes exposées aux UV

Olivier Schumpp¹, Valentine Berger¹, Eric Remolif¹, Bernard Messerli², Peter Frei¹, Michel Monod³, Jean-Luc Wolfender⁴ et Katia Gindro¹

¹Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon

²Musée national suisse, Château de Prangins, 1197 Prangins

³Département de dermatologie et de vénéréologie, laboratoire de mycologie, Centre hospitalier universitaire vaudois, Lausanne

⁴Phytochimie et produits naturels bioactifs, Section des sciences pharmaceutiques, Université de Genève - Université de Lausanne, Quai Ernest Ansermet 30, 1211 Genève 4

Renseignements: Olivier Schumpp, e-mail olivier.schumpp@acw.admin.ch, tél. +41 22 363 43 53



La biodiversité végétale peut être à l'origine d'intéressantes molécules antifongiques.

Introduction

Avec l'émergence de résistances aux produits phytosanitaires et l'apparition de nouvelles maladies en milieu hospitalier, les secteurs médicaux et agronomiques sont à la recherche de nouvelles substances actives (Fisher *et al.* 2012). Dans un environnement naturel où les micro-organismes sont très présents, les plantes et les micro-organismes sont capables de se protéger eux-mêmes de leurs agresseurs par la production de substances toxiques

(Bennett et Wallsgrove 1994; Spiteller 2008). L'homme a su exploiter cette source de molécules actives pour son propre usage et aujourd'hui encore, une large part des substances antimicrobiennes de la pharmacopée et quelques produits phytosanitaires sont issus de produits naturels ou s'en inspirent (Newman et Cragg 2007). Toutefois, l'intérêt pour les substances naturelles a décliné au cours de ces deux dernières décennies en raison de la difficulté de travailler avec des extraits complexes et du temps nécessaire à l'isolement des produits bioactifs.

Aujourd'hui, l'industrie tend à favoriser l'usage de banques de molécules de synthèse dans les processus de criblage de nouvelles molécules (Strohl 2000; Li et Vederas 2009).

Pour activer la production de substances naturelles nouvelles plus rares, les microbiologistes appliquent des stress environnementaux sur leurs cultures (Bode *et al.* 2002; Scherlach et Hertweck 2009). Chez les plantes, l'application d'éliciteurs chimiques dans le milieu de culture induit également la production de nouvelles substances actives (Poulev *et al.* 2003).

L'objectif de ce travail est de tester si un stress non spécifique sur les feuilles ou les fleurs peut stimuler la production de nouveaux composés d'intérêt agronomique ou médical chez les végétaux. Les UV induisent un stress général qui tend à activer le métabolisme secondaire. Dans ce contexte, nous avons exploré les propriétés fongicides de molécules induites par les UV. L'activité fongicide a été évaluée sur des espèces de *Fusarium*, particulièrement dévastatrices en agronomie et à l'origine de cas cliniques d'onychomycoses (mycoses des ongles) de plus en plus nombreux.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Le matériel végétal a été collecté sur le domaine d'Agroscope ACW et dans le jardin de variétés anciennes du Château de Prangins (Prangins). Les feuilles et les fleurs ont été déposées sur un papier filtre imbibé de 30 ml d'eau dans des boîtes de polystyrène. Après l'exposition aux rayonnements UV-C (longueur d'onde 253 nm; fig. 1), les boîtes ont été scellées puis transférées en chambre de culture.

La souche *Fusarium solani* Sin74 est issue d'une collection de souches cliniques isolées de patients atteints d'onychomycose au Centre hospitalier universitaire vaudois (Schumpp *et al.* 2012). Les souches fongiques sont stockées avec la collection Mycoscope (<http://mycoscope.bcis.ch/>) selon la procédure de conservation standard. De fragments de culture solide sont repiquées dans du PDB (Potato Dextrose Broth, Difco) à une concentration 4 fois inférieure à celle recommandée par le fabricant.

