

Candy Ibelisse Quiroga Castro

IDENTIFICATION DE FACTEURS FAVORISANT L'ACTIVITÉ DE L'AGENT DE  
LUTTE BIOLOGIQUE  
*PSEUDOZYMA FLOCCULOSA*

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie végétale  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE PHYTOLOGIE  
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2009

## RÉSUMÉ

Ce projet de recherche avait pour but d'identifier les facteurs favorisant l'activité de *Pseudozyma flocculosa*, un agent de lutte biologique contre le blanc des cultures agricoles. Pour réaliser cette identification, nous avons d'abord analysé le développement de *P. flocculosa* en présence d'extrait de levure (YNB), reconnu pour reproduire le comportement de *P. flocculosa* en conditions naturelles d'antagonisme du blanc. Les objectifs de l'étude étaient: 1) évaluer l'activité des différentes fractions de l'extrait de levure sur la croissance et la morphologie de *P. flocculosa*; 2) caractériser la nature de la (des) molécule(s) dans la fraction active et 3) déterminer la relation entre la (les) molécule(s) provenant de l'extrait de levure et celle(s) exsudée(s) par le blanc au contact de *P. flocculosa*.

Les expériences ont démontré que le zinc et le manganèse étaient responsables de la stimulation du métabolisme de croissance et production de conidies de *P. flocculosa*. Ces deux oligoéléments permettent d'obtenir les mêmes effets que ceux obtenus avec l'extrait de levure. Pour valider ces résultats *in vivo*, une solution de zinc et manganèse a été vaporisée sur des feuilles de tomates saines sur lesquelles *P. flocculosa* a ensuite été appliqué. Les observations en microscopie électronique à balayage ont confirmé que *P. flocculosa* se développait de façon abondante sur la feuille en association avec la solution de zinc et manganèse, résultat qui laisse supposer que le champignon extrait ces minéraux essentiels à sa croissance à partir des colonies de blanc et exerce ainsi son effet délétère sur cet agent pathogène.

Le zinc et le manganèse jouent donc un rôle clé dans la transition morphologique de *P. flocculosa*, lui conférant son activité de lutte biologique et sa spécificité à l'égard des colonies des Érysiphales.

## AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, M. Richard R. Bélanger, pour avoir eu confiance en moi et m'avoir accueillie dans son laboratoire. Il m'a permis de parfaire mes connaissances en lutte biologique, et de vivre une expérience extrêmement enrichissante au Québec. Je veux aussi dire merci à Mme Caroline Labbé, pour son support professionnel et ses nombreux conseils, tout au long de ma maîtrise. Mme Labbé m'a permis d'acquérir une expérience précieuse dans le domaine de la recherche. Je considère que travailler dans l'équipe du Laboratoire de Biocontrôle fut très enrichissant au niveau professionnel, personnel et social.

## TABLE DE MATIÈRES

Résumé .....	ii
AVANT-PROPOS .....	iii
Table de matières .....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux .....	vii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1.....	3
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.1 Le blanc et la lutte biologique .....	4
1.2 <i>Pseudozyma flocculosa</i> .....	5
1.3 Mode d'action de <i>Pseudozyma flocculosa</i> .....	5
1.4 La flocculosine.....	5
1.5 Métabolisme de <i>Pseudozyma flocculosa</i> .....	6
1.6 Effet de l'extrait de levure et de ses composantes chez les champignons.....	7
1.7 Écologie de <i>Pseudozyma flocculosa</i> .....	8
1.8 Problématique .....	9
CHAPITRE 2.....	10
Purification et identification d'une fraction active de l'extrait de levure qui stimule la croissance de <i>Pseudozyma flocculosa</i> .....	10
2.1 Introduction.....	11
2.2 Méthodologie.....	12
2.2.1 Conditions de culture .....	12
2.2.2 Préparation des cultures pour les bioessais.....	12
2.2.3 Détermination de la masse cellulaire (biomasse) de <i>P. flocculosa</i> .....	12
2.2.4. Fractionnement de l'extrait de levure.....	13
2.2.5 Évaluation des fractions.....	14
2.2.6 Nature chimique de la fraction active .....	15
2.3.1 Fractionnement .....	17

2.3.2 Nature de la fraction active.....	21
<b>2.4 Discussion.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Conclusion .....</b>	<b>32</b>
<b>CHAPITRE 3.....</b>	<b>33</b>
<b>Détermination de la relation entre les besoins en zinc et manganèse de</b> <b><i>Pseudozyma flocculosa</i> et sa capacité à coloniser le blanc.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Introduction.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Méthodologie.....</b>	<b>35</b>
3.2.1 Bioessais in vivo avec <i>P. flocculosa</i> .....	35
3.2.2 Microscopie électronique à balayage (MEB) .....	35
3.2.3 Détection de la flocculosine in situ par spectrométrie de masse en phase liquide..	35
<b>3.3 Résultats.....</b>	<b>36</b>
3.3.1 Observations par microscopie électronique à balayage (MEB).....	36
3.3.2 Détection de la flocculosine in situ par spectrométrie de masse en phase liquide..	37
<b>3.4 Discussion.....</b>	<b>40</b>
<b>3.5 Conclusion .....</b>	<b>41</b>
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS .....</b>	<b>42</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>45</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>51</b>

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Micrographies optiques de la croissance cellulaire de *Pseudozyma flocculosa* après 48 heures de croissance en milieu minimal (MOD) et en milieu MOD+YNB... 14
- Figure 2. Chromatogramme HPLC et spectres d'absorption UV d'une fraction stimulant la croissance et la production de conidies chez *Pseudozyma flocculosa* obtenue à partir de la séparation de l'extrait de levure YNB sur cartouche C18..... 18
- Figure 3. Effet de l'ajout d'oligoéléments (Cu, Mo, Mn, Zn, B et I) sur la production de biomasse et de conidies par *Pseudozyma flocculosa* en milieu MOD..... 24
- Figure 4. Effet du retrait de chacun des oligoéléments (Cu, Mo, Mn, Zn, B et I), de la solution d'oligoéléments complète, sur la production de biomasse et de conidies par *Pseudozyma flocculosa* en milieu MOD..... 26
- Figure 5. Effet de l'ajout conjoint de zinc et de manganèse au milieu minimal tamponné MOD sur le métabolisme de croissance de *Pseudozyma flocculosa* ..... 26
- Figure 6. Observations en microscopie optique de la morphologie de *Pseudozyma flocculosa* après 48 heures de croissance dans différents milieux..... 27
- Figure 7. Observations de la croissance de *Pseudozyma flocculosa* 24 heures après une vaporisation de conidies du champignon sur des feuilles de tomate saines par microscopie électronique à balayage ..... 36
- Figure 8. Profils LC-MS de l'extraction de surface d'une feuille de tomate saine (témoin négatif), de conidies de *Pseudozyma flocculosa* avant traitement foliaire, de feuilles de tomate saines traitées avec de l'eau et *P. flocculosa*, d'une solution zinc-manganèse et *P. flocculosa*, d'une feuille de tomate avec du blanc et *P. flocculosa*..... 38
- Figure 9. Structures et masses moléculaires respectives de la flocculosine et d'une molécule dérivée, monoacétylée ..... 39
- Figure A1 : Structure chimique de la flocculosine ..... 52

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1. Effet de deux fractions obtenues de l'extrait de levure YNB par une séparation sur colonne SepPak C18 sur le comportement de <i>Pseudozyma flocculosa</i> en milieu MOD .....	17
Tableau 2. Effet de quatre fractions issues d'une séparation HPLC de la fraction active, préalablement obtenue à partir de la séparation de l'extrait de levure YNB sur cartouche C18, sur le comportement de <i>Pseudozyma flocculosa</i> en milieu MOD.....	19
Tableau 3. Effet de quatre fractions, issues de la séparation par échange ionique sur cartouches SAX et SCX de la fraction active* FI obtenue de la purification par HPLC, sur le comportement de <i>Pseudozyma flocculosa</i> cultivé en milieu MOD .....	20
Tableau 4. Effet de trois fractions, issues de la séparation par ultrafiltration (colonne 10KDa) de la fraction active obtenue de la séparation ionique, sur le comportement de <i>Pseudozyma flocculosa</i> cultivé en milieu MOD.....	22
Tableau 5. Effet de l'hydrolyse à l'acide nitrique de la fraction active, préalablement obtenue de la séparation ionique, sur le comportement de <i>Pseudozyma flocculosa</i> cultivé en milieu MOD .....	23
Tableau 6. Effet de l'ajout d'une solution d'oligoéléments (Cu, Mo, Mn, Zn, B et I), sur la croissance de <i>Pseudozyma flocculosa</i> en milieu MOD .....	24
Tableau A1. Liste des composants de l'extrait de levure YNB de Difco .....	53

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

*Pseudozyma flocculosa* est un champignon épiphyte qui a été isolé des feuilles de trèfle infectées de blanc (Traquair et coll. 1988). Ce champignon est reconnu comme agent de lutte biologique contre le blanc du concombre et du rosier de serre (Cheng et coll. 2003). Le mode d'action de *P. flocculosa* serait l'antibiose. Ce mécanisme se manifeste par le relâchement extracellulaire de métabolites secondaires à activité antimicrobienne. La flocculosine est un métabolite produit à partir de filtrats de culture de *P. flocculosa*. Cette molécule possède des activités antagonistes contre certains champignons pathogènes chez les plantes et même chez les humains (Mimee et coll. 2005).

