

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

**RÔLE DE SUBSTANCES SIMILAIRES AU PHLOROGLUCINOL DANS L'ACTIVITÉ ANTAGONISTE DE
BACTÉRIES RHIZOSPHERIQUES VIS-À-VIS DE CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGÈNES**

S. MEZAACHE-AICHOURE^{(1)*}, N. HAICHOURE⁽¹⁾, Z. TALEB⁽¹⁾, N. BENLARBI⁽¹⁾, A. GUECHI⁽¹⁾
et M.M. ZERROUG⁽¹⁾,

⁽¹⁾ LMA Département de Microbiologie, Faculté SNV, Université Ferhat ABBES Sétif 1 (EL BEZ), Sétif
19000, ALGÉRIE. email*: mezaic2002@yahoo.fr

RÉSUMÉ

La rhizosphère est un environnement où la diversité microbienne, et les interactions plante-microbe et/ou microbe-microbe sont nombreuses et complexes. Des bactéries isolées de la rhizosphère du blé et de la pomme de terre, ont été préalablement caractérisées comme productrices de substances antagonistes, capables d'inhiber *in vitro* la croissance des champignons phytopathogènes telluriques tel que: *Phytophthora infestans*; *Fusarium solani* var. *coeruleum* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. En effet, les résultats montrent qu'en culture mixte avec ces champignons, les extraits de ces isolats ont un effet fongistatique. Une inhibition significative a été obtenue avec les extraits des bactéries (XI49 et XI35'). En effet, la CI50 a été de 13 et 53µl respectivement. D'autre part, ces substances possèdent des caractéristiques similaires à celles du DAPG. Ceci suppose que ces isolats pourraient être utilisés dans le biocontrôle.

Mots-clés : antagonisme, DAPG, champignons telluriques phytopathogènes, rhizosphère.

ABSTRACT

THE ROLE OF SIMILAR SUBSTANCES TO PHLOROGLUCINOL IN ANTAGONISTIC ACTIVITY OF RHIZOSPHERIC BACTERIA AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI

The rhizosphere is an environment where the microbial diversity of plant-microbe and / or microbe-microbe interactions are numerous and complex. Bacteria isolated from the rhizosphere of wheat and potato, previously characterized as antagonists producing substances that inhibit *in vitro* the growth of plant pathogenic soil fungi such as: *Phytophthora infestans*; *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium oxysporum* f.p. *albedinis*. Indeed, the results show that in mixed culture with these fungi, extracts of these isolates have a fungistatic effect. A significant inhibition was obtained with extracts of bacteria (XI35 'and XI49). Indeed, the IC50 was 13 and 53µl respectively. Furthermore, these substances possess similar characteristics to those of DAPG. This assumes that these isolates may be used in the biocontrol.

Keywords: Antagonism, DAPG, soil borne phytopatogenic fungi, rhizosphere.

INTRODUCTION

La rhizosphère représente assurément un puits de diversité microbienne. Dans cet environnement, les interactions plante-microorganismes sont nombreuses et complexes. Alors que, les bactéries commensales se développent sans incidence sur la croissance de la plante, d'autres par contre ont la capacité d'en promouvoir le développement. Ces bactéries qui colonisent la surface des racines et les espaces intercellulaires protègent les racines par différents mécanismes, l'antibiose apparaît comme un des plus importants et des plus étudiés. La connaissance des genres bactériens impliqués dans la synthèse de ces antibiotiques nous permet alors de cribler les populations de rhizobactéries productrices d'antibiotiques et d'isoler rapidement des agents potentiels de biocontrôle. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. D'abord, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Mais aussi, l'excrétion de plusieurs molécules antifongiques telles que la phénazine, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le 2,4-diacétylphloroglucinol, pour ne citer que les plus importants (Haas et Defago, 2005; Bojanowski, 2011).

La majorité des études montrent que de 1 à 10% des isolats du sol peuvent avoir un certain pouvoir antagoniste *in vitro*, très peu de ces isolats ont la capacité de supprimer les agents phytopathogènes dans divers sols et conditions de croissance et encore un plus petit nombre est capable d'inhiber un large spectre d'espèces pathogènes (McSpadden Gardener et Fravel, 2002 ; Allaire, 2005).