Biotests

L'extraction par ultra-sonication des échantillons a été réalisée sur du matériel frais pendant 20 minutes à une fréquence de 25 KHz dans du méthanol (30 ml par gramme de matériel végétal). Les extraits ont été ensuite filtrés sur filtre-seringue 0,45 μ m, séchés, repris en suspension dans l'eau et déposés sur une colonne de phase

Résumé ■ En situation de stress, les plantes produisent des composés chimiques pour se protéger. Ces molécules les aident à s'adapter aux changements de leur environnement et à se défendre entre autres contre les maladies fongiques. Certaines espèces de champignons phytopathogènes, particulièrement celles appartenant au groupe des *Fusarium*, sont également capables de développer des maladies chez l'homme. Afin de découvrir de nouvelles molécules fongicides, exploitables tant dans le domaine agronomique que médical, une trentaine d'espèces végétales ont subi un stress lumineux par traitement aux UV-C. Les espèces de la famille des *Vitaceae* répondent particulièrement bien à ce stimulus en produisant de nouvelles substances efficaces contre les *Fusarium*.

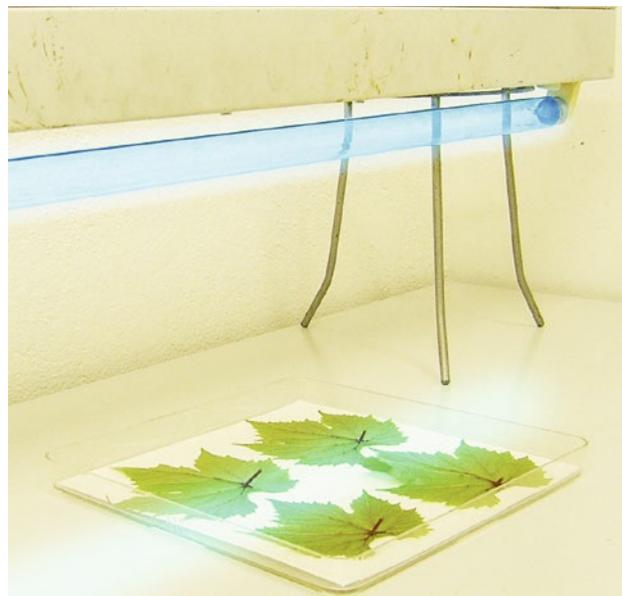


Figure 1 | Exposition de feuilles de vigne aux UV-C (253 nm).

