

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

ÉVALUATION DE LA CAPACITÉ ANTI-GERMINATIVE D'EXTRAITS BACTÉRIENS

S. MEZAACHE-AICHOURL^{(1)*}, N. HAICHOURL⁽¹⁾, S. CHEBEL⁽¹⁾, A. GUECHIL⁽¹⁾ et M.M. ZERROUG⁽¹⁾

⁽¹⁾ LMA DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE, FACULTÉ SNV, UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS SÉTIF 1(EL BEZ), SÉTIF 19000, ALGÉRIE. MÉL *: mezaic2002@yahoo.fr

RÉSUMÉ

Ce travail vise à évaluer l'activité anti-germinative de filtrats bactériens déjà caractérisés pour leurs capacités antifongiques vis-à-vis des champignons phytopathogènes telluriques : *Fusarium oxysporum* fsp. *albedinis* (Foa), *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Fsc) et *Phytophthora infestans* (Pi). Les résultats ont montré que ces filtrats sont capables d'inhiber la germination des spores fongiques. En effet, le filtrat de l'isolat Xi35' a totalement inhibé la germination du Foa et du Fsc, par contre *Phytophthora infestans* n'a été inhibé qu'à 16.66%.

Mots-clés : Inhibition de la germination, les champignons telluriques phytopathogènes, les métabolites secondaires.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTI-GERMINATIVE CAPACITY OF BACTERIAL EXTRACTS

This work aims to evaluate the anti-germinative activity of bacterial extracts. These bacteria were already characterized for their antagonistic capacity against telluric phyto-pathogens fungi: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa), *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Fsc) and *Phytophthora infestans* (Pi), causing Bayoud, dry rot and mildew diseases respectively. The results showed that these bacterial filtrates are able of inhibiting fungal spore germination, between these filtrates Xi35 ' one gave a total inhibition (100%) on both of the tested fungi Foa and Fsc, while on *Phytophthora infestans* it only gave 16.66% of inhibition.

Key words: Inhibition of germination, telluric phyto-pathogenic fungi, secondary metabolites.

INTRODUCTION

Les maladies des plantes dues aux agents telluriques sont économiquement importantes et pour la plupart difficiles à contrôler et/ou traiter. Les fusarioses, les pourritures et le mildiou sont redoutables causant des pertes économiques considérables au niveau mondial, affectant des plantes annuelles tels que la pomme de terre, ou encore pérennes telles que le palmier dattier. Dans ces cas, le traitement chimique est inefficace voir inutile.

Au cours du vingtième siècle, des recherches considérables ont démontré la capacité des microorganismes provenant de diverses origines phylogénétiques à inhiber différents agents phytopathogènes. Ces microorganismes agissent soit par antibiose, compétition ou encore en interagissant avec la plante, induisant chez celle-ci des mécanismes de défense plus complexes et menant au biocontrôle.

Au niveau de la rhizosphère et du contrôle des agents pathogènes telluriques, la lutte se fait principalement via des bactéries appartenant aux genres *Streptomyces*, *Bacillus*, *Agrobacterium* et *Pseudomonas* et des champignons des genres *Ampelomyces*, *Candida* et *Trichoderma*. La majorité des études montrent que de 1 à 10% des isolats du sol peuvent avoir un certain pouvoir antagoniste *in vitro*, mais de ce nombre, très peu a la capacité de supprimer les agents phytopathogènes dans divers sols et conditions de croissance et, un plus petit nombre encore est capable d'inhiber un large spectre d'espèces pathogènes (McSpadden Gardener et Fravel, 2002).

L'objectif de ce travail est de tester l'activité anti-germinative d'extraits bactériens déjà caractérisés pour leurs capacités antagonistes *in vitro* vis-à-vis de champignons telluriques responsables de fusariose *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, de pourriture *Fusarium solani* var. *coeruleum*, et du mildiou *Phytophthora infestans*.

MATERIEL ET MÉTHODES

MATERIEL BIOLOGIQUE

Champignons phythopathogènes

Les souches testées sont :

- *Phytophthora infestans* (Pr Larous, LMA, Département de microbiologie, Université Sétif-1.
- *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (INRAA, Alger).
- *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Institut Pasteur de Paris, France).

