

SUR LE RÔLE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES AU COURS DE L'INFECTION DES CABOSSES DE *THEOBROMA CACAO* L. PAR *PHYTOPHTHORA PALMIVORA* Butl.

M. MEIFFREN

Directeur de recherches à l'O. R. S. T. O. M.
Phytopathologiste

J. TANGUY

Attaché de recherches à l'O. R. S. T. O. M.
Biochimiste

Dans ce travail, nous nous sommes proposés de faire l'inventaire et de caractériser les substances phénoliques contenues dans les tissus de différents types de cabosses de cacaoyer étudiés par ailleurs par TARJOT au Centre de recherches de l'I. F. C. C. de Côte d'Ivoire, et de suivre les variations qui se produisent au moment de l'infection expérimentale et de la maturation.

On sait que la plupart des cacaoyers cultivés sont sensibles à la pourriture brune. Il n'existe pas à notre connaissance de matériel complètement résistant. Ceci rend impossible une étude comparative. Nous nous proposons néanmoins d'apporter des données susceptibles d'éclairer les processus d'invasion du fruit par le parasite.

Les travaux récents de TARJOT, qui a retenu comme critères la durée de la période de contamina-

tion et le pourcentage d'inoculations positives sur cabosses en place ou détachées, ont permis de distinguer certains cacaoyers Trinitario moins sensibles que l'Amelonado courant. Il sera dès lors possible de préciser les premiers résultats.

Nous avons étudié par ailleurs l'action de ces substances phénoliques sur le champignon *in vitro*. Elles se sont révélées fongistatiques. Nous donnons pour certaines d'entre elles la concentration minimale inhibitrice du développement du champignon.

Dans un travail ultérieur nous rechercherons si elles sont susceptibles d'inhiber les enzymes pectinolytiques et cellulolytiques produits par *Phytophthora palmivora*. On peut penser en effet que ces enzymes interviennent au moment de l'envahissement des tissus, étant donné la teneur élevée de l'épicarpe en pectines.

DISTRIBUTION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DANS LES CABOSSES DE CACAOYERS AMELONADO ET TRINITARIO

Les cabosses de cacaoyers Amelonado et Trinitario ayant fait l'objet de cette étude sont très riches en composés phénoliques. Les polyphénols détectés appartiennent à trois groupes bien distincts : flavanes, dérivés de l'acide cinnamique et dérivés de l'aci-

de benzoïque. Le groupe des flavanes renferme de l'épicatéchine, de la catéchine ou flavane-3-ols, un dimère constitué d'une molécule d'épicatéchine et d'une molécule de leucocyanidol ou flavane-3-4-diols, puis des formes très polymérisées formées par la

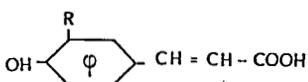
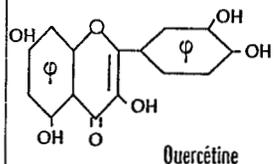
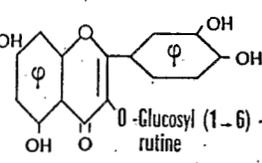
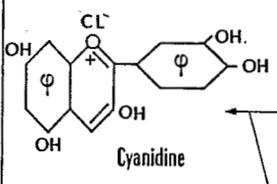
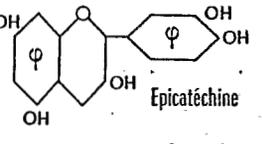
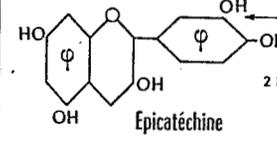
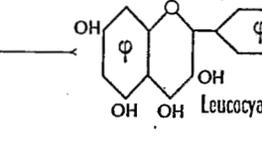
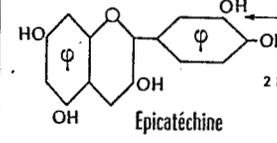
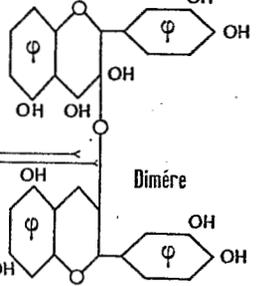
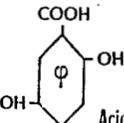
	EXTRAIT HYDROLYSÉ	EXTRAIT NON HYDROLYSÉ
Acides cinnamiques Les dérivés	 <p>acide p- coumarique acide Férulique acide caféique</p>	Composé du groupe chlorogénique donnant par hydrolyse de l'acide caféique.
Flavonols Flavonosides	 <p>Quercétine</p>	 <p>O -Glucosyl (1-6) - Rhamnosyl rutine</p>
Flavans	 <p>Cyanidine</p>	 <p>Epicatechine</p>
	 <p>Epicatechine</p>	 <p>Leucocyanidine</p>
	 <p>Epicatechine</p>	 <p>Dimère</p>
Acide benzoïque	 <p>Acide gentisique ou acide 2-5 dihydroxy benzoïque</p>	