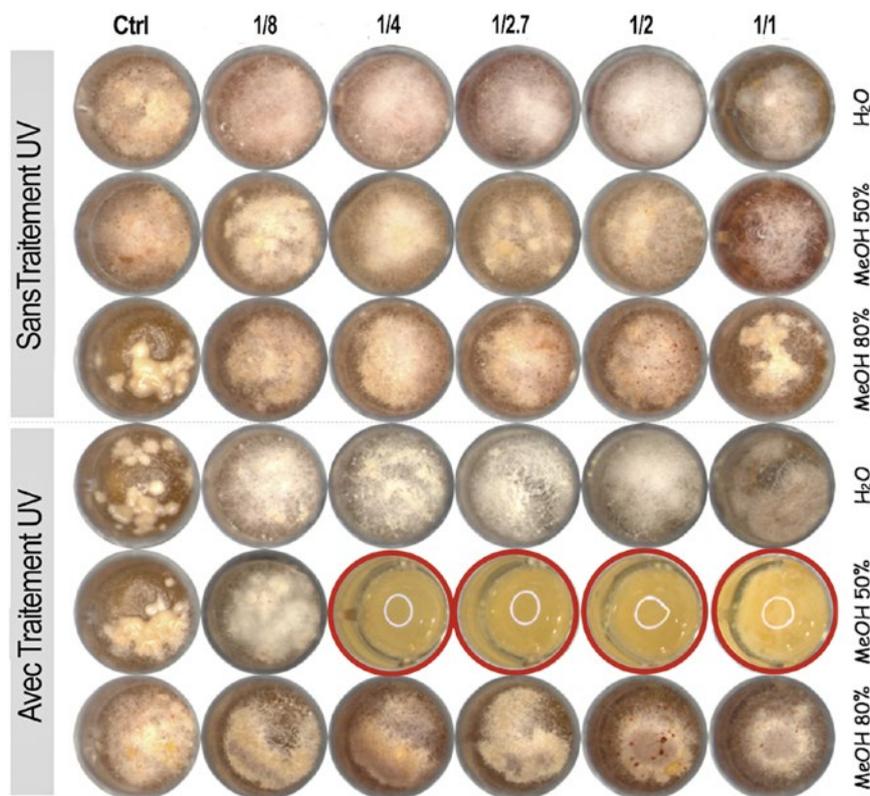


Figure 2 | Tests de l'activité antifongique d'extraits de vigne avec ou sans traitement aux UV-C contre la souche de *Fusarium solani* Sin74 résistante aux traitements connus. Les facteurs de dilutions sont indiqués en caractère gras. Après exposition aux UV-C, la fraction semi-polaire éluee avec 50% de méthanol présente une activité anti-fusarique qui inhibe la croissance de la souche fongique *Fusarium solani* Sin74 (puits cerclés de rouge). L'extrait initial perd son activité lorsqu'il est dilué huit fois ou davantage (Ctrl = milieu de culture témoin, sans extrait végétal).

inverse (Supelclean™ LC18, 3 ml, 500 mg, de Sigma, Buch, Switzerland) préalablement conditionnée avec 3×3 volumes de méthanol et 3×3 volumes d'eau. Les extraits ont été successivement élués en 3 fractions de polarité différentes et séchés: la fraction polaire est éluee avec 6 ml d'eau. La fraction semi-polaire est éluee avec 6 ml de méthanol 50% et la fraction la plus apolaire avec 6 ml de méthanol 80%. L'activité anti-fusarique a été mesurée en microplaques sur une gamme de dilution s'étalant de un à huit. La quantité d'extrait issue de quatre grammes de matériel végétal frais est re-suspendue dans 1 ml de milieu de culture pour la concentration la plus élevée et diluée dans les quatre fractions suivantes selon Schumpert *et al.* (2012).

Analyse HPLC

Trois disques foliaires de 4 mm par feuille de chaque espèce végétale testée ont été collectés, pesés et immédiatement extraits sous agitation dans 100 μ l de méthanol pendant 10 min à 60 °C. Après centrifugation des

débris végétaux, 30 μ l du surnageant ont été directement injectés dans une HPLC-UV Ultimate 3000 (Dionex) équipée d'une colonne de phase inverse Lichrospher C18 (Merck) et analysés à 250 nm.

Résultats et discussion

Le matériel végétal collecté en champs ou en serre a été immédiatement disposé en boîte, la face abaxiale vers le haut. Après l'exposition aux UV, les feuilles ont été transférées durant trois jours en chambre de culture. Au-delà de cette période, des signes de dégradation des tissus (plages nécrotiques) sont observés sur les espèces les plus sensibles au traitement. Pour les mêmes raisons, la période d'incubation des fleurs a été fixée à 48 h. L'application d'un traitement UV sur les feuilles ou les fleurs induit des modifications chimiques observables en HPLC-UV. Ces variations sont d'ordre qualitatif: de nouveaux pics (représentant de nouvelles substances) apparaissent sur le chromatogramme des

Tableau 1 | Propriétés anti-fusariques de 31 espèces végétales. Les extraits de feuilles sont testés en microplaques de 96 puits. Les symboles (-, +, ++...etc) indiquent l'activité anti-fusarique. Les échantillons présentant une activité antifongique, induite, réprimée ou non affectée par l'exposition aux UV sont sur fond grisé (nd = activité non déterminée)