Certains champignons phytopathogènes doivent établir une relation biotrophique avec leurs hôtes. Cette phase biotrophique inclut des processus d'adaptation, qui permettent de maintenir la prolifération fongique dans l'environnement de l'hôte. Récemment, des études ont montré que les conditions écologiques favorisant le développement de *P. flocculosa* étaient liées à la présence ou non de colonies de l'agent pathogène (Neveu et coll. 2007). En association avec les colonies du blanc, *P. flocculosa* semble pouvoir se développer à la surface des feuilles de différentes espèces végétales. Ces résultats suggèrent qu'une molécule signal ou de croissance provenant des exsudats de l'agent pathogène influence son développement (Clément-Mathieu et coll. 2008).

Plusieurs auteurs ont démontré que la modification des sources de carbone et d'azote influence le développement *in vitro* des champignons. Chez *P. flocculosa*, la concentration des hydrates de carbone dans le milieu influence le développement. La concentration de sucrose est le facteur qui agit sur la production de flocculosine et de biomasse (Hammami et coll. 2007). Certaines concentrations d'azote organique et inorganique n'influencent pas la production de flocculosine. De récents travaux ont révélé que l'extrait de levure contenait un (des) facteur(s) qui stimulai (en) t grandement la croissance (mycélium et conidies) de *P. flocculosa*.

En 2009, Marchand et coll. ont remarqué que le comportement de *P. flocculosa* était similaire en présence de blanc ou d'extrait de levure. Des résultats obtenus par qRT-PCR (quantitative en temps réel, Polymerase Chain Reaction) suggèrent que le même gène

(*cyp1*) est réprimé quand *P. flocculosa* se développe sur des feuilles infectées de blanc, ou quand il est situé dans un milieu de culture avec extrait de levure.

Considérant ces données, on suppose qu'un facteur intrinsèque de l'extrait de levure est similaire à celui exsudé par le blanc.

Dans ce sens, l'hypothèse de ce mémoire est la suivante :

Le développement de l'agent de lutte biologique *P. flocculosa* est tributaire d'un facteur de croissance relâché par les colonies du blanc. Ce facteur s'apparente à un des constituants de l'extrait de levure.

Afin de vérifier cette hypothèse, trois objectifs principaux ont été établis:

- Évaluer l'activité des différentes fractions de l'extrait de levure sur la croissance et la morphologie de *P. flocculosa*.
- Caractériser la nature de la (des) molécule (s) dans la fraction active.
- Déterminer la relation entre la (les) molécule (s) provenant de l'extrait de levure et celle (s) exsudée (s) par le blanc au contact de *P. flocculosa*.

## **CHAPITRE 1**

### **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1.1 Le blanc et la lutte biologique

Le blanc (oïdium) est un champignon qui provoque diverses pertes économiques dans les cultures agricoles (Agrios 2005). Cette maladie est répandue sur plusieurs espèces végétales tels le concombre (*Cucumis sativus*), la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et la rose (*Rosa* spp.) (Bélanger et Benyagoub 1997). Le blanc rivalise avec la pyriculariose du riz (*Magnaporthe grisea*), qui est la plus importante maladie au monde sur le plan commercial (Bélanger, 2004). Le blanc est un parasite biotrophique i.e qu'il doit être en association avec un hôte vivant. Cet agent pathogène est identifiable par le feutrage blanchâtre qui se développe sur les surfaces supérieures et inférieures des feuilles ainsi que sur les tiges des plantes atteintes. Ce champignon a une propagation végétative grâce à ses spores asexuées qui préfèrent une humidité relative élevée (Bélanger et Labbé 2002). En serre, le blanc est particulièrement agressif, à cause des conditions environnementales favorables qui accélèrent son développement (Paulitz et Bélanger 2001).

Au cours des dernières années, l'apparition de souches résistantes du blanc à certains fongicides a encouragé l'utilisation de méthodes de remplacement, comme la lutte biologique (Punja et Utkhede 2003).

Au Canada, deux agents de lutte biologique (ALB) sont présentement homologués pour la lutte contre le blanc : Le Serenade® Max™, biofongicide dont la principale composante est la bactérie *Bacillus subtilis*, appliquée dans les cultures de concombre, melons, citrouilles et courges (RAP 2007) et le Sporodex®, un biofongicide homologué par la société horticole ontarienne Plant Products Co. Ltd. Ce dernier est utilisé pour son application contre le blanc dans les cultures en serre. Sa formulation est à base de conidies du champignon *Pseudozyma flocculosa* (Traquair, Shaw et Jarvis) Boekhout et Traquair (Cheng et coll. 2003).

## 1.2 *Pseudozyma flocculosa*

*Pseudozyma flocculosa* est un basidiomycète épiphyte appartenant à l'ordre des Ustilaginales, qui inclut le champignon responsable du charbon du maïs *Ustilago maydis*.

Les espèces du genre *Pseudozyma* se reproduisent uniquement de façon asexuée. Ils sont anamorphes. Pour sa part, *P. flocculosa* a été isolé des feuilles de trèfle infectées de blanc (Traquair et coll. 1988).

Depuis 1989, plusieurs études ont été réalisées sur l'activité antagoniste de *P. flocculosa* contre certains champignons phytopathogènes.

## 1.3 Mode d'action de *Pseudozyma flocculosa*

Des études cytologiques et microscopiques ont indiqué que *P. flocculosa* ne pénètre pas les hyphes du blanc. En effet, le mode d'action de cet agent de lutte biologique serait l'antibiose (Hajlaoui et coll. 1992). Cette activité antagoniste est attribuable au relâchement extracellulaire de métabolites secondaires (Hajlaoui et coll. 1994).

## 1.4 La flocculosine

Des analyses chimiques ont démontré que *P. flocculosa* produisait des acides gras comportant une activité antibiotique (Hajlaoui et coll. 1994). Ceux-ci étaient vraisemblablement des produits de dégradation du champignon. À partir de filtrats de culture de *P. flocculosa*, un métabolite secondaire a été purifié et identifié comme étant la flocculosine. Son activité antimicrobienne *in vitro* indique qu'elle est la molécule conférant à ce champignon son activité antagoniste contre le blanc (Cheng et coll. 2003). Par ailleurs, il a aussi été montré que la flocculosine possédait une activité antimicrobienne contre les agents responsables de mycoses chez les humains (Mimee et coll. 2005).

La structure chimique de la flocculosine a été décrite par Mimee et coll. 2005 (Annexe; Figure A1). Cette molécule est un cellobiose lipide ressemblant grandement à l'acide ustilagique produit par l'agent phytopathogène *U. maydis*. Les deux structures ne diffèrent que par quelques détails. La flocculosine tient une chaîne acyle de huit carbones, tandis que

l'acide ustilagique a une chaîne de huit ou dix carbones. La flocculosine détient deux acétylations, contre une seule pour l'acide ustilagique. La position de l'hydroxyle sur l'acide dihydroxypalmitique de la molécule (position trois au lieu de deux pour la flocculosine) diffère aussi. Par ailleurs, l'acide ustilagique présente une activité antifongique et même antibactérienne (Boekhout 1995).

### **1.5 Métabolisme de *Pseudozyma flocculosa***

Depuis plusieurs années, l'élucidation des voies métaboliques responsables de la production des glycolipides chez les champignons retient l'attention. Ces molécules sont prometteuses pour leurs différentes applications dans les domaines de la santé, de la nutrition, de l'industrie et de l'environnement (Desai et Banat 1997). La production de ces molécules bioactives peut être contrôlée en modifiant les conditions du milieu de culture tels le pH, la température, les sources de carbone, l'azote, les sels et les oligo-éléments. (Demain et Sanchez 2002; Lengeler et coll. 2000 ; Naganuma et coll. 1989).

Récemment, des travaux ont révélé que si les hydrates de carbone étaient fournis en quantités nécessaires à *P. flocculosa* ce dernier synthétisait abondamment de la flocculosine. Toutefois, la production de flocculosine était fortement réprimée si on ajoutait de l'extrait de levure au milieu de culture. En effet, l'extrait de levure stimule la croissance du champignon au détriment de la production de flocculosine, en présence de sucres (Hammami et coll. 2008).

Ce n'est pas la première fois qu'un tel phénomène est démontré. Casas et Garcia-Ochoa 1999 ont rapporté que des concentrations élevées de l'extrait de levure dans le milieu de culture de *Candida bombicola* étaient favorables au développement de la biomasse. Par contre, cela entraînait une diminution de la production des sophorolipides, un autre glycolipide, chez cette levure.