Les souches bactériennes de référence

Les souches bactériennes de référence testées sont *Pseudomonas protogene* CHA0, *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 (Pr Haas, Lausanne, Suisse) et la souche 2 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *auréofaciens* (Dr. Mezaache-aichour, LMA Département de Microbiologie, Université Sétif-1-)

Les souches bactériennes testées

Les bactéries utilisées pour les tests d'inhibition de la germination des spores ont été isolés précédemment par Belatrous (2011) et Sayah (2011) et identifiées par Mansouri et Remadna (2013) : Xi29, Xi48, Xi49, Xi47, B5, B21, Xi35', Xi29', Xi37', Xi30, Xi12, Xi1.

METHODES

Préparation des filtrats bactériens

Les souches bactériennes de référence ainsi que les souches testées préalablement ravivées sur bouillon nutritif (BN) sont cultivées dans 25 ml de bouillon nutritif à l'extrait de leure (NBY) pendant 72h, sous agitation permanente à température ambiante. La DO est mesurée à 625 nm afin de déterminer la charge microbienne productrice des substances anti-germinatives

Les cultures bactériennes sont ensuite centrifugées pendant 20 mn à 5600 rpm, filtrées à travers des membranes de 0.45µm de diamètre (Thomapot®Membranfilter), et les filtrats sont récupérés dans des flacons stériles et emmagasinés à 4 °C en vue d'être utilisés.

Méthode d'inhibition de la germination

On dispose dans une série de microtubes un volume de 1ml de suspension sporale de concentration déterminée (10^7 spores /ml), et à l'aide d'une micropipette on ajoute un volume de 20 μ l des filtrats bactériens à étudier en plus des filtrats des souches de référence. Les tubes sont préparés en triplicatas, et incubés pendant 24h à température ambiante. Après incubation, l'inhibition de la germination des spores est observée sous microscope à l'aide d'une cellule de Malassez. Le nombre de spores germées ou non est reporté.

Le pourcentage des spores non germées est calculé selon la formule:

$$\%SNG = \frac{SNG}{SG+SNG} \times 100$$

% SNG : pourcentage des spores non germées.

SG : nombre des spores germées.

SNG : nombre des spores non germées.

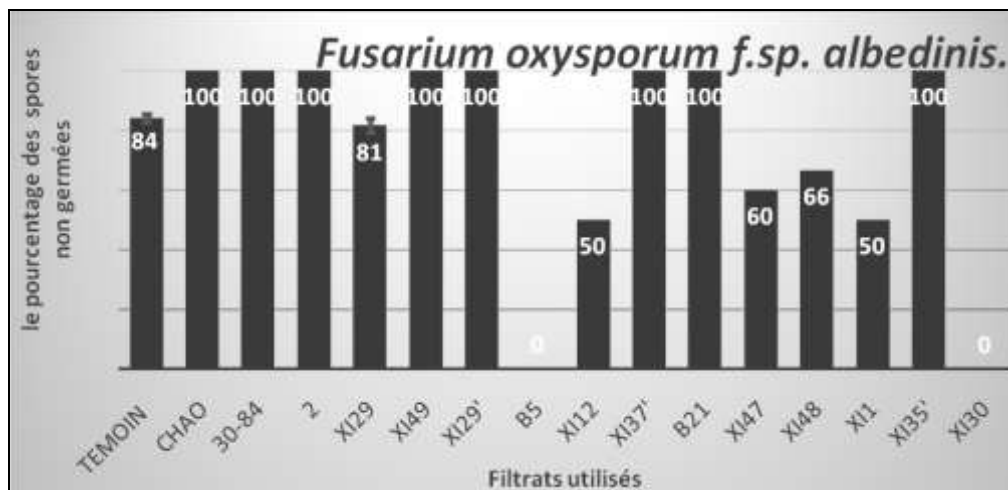
RESULTATS

INHIBITION DE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. ALBEDINIS

Le pourcentage des spores non germées pour *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* a été nulle (0%) avec les extraits des isolats Xi30 et B5 et maximal (100%) pour les extraits des isolats testés Xi49, Xi29', Xi35', Xi37' et B21 ; ainsi que ceux des souches de référence 30-84 (Figure 1).

Figure 1 : Représentation graphique des pourcentages des spores non germées du *Foa* traitées par différents filtrats bactériens

(Graphical representation of the percentages of non-germinated *Foa* spores treated by different bacterial filtrates).