TABLEAU 1

Classification des différentes substances phénoliques
des extraits des différents types de cabosses

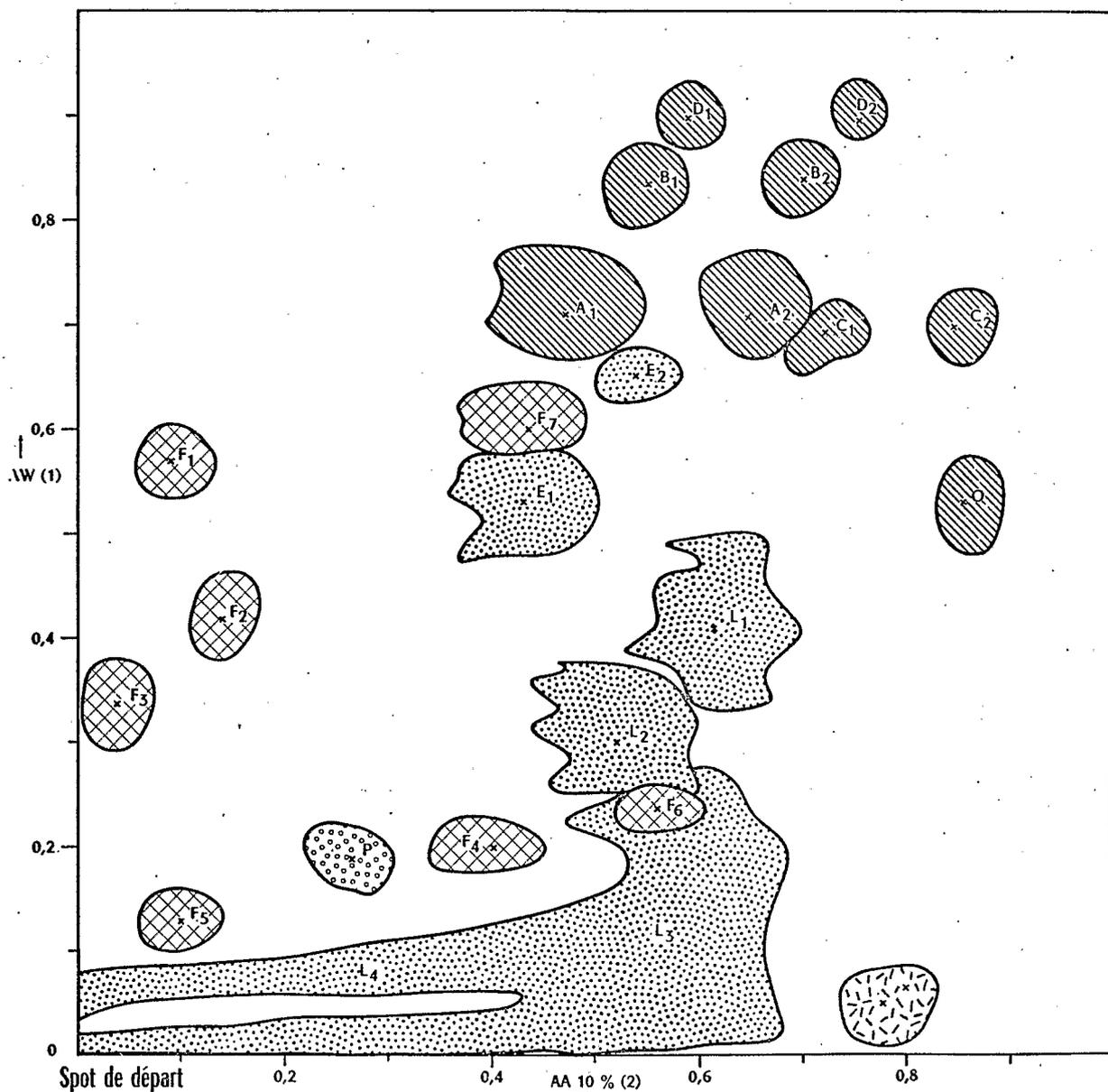


Fig. 1. — Chromatogrammé faisant apparaître la distribution des substances phénoliques.

En pointillé — Le groupe des flavanes

E1 = épicatechine

E2 = catéchine

L1-2 = Leucocyanidines peu polymérisées

L1 = dimère constitué par une molécule d'épicatechine et une molécule de leucocyanidine

L3-4 = leucocyanidines très polymérisées ou « tanins condensés »

En hachuré — Les substances du groupe cinnamique et peut-être du groupe benzoïque

A = composé apparenté à l'acide isochlorogénique, s'isomérisé dans un solvant aqueux en deux isomères *trans* et *cis*

B = ester de l'acide férulique, s'isomérisé dans le solvant aqueux en deux isomères *trans* et *cis*

D = ester de l'acide para-coumarique, s'isomérisé également dans un solvant aqueux en deux isomères

O = glycoside de l'acide gentisique

En double hachuré — Le groupe des flavonosides

F4 = rutine ou quercétine-3-rutinosé

En bâtonnets — La substance caractéristique des cabosses Trinitario 407C, appelée X

En petits ronds — Une anthocyane détectée dans certaines cabosses Trinitario

réunion d'un grand nombre de molécules de leucocyanidol, ces derniers composés sont appelés « tanins condensés ». Les dérivés de l'acide cinnamique comprennent un isomère de l'acide isochlorogénique et les esters des acides férulique et para-coumarique, à ce groupe se rattachent les glycosides des flavonols ou flavonosides. La catégorie de l'acide benzoïque contient un glycoside dont le résidu phénolique est de l'acide gentsique.

Les substances ont été séparées par chromatographie sur papier avec comme solvants du butanol acé-

