

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**RECHERCHE EXTRACTION ET MISE EN EVIDENCE DE SUBSTANCES
ANTIFONGIQUES CHEZ LES SOUCHES INDIGENES DE *PSEUDOMONAS SP.* ANTAGONISTES**

S. MEZAACHE-AICHOURE⁽¹⁾, N. HAICHOURE⁽¹⁾, A. KHALED⁽¹⁾ et M.M. ZERROUG^{(1)*}

⁽¹⁾ LMA Departement de Microbiologie, Faculté SNV, Université Ferhat ABBES Sétif 1(EL BEZ), Sétif
19000, ALGÉRIE. email*: med.zerroug@gmail.com

RÉSUMÉ

La mise en évidence de substances antifongiques produites par des souches antagonistes de lutte biologique est une étape importante dans la recherche d'alternatives à la lutte chimique. Les résultats obtenus par Chromatographie sur Couche Mince ont permis d'identifier, chez les isolats de *Pseudomonas sp.* indigènes, des phloroglucinols par comparaison avec la souche de référence CHA0 productrice de DAPG et ses dérivés.

Mots-clés: Antagonisme, substance antifongique, souches indigènes.

ABSTRACT

The identification of antifungal substances produced by antagonistic strains of biological control is an important step in the search for an alternative to chemical control. The results obtained by thin layer chromatography led to identify, among indigenous isolates of *Pseudomonas sp.*, phloroglucinols by comparison with the reference strain CHA0 producing DAPG and its derivatives.

Keywords: Antagonism, antifungal substance, indigenous strains.

INTRODUCTION

Les pesticides chimiques, non seulement sont susceptibles de polluer l'atmosphère, mais aussi peuvent être néfastes pour l'environnement, parce qu'ils peuvent se répandre dans l'air et s'accumuler dans le sol. En outre, l'utilisation répétée de ces produits chimiques a permis le développement de résistances aux produits chimiques chez les organismes ciblés (Lee *et al.*, 2003).

Les pesticides d'origine microbienne, ont été mis en évidence non seulement pour leur efficacité sur les organismes cibles, mais aussi pour leur biodégradabilité (Lee *et al.*, 2003). Ils ont aussi comme objectifs principaux, l'efficacité et le respect de l'environnement (Benhamou et Picard., 2000).

Des centaines de bactéries possédant une action antagoniste, sont utilisées pour leur structure complexe qui favorise la production de substances naturelles chimiquement et biologiquement diversifiées. Ces bactéries sont utilisées dans la lutte biologique pour stimuler la croissance et la protection des plantes contre les pathogènes (Lee *et al.*, 2003).

Les *Pseudomonas* fluorescents (*Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* et *P. putida*) et des espèces étroitement apparentées sont d'importantes bactéries antagonistes présentes dans le sol. Ceci est dû à la production d'une large gamme de composés antifongiques tels que : les pigments fluorescents (sidérophores), les composés volatils tels que l'acide cyanhydrique (HCN), des enzymes lytiques et des antibiotiques (Ramayasmruthi *et al.* 2012).

Parmi les antibiotiques produits par les *Pseudomonas*, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), l'acide phénazine carboxylique (PCA), la pyrrolnitrine (PRN), la pyoluteorine (PLT) sont très efficaces dans le contrôle et la suppression de divers pathogènes telluriques (Maddulla *et al.*, 2008).

L'objectif de notre étude est de déterminer la nature des antifongiques produits par certaines souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre et du blé, par comparaison avec des souches de référence produisant du DAPG et des phénazines.

MATERIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Les souches bactériennes des *Pseudomonas* à activité antagonistes, utilisées dans ce travail, ont été isolées de la rhizosphère de la pomme de terre et du blé. Les numéros assignés sont les suivants : XI29, XI30, XI34, XI35', XI36', XI37', XI47, XI48, XI49 (Mezaache-aichour *et al.*, 2012; Mezaache-aichour *et al.*, 2013); De plus, ces souches ont été évaluées avec des souches de références : *P. fluorescens* CHA0 et *P. aureofaciens* 30-84 (généreusement offertes par le Pr. HAAS, Lausanne SUISSE).

MÉTHODES

Préparation du milieu de culture

Afin d'évaluer la production d'antibiotiques par les souches bactériennes déjà citées, un milieu de culture spécifique à cet effet, a été préparé (NBY : Nutrient Broth Yeast extract). Le bouillon obtenu après dissolution des substances requises, est réparti en tube puis stérilisé à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes.