Ces résultats suscitent des questions intéressantes. Comment l'extrait de levure stimule-t-il la croissance cellulaire au détriment de la production de métabolites secondaires? Est-ce que l'extrait de levure possède un (des) facteur (s) qui provoque (nt) le changement morphologique de *P. flocculosa* ?

## **1.6 Effet de l'extrait de levure et de ses composantes chez les champignons**

L'extrait de levure est constitué des composantes solubles de l'eau des cellules de levure (Annexe; Tableau A1). L'extrait de levure est une source d'azote organique, de vitamines, d'acide aminés et de ses dérivés, d'éléments minéraux et de nucléotides pour les cultures cellulaires (Geng et coll. 2008). Il est utilisé dans l'industrie de l'alimentation, pour la production d'antibiotiques, de biopharmaceutiques, de vitamines, d'acides organiques et de probiotiques.

Au cours des années 50, plusieurs études ont été réalisées sur l'effet des composantes de l'extrait de levure et leur influence sur le développement des champignons (Hofsten et Hofsten 1958). La plupart des auteurs ont identifié des composantes différentes dans l'extrait de levure.

Par exemple, la cystéine provenant de l'extrait de levure a la propriété de transformer des souches filamenteuses de *Candida albicans* vers sa phase levuroïde (Falcone 1956). Smith et coll. 1975 ont identifié une composante de nature polypeptidique à partir de l'extrait de levure qui agissait comme un facteur de croissance chez *Thermoplasma acidophilum*. Un autre exemple est la thiamine, le constituant actif de l'extrait de levure influençant la formation de corps fructifères chez *Lentinula edodes* (Gab-Gyun et coll. 1997). Chez *Sinorhizobium meliloti*, les facteurs de croissance trouvés dans l'extrait de levure sont la biotine, le cobalt et la méthionine (Watson et coll. 2001).

Incidentement, Edens et coll. 2002 ont mis en évidence que l'extrait de levure possédait des propriétés stimulatrices d'assimilation des sucres chez les cellules animales.

Plusieurs études affirment l'existence d'un facteur de tolérance au glucose, le GTF, dans l'extrait de levure. Il a été démontré que le GTF stimulait l'oxydation de sucres dans les levures et dans les adipocytes (Burkeholder et Mertz 1967). Dans la littérature, divers protocoles d'extraction sont proposés (Zetic et coll. 2001 ; Beran et coll. 1995; Mirsky et coll. 1980). Toutefois, même en fragmentant par chromatographie l'extrait de levure, ces auteurs n'ont pas réussi à identifier complètement le(s) facteur(s) responsable(s) de cette

stimulation (Edens et coll. 2002, Beran et coll. 1995, Mirsky et coll. 1980, Smith et coll. 1975).

Les oligo-éléments constituent une classe de nutriments essentiels pour la croissance de champignons. La propriété la plus importante de ces minéraux est leur extraordinaire faculté de se fixer sur des acides aminés, des protéines (cofacteurs) et des acides nucléiques. À de rares exceptions, les métaux n'apparaissent jamais à l'état d'ions libres dans les organismes. Les oligo-éléments métalliques influencent la stabilité des membranes cellulaires. Les minéraux sont absorbés, transportés, mis en réserve et agissent liés à des molécules, comme par exemple aux phyto-chélatines, aux métallos thionines, aux protéines riches en cystéine et au glutathion (Mendoza- Cozatl et coll. 2008).

### **1.7 Écologie de *Pseudozyma flocculosa***

Certains champignons pathogènes possèdent des processus d'adaptation pour maintenir leur prolifération dans l'environnement de l'hôte (Zheng et coll. 2008). Il a été proposé que le changement de morphologie entre la forme levuroïde et la forme filamenteuse est un déterminant crucial de la pathogénécité des champignons chez les animaux et chez les plantes. Le dimorphisme est la propriété de se présenter sous deux formes morphologiques. Il est induit en réponse aux changements environnementaux (Madhani et Fink 1998). Il existe une variation de ce changement morphologique entre les espèces.

Par exemple, chez *Saccharomyces cerevisiae*, le dimorphisme résulte de l'épuisement de l'azote (Borges-Walmsley et Walmsley 2000). Chez *C. albicans*, le dimorphisme est lié au sérum et à la température (entre autres) et chez *U. maydis*, attribué à des signaux moléculaires putatifs (Madhani et Fink 1998). En effet, des études ont montré que l'AMP cyclique est la molécule qui régule le changement morphologique d'*U. maydis* (Bölker et coll. 2008; Bölker 2001; Gold et coll. 1994).

Les espèces de *Pseudozyma* sont pour la plupart des épiphytes. Ces champignons se développent en utilisant d'autres champignons ou plantes comme support. Il ne s'agit pas de champignons parasites car ils n'attaquent pas leurs hôtes pour se nourrir. Ils occupent une niche écologique limitée. Ils croissent habituellement dans les zones humides, à proximité

des nervures et à la base des trichomes d'une feuille et se nourrissent d'exsudats foliaires ou encore de miellats larvaires (Jarvis et coll. 1989). D'autre part, ils peuvent être présents sur diverses plantes hôtes.

Dernièrement, des études réalisées avec la technologie Green Fluorescent Protein (GFP) ont mis en évidence que le développement de *P. flocculosa* était favorisé par les conditions écologiques. La croissance de ce champignon à la surface des feuilles de différentes espèces végétales est liée à la présence ou non de colonies de l'agent pathogène (Neveu et coll. 2007). En effet, *P. flocculosa* semble se développer exclusivement en association avec les colonies du blanc (Clément-Mathieu et coll. 2008).

Les résultats obtenus par qRT-PCR (quantitative en temps réel, Polymerase Chain Reaction) suggèrent que le comportement de *P. flocculosa* est similaire en présence de blanc ou de l'extrait de levure. Le gène *cyp1*, responsable de la synthèse de flocculosine entraînant un ralentissement de croissance, est réprimé lorsque *P. flocculosa* se développe sur des feuilles infectées de blanc ou quand il est dans un milieu de culture avec l'extrait de levure (Marchand et coll. 2009). C'est donc dire que le blanc sur les feuilles stimule la croissance de *P. flocculosa* de manière analogue à l'extrait de levure en milieu de culture.

## **1.8 Problématique**

À la suite de cette revue bibliographique, il semble donc qu'un facteur commun aux colonies du blanc et à l'extrait de levure stimule la croissance de *P. flocculosa* et par conséquent, son activité antagoniste. L'identification de ces facteurs pourrait s'avérer fort utile afin de mieux comprendre l'interaction entre *P. flocculosa* et le blanc. Cela pourrait permettre d'améliorer les conditions menant au succès de la lutte biologique contre cette maladie.

## **CHAPITRE 2**

### **PURIFICATION ET IDENTIFICATION D'UNE FRACTION ACTIVE DE L'EXTRAIT DE LEVURE QUI STIMULE LA CROISSANCE DE *PSEUDOZYMA FLOCCULOSA***

## 2.1 Introduction

En 2008, Hammami et coll. ont révélé que l'extrait de levure YNB Difco contenait un (des) facteur(s) qui stimulai (en)t grandement la croissance de *P. flocculosa*. En effet, l'ajout d'extrait de levure dans un milieu minimal propice à la production de flocculosine provoquait de façon très nette l'arrêt de la production de la flocculosine et l'apparition de mycélium et de conidies. Ce déclenchement du métabolisme de croissance ressemblait en tous points au phénomène observé lorsque *P. flocculosa* est appliqué sur des colonies de blanc dans le contexte de lutte biologique (Neveu et coll. 2007). Est-ce que l'extrait de levure et l'organisme du blanc auraient en commun un facteur de croissance? Si oui, lequel? Comme le blanc est un parasite obligatoire, il devenait très compliqué d'en extraire les molécules actives puisque la biomasse que l'on peut obtenir avec ce champignon est très modeste. L'hypothèse de cette recherche était que l'extrait de levure et le blanc avaient un (des) facteur(s) de croissance commun(s) qui stimulai (en)t la croissance de *P. flocculosa*. Afin de découvrir le(s) facteur(s) dans l'extrait de levure responsable(s) de cet effet, ce dernier a été fractionné par différentes méthodes.

Tout d'abord, pour observer l'effet des fractions d'YNB sur le comportement de *P. flocculosa*, le milieu minimal MOD tamponné (Hammami et coll. 2008) a été utilisé. Ce milieu minimal stimule la production de flocculosine, donc le métabolisme de stress, au détriment de la croissance de *P. flocculosa*. Une fraction était considérée active quand l'inhibition de la production de flocculosine et la présence de conidies étaient observées. Les observations ont été effectuées par microscopie à 400X après 24 et 48 h de croissance.

Pour la purification de l'extrait actif, des méthodes de séparation sur phase solide C18 (cartouche et HPLC) ont été utilisées. Par la suite, des méthodes d'échange ionique, anionique et cationique, ont permis de déterminer la polarité de l'extrait actif. Pour l'identification de la nature de l'extrait actif, des méthodes biochimiques tels des tests colorimétriques de Bradford et l'électrophorèse SDS-Page ont été utilisées. Également, plusieurs molécules standard (vitamines, facteurs de croissance, nucléotides) ont été testées en combinaison avec le milieu MOD. Finalement, les molécules inorganiques, présentes dans l'extrait de levure YNB, ont aussi été étudiées.