tique et de l'acide acétique 10 %. La détection a été faite en utilisant les réactifs des différents groupes comme la vanilline chlorhydrique et l'acide p-toluène sulfonique caractéristiques des composés flavoniques, le chlorure d'aluminium, le carbonate de sodium, la soude, spécifiques des substances dérivées des acides cinnamique et benzoïque.

La structure des principaux composés est donnée dans le tableau 1 (p. 338).

La distribution de ces substances sur un chromatogramme est donnée dans la figure 1 (p. 339).

ÉVOLUTION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES AU COURS DE LA MATURATION

Différences dans la composition en polyphénols des deux types de cabosses

Dans les deux types de cabosses, Amelonado et Trinitario, la maturation s'accompagne d'une baisse des flavanes, des flavonosides, des acides caféique et paracoumarique, et d'une augmentation des acides gentsique et férulique. La baisse en flavanes ne signifie pas forcément une diminution de ces composés, peut-être y a-t-il une polymérisation accrue et donc une impossibilité de les extraire par les solvants usuels.

Les cabosses Trinitario se distinguent assez nettement des cabosses Amelonado par une plus grande quantité de flavanes et d'acide férulique et par une quantité moindre de flavonosides. Les cabosses du clone Trinitario 407 se reconnaissent aisément par simple chromatographie sur papier ; en effet celles-ci possèdent une plus grande quantité d'acide gentsique et une substance spécifique de fluorescence violette dans l'ultra-violet. Pour les cabosses provenant du clone 407, TARJOT a noté que la tache de pourriture se développait moins rapidement que pour les autres Trinitario après inoculation.