Nom vernaculaire:	Nom latin:	Famille:	Fraction polaire (eau)		Fraction semi-polaire (MeOH 50%)		Fraction apolaire (MeOH 80%)	
			Témoin	UV	Témoin	UV	Témoin	UV
Chervis	<i>Sium sisarum</i>	Apiaceae	-	-	-	-	-	-
Absinthe	<i>Artemisia absinthium</i>	Asteraceae	-	-	-	-	-	-
Cardon	<i>Cynara cardunculus</i>	Asteraceae	-	-	-	-	-	-
Topinambour	<i>Helianthus tuberosus</i>	Asteraceae	-	-	-	-	-	-
Laitue	<i>Lactuca sativa</i>	Asteraceae	-	-	-	-	-	-
Bourrache officinale	<i>Borago officinalis</i>	Boraginaceae	-	-	-	-	-	-
Roquette	<i>Brassica eruca</i>	Brassicaceae	-	-	-	-	-	-
Raifort	<i>Cochlearia armoracia</i>	Brassicaceae	-	-	-	-	-	-
Chanvre	<i>Cannabis sativa</i>	Cannabaceae	-	-	-	-	-	-
-	<i>Euphorbia leuconeura</i>	Euphorbiaceae	-	-	-	-	-	-
-	<i>Euphorbia pulcherrina</i>	Euphorbiaceae	-	-	-	-	-	-
Pois	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	++	-	+++	+++	-	-
Crocus (safran)	<i>Crocus sativus_</i>	Iridaceae	-	-	-	-	-	-
Hysope officinale	<i>Hyssopus officinalis</i>	Lamiaceae	-	-	-	-	-	-
Ail rocambole	<i>Allium scorodoprasum</i>	Liliaceae	+	+	-	-	-	-
Dragonnier de Madagascar	<i>Dracaena marginata</i>	Liliaceae	-	-	-	-	-	-
Figuier commun	<i>Ficus carica</i>	Moracées	-	-	-	-	-	-
Dendrobium	<i>Dendrobium sp.</i>	Orchidaceae	-	-	-	-	-	-
Plantain corne de cerf	<i>Plantago coronopus_</i>	Plantaginaceae	-	-	-	-	-	-
Maïs	<i>Zea mays</i>	Poacées	-	-	-	-	-	-
Hellébore Noir	<i>Helleborus niger</i>	Ranunculaceae	+++	+++	++	+	++	-
Citronnier	<i>Citrus limon</i>	Rutaceae	-	-	-	-	-	-
Rue des jardins	<i>Ruta graveolens</i>	Rutaceae	-	-	-	-	+	+
Nicotiana benthamiana	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Solanaceae	-	-	-	-	-	-
-	<i>Ampelopsis sp.</i>	Vitaceae	nd	nd	-	++	nd	nd
Vigne d'appartement	<i>Cissus antartica</i>	Vitaceae	-	-	+	+	-	-
Vigne lierre	<i>Cissus rhombifolia</i>	Vitaceae	-	-	++	-	++	++
-	<i>Vitis candicans</i>	Vitaceae	nd	nd	+	+++	nd	nd
Muscadine	<i>Muscadinia rotundifolia</i>	Vitaceae	nd	nd	+	++	nd	nd
-	<i>Vitis rupestris</i>	Vitaceae	nd	nd	+	+++	nd	nd
Vigne cultivée	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	-	-	-	+++	-	-

échantillons traités en comparaison avec le chromatogramme des échantillons non traités. Ces modifications sont également d'ordre quantitatif avec des substances déjà présentes dans les échantillons témoins non traités mais pour lesquelles la concentration augmente parfois de façon importante trois jours après le traitement aux UV-C.

La production de composés secondaires qui absorbent les UV est un des mécanismes de résistance des plantes exposées à un rayonnement fort (Frohnmeier

et Staiger 2003). Néanmoins, des composés secondaires impliqués dans la défense des plantes contre les micro-organismes sont aussi produits dans les mêmes conditions (Schumpp *et al.* 2012). Afin de mieux évaluer leur activité fongitoxique, les extraits végétaux bruts sont séparés en 3 fractions de polarités différentes sur colonne SPE. Chaque fraction est ensuite évaluée sur microplaques (fig. 2) pour son efficacité contre *Fusarium solani* Sin74, un champignon peu sensible aux traitements conventionnels. Aucune induction ni activité

antifongique n'a pu être détectée sur les fleurs. En revanche, sur les 31 espèces végétales pour lesquelles les feuilles ont subi une exposition aux UV, 5 espèces présentent une induction d'activité anti-fusarique dans la fraction semi-polaire. Cinq autres espèces présentent une activité anti-fusarique non affectée par l'exposition aux UV dans l'une des trois fractions. Trois espèces perdent leur activité fongicide dans une ou deux des 3 fractions après exposition aux UV (tabl. 1). Cette perte d'activité peut s'expliquer par une dégradation des molécules exposées aux rayonnements UV (isomérisation, polymérisation, photolyse...), ou par une réorientation des flux métaboliques de la plante suite à l'activation de certaines voies de biosynthèse en lien avec la résistance aux stress lumineux.

Bien que les espèces végétales utilisées dans cette étude présentent souvent une activation de molécules observables en HPLC-UV, seules certaines plantes de la famille des *Vitaceae* induisent la production de nouvelles molécules possédant des propriétés antifongiques exploitables dans cette étude dans l'une ou l'autre des 3 fractions. Le fractionnement de l'extrait brut permet d'enrichir les fractions en molécules actives et donne des premiers éléments d'information sur la polarité de ces molécules actives. Ainsi, chez les *Vitaceae*, cette activité se retrouve essentiellement dans la fraction éluée avec 50 % de méthanol, ce qui indique que l'activité anti-fusarique pourrait concerner une même famille de molécules présentant une polarité intermédiaire.