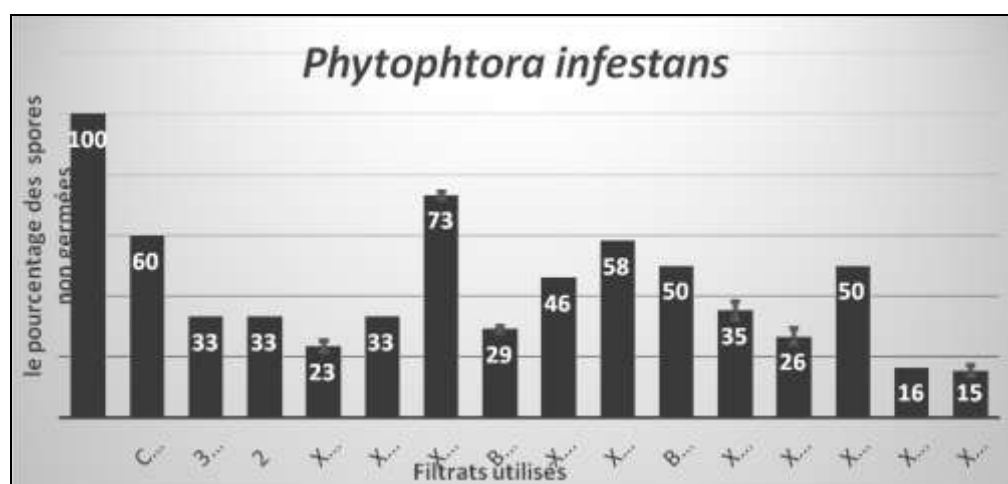


CHAO, 30-84 et 2 : filtrats de *Pseudomonas protogene* CHAO, *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 et la souche 2 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *auréofaciens*. Filtrats des souches testées : Xi29, Xi49, Xi29', B5, Xi12, Xi37', B21, Xi47, Xi48, Xi35', Xi30. La première colonne correspond au témoin non traité.

INHIBITION DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Le pourcentage des spores non germées pour *Phytophthora infestans* a varié entre 15.47% pour l'extrait de l'isolat Xi30 et 100% pour le témoin. Alors que pour les souches de référence la Souche 2, 30-84 et CHAO l'inhibition a varié de 33.33%, 33.33% à 60% respectivement (Figure 2).

Figure 2: Représentation graphique des pourcentages des spores non germées du Pi traitées par différents filtrats bactériens
(Graphical representation of the percentages of non-germinated Pi spores treated by different bacterial filtrates)



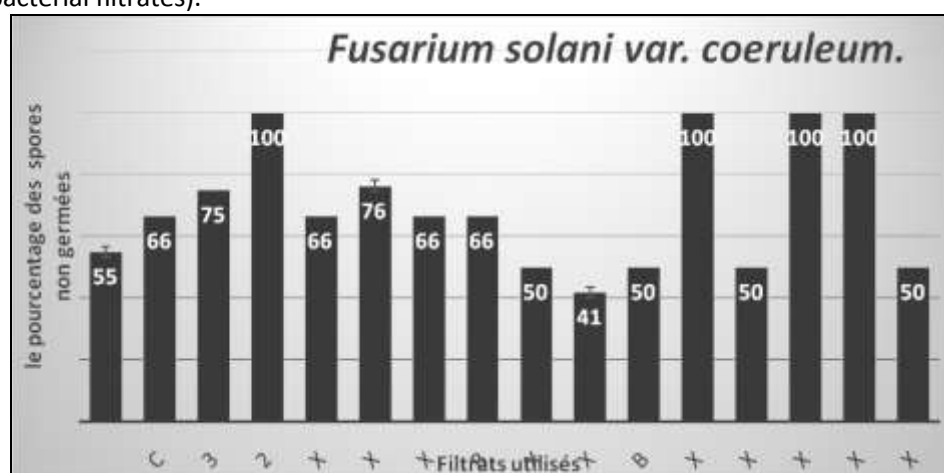
C, 3 et 2 : filtrats de *Pseudomonas protogene* CHA0, *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 et la souche 2 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *auréofaciens*. Filtrats des souches testées X...., B..... : XI29, XI49, XI29', B5, XI12, XI37', B21, XI47, XI48, XI35', XI30. La première colonne correspond au témoin non traité.

INHIBITION DE *FUSARIUM SOLANI* VAR. *COERULEUM*

Après 24h d'incubation on a pu observer une inhibition significative de la germination des spores de *Fusarium solani* var. *coeruleum* par les extraits bactériens. En effet, cette inhibition a variée entre 41.9% pour l'extrait de l'isolat Xi37', et 100% pour les extraits des isolats Xi1, Xi35'et Xi47. Alors que pour les souches de référence CHA0, 30 -84 et Souche 2, on a observé une inhibition de 66.66, 75 et 100% respectivement (Figure 3).