VARIATIONS DES POLYPHÉNOLS AU COURS DE L'INFECTION

L'infection par *Phytophthora palmivora* s'accompagne d'une accumulation de polyphénols, tout particulièrement de flavanes dans les zones apparemment saines bordant les tissus nécrosés. Il y a une forte augmentation de tous les flavanes peu et très polymérisés, mais accroissement considérable de ces dernières substances. Ce phénomène semble résulter d'une migration de ces composés des zones extérieures éloignées du point d'infection vers les régions avoisinant les zones nécrosées. Il y a une baisse considérable des substances aromatiques dans les zones brunes nécrosées.

Le tableau 2 donne les pourcentages en tanins par rapport au poids frais et au poids sec dans les cabosses vertes adultes Amelonado et Trinitario.

Le tableau 3 donne les quantités en tanins par rapport au poids frais et au poids sec dans les zones nécrosées, les zones saines bordant les tissus nécrosés, dites zones marginales, et les zones éloignées du point d'infection ou zones extérieures, dans les différents types de fruits infectés par le pathogène.

Au cours des hydrolysats, il y a augmentation des acides benzoïque, caféique, férulique et para-coumarique dans les zones marginales, avec une production importante du dernier acide dans les régions nécrosées et adjacentes à cette nécrose.

TABLEAU 2

Les pourcentages en tanins par rapport au poids frais et au poids sec dans les cabosses vertes adultes Amelonado et Trinitario

Les différents types de cabosses	Les poids secs	% en tanins par rapport	
		au poids frais	au poids sec
Cabosses vertes adultes Amelonado	16,6	1,0	6,5
Cabosses vertes adultes Trinitario	13,3	1,8	13,5

TABLEAU 3

Les pourcentages en tanins par rapport au poids frais et au poids sec dans les zones nécrosées, marginales et extérieures des cabosses vertes adultes Amelonado et Trinitario

Les différents types de cabosses	Les différentes zones	Les poids secs	% en tanins par rapport	
			au poids frais	au poids sec
Cabosses vertes adultes Amelonado	Zones nécrosées	21,5	0,4	2,0
	Zones marginales	20,7	1,5	7,0
	Zones extérieures	19,0	0,8	4,2
Cabosses vertes adultes Trinitario (407C)	Zones nécrosées	12,0	0,2	1,7
	Zones marginales	12,1	1,6	13,2
	Zones extérieures	12,1	0,9	6,4

Quand la nécrose envahit le fruit, l'augmentation des composés dans les zones marginales ne semble concerner que les flavanes, et, à un moindre degré que précédemment, les autres phénols ne semblent pas subir d'augmentation visible dans cette zone.

ÉVALUATION DU POUVOIR FONGISTATIQUE DE CES SUBSTANCES

Aucun milieu chimiquement défini ou semi-synthétique n'ayant donné satisfaction, on a retenu l'eau de pomme de terre. Comme inoculum, on utilise une suspension de sporanges obtenue à partir d'une culture de douze jours. On détermine la concentration minimale inhibitrice du développement du champignon. La durée des observations est de dix jours.

Au cours de travaux antérieurs, nous avons constaté que *Phytophthora palmivora* est, *in vitro*, très sensible aux antibiotiques. Il était donc intéressant d'essayer ces substances avec un organisme beaucoup plus résistant, que nous avons utilisé depuis plusieurs années comme organisme témoin dans la recherche de substances antifongiques d'origine végétale : *Pestalozzia coffeicola*. Le pouvoir fongista-

Il apparaît à la suite de ce travail que l'infection par *Phytophthora palmivora* des différents types de cabosses conduit à une augmentation de la teneur en polyphénols, surtout en flavanes, tout spécialement en tanins condensés dans les zones saines bordant le tissu nécrosé.

Il semble donc y avoir dans ces zones une intense activité métabolique, mais l'accélération des processus biochimiques serait temporaire, car l'accroissement des composés aromatiques est faible au cours de nécroses avancées.