L'objectif du présent travail est de rechercher et tester parmi des bactéries antagonistes isolées de la rhizosphère du blé et de la pomme de terre, les producteurs de substances impliquées dans la protection et la stimulation de la croissance des plantes .

MATERIEL ET MÉTHODE

MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude comprennent la souche de référence: *Pseudomonas protegens* sp-nov CHAO (généreusement offerte par le Pr HAAS, Lausanne Suisse; Ramette *et al*, 2011). Et des souches bactériennes isolées de la rhizosphère de blé et de pomme de terre XI 35', XI48, XI49, XI1, XI45, XI47, XI29, XI29', XI37', B12, B21, B5, B10, souche2, XI12, XI30, XI44, XI39, A16 (Mezaache-Aichour *et al*, 2012 a, b ;2013)

Les champignons utilisés pour les tests de l'antagonisme: *Fusarium solani* var. *coeruleum* (Institut Pasteur de Paris), *Phytophthora infestans* (LMA), *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (INRA Alger).

MÉTHODES

Préparation des inoculums bactériens

Deux lots de souches ont été cultivées sur bouillon nutritif à l'extrait de levure (NBY). Incubées à température ambiante, pendant 3 jours, sous agitation permanente (James et Gutterson, 1986).

Extraction des substances actives

Après croissance, les cultures sont acidifiées avec du HCl jusqu'à pH 2 et l'extraction est alors effectuée deux fois avec le même volume d'acétate d'éthyl pour un 1^{er} lot et à l'acétone pour le 2nd, après agitation vigoureuse et décantation les phases organiques et aqueuses sont séparées, et la phase organique est débarrassée de toute trace d'eau après passage au travers du sulfate d'ammonium anhydre (Velusamy *et al*, 2006).

Chromatographie sur couche mince

Les extraits obtenus sont alors soumis à une chromatographie en couche mince sur plaque de silice dans un mélange : Acétone/Chloroforme (1/9), ensuite observés sous UV à 254nm. En même temps que l'extrait de la souche de référence CHAO (Bangera et Thomashow, 1996).

Détermination de l'activité antifongique des extraits

Les extraits des souches testées et bien sur CHA0, ayant montré des caractéristiques similaires au DAPG, ont été testés quand à leurs activité antifongique. Le milieu PDA semi solide à des concentrations croissantes d'extrait est versé dans des plaques de 24 puits à raison de 1ml par puits, après mélange et solidification des milieux, un disque fongique de 3mm de diamètre est déposé au centre de chaque puits. Les plaques sont alors incubées pendant 5 jours à température ambiante (James et Gutterson, 1986). Ensuite la CI_{50} a été déterminée par la méthode de Finney (1971) in Zerroug (2007).

RESULTATS

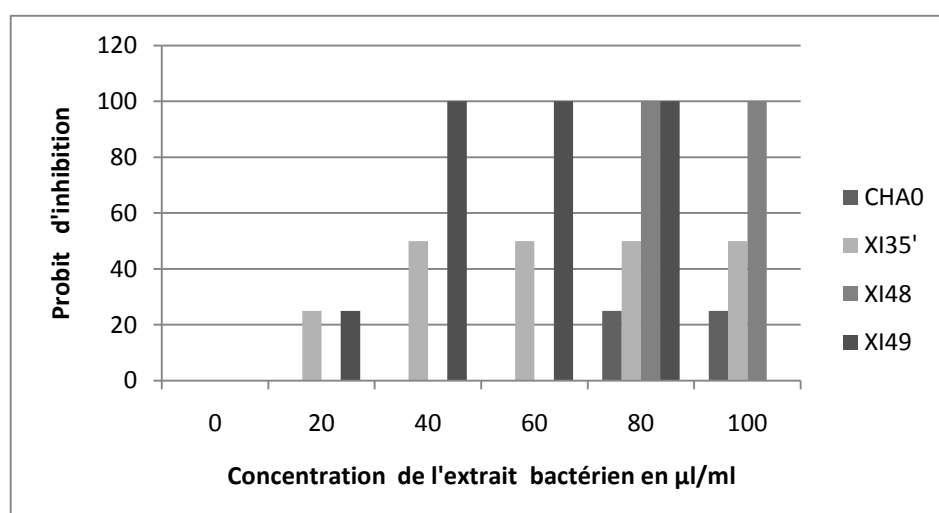
CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Après migration des deux lots d'extraits des résultats différents ont été obtenus. L'observation des extraits d'acétone sous UV à 366 nm permet de détecter des spots correspondants respectivement aux isolats XI48, XI49 et XI 35' semblables, et avec des rapports frontaux proches de ceux produits par la souche de référence CHA0. Par contre, les extraits d'acetate d'éthyl de XI1, XI12, XI29, XI29', XI30, XI37', B5, B12, B21 et XI47 et sous UV à 254 nm, ont donné des spots de couleur différentes des précédents mais semblables à ceux de la souche de référence CHA0.

DETERMINATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS

Parmi les extraits testés, les extraits des souches XI49 et XI48 ont totalement inhibé la croissance des 3 champignons testés. En effet, pour les isolats XI 48 et XI49, respectivement 40 et 80 μ l d'extrait ont été suffisants pour inhiber toute croissance fongique. Alors que pour les isolats XI35' et CHA0 100 μ l d'extrait n'ont inhibé respectivement le *Fusarium solani* var. *coruleum* qu'à 50% et 25% (Figure 1). Ces résultats ont permis la détermination de la CI_{50} . En effet, dans le cas du FSC et avec l'extrait de l'isolat XI49, 13 μ l ont donné une CI_{50} , par contre avec la souche CHA0 109 μ l ont été nécessaires (Tableau I).

Figure 1 : Activité des extraits des souches (CHA0, XI35', XI48 et XI49) vis-à-vis du FSC (Activity of strains extracts (CHA0, XI35 'XI48 and XI49) against FSC)



FSC: *Fusarium solani* var *coeruleum*.

0, 20, 40, 60, 80 et 100 concentration en μ l des extraits de CHA0, XI35', XI48 et XI49.

CHA0, XI35', XI48 et XI49 isolats de référence et de la rhizosphère testés(reference and rhizospheric isolates tested).

Tableau I : CI50 en µl des extraits des isolats testés (IC50 in µl of tested isolates extracts)

Champignon/souche	CHA0	XI35'	XI48	XI49
PI	148	53	77	ND
FSC	109	77	77	13
FOA	ND	62	77	ND

PI: *Phytophthora infestans* ; FSC: *Fusarium solani* var *coeruleum*; FOA: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*; CHA0, XI35', XI48 et XI49 isolats de référence et de la rhizosphère testés (reference and rhizospheric isolates tested) ;ND : non déterminée (not determined).

DISCUSSION

Les *Pseudomonas* fluorescents associés aux racines sont capables de protéger les plantes contre les pathogènes fongiques par production d'une large gamme de métabolites secondaires (Thomashow et Weller, 1988; Dowling et O'Gara, 1994), ce qui a conduit à leur utilisation pour la lutte biologique (Madulla *et al.*, 2008). Les isolats utilisés dans notre étude ont été sélectionnés à partir de la rhizosphère du blé et de la pomme de terre, sur la base de leurs activités antagonistes *in vitro* vis-à-vis de certains champignons phytopathogènes.

Parmi les composés antifongiques synthétisés par ces *Pseudomonas*, les phloroglucinol (PHL et MAPG DAPG) antibiotiques non hétérocycliques produits par la souche *Pseudomonas fluorescens* Q2-87 (Bangera et Thomashow., 1996) et la souche *P. fluorescens* CHA0 (Fernando *et al.*, 2006), impliqués dans le contrôle biologique de certaines maladies des cultures de blé « piétin-échaudage » causée par *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Keel et Défago, 1992) aux Etats-Unis (Thomashow et Weller, 1988), la pourriture noire des racines de tabac causée par *Thielaviopsis basicola* (Stutz *et al.*, 1986) dans une région de la Suisse (Keel et Défago, 1992), la betterave à sucre (Defago *et al.*, 1990), et dans d'autres régions du monde, Irlande (Fenton *et al.*, 1992), Angleterre (Broadbent *et al.*, 1976), Belgique (Dutrecq *et al.*, 1991) et l'Ukraine (Pidoplichko *et al.*, 1979).