Extraction du 2,4-Diacétylphloroglucinol

Les souches de bactéries antagonistes sont repiquées dans le milieu préparé, cultivées au bain marie agité pendant au moins 72 h à 28° C (Thomashow et Weller, 1988; Krishnan *et al.*, 2007).

Les suspensions obtenues sont acidifiées à pH 2,0 par l'HCl (Kavitha *et al.*, 2005), puis centrifugées à 3000 tours/min pendant 15 minutes. Les surnageants sont récupérés, puis l'extraction est effectuée par un volume équivalent d'acétone (Rezzonico *et al.*, 2007; Prasanna *et al.*, 2009). L'étape d'extraction est suivie d'une filtration à travers du sulfate d'ammonium anhydre.

Détermination de l'absorbance maximale du DAPG

Après acidification à pH 2,0 et centrifugation des suspensions bactériennes, l'absorbance maximale des surnageants de chaque souche est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les DAPG sont détectés à 350 nm (Vincent *et al.*, 1991).

Identification du DAPG par chromatographie sur couche mince

Sur une plaque de gel de silice (20 x 20 cm), on a réalisé des dépôts de 20 µl de chaque échantillon, avec la souche CHA0 comme souche de référence productrice de DAPG. Une migration de 50 mn a

été réalisée dans un tampon constitué d'un mélange Chloroforme / Acétone (9/1 vol/vol) utilisé comme phase mobile (Bangera et Thomashow., 1996). Après la migration des échantillons, les spots sont observés sous UV à 366 nm, et leurs rapports frontaux (R_f) déterminés.

RESULTATS

CARACTERISTIQUES DES SURNAGEANTS A 350 NM

Quelques surnageants des isolats rhizosphériques à caractère antifongique (XI35', XI48 et XI49), ont donné des valeurs d'absorbance à 350 nm (c'est-à-dire qu'ils absorbent à 350 nm au même titre que CHA0) (Tableau I et fig.1).

Tableau I. Absorbances maximales des surnageants à 350 nm (maximum absorbance of the supernatants at 350 nm).

Souches	XI 35'	XI48	XI49	CHA0
Absorbance à 350 nm	0,16	0,67	0,69	0,58

CHA0: souche de *Pseudomonas fluorescens* de référence ; souches XI35', XI48, XI49: isolats étudiés.

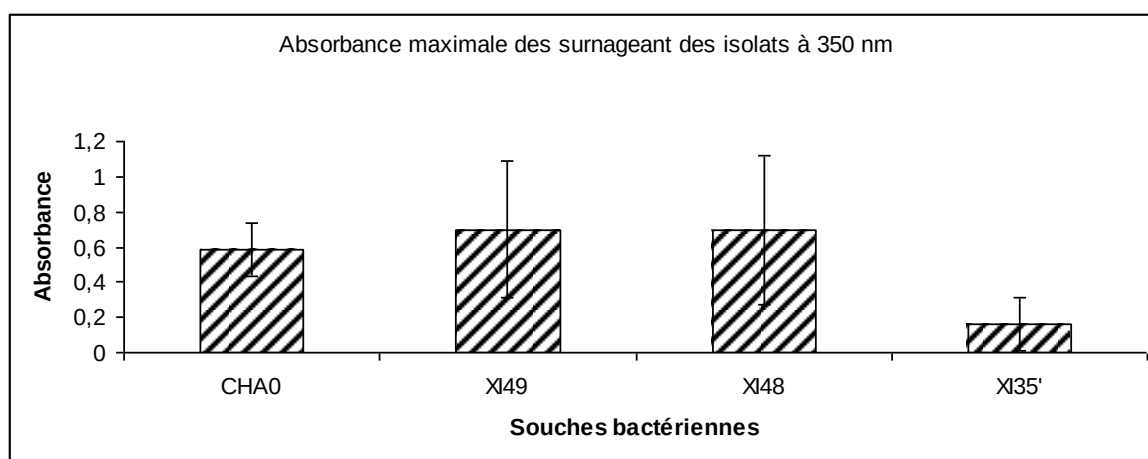


Figure 1. Histogramme des absorbances maximales des surnageants à 350 nm (Histogram of maximum absorbance of the supernatants at 350 nm.).

CHA0 : souche de *Pseudomonas fluorescens* de référence, souches XI35', XI48, XI49 : isolats étudiés, Strains XI35 'XI48, XI49: studied strains.

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CMM) DES EXTRAITS D'ACETONE:

Après migration, l'observation sous UV à 366 nm permet de détecter des spots correspondant respectivement aux isolats XI48, XI49, XI 35' semblables à ceux produits par de la souche de référence *P. fluorescens* CHA0, et avec des rapports frontaux proches de ceux de CHA0. Ces rapports sont respectivement : 0,048 et 0,089, 0,06, 0,055 et 0,048 pour la souche CHA0.