Figure3 : Représentation graphique des pourcentages des spores non germées du Pi traitées par différents filtrats bactériens

(Graphical representation of the percentages of non-germinated Fsc spores treated by different bacterial filtrates).



C, 3 et 2 : filtrats de *Pseudomonas protogene* CHA0, *Pseudomonas auréofaciens* 30-84 et la souche 2 *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *auréofaciens*. Filtrats des souches testées X...., B..... : XI29, XI49, XI29', B5, XI12, XI37', B21, XI47, XI48, XI35', XI30. La première colonne correspond au témoin non traité.

DISCUSSION

Beaucoup d'antagonismes existent certainement dans la nature et exercent une protection biologique plus ou moins efficace sur les pathogènes des plantes. Le résultat est un accroissement global des activités inhibitrices des antagonistes contre les pathogènes. Le potentiel d'un contrôle éventuel des maladies avec cette méthode reste actuellement limité car, contrairement aux laboratoires et sous serre, les résultats au champ ne sont pas aussi bons. Les problèmes majeurs sont dus au fait que les microorganismes introduits échouent généralement dans leur compétition avec la microflore existante (Nasraoui, 2006).

De tels microorganismes portent le nom de PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Ils utilisent plusieurs mécanismes pour la protection biologique. Cependant, la synthèse d'antibiotiques semble être le principal mécanisme utilisé contre les pathogènes des cultures par différents genres tels que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Rhizobium* et *Serratia* (Narayanasamy, 2013).

Parmi les isolats testés qui ont montré une activité sur les champignons, les filtrats des isolats XI29 et XI49 (bacilles à Gram +ve), B5 (*Bacillus mégathérium*) et XI29' (*Pseudomonas* sp.) ont inhibé la germination des spores des champignons étudiés. XI29, XI49 et B5 ont été les plus actifs sur le Fsc et le Pi avec des pourcentages respectifs allant de 55.04 à 66.66% et 46.2 à 73.3%. Cependant, l'inhibition du Foa a été nulle pour le filtrat de l'isolat B5 et maximale pour les autres.

Alors que, les filtrats des isolats XI1 (*Bacillus licheniformis*), XI35' et XI47 (*Bacillus subtilis*) ont totalement inhibé la germination du Fsc (100%). Les filtrats des isolats XI12, XI37' et B21 (bacilles à Gram +ve) ont montré un effet moindre variant de 41.9 à 50 %. Le filtrat de *Bacillus subtilis* D1/2, s'est déjà avéré efficace pour empêcher la diffusion de *Fusarium graminearum*. Cette activité antifongique a été attribuée aux lipopeptides extracellulaires identifiés comme des fengycines (Chan et al., 2009).

XI37' (*Bacillus cereus*) a montré une activité moyenne de 58.33% sur le Pi. Silo-Suh et al (1994) ont démontré que le filtrat de la culture de *Bacillus cereus* contenait deux antibiotiques qui suppriment la maladie de la luzerne causée par *Phytophthora medicaginis*. La zwittermicine A purifiée réduit réversiblement l'allongement des tubes germinatifs dérivant de kystes de *P. medicaginis*, et la zwittermicine B est responsable des déformations des tubes germinatifs.

D'autre part, l'inhibition totale de la germination du témoin Pi dans notre étude, pourrait être le résultat d'auto-inhibitions de la germination fréquemment observées quand les concentrations de spores sont élevées imposant ainsi un état de dormance, alors que la fréquence de la germination augmente lorsque la concentration diminue. Ce phénomène fût observé pour la première fois par Edgerton (1910) qui a noté que lorsque plus de 12 à 15 conidies de *Colletotrichum lindemuthianum* sont incluses dans 1 millimètre cube, le pourcentage de germination des spores est réduit. Dans certains cas, cette inhibition est due aux effets d'inhibiteurs chimiques spécifiques, mais dans d'autres cas, elle peut être simplement due à une concentration inadéquate d'oxygène ou d'éléments nutritifs (Moore, 1996). En effet, dans notre étude en absence de toute substance inhibitrice, on a observé une inhibition de la germination des spores du témoin.