Les extractions des composés actifs ont été effectuées après 72 heures de culture. Le DAPG est un métabolite secondaire phénolique, retrouvé qualitativement et quantitativement dans les surnageants des cultures (Shanahan *et al.*, 1992). Produit par des *Pseudomonas* fluorescents efficaces qui colonisent la rhizosphère du blé, avec un maximum entre 24 heures et 48 heures (Okubara et Bonsall, 2008), et présentant 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 et une couleur semblables à celles de la souche de référence CHA0. Les rapports frontaux convergents avec celui de CHA0, de même que les valeurs des absorbances des surnageants (données non fournies). Cette technique permet de déceler jusqu'à 1µg de substance active (Bangera et Thomashow, 1996). 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).

D'autre part, la CCM dans le système acétone/chloroforme, et visualisons sous UV à 254 nm, les extraits des 15 autres souches étudiées ont donné naissance à des spots avec des couleurs et des *Rf* (0,76) similaires à ceux de la souche de référence CHA0, ce qui laisse supposer que les composés produits par ces souches pourraient être des phloroglucinols ou leurs dérivés. Velusamy *et al.*, (2006) ont aussi identifié les producteurs de DAPG après chromatographie, visualisation sous UV à 254 nm, et comparaison des bandes obtenues avec celles de CHA0.

Parmi les 18 isolats ayant une activité antagoniste, trois isolats (XI35', XI48 et XI49), soit approximativement 17% des isolats testés, ont inhibé la croissance des champignons étudiés avec des valeurs allant de 25% à 100%. La plus forte inhibition a été observée avec l'isolat XI48 où 80µl d'extrait correspondant à 12.10^{13} UFC ont inhibé totalement la croissance des trois champignons étudiés. Shanahan *et al.* (1992) avaient utilisé près de 10^9 UFC/ ml de solution testé pour inhiber *Pythium ultimum*. Gleeson *et al.* (2010) ont rapporté que le DAPG inhibait la croissance des *Oomycètes* et des champignons filamenteux et ont démontré que ce dernier avait une activité fongistatique vis-à-vis de *Saccharomyces cerevisiae*. En plus, cette variabilité d'activité entre nos souches pourraient être due à une diversité génétique (Keel *et al.*, 1996; Picard *et al.*, 2003). Les producteurs de substances antifongiques tel que le DAPG sont également capable d'induire une résistance systémique de type ISR chez la plante (Iavicoli *et al.*, 2003).

CONCLUSION

La protection des cultures contre les agents phytopathogènes est un enjeu majeur en agriculture. Le caractère suppressif ne dépend pas de facteurs abiotiques uniquement. Il s'agit d'un système basé sur la biologie du sol. 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. L'efficacité des bactéries isolées laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces microorganismes dans la lutte contre les maladies fongique du blé et de la pomme de terre. Toutefois, cette éventualité ne pourra être envisagée que si l'efficacité observée *in vitro*, se confirme en milieu réel dans les champs.

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

- Allaire M., 2005- Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel. Mémoire de Maitre ès Sciences Université Laval, 10-26.
- 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 Interact*, 9, 83–90.
- Bojanowski A., 2011- Molécules antifongiques et activité antagoniste de deux souches de *Pseudomonas* envers *Helminthosporium solani*, agent responsable de la tache argentée de la pomme de terre, Mémoire de Maitre ès Sciences .Université Laval, 10-16.
- Broadbent D.R., Mabelis P., Spencer H . C., 1976- Acetylphloroglucinols from *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochem*, 15, 17-85.
- Defago G., Berling C.H., Burger U., Haas D., Kahr G., Keel C., Voisard C., Wirthner P., Wuthrich B.,1990. Suppression of black root rot of tobacco and other diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens* : potential applications and other mechanisms. *In* Biological control of soilborne plant pathogen. Editions: Hornby D., Cook R.J., Henis Y., Ko W.H., Rovira A.D., Schippers B., and Scott P.R. CAB International Oxon, UK, 93108.
- Dowling D.N., O'Gara F., 1994- Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol*, 12,133-144.
- Dutrecq A. P.,Debras J., Stevaux, Marlier M., 1991. Activity of 2,4-diacetylphloroglucinol isolated from a strain of *Pseudomonas fluorescens* to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *In* Biotic interactions and soil-borne diseases. Editions: Beemster A. B. R., Bollen G. J., Gerlagh M., Ruissen M. A., Schippers B., and Tempel A.Elsevier Biomedical Press Amsterdam, 252–257.