Ces substances jouent-elles un rôle au moment de la pénétration du pathogène et de l'invasion des tissus en inhibant ses enzymes ou en agissant sur son développement ? Nous avons voulu apporter des données sur ce dernier point en étudiant leur action sur le champignon *in vitro*.

Les composés ont été séparés par chromatographie sur papier, puis élués et enfin mis à la concentration voulue. Ce sont, dans le groupe des flavanes : l'épicatéchine, le dimère formé par une molécule de leucocyanidine et par une molécule d'épicatéchine, puis les formes très condensées. L'isomère de l'acide isochlorogénique et les esters des acides férulique et para-coumarique ont été retenus dans la catégorie des dérivés de l'acide cinnamique.

rique des esters des acides férulique et coumarique est remarquable.

Les résultats sont exprimés en milligrammes de matériel de départ par millilitre de milieu :

Concentration minimale inhibitrice (mg/ml)

	<i>P. palmivora</i>	<i>P. coffeicola</i>
Epicatéchine	30	78
Dimère (épicatéchine + leucocyanidol) L1-2	20	45
Tanins condensés L3-4	15	40
Isomère de l'acide isochlorogénique A	20	51
Esters des acides férulique et para-coumarique B-D	8	22

CONCLUSIONS

Il est intéressant de noter qu'il se produit une accumulation de composés aromatiques dans la zone marginale. Ce fait a d'ailleurs été constaté pour d'autres plantes par de nombreux phytopathologistes, qui ont mis en évidence le rôle des substances du

groupe de l'acide chlorogénique dont le pouvoir antifongique est connu. Pour certains, à une concentration suffisante, il déterminerait la résistance.

La plupart des composés isolés de l'épicarpe des cabosses étant fongistatiques, on peut émettre une

hypothèse simple. Le cacaoyer résistant recherché contiendrait ou pourrait produire dans les tissus de ses fruits des substances phénoliques à des doses susceptibles d'inhiber le développement de *Phytophthora palmivora*.

En tout état de cause, les recherches pourront progresser plus rapidement lorsque les chercheurs qui travaillent sur le terrain auront trouvé un cacaoyer présentant un caractère certain de résistance.

MEIFFREN (M.), TANGUY (J.). — Sur le rôle des composés phénoliques au cours de l'infection des cabosses de *Theobroma cacao* L. par *Phytophthora palmivora* Butl. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XI, n° 4, oct.-déc. 1967, p. 337-342, fig., tabl.

Les auteurs ont fait l'inventaire des substances phénoliques contenues dans les tissus des cabosses de cacaoyers et les ont caractérisées. Ils ont également suivi leurs variations au moment de l'infection expérimentale par *Phytophthora palmivora* et au cours de la maturation des cabosses.

L'infection par *Phytophthora palmivora* des différents types de cabosse conduit à une augmentation de la teneur en polyphénols, surtout en flavanes et tout spécialement en tanins condensés, dans les zones saines bordant le tissu nécrosé.

Pour savoir si ces substances phénoliques jouent un rôle au moment de la pénétration du pathogène et de l'invasion des tissus, leur action sur le champignon a été étudiée *in vitro* : elles se sont révélées fongistatiques et les auteurs donnent pour certaines d'entre elles la concentration minimale inhibitrice.

La plupart des composés isolés de l'épicarpe des cabosses étant fongistatiques, on peut penser que le cacaoyer résistant à *Phytophthora palmivora* recherché contiendrait, ou pourrait produire, dans les tissus de ses fruits des substances phénoliques à des doses susceptibles d'inhiber le développement de *P. palmivora*.

MEIFFREN (M.), TANGUY (J.). — A note on the rôle of phenolic compounds during the infection of pods of *Theobroma cacao* L. by *Phytophthora palmivora* Butl. *Café, Cacao, Thé* (Paris), vol. XI, n° 4, oct.-déc. 1967, p. 337-342, fig., tabl.