## 2.2 Méthodologie

### 2.2.1 Conditions de culture

Les précultures de *Pseudozyma flocculosa* (DAOM 196992) ont été réalisées dans des flacons de 500 ml embossés contenant 100 ml de milieu YMPD (Difco™, BD Biosciences, Mississauga, Canada) (extrait de levure 3 g/l, extrait de malt 3 g/l, peptone water 5 g/l et dextrose 10 g/l). Les flacons ont été ensuite stérilisés à l'autoclave (20 minutes à 121 °C) et inoculés avec  $5 \times 10^8$  cellules. L'incubation des précultures a été faite à 28 °C et 150 rpm, pendant trois jours.

### 2.2.2 Préparation des cultures pour les bioessais

Le milieu utilisé pour les bioessais était un milieu minimal (MOD) comprenant les éléments suivants : 35 g/l de sucrose, 1 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Le milieu était également tamponné à pH 6 à l'aide de tampon citrate 50 mM (12,85 g/l citrate·2H<sub>2</sub>O et 1,21 g/l d'acide citrique) (Hammami et coll. 2008). Pour tous les bioessais, deux témoins étaient utilisés soit le milieu MOD seul (témoin négatif) et le milieu MOD amendé avec 3g/l d'extrait de levure sans azote (YNB; Difco™, BD Biosciences, Mississauga, Canada) (témoin positif). Pour tester les différentes fractions obtenues des diverses étapes de purification de l'extrait de levure (voir ci-bas), ces dernières étaient d'abord filtrées à froid (filtres 0,22 µm) et ensuite ajoutées au milieu MOD à raison de l'équivalent de 3 g/l d'extrait de levure. *P. flocculosa* était enfin inoculé dans les différents milieux en aliquots de 5 ml de préculture par 100 ml de milieu. Les cultures étaient incubées à 28°C et agitées à 150 rpm de 24 à 48 h dans des flacons embossés de 500 ml. Chaque bioessai était dupliqué.

### 2.2.3 Détermination de la masse cellulaire (biomasse) de *P. flocculosa*

Après 48 h de croissance, 10 ml de culture étaient centrifugés à 3500 g pendant 10 min. Après élimination du surnageant, les cellules étaient lavées avec 5 ml de MeOH et centrifugées à 3500 g pendant 10 min. Après élimination du MeOH, les cellules étaient resuspendues dans 5 ml d'eau distillée et la suspension était mise à sécher dans une balance

à lampe halogène (Mettler Toledo, Model HR 83, VWR Canada) pour obtenir la masse sèche.

#### *2.2.4. Fractionnement de l'extrait de levure*

L'extrait de levure Yeast Nitrogen Base (YNB) a été utilisé tout au long de cette expérience. En effet, il est beaucoup plus purifié (absence d'acides aminés) que l'extrait de levure normal (YE) tout en ayant le même effet sur la croissance de *P. flocculosa* (Hammami, communication personnelle).

##### *❖ Extraction sur phase solide*

Le Sep-pak C18 (Waters, Montréal, Canada) est une cartouche à base de silice sur laquelle de longues chaînes d'acides gras (C18) ont été ajoutées par estérification. Cette chimie permet de séparer un mélange de composés sur la base de leur hydrophobicité. Brièvement, la cartouche était conditionnée par l'élution de 3 ml de méthanol (MeOH) suivie d'une élution avec 3 ml d'eau bidistillée. L'extrait de levure en solution (1 g/10 ml d'eau) était ensuite passé à travers la cartouche. La fraction non retenue, appelée tout droit (TD), a été conservée pour les bioessais, alors que la fraction retenue (SP) a été obtenue par élution successive avec avec 3 ml d'eau (ajoutés à TD) et 3 ml de MeOH.

##### *❖ Purification par HPLC*

La fraction active issue de la séparation SepPak a été analysée et purifiée par HPLC (Modèle Waters<sup>TM</sup> 600). Une colonne Radial-Pak<sup>TM</sup> C18 (Waters, Montréal, Canada) a été utilisée et la détection se faisait par détecteur UV à photodiodes et ce, de 210 à 400 nm. Un gradient de purification a été mis au point : [85% solvant A : 15% solvant B] ( $t_0$ ) à 100% [solvant B] ( $t_{20}$ ), à un débit de 1 ml/min où le solvant A était le mélange eau :MeOH (95 :5) et le solvant B, du MeOH pur. Tous les solvants utilisés étaient de grade HPLC.

##### *❖ Séparation ionique*

Les molécules polaires ionisées ont été séparées sur des cartouches échangeuses d'anions (SAX, Silicycle, Québec, Canada) et de cations (SCX, Silicycle). La fraction active était éluée sur les deux résines selon les instructions du fabricant. Brièvement, les cartouches,

anionique et cationique, étaient préalablement conditionnées par 3 ml de MeOH. Ensuite, l'échantillon (équivalent à 1g d'extrait de levure par 10 ml de solution) était chargé sur la cartouche et l'élution était effectuée avec 3 ml d'eau contenant 5% d'acide citrique (SAX) et 3 ml d'eau contenant 5% de sulfate d'ammonium (SCX). Les fractions tout droit (TDA et TDC) et éluées (A et C) ont été gardées pour bioessais et analyses.

### 2.2.5 Évaluation des fractions

Dans le cadre de notre criblage, des observations sur la morphologie et la croissance de *P. flocculosa* ont été effectuées par microscopie optique (400X) après 24 et 48 h de croissance. Si la fraction donnait un résultat identique à celui obtenu avec le milieu MOD (Figure 1A), le résultat était considéré comme négatif et la fraction rejetée. Par contre, si la fraction donnait un résultat identique au milieu MOD + YNB (Figure 1B), le résultat était considéré comme positif et la fraction était conservée pour de plus amples analyses.

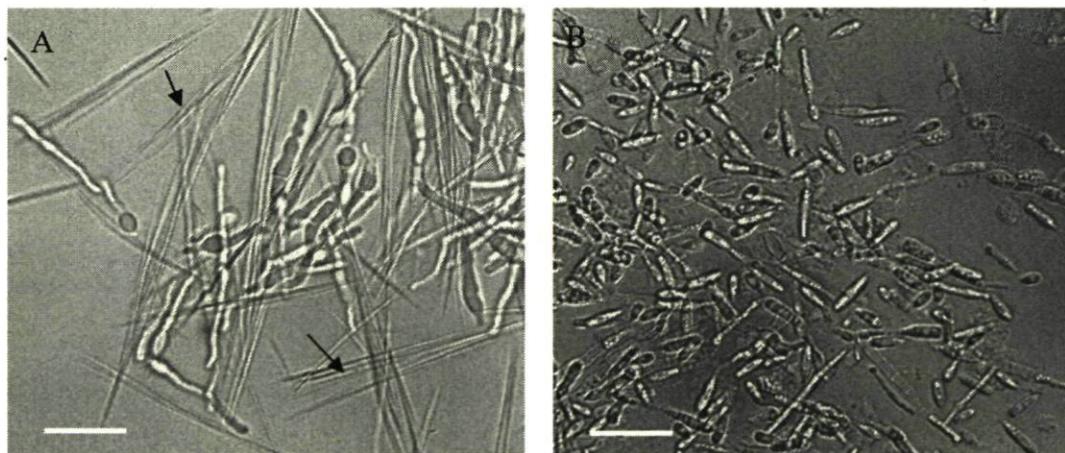


Figure 1 : Micrographies optiques de la croissance cellulaire de *Pseudozyma flocculosa* après 48 heures de croissance en milieu minimal (MOD) (A) et en milieu MOD+YNB (extrait de levure) (B). Les flèches indiquent l'accumulation de flocculosine confirmant le métabolisme de stress du milieu MOD. Le trait de référence = 20  $\mu$ m.

### 2.2.6 Nature chimique de la fraction active

Selon les résultats obtenus suite aux bioessais, la nature des fractions actives a été déterminée par ces méthodes:

#### ❖ *Séparation par ultrafiltration*

Les colonnes 10K Nanosep<sup>®</sup> (VWR, Ville-Mont-Royal, Canada) ont été utilisées pour filtrer et séparer les composés de la fraction active selon leur poids moléculaire. La fraction active était déposée dans la partie supérieure de la colonne pour être ensuite centrifugée pendant 10 min à 11000 g. Une première centrifugation a permis d'obtenir les molécules de poids moléculaire inférieur à 10 KDa (F1). Un rinçage de la colonne avec 1 ml de saline suivi d'une autre centrifugation a permis d'obtenir la deuxième fraction (F2). Enfin, les produits résiduels au-dessus du filtre ont été recueillis avec 1 ml d'eau (F3). Des bioessais ont été réalisés avec les fractions obtenues.