Les spots ont des formes et des couleurs semblables à ceux produits par la souche CHA0 (Fig. 2).

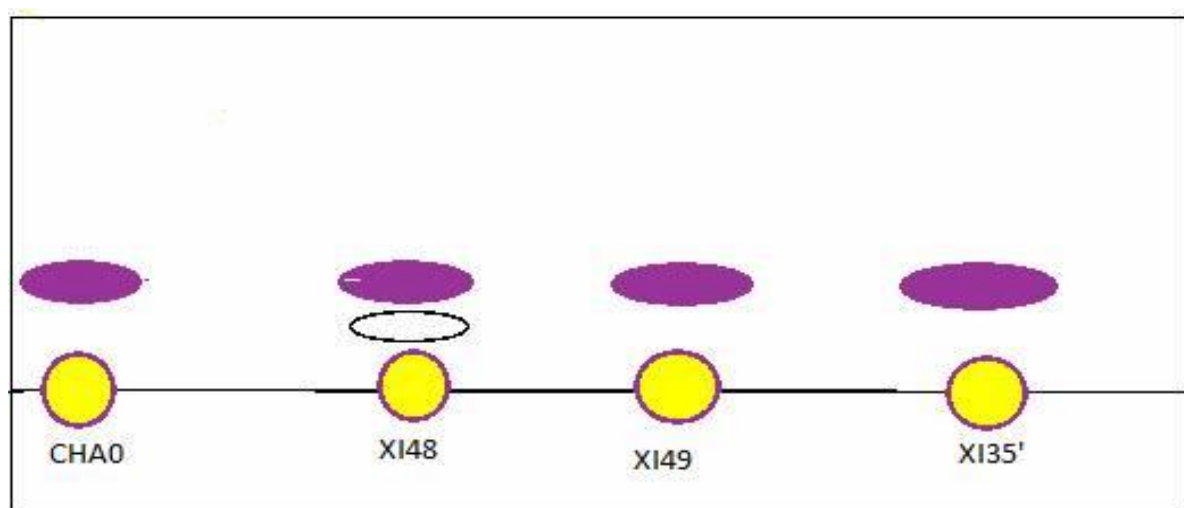


Figure 2. Observation sous UV de la plaque CCM pour la recherche de DAPG (Observation under UV TLC plate for DAPG).

CHA0, XI35', XI48, XI49 : extraits de la souche CHA0 et des isolats (strains CHA0 and isolates extracts)

DISCUSSION

Les *Pseudomonas* fluorescents utilisés dans la lutte biologique produisent une large gamme de métabolites secondaires possédant des activités antimicrobiennes (Madulla *et al.*, 2008). Les isolats utilisés dans notre étude ont été sélectionnés sur la base de leurs activités antagonistes *in vitro* vis-à-vis de certains champignons phytopathogènes (Mezaache-aichour *et al.*, 2013).

Les *Pseudomonas* fluorescents produisent des antibiotiques non hétérocycliques. Il s'agit des phloroglucinols (MAPG et DAPG) produits par la souche *Pseudomonas fluorescens* Q2-87 (Bangera et thomashow, 1996) et la souche *P. fluorescens* CHA0 (Fernando et Zhang, 2006) responsables de la suppression de maladies telluriques de par le monde. Ces antibiotiques présentent des caractéristiques spécifiques avec des maximums d'absorbance dans l'UV à 350 nm (Vincent *et al.*, 1991).

Les spots obtenus après CCM dans un mélange Chloroforme/Acétone (9/1 vol/vol) ont une forme ovale de couleur mauve semblable à celui de la souche de référence CHA0. Les rapports frontaux convergents avec celui de CHA0, de même que les valeurs des absorbances des surnageants. Ces résultats permettent de dire que probablement ces isolats produisent des phloroglucinols par comparaison avec la souche de référence CHA0 productrice de DAPG et ses dérivés (Keel *et al.*, 1996 ; Prassana *et al.*, 2009) ; et qui est responsable de la protection des plantes vis à vis des pathogènes telluriques (Ramette *et al.*, 2011).