L'inhibition de la germination des spores du Foa a été totale avec les filtrats des isolats XI49, XI37', B21 et XI35'. Les bactéries associées aux champignons ont une influence considérable sur leur pathogénèse ; leur association avec *Fusarium oxysporum* semble importante dans leurs capacité à adopter un état invasif/ou une croissance pathogène. En effet, il a été démontré que des composés volatils produits par *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 empêchent la croissance et la germination des spores de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Yuan et al., 2012). D'autre part, un effet négatif sur la pathogénèse fongique a été observé avec l'inhibition de la germination des spores du phytopathogène *Botrytis cinerea* par une communauté bactérienne antagoniste sur les feuilles des Chrysanthèmes (Frey-Klett et al., 2011).

Pseudomonas possède de multiples mécanismes de biocontrôle, la production d'antibiotiques semble être le principal mécanisme d'action contre les microorganismes pathogènes de récolte, par

la sécrétion de Pyrrolnitrine, Aerugine, Phenazines et Phloroglucinols tels que le 2,4-DAPG(diacetyl-phloroglucinol). Parmi ces métabolites le 2,4-DAPG est actif vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, en plus d'autres métabolites antifongiques tels que les protéases, lipases et chitinases (Narayanasamy, 2013). Certains des isolats testés (XI35', XI48 et XI49) produisent des métabolites présentant les mêmes caractéristiques biochimiques du DAPG (Mezaache-Aichour et al., 2015), et l'isolat 2 produit des phénazines (Mezaache-Aichour et al., 2012)

Les filtrats des souches de référence testées ont donné une inhibition de la germination des spores mais avec des pourcentages différents en fonction du champignon étudié. Alors qu'elles ont montré une inhibition totale (100%) du Foa. L'inhibition du Fsc et du Pi par les filtrats de ces souches de référence est de moindre effet, sauf le filtrat de la souche 2 qui a donné une inhibition totale du Fsc. En plus de cette souche 2, les isolats étudiés produisent des sidérophores qui sont excrétés dans le milieu (Haichour et al., 2015). Une relation directe a été établie *in vitro* entre la synthèse des sidérophores chez *Pseudomonas fluorescens* et leur capacité d'inhiber la germination des chlamydospores de *F. oxysporum* (Pal et McSpadden Gardener., 2006). En effet, Mezaache-Aichour et al. (2012), ont démontré que cette bactérie (souche 2) inhibe la croissance mycélienne du Foa, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* et l'oomycète *Pythium ultimum*.

D'autre part, le filtrat de l'isolat XI29' a montré une inhibition de la germination des spores du Fsc de l'ordre de 66.66%. Par contre, les filtrats des isolats XI48 et XI30 (bacilles à Gram-ve), ont montré un effet moindre avec 50% d'inhibition seulement. Concernant le Foa, le filtrat de l'isolat XI29'a montré une inhibition de l'ordre de 100%, alors que celui de XI30 n'a montré aucune action sur la germination des spores de ce champignon. Lim et al. (1991) ont par ailleurs démontré que le filtrat de *Pseudomonas stutzeri* Ypl-1 contenant des enzymes lytiques telle que : chitinase et laminarinase, empêchent la croissance mycélienne plutôt que la germination des spores, mais causent également la lyse des mycéliums et des tubes germinatifs chez *F. solani*.

Cependant pour le Pi, les inhibitions respectives ont été de 73.33, 26.78 et 15.47% avec XI29', XI48 et XI30. Ces isolats produisent des molécules semblables au phloroglucinol et ses dérivés (Mezaache-Aichour et al., 2015). Ce polycétide, produit par des bactéries de biocontrôle tels que *P. fluorescens*, empêche la zoosporogénèse et altère la motilité des zoospores de *Plasmopara viticola* et d'*Aphanomyces cochlioides*. Généralement, les zoospores sont d'abord immobilisées après une courte exposition au DAPG, ensuite elles subissent une lyse (Tofazzel et Tiedemann, 2011). La faible sensibilité des spores du Pi à l'extrait de l'isolat XI30 pourrait être due à la faible concentration en molécules actives. Tofazzel et Tiedemann, (2011) ont démontré que, lorsqu'elles sont traitées avec une petite fraction de DAPG, au lieu d'être lysées les zoospores d'*A. cochlioides* germent et forment autour des cystospores de multiples tubes germinatifs avec plusieurs branchements.