#### ❖ *Test de Bradford et SDS-Page*

Les fractions obtenues par ultrafiltration ont été analysées pour détecter la présence de protéines. Pour le test de Bradford, 5 ml de réactif de Bradford (Sigma, St. Louis, Mo) préalablement préparé selon les instructions du fabricant, étaient ajoutés à 100 µl de fraction à analyser. Après incubation de 5 minutes, l'absorbance du mélange était mesurée par spectrophotométrie à 595 nm.

Afin d'analyser le contenu en protéines des échantillons actifs, un protocole de séparation par gel d'électrophorèse a été effectué. Brièvement, un minigel de polyacrylamide 15% a été préparé selon les procédures classiques du protocole SDS-Page (selon les instructions de BioRad). Les échantillons issus de l'ultrafiltration ont été ajoutés au tampon Laemmli avant d'être déposés dans le gel. La migration s'est effectuée à 120V jusqu'à migration complète. La coloration au nitrate d'argent a été utilisée comme moyen de détection.

#### ❖ *Effet de facteurs de croissance connus sur la croissance de P. flocculosa*

Les nucléotides AMPc, ATP, CTP, UTP et GTP ont été testés sur la croissance de *P. flocculosa* en ajoutant 1mM de chacun au milieu MOD. Les facteurs et cofacteurs GSH,

GSSG, NAD, NADPH, acide folique, cystéine et acide nicotinique ont été également testés en bioessais. Des concentrations de 1 à 5 mM ont été testées pour chacun des facteurs de croissance. Tous les produits provenaient de chez Sigma (St. Louis, Mo).

❖ *Hydrolyse acide*

Un g d'extrait de levure (YNB) a été hydrolysé dans 5 ml de HNO<sub>3</sub> 2N pendant 2 h à 100°C. L'équivalent de 3g/l d'extrait de levure a été ajouté au milieu MOD pour bioessai.

❖ *Bioessais avec oligoéléments*

Les sels KI, ZnSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ont été obtenus chez Sigma. Pour chaque oligo-élément, une solution 10X a été préparée pour obtenir en finalité la même concentration que celle retrouvée dans l'extrait de levure YNB (Annexe. Fiche signalétique YNB). Les bioessais suivants ont été réalisés : milieu MOD + chacun des oligoéléments ; milieu MOD + oligoéléments (moins un) ; milieu MOD + oligoéléments combinées.

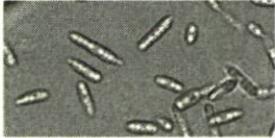
## 2.3 Résultats

### 2.3.1 Fractionnement

#### ❖ Fractionnement sur phase solide

L'utilisation de la colonne Sep-pak C18 a permis de séparer l'extrait de levure en deux fractions distinctes : TD et SP. Après bioessai, les observations microscopiques (400X) ont montré que seule la fraction TD était active et donnait le même type de croissance et la même morphologie que le résultat-type du témoin positif (Tableau 1).

Tableau 1. Effet de deux fractions obtenues de l'extrait de levure YNB par une séparation sur colonne SepPak C18 sur le comportement de *Pseudozyma flocculosa* en milieu MOD (milieu minimal tamponné).

Traitement		Métabolisme	Résultat-type
Témoin négatif (MOD)		stress	
Témoin positif (MOD+YNB)		croissance	
SepPak C18	<b>fraction TD*</b>	croissance	
	fraction SP	stress	

\*fraction active : stimule la croissance et la production de conidies chez *P. flocculosa* (TD) tout droit de la colonne SepPak; (SP) élution au méthanol 100% de la colonne SepPak.

### ❖ Purification par HPLC

La fraction TD issue de l'extraction sur phase solide a été analysée et séparée par HPLC. Une méthode de séparation a été mise au point et quatre fractions distinctes ont pu être obtenues (Figure 3) où les pics 1 et 2 représentaient la fraction I (FI), le pic 3, la fraction II (FII), le pic 4, la fraction III (FIII) et le pic 5, la fraction IV (FIV).

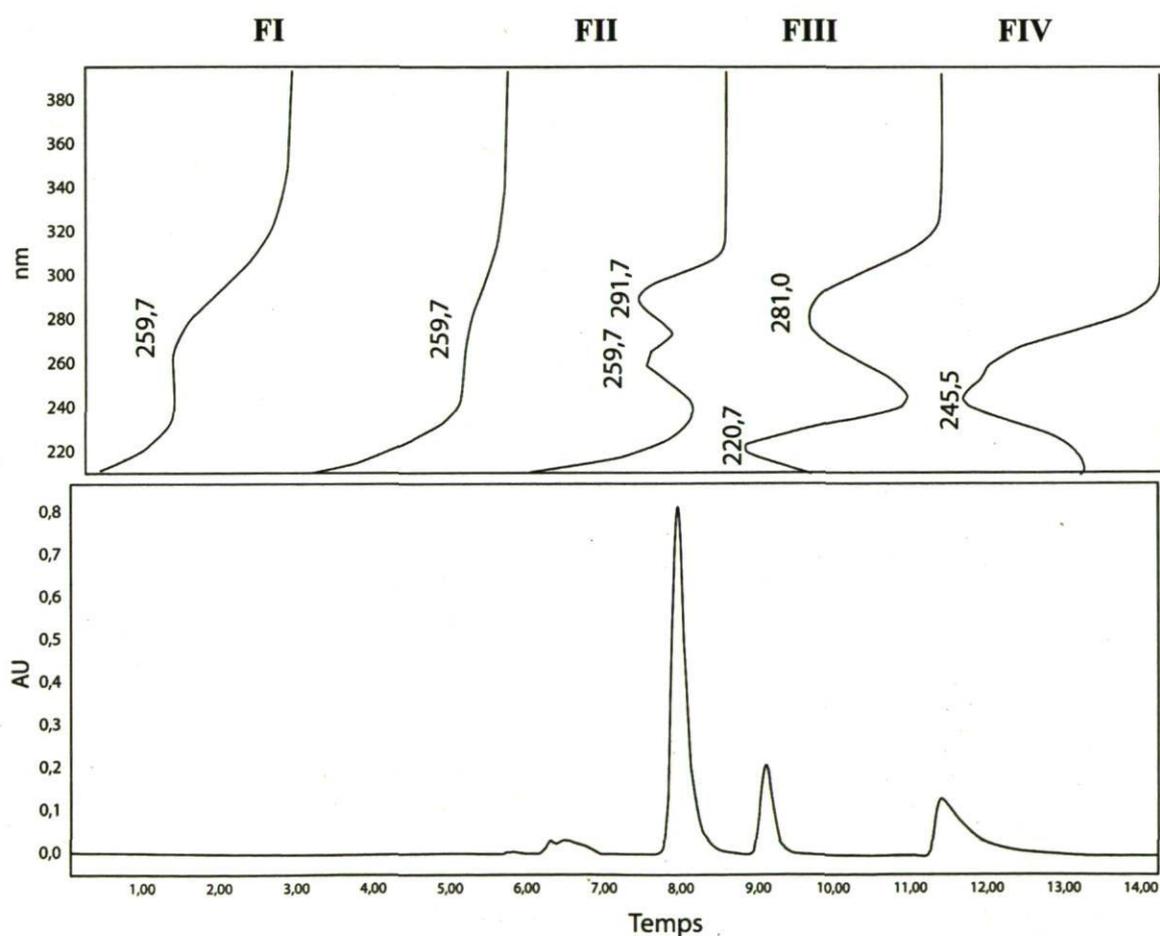
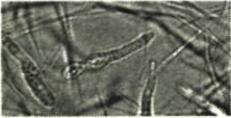
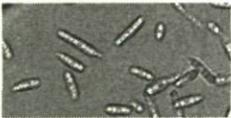
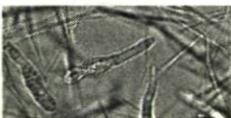
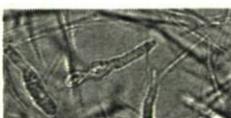


Figure 2. Chromatogramme HPLC et spectres d'absorption UV d'une fraction stimulant la croissance et la production de conidies chez *Pseudozyma flocculosa* (TD) obtenue à partir de la séparation de l'extrait de levure YNB sur cartouche C18. Les fractions I, II, III et IV ont été séparées tel qu'indiqué en haut de la figure.

Suite aux bioessais, seule la FI a démontré une activité sur la croissance de *P. flocculosa* (Tableau 2).

Tableau 2. Effet de quatre fractions issues d'une séparation HPLC de la fraction active\* (TD), préalablement obtenue à partir de la séparation de l'extrait de levure YNB sur cartouche C18, sur le comportement de *Pseudozyma flocculosa* en milieu MOD (milieu minimal tamponné).