The writers have drawn up a list of the phenolic substances contained in the tissues of cocoa pods and defined their characteristics. They have also followed up the various changes in them, from the moment of the experimental infection with *Phytophthora palmivora* and during the ripening of the pods.

The infection by *Phytophthora palmivora* of the various kinds of pods causes an increase in polyphenol content, notably in flavans and more especially in condensed tannins, in the healthy parts next to the necrotic tissue.

In order to find out if these phenolic substances play a part at the moment when the pathogenic agent penetrates and invades the tissues, their action on the fungus was studied *in vitro* : they proved to be fungi-static and the writers give, in the case of some of them, the minimum inhibitive concentration.

The majority of the compounds isolated from the epicarp of the pods being fungi-static, it can be presumed that the cocoa tree resistant to *Phytophthora palmivora* which is being sought after, would contain, or could produce, in the tissues of its fruit, phenolic substances at concentrations capable of arresting the development of *P. palmivora*.

MEIFFREN (M.), TANGUY (J.). — Die Rolle der Phenolverbindungen bei der Infektion der Schoten von *Theobroma cacao* L. durch *Phytophthora palmivora* Butl. *Café, Cacao, Thé* (Paris), vol. XI, n° 4, oct.-déc. 1967, p. 337-342, fig., tabl.

Die Autoren nahmen den Bestand der in den Zellen der Kakaoschoten enthaltenen Phenolstoffe auf und kennzeichnen sie. Sie beobachteten ebenfalls ihre Schwankungen bei der Versuchsinfektion durch *Phytophthora palmivora* und im Verlauf des Reifungsprozesses der Schoten.

Die Infektion der verschiedenen Schotentypen durch *P. palmivora* führte zu einer Erhöhung des Gehaltes an Phenolen, vor allem an Flavananen und ganz besonders an kondensierten Gerbstoffen in den gesunden das nekrosierte Gewebe umgebenden Zonen.

Um festzustellen ob diese Phenolstoffe beim Eindringen des Krankheitserregers und der Verbreitung in den Geweben eine Rolle spielen wurde ihre Wirkung auf diesen Schimmelpilz *in vitro* untersucht ; sie erwiesen sich als fungistatisch und die Autoren geben für einzelne von ihnen die inhibierende Minimalkonzentration an.

Da die meisten der isolierten Verbindungen des Exokarps fungistatisch waren kann angenommen werden, dass der gegen *P. palmivora* widerstandsfähige Kakaobaum in den Geweben seiner Früchte Phenolstoffe in Dosen enthalten oder erzeugen könnte, welche fähig sind die Entwicklung von *P. palmivora* zu inhibieren.

MEIFFREN (M.), TANGUY (J.). — Consideraciones sobre el papel de los compuestos fenólicos durante la infección de las mazorcas de *Theobroma cacao* L. por *Phytophthora palmivora* Butl. *Café, Cacao, Thé* (Paris), vol. XI, n° 4, oct.-déc. 1967, p. 337-342, fig., tabl.

Los autores hicieron el inventario de las substancias fenólicas contenidas en los tejidos de las mazorcas de cacao y caracterizaron dichas substancias. Estudiaron igualmente sus variaciones en el momento de la infección experimental por *Phytophthora palmivora* y durante la maduración de las mazorcas.

La infección de los varios tipos de mazorcas por *Phytophthora palmivora* produce un aumento del contenido de polifenoles, sobre todo de flavanos y especialmente de taninos condensados, en las zonas sanas que bordean el tejido necrótico.

Para saber si dichas substancias fenólicas desempeñan un papel en el momento de la penetración del patógeno y de la invasión de los tejidos, fué estudiada *in vitro* su acción sobre el hongo : se revelaron fungistáticas y los autores dan la concentración mínima inhibidora para algunas de dichas substancias.

Ya que la mayor parte de los compuestos aislados del epicarpio son fungistáticos se puede pensar que el cacao resistente a *Phytophthora palmivora* que se busca llevaría, o podría producir en los tejidos de sus frutos dosis de substancias fenólicas capaces de inhibir el desarrollo de *P. palmivora*.