Fenton A.M., Stephens P.M., Crowley J., O'Callaghan M., O'Gara F., 1992- Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl Environ Microbiol*, 58, 3873–3878.

Fernando W., Nakkeeran S., Zhang Y., 2006. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Editions Siddiqui Z.A., Springer, Dordrecht, The Netherlands, 67-109.

Gleeson O., O'Gara F., Morrissey J.P., 2010- The *Pseudomonas fluorescens* secondary metabolite 2,4 diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae* . *Antonie van Leeuwenhoek*, 97, 261–273.

Haas D., Defago G., 2005- Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent Pseudomonas*. *Nature Rev Microbiol*, 3, 307-319.

Haas D., Keel C., 2003- Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopatho*, 41, 117-153.

Iavicoli A., Boutet E., Buchala A., Métraux J.P., 2003- Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact*, 16, 10, 851-858.

James D.W., Gutterson N.I., 1986- Multiple Antibiotics Produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and Their Differential Regulation by Glucose. *Appl. Environ. Microbiol*, 52, 5, 1183-1189.

Keel C., Schinder U., Maurhofer M., Voisard C., Laviller J., Burger U., Wirthner P., Haas D., Defago G., 1992- Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol Plant Microbe Interact*, 5, 4–13.

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 Environ Microbiol*, 62, 552–56.

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. *Journal of Bacteriology*, 190, 2759–2766.

McSpadden Gardener B. B., Fravel D. R., 2002- Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.

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 a- 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.

Mezaache-aichour S., Sayah N., Zerroug M.-M., Haichour N., Guechi A., 2012 b- Habilité de biocontrôle d'isolats bactériens de la rhizosphère du blé vis-à-vis des phytopathogènes d'origine tellurique. AFPP – 10^e Conférence internationale sur les maladies des plantes Tours – 3, 4 et 5 Décembre 2012, 703-708.

Okubara A.P., Bonsall F.R., 2008- Accumulation of *Pseudomonas*-derived 2,4-diacetylphloroglucinol on wheat seedling roots is influenced by host cultivar . *Biological Control*, 46, 322–331.

Picard C., Bosco M., 2003- Genetic diversity of *phlD* gene from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. strains from the maize rhizosphere. *FEMS Microbiol Lett*, 219, 167-172.

Pidoplichko V.N., Garagulya A.D., 1979- Antagonistic activity of bacterial genera *Pseudomonas* and *Bacillus* against root rot causal agents. *Winter wheat Mikol Fitopatol*, 13, 53–57.

Prasanna B. R. , Reddy M. S., Krishna Kumar K. V., 2009- Characterization of antifungal metabolites of *Pseudomonas fluorescens* and their effect on mycelial growth of *Magnaporthe grisea* and *Rhizoctonia solani*. *International Journal of PharmTech Research*, 1, 4, 1490-1493.

Ramette A. , Frapolli M., Fischer-Le Saux M., Gruffaz C. M., Défago G., Sutra L., Moëgne-Loccoz Y., 2011- *Pseudomonas protegens* sp.nov.widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin . *Appl Microbiol*, 34, 180-188.

Shanahan P., O'Sullivan D.J., Simpson P., Glennon J.D., O'Gara F., 1992- Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent *Pseudomonas* and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl Environ Microbiol*, 58, 353-358.

Stutz E.W., Defago G., Kern H., 1986- Naturally occurring fluorescent pseudomonas involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathol*, 76, 181–185.

Thomashow L.S., Weller D.M., 1988- Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J Bacteriology*, 170, 3499-3508.

Velusamy P., Immanuel J.E., Gnanamanickam S.S., Thomashow L.S., 2006- Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. *J Microbiol*, 52,56–65.

Vincent M.N., Harrison L.A., Bracki J.M., Kovacevich P.A., Mukerji P., Weller D.M., Pierson E.A., 1991- Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain 3084. *Appl Environm Microbiol* , 57, 2928-2934.

Zerroug M.M., 2007- Recherche de l'implication de la solanapyrone A dans l'expression du pouvoir pathogène de *Didymella rabiei* kovashevski (*Ascochyta rabie* Pass. Labrousse) agent de l'anthracnose du pois chiche. Thèse de doctorat d'état Département de Biologie Faculté des Sciences Université Ferhat Abbas de Sétif ,121.