Traitement		Métabolisme	Résultat-type
Témoin négatif (MOD)		stress	
Témoin positif (MOD+YNB)		conidies	
HPLC	FI**	conidies	
	FII	stress	
	FIII	stress	
	FIV	stress	

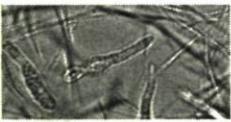
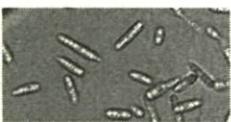
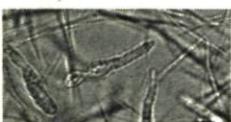
\*fraction active : stimule la croissance et la production de conidies chez *P. flocculosa*

\*\*fraction active de la purification HPLC

### ❖ Séparation ionique

Suite au passage de la fraction active FI du HPLC sur la résine d'échange anionique (SAX), la fraction tout droit (FI) s'est avérée active (Tableau 3). Par contre, le passage de la même fraction sur la résine d'échange cationique (SCX) n'a pas permis d'obtenir de fraction active.

Tableau 3. Effet de quatre fractions, issues de la séparation par échange ionique sur cartouches SAX (échange anionique) et SCX (échange cationique) de la fraction active\* FI obtenue de la purification par HPLC, sur le comportement de *Pseudozyma flocculosa* cultivé en milieu MOD (milieu minimal tamponné).

Traitement		Métabolisme	Résultat-type
Témoin négatif (MOD)		stress	
Témoin positif (MOD+YNB)		conidies	
SAX	FI**	conidies	
	FII	stress	
SCX	FI	stress	
	FII	stress	

\*fraction active : stimule la croissance et la production de conidies chez *P. flocculosa*

\*\*fraction active de la purification par échange ionique

### 2.3.2 Nature de la fraction active

#### ❖ *Séparation par ultrafiltration*

Afin de déterminer la taille de la (des) molécule(s) active(s) dans la fraction SAX FI, cette dernière a été ultrafiltrée sur une colonne de séparation de 10 KDa. Des trois fractions obtenues, l'activité biologique (croissance de *P. flocculosa*) a été divisée entre les deux premières fractions (Tableau 4). En effet, la FI qui contenait théoriquement les molécules de masse inférieure à 10 KDa, a montré un métabolisme intermédiaire entre le métabolisme de stress et de croissance i.e. une croissance cellulaire qui ne se rendait pas aux conidies avec absence de flocculosine (molécule de stress) tandis qu'en présence de la FII (élution à la saline), *P. flocculosa* s'est rendu au stade conidies tout en produisant de la flocculosine (Tableau 4). La fraction supérieure, masse moléculaire plus grande que 10 KDa, n'a pas montré d'activité sur la croissance de *P. flocculosa*.

#### ❖ *Bradford et SDS-Page*

Pour déterminer si les fractions FI et FII, issues de la séparation par ultrafiltration, contenaient des molécules de nature peptidique, le test de Bradford et un gel d'électrophorèse SDS-Page ont été utilisés. Les deux méthodes ont révélé que la (les) molécule(s) active(s) n'étaient pas de nature peptidique.

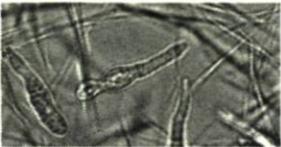
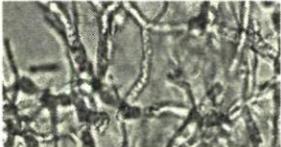
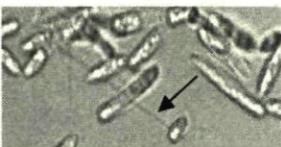
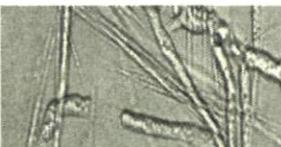
#### ❖ *Effet de facteurs de croissance connus sur la croissance de P. flocculosa*

Aucun des facteurs de croissance (GH, GSSG, acide folique, acide nicotinique, NAD, NADP, cystéine) et nucléotides (AMPc, ATP, GTP, UTP, CTP) de nature cationique utilisés en combinaison avec le milieu MOD n'a réussi à activer le métabolisme de croissance de *P. flocculosa* (résultats non-montrés).

#### ❖ *Hydrolyse acide*

La fraction SAX FI active a été complètement hydrolysée par l'acide nitrique afin de détruire les molécules organiques et de libérer les molécules inorganiques. L'ajout de la fraction hydrolysée au milieu MOD s'est avéré positif (Tableau 5).

Tableau 4. Effet de trois fractions, issues de la séparation par ultrafiltration (colonne 10KDa) de la fraction active\* FI (SAX) obtenue de la séparation ionique, sur le comportement de *Pseudozyma flocculosa* cultivé en milieu MOD (milieu minimal tamponné).

Traitement		Métabolisme	Résultat-type
Témoin négatif (MOD)		stress	
Témoin positif (MOD+YNB)		conidies	
PALL	FI **	stress/croissance	
	FII **	conidies/flocculosine	
	FIII	stress	

\*fraction active : stimule la croissance et la production de conidies chez *P. flocculosa*

\*\*fraction active de la séparation par ultrafiltration

FI (tout droit), FII (élution à la saline) et FIII (fraction récupérée en haut de la membrane)

↙ Présence de flocculosine

Tableau 5. Effet de l'hydrolyse à l'acide nitrique de la fraction active\* SAX FI, préalablement obtenue de la séparation ionique, sur le comportement de *Pseudozyma flocculosa* cultivé en milieu MOD (milieu minimal tamponné).

Traitement	Métabolisme	Résultats-type
Témoin négatif (MOD)	stress	
Témoin positif (MOD+YNB)	conidies	
Hydrolyse HNO <sub>3</sub> **	conidies	

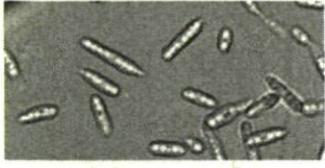
\*fraction active : stimule la croissance et la production de conidies chez *P. flocculosa*

\*\*fraction (SAX FI) active après hydrolyse

#### ❖ Bioessais avec oligoéléments

L'ajout des oligoéléments au milieu minimal (Cu, Mo, Mn, Zn, B et I), à la concentration connue dans l'extrait de levure, a permis d'obtenir la réponse recherchée soit croissance avec obtention de conidies (Tableau 6). Par contre, si chacun des oligoéléments était utilisé individuellement en combinaison avec le milieu MOD, aucun des cations testés ne montrait le métabolisme recherché soit augmentation de la biomasse avec obtention de conidies (Figure 3). Les sels de cuivre (CuSO<sub>4</sub>) et de zinc (ZnSO<sub>4</sub>), bien qu'indiquant une croissance accrue lorsque comparés au milieu minimal seul, n'ont pas permis de lever l'état de stress observé dans le milieu MOD (Figure 3).

Tableau 6. Effet de l'ajout d'une solution d'oligoéléments (Cu, Mo, Mn, Zn, B et I), sur la croissance de *Pseudozyma flocculosa* en milieu MOD (milieu minimal tamponné).

Traitement	Métabolisme	Résultats
Témoin négatif (MOD)	stress	
Témoin positif (MOD+YNB)	conidies	
Oligoéléments*	conidies	

\*stimule la croissance et la production de conidies chez *P. flocculosa*

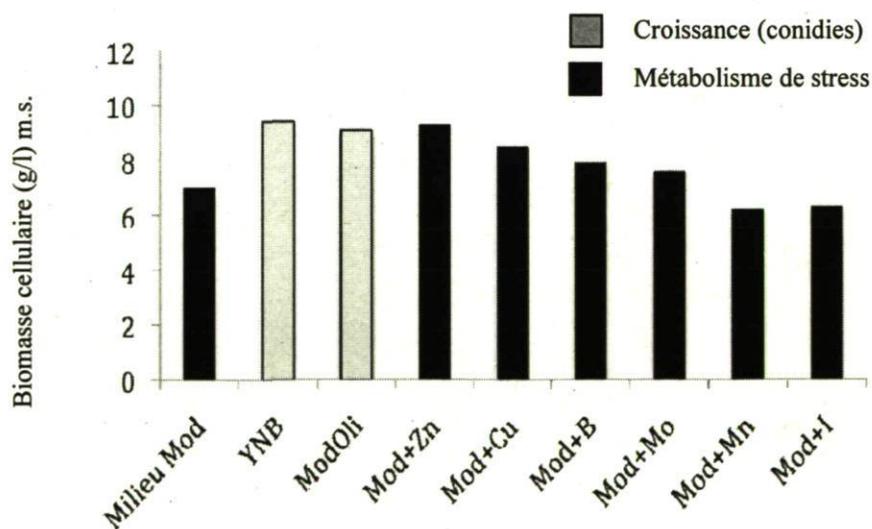


Figure 3. Effet de l'ajout d'oligoéléments (Cu, Mo, Mn, Zn, B et I) sur la production de biomasse et de conidies par *Pseudozyma flocculosa* en milieu MOD (milieu minimal tamponné). Chaque valeur représente la moyenne de deux réplifications. L'erreur standard moyenne = 0,77.

Par la suite, une expérience dans laquelle on avait enlevé successivement chacun des oligoéléments à la solution complète a montré que le retrait du cuivre, du bore, de l'iode et du molybdène ne modifiait aucunement l'efficacité de la solution d'oligoéléments complète (Figure 4). Toutefois, le retrait du zinc ou du manganèse modifiait l'efficacité de la solution en reproduisant le métabolisme de stress observé dans le milieu MOD seul (Figure 4). Enfin, l'utilisation de zinc et de manganèse en combinaison avec le milieu MOD a permis de restaurer le métabolisme de croissance de *P. flocculosa* en obtenant les mêmes effets que ceux obtenus avec l'extrait de levure (Figure 5). En effet, la biomasse obtenue avec le mélange des deux sels était équivalente à celle obtenue avec l'extrait de levure et la solution d'oligoéléments complète. De plus, pour la première fois, un milieu totalement défini a permis d'annuler le métabolisme de stress au profit du métabolisme de croissance et de la production de conidies. Les micrographies de la Figure 6 récapitulent les résultats obtenus dans cette étude de l'effet des oligoéléments. Elles montrent que l'extrait de levure (YNB), la solution d'oligoéléments et la combinaison zinc/manganèse agissent de la même façon sur le métabolisme de *P. flocculosa* en désactivant le métabolisme de stress (Figure 6A) et en activant le métabolisme de la croissance cellulaire (Figure 6B, 6C et 6D).

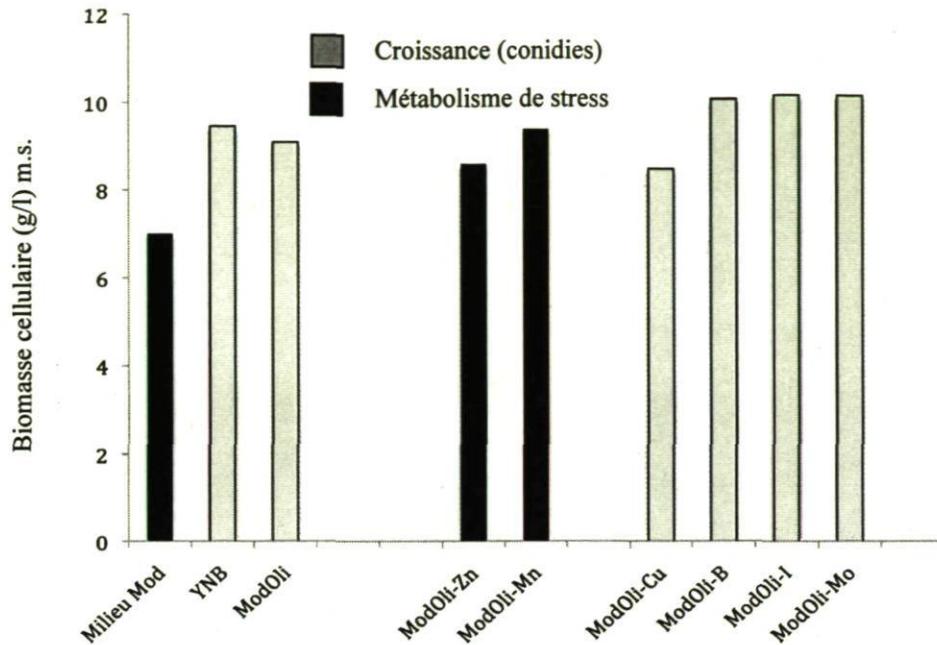


Figure 4. Effet du retrait de chacun des oligoéléments (Cu, Mo, Mn, Zn, B et I), de la solution d'oligoéléments complète, sur la production de biomasse et de conidies par *Pseudozyma flocculosa* en milieu MOD (milieu minimal tamponné). Chaque valeur représente la moyenne de deux répliques. Erreur standard moyenne = 0,77

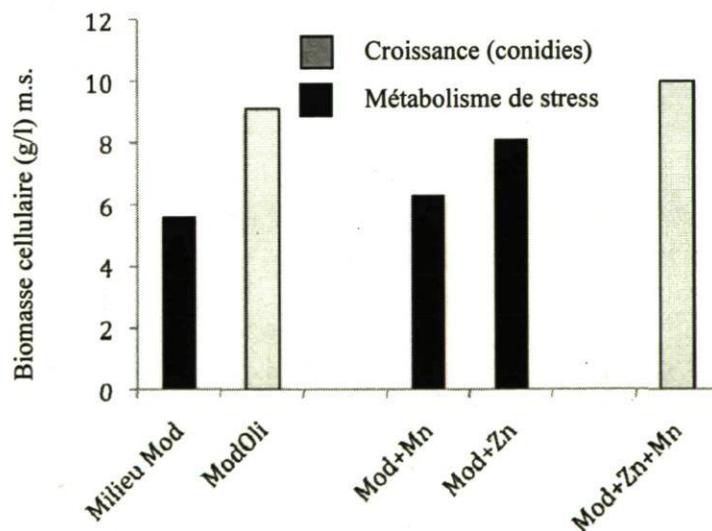


Figure 5. Effet de l'ajout conjoint de zinc et de manganèse au milieu minimal tamponné MOD sur le métabolisme de croissance de *Pseudozyma flocculosa*. Chaque valeur représente la moyenne de deux répliques. Erreur standard moyenne = 0,77

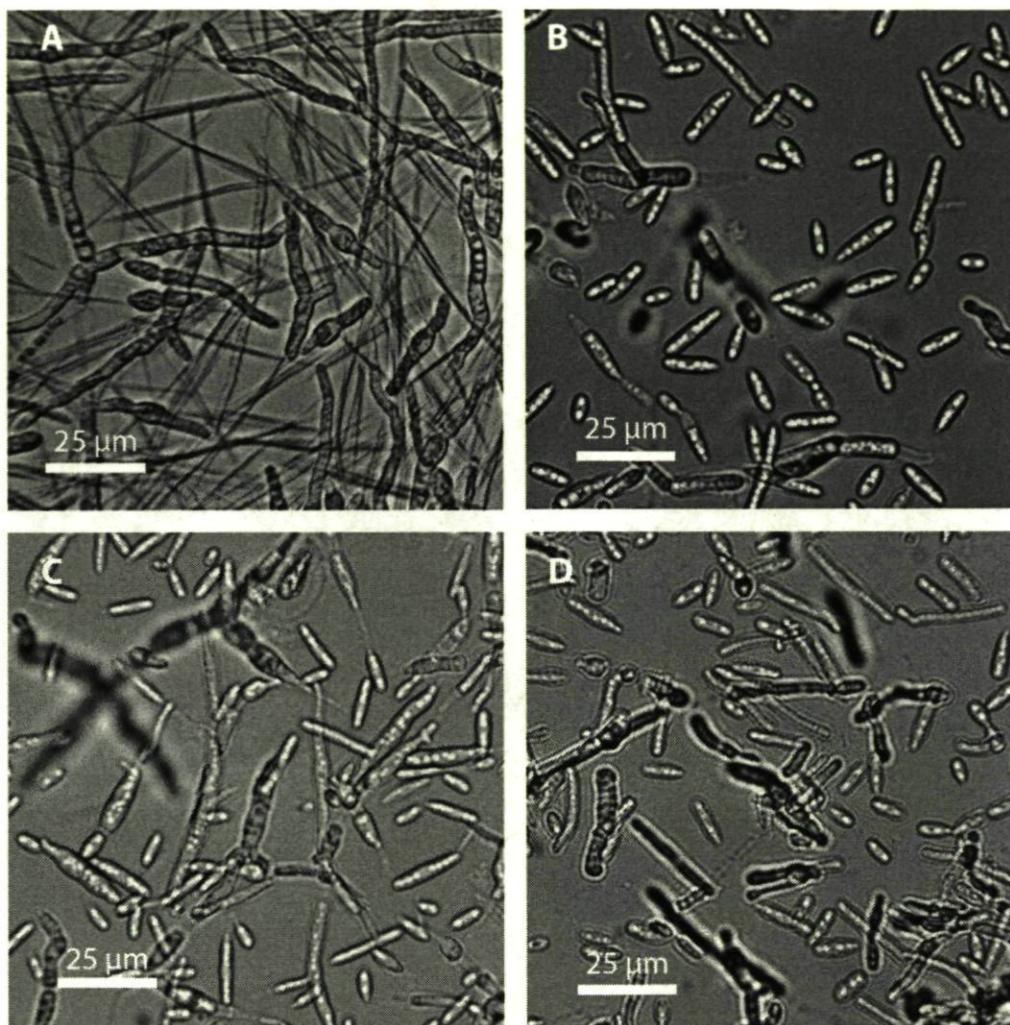


Figure 6. Observations en microscopie optique de la morphologie de *Pseudozyma flocculosa* après 48 heures de croissance dans les milieux (A) MOD (milieu minimal tamponné), (B) MOD + oligoéléments (Cu, Mo, Mn, Zn, B et I), (C) MOD + extrait de levure (YNB) et (D) MOD + ZnSO<sub>4</sub> + MnSO<sub>4</sub> (0,4 µg/ml).

## 2.4 Discussion

L'extrait de levure induit le métabolisme de croissance de *Pseudozyma flocculosa* (Hammami et coll. 2008). En effet, l'extrait de levure, Difco ou autre, est connu pour être une source complexe de facteurs de croissance, de vitamines, d'acides aminés, etc. (Geng et coll. 2008 ; Edens et coll. 2002). Toutefois, Hammami (communication personnelle) avait observé que l'extrait de levure Yeast Extract Nitrogen Base (YNB) montrait le même effet sur la croissance de *P. flocculosa* que l'extrait de levure conventionnel. Comme ce produit est beaucoup plus purifié et ne contient pas de source d'azote, organique ou inorganique, ce dernier a été utilisé tout au long de cette expérience dans l'objectif de faciliter la purification de la fraction active.

Tout au long du processus de purification, les fractions obtenues étaient ajoutées au milieu MOD. Une fraction était active lorsque le métabolisme de stress (hyphes difformes et flocculosine) était inhibé dans le milieu minimal MOD et que le métabolisme de croissance était nettement stimulé (présence de conidies et augmentation de la biomasse).

La première étape de purification consistait à utiliser la résine C18, soit sur cartouche ou par HPLC (séparation en phase inverse). Cette chimie permettait de séparer les différentes molécules de l'extrait de levure sur la base de leur hydrophilicité/hydrophobicité. Théoriquement, plus les molécules sont hydrophobes, plus elles sont retenues par la cartouche ou la colonne; c'est d'ailleurs le cas de plusieurs vitamines. Au contraire, plus les molécules sont polaires ou hydrophiles, moins elles sont retenues par la résine C18 et sont ainsi éluées très rapidement; c'est le cas des ions organiques ou inorganiques (Geng et coll. 2008 ; Edens et coll. 2002).

Lors de l'utilisation de la résine C18, c'est la fraction « tout droit » (TD) qui a donné le résultat attendu soit la croissance cellulaire de *P. flocculosa* à la place du métabolisme de stress. Cela signifiait que la (les) molécule(s) active(s) étai (en)t très polaire(s). La deuxième étape, a permis de fractionner la fraction TD en quatre sous-fractions distinctes. Encore une fois, c'est la fraction I, soit la plus polaire, qui a stimulé la croissance du champignon. Cela signifiait donc que la fraction active était fort probablement chargée

(ionisée). C'est pourquoi l'étape suivante de purification a consisté à séparer la FI sur des cartouches d'échange ionique. Avec la résine SAX (anionique) on a trouvé que la fraction FI (fraction non retenue), composée de molécules soit neutres soit cationiques, était active. Cependant, les deux fractions obtenues avec la résine SCX (cationique) n'ont montré aucune activité sur la croissance de *P. flocculosa*. Ce genre de résultats a déjà été obtenu par Smith et coll. (1975). En effet, en travaillant sensiblement sur une problématique comparable, soit la purification d'une fraction active de l'extrait de levure sur *Thermoplasma acidophilum*, ils avaient prouvé que la fraction active était retenue irréversiblement dans les résines cationiques. Suite à ces résultats, il était donc probable que la fraction active contenait des molécules fortement cationiques. Dans la littérature, on trouve également plusieurs exemples où la fraction active de l'extrait de levure est composée de molécules organiques cationiques comme les nucléotides, certains cofacteurs et des peptides (Edens et coll. 2002 ; Beran et coll. 1995; Mirsky et coll. 1980; Smith et coll. 1975).

Afin d'identifier les possibles molécules organiques cationiques dans la fraction active, il a été d'abord convenu de trouver la masse moléculaire, voire confirmer ou infirmer la nature peptidique du (des) facteur(s) de croissance. Les colonnes d'ultrafiltration PALL 10K ont été utilisées dans ce but. En effet, cette colonne possède une membrane d'ultrafiltration capable de séparer les macromolécules, comme les protéines et les acides nucléiques, en fonction de leur poids moléculaire. Des trois fractions récoltées, seule la fraction III (dessus de la colonne) devait contenir les peptides de masse moléculaire supérieure à 10 KDa. Les fractions FI et FII représentaient les molécules de masse moléculaire inférieure à 10 KDa. Cette fois encore, ce sont les deux fractions non retenues par la colonne qui ont montré de l'activité sur la croissance de *P. flocculosa*. Curieusement, l'activité semblait divisée entre les deux sous-fractions. La fraction FI activait la croissance de *P. flocculosa* (croissance cellulaire mycélienne) mais les conidies étaient absentes tandis que la FII, bien qu'affichant la présence de conidies, présentait aussi des amas de flocculosine ce qui est un indicateur du métabolisme de stress.

Afin de confirmer ou d'infirmer la nature peptidique du (des) facteur(s) de croissance présent(s) dans l'extrait de levure YNB, un test de Bradford (Bradford 1976) ainsi qu'un

gel d'électrophorèse de polyacrylamide (SDS PAGE) ont été effectués. En effet, ces méthodes sont utilisées de façon routinière pour la détection des protéines et/ou peptides. Les résultats obtenus étant négatifs, ils indiquaient que la nature de la (des) molécule(s) active(s) de l'extrait de levure était non peptidique.

Par ailleurs, plusieurs autres travaux ont trouvé que la stimulation du métabolisme cellulaire des champignons était obtenue par l'apport de facteurs de croissance exogènes tels des nucléotides (ex. AMPc, ATP, GTP, UTP, CTP), des facteurs de croissance (GH, GSSG, acide folique, acide nicotinique, cystéine) et certains cofacteurs (NAD, NADP) (Bolker et coll. 2008; Zheng et coll. 2008 ; Pócsi et coll. 2004; Lengeler et coll. 2000 ; Hofsten et Hofsten 1958 ; Smith et coll. 1975). Cependant, dans notre recherche, aucun des facteurs de croissance ou des nucléotides de nature cationique cités précédemment n'a réussi à activer le métabolisme de croissance de *P. flocculosa* lorsque rajouté au milieu minimal MOD.

Nos résultats ont donc mené à la conclusion que les molécules organiques de l'extrait de levure n'étaient pas impliquées dans l'induction du métabolisme de croissance de *P. flocculosa*. La fraction inorganique du YNB a donc été analysée. Toutefois, une expérience consistant à tester les différents sels d'oligoéléments individuellement sur la croissance de *P. flocculosa* avait déjà été effectuée dans notre laboratoire. Cette expérience, bien que préliminaire, n'avait pas donné de résultats probants. Afin de tester la fraction inorganique totale de l'extrait de levure, ce dernier a été soumis à une hydrolyse acide forte. En effet, cette opération consiste à détruire les molécules organiques et à ne laisser intactes que les molécules inorganiques tels les cations.

Comme montré au Tableau 5, l'hydrolysate du YNB s'est avéré positif en stimulant la croissance de *P. flocculosa* et en inhibant le métabolisme de stress. Cette fraction a été analysée par ICP-MS (résultats non montrés) afin d'identifier les cations présents dans l'extrait de levure. Comme les résultats de cette analyse correspondaient à la liste des cations de la fiche signalétique du YNB (Annexe, tableau 1A), un mélange d'oligoéléments a été préparé selon cette dernière. Le mélange d'oligoéléments a permis de reproduire le changement métabolique de *P. flocculosa* tel qu'observé en présence d'extrait de levure. Pour la première fois, il était possible d'induire la croissance de *P. flocculosa* dans un

milieu totalement défini. Afin de déterminer le(s) quel(s) de ces oligoéléments étai(en)t responsable(s) du changement métabolique de *P. flocculosa*, chacun des éléments a d'abord été testé individuellement. Une fois de plus, cette expérience n'a pas permis d'identifier le cation responsable. Une autre façon de procéder était d'éliminer en séquence chacun des cations dans le mélange d'oligoéléments et d'en observer le résultat. Par cette expérience, il a été déterminé que le Cu, le B, l'I et le Mo n'étaient pas impliqués dans le changement métabolique car, absents ou présents, le résultat obtenu était semblable au mélange complet d'oligoéléments. Cependant, le retrait du Zn ou du Mn a modifié l'efficacité du mélange d'oligoéléments par la réapparition du métabolisme de stress. L'utilisation de ces deux oligoéléments en combinaison avec le milieu MOD a confirmé leur implication dans le métabolisme de croissance de *P. flocculosa*. Comme le résultat obtenu était semblable qualitativement (morphologie) et quantitativement (masse sèche) à celui obtenu avec le YNB, la conclusion était que seuls ces deux éléments conféraient l'efficacité de l'extrait de levure à induire la croissance du champignon.

Dans la littérature, on trouve de multiples exemples où le zinc et le manganèse peuvent contrôler le métabolisme des microorganismes. Chez les champignons, le zinc et le manganèse sont reconnus comme des activateurs des enzymes fongiques qui régulent le métabolisme intermédiaire et la synthèse d'ADN et d'ARN (De Nicola et coll. 2007). Le zinc a été prouvé essentiel dans la division cellulaire (Ross 1994) et de plus, il est considéré comme un modulateur de stress chez les levures en plus d'être un stabilisateur membranaire (Walker et coll. 2006). Le manganèse, est connu comme un régulateur de croissance chez *Chaetomium