L'induction UV permet donc d'induire chez certaines espèces la production de nouvelles molécules actives dans une plante qui ne les produit pas en conditions standards. Ces résultats démontrent que l'utilisation de stress, tels que les UV, peut mettre en évidence dans certaines plantes des activités biologiques jusque-là non identifiées et exploitables à des fins pharmacologique ou agronomique.

Conclusions

- La grande majorité des plantes est capable de se défendre contre les agressions extérieures. Cette résistance n'est généralement pas constitutive mais induite en réponse à des facteurs de stress biotiques ou abiotiques.
- En activant le métabolisme secondaire par un stress général, l'exposition des végétaux aux UV-C provoque l'apparition de nouvelles substances antifongiques chez certaines plantes de la famille des *Vitaceae*.
- Les UV-C se révèlent un outil innovant et efficace pour mettre en évidence de nouvelles propriétés biologiques, en explorant notamment les plantes cultivées ou des variétés anciennes constituant la diversité biologique locale. ■

Riassunto

Nuove proprietà antifungine di piante esposte ai raggi UV

In situazioni di stress, le piante producono dei composti chimici per proteggersi. Queste molecole le aiutano ad adattarsi ai cambiamenti del loro ambiente e a difendersi tra l'altro contro le malattie fungine. Certe specie di funghi fitopatogeni, in particolare quelle che appartengono al gruppo *Fusarium*, sono pure capaci di sviluppare delle malattie nell'uomo. Per scoprire nuove molecole fungicide, sfruttabili sia nel settore agronomico che in quello medico, una trentina di specie vegetali hanno subito uno stress luminoso attraverso trattamento agli UV-C. Le specie della famiglia delle Vitaceae rispondono particolarmente bene a questo stimolo, producendo delle nuove sostanze efficaci contro i *Fusarium*.

Summary

Antifungal properties of plants exposed to UV irradiation

When exposed to stress, plants produce protective compounds. These molecules contribute to their adaptation to environmental changes and to resistance to microbial attacks. Some fungal phytopathogenic species, especially those belonging to the *Fusarium* group, are also able to develop diseases in humans. In order to identify new sources of antifungal molecules of pharmacologic or agronomic interest, around thirty plant species from different taxonomical groups have been exposed to UV-C. Plant species from the *Vitaceae* group respond to UV treatment with the induction of a strong anti-fusaric activity.

Key words: *Fusarium*, UV-C, stress, OSMAC, fungicides.

Bibliographie

- Bennett R. & Wallsgrove R., 1994. Secondary Metabolites in Plant Defense-Mechanisms. *New Phytol* **127** (4), 617–633.
- Bode H. Bethe B., Hofs R. & Zeeck A., 2002. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **3** (7), 619–627.
- Fisher M. C., Henk D. A., Briggs C. J., Brownstein J. S., Madoff L. C., McCraw S. L. & Gurr S. J., 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484** (7393), 186–194.
- Frohnmeyer H. & Staiger D., 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol.* **133** (4), 1420–1428.
- Li J. W. H. & Vederas J. C., 2009. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science* **325** (5937), 161–165.
- Newman D. J. & Cragg G. M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70** (3), 461–477.
- Poulev A., O'Neal J., Logendra S., Pouleva R., Timeva V., Garvey A., Gleba D., Jenkins I., Halpern B., Kneer R., Cragg G. & Raskin I., 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *J. Med. Chem.* **46** (12), 2542–2547.
- Scherlach K. & Hertweck C., 2009. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org. Biomol. Chem.* **7** (9), 1753–1760.
- Schumpp O., Bruderhofer N., Monod M., Wolfender J.L. & Gindro K., 2012. Ultraviolet induction of antifungal activity in plants. *Mycoses* doi:10.1111/j.1439-0507.2012.02192.x
- Spitteller P., 2008. Chemical defence strategies of higher fungi. *Chemistry* **14** (30), 9100–9110.
- Strohl W., 2000. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discov Today* **5** (2), 39–41.