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ce travail d'initiation à la recherche permettent de dire que l'activité antagoniste des isolats rhizosphériques (XI48, XI49, et XI35') de souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre et du blé vis-à-vis des certains champignons telluriques phytopathogènes pourrait être due en partie, à leur capacité à produire un antibiotique de la famille des phloroglucinols, ainsi qu'à d'autres déterminants qui n'ont pas été traités dans ce travail. Le point le plus intéressant est assurément que ces souches ne produisent pas de phénazines mais pourraient être considérées comme des productrices potentielles de DAPG ou de l'un de ses dérivés. Les perspectives à venir seraient de déterminer la nature exacte et la quantification de ces substances, afin d'évaluer l'importance des ces souches par rapport aux souches mondialement connues pour leurs capacités protectrices.

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 et PNR 1 / u19 / 332 F01220130088 "

BIBLIOGRAPHIE

- Bangera M.G., Thomashow L.S. 1996- Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol Plant Microbe Interac* 9 (2):83-90.
- Benhamou N., Picard K. 2000- Résistance Induite Contre Les Agents Pathogènes. *Phytoprotection*, 80 : 137-168.
- Fernando W., Zhang S.N.Y. 2006- Chapter3: Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its Relation in Biocontrol of Plant Diseases *IN PGPR: Biocontrol and Biofertilization* , edited by Z.A. Siddiqui , p. 67-109.
- Kavitha K., Mathiyazhagan S., Vel V.S. Nakkeeran S., Chandrasekar G., Dilantha Fernando W. G. 1996- Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematode. *Arch Phytopathol Plant Protec*, 38(1): 69 – 76.
- Keel C., Weller D.M., Natsch A., Defago G., Cook R.J., Thomashow L.S. 1996- Conservation of the 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthesis Locus among *fluorescent Pseudomonas* Strains from Diverse Geographic Locations. *Appl Environmen Microbiol*, 62 (2): 552–563.
- Krishnan H.B., Kang B.R., Krishnan A.H., Kim K.Y., Kim Y.C. 2007. *Rhizobium etli* USDA9032 Engineered To Produce a Phenazine Antibiotic Inhibits the Growth of Fungal Pathogens but Is Impaired in Symbiotic Performance. *Appl Environmen Microbiol*, 73 (1):337-330.
- Lee J.Y., Moon S.S., Hwang B.K. 2003- Isolation and Antifungal and Antioomycete Activities of Aerugine Produced by *Pseudomonas fluorescens* Strain MM-B16. *Appl Environmen Microbiol*, 69 (4):2023–2031, 2003.
- Maddula V.S.R.K., Pierson E.A., Pierson III L.S. 2008- Altering the Ratio of Phenazines in *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* Strain 30-84: Effects on Biofilm Formation and Pathogen Inhibition. *J Bacteriol*, 190: 2759–2766.
- Mezaache-Aichour S., Haichour N., Sayeh N., Guechi A., Zerroug M. M., 2013-Isolation and Selection of Indigenous Bacterial Strains with Suppression Properties from the Rhizospheres of Potato and Wheat. *Ann Rev Res Biol*. 3, 4, 405-415.
- Mezaache-aichour S., Sayah N., Zerroug M.-M., Haichour N., Guechi A., 2012 - Criblage de bactéries telluriques à caractère suppressif. AFPP – 10^e Conférence internationale sur les maladies des plantes Tours – 3, 4 et 5 Décembre 2012, 614-619.
- Prasanna B.R., Reddy M.S., KrishnaKumar K.V. 2009- Characterization of antifungal metabolites of *Pseudomonas fluorescens* and their effect on mycelial growth of *Magnaporthe grisea* and *Rhizoctonia solani*. *Inter Journal PharmTech Res*, 1(4): 1490-1493.
- Ramette A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux M., Gruffac, C., Meyer J.M., Défago G., Sutra L., Moënnelocoz Y. 2011- *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol*, 34: 180–188.
- Ramyasmruthi S., Pallavi O., Pallavi S., Tilak K., Srividya S. 2012- Chitinolytic and secondary metabolite producing *Pseudomonas fluorescens* isolated from Solanaceae rhizosphere effective against broad spectrum fungal phytopathogens. *Asian J Plant Sci Res*, 2 (1):16-24.
- Rezzonico F., Zala M., Kee C., Duffy B., Moënnelocoz Y., Défago G. 2007- Is the ability of biocontrol *fluorescent pseudomonads* to produce the antifungal metabolite 2,4- diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytolo*, 173: 861–872.
- Thomashow L.S., Weller D.M. 1988- Role of a Phenazine Antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in Biological Control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J Bacteriol*, 170 (8): 3499-3508.
- Vincent N.M., Harrison L. A., Joan M.B., Peter A.K. 1991- Genetic Analysis of the Antifungal Activity of a Soilborne *Pseudomonas aureofaciens* Strain. *Appl Environmen Microbiol*, 57(10) : 2928-2934.