Enfin, dans cette étude les isolats les plus efficaces sur l'inhibition de la germination des spores fongiques sont : les isolats XI29', XI35', XI37' et XI49 en plus des souches de référence testées.

CONCLUSION

La protection des cultures contre les phytopathogènes est un enjeu majeur en agriculture. La lutte chimique est largement employée, mais elle n'est pas toujours efficace et peut conduire à des contaminations des aliments et de l'environnement. La capacité de ces bactéries à produire des substances antagonistes qui inhibent la germination des spores des champignons phytopathogènes aussi différents que le Foa et le Fsc isolées, laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces microorganismes dans la lutte contre les maladies fongiques du palmier dattier et de la pomme de terre ; ceci soit en retardant les infections, soit en contribuant à affaiblir le pathogène et le prédisposant à d'autres substances chimiques ou biologiques.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour son soutien financier dans le cadre des programmes de recherche "CNEPRU N° F01220100022, F01220130088 et PNR 1 / u19 / 332".

BIBLIOGRAPHIE

- Belatrous Z., 2011- Contribution à l'étude des sols suppressif de la region de Ain oulmane. UFA Sétif Mémoire de Master pp 23-34.
- Chan Y-K., Savard M. E., Reid L. M., Cyr T., McCormick W. A., Seguin C., 2009- Identification of lipopeptide antibiotics of a *Bacillus subtilis* isolate and their control of *Fusarium graminearum* diseases in maize and wheat. *Bio Control* 54:567–574.
- Frey-Klett P., Burlinson P., Deveau M.A., Tarkka B.M., Sarniguet A., 2011- Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiol mol bio rev* 75(4):583-609.
- Haichour N., Mezaache-aichour S., Boukhalfa A., Madaci I., Guechi A. et Zerroug M.M. Métabolites impliqués dans la promotion de la croissance des plantes et leur protection. AFPP – Cinquième Conférence Internationale sur les méthodes alternatives en protection des Plantes. Lille, 10, 11 et 12 Mars 2015. Pp. 309-316.
- Lim H.S., KIM Y.S., Kim S.D., 1991- *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl Environ microbiol* 57(2): 510-516.
- McSpadden Gardener B. B and Fravel D. R. 2002-Biological control of plant pathogènes: Research, commercialization, and application in the USA Online. *Plant Health Progress* 10:1-18.
- Mezaache-Aichour S., Guechi A., Nicklin J., Drider D., Prevost H., Strange R.N., 2012- Isolation, identification and antimicrobial activity of pseudomonads isolated from the rhizosphere of potatoes growing in Algeria. *Plant Pathol* 94(1): 89-98.
- Mezaache-aichour S., Haichour N., Taleb Z., Benlarbi N., Guechi A., Zerroug M.M., 2015- Activités d'isolats indigènes antagonistes par des substances similaires au phloroglucinol. AFPP – Cinquième Conférence Internationale sur les méthodes alternatives en protection des Plantes. Lille, 10, 11 et 12 Mars 2015. Pp.301-308.
- Moore. L. E., 1996- Fundamentals of the fungi. Chap12. 4th ed. Prentice hall international london. p: 361, 1996.
- Narayanasamy P., 2013- Detection and Identification of Bacterial Biological Control Agents. Chap. 4 In: *Biological Management of Diseases of Crops, Progress in Biological Control*: pp 201-293,
- Nasraoui B., 2006- Les champignons parasites des plantes cultivées. Centre de publication Universitaires, Tunisie p : 330, 2006.
- Pal K. K., McSpadden Gardener B., 2006- Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Remadna H., Mansouri S., 2013- Identification de bacteries isolees de la rhizosphere. UFA Sétif Mémoire de master pp 25-35, 2013.
- Sayah N., 2011- Contribution à l'étude des sols suppressif de la région de Ain azel. UFA Sétif mémoire de master pp. 28-36.
- Silo-Suh A.A., Lethbridge B. J., Raffel S. J., He H., Clardy J., Handelsman J., 1994- Biological Activities of Two Fungistatic Antibiotics Produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ microbiol* 60(6):2023-2030.
- Tofazzel I.M., Tiedemann A.V., 2011- 2, 4-Diacetylphloroglucinol suppresses zoosporogenesis and impairs motility of Peronosporomycete zoospores. *World J Microb Biotech* 27:2071-2079.
- Yuan J., Raza W., Shen Q., Huang Q., 2012- Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Appl Environ Microbiol* 78(16):5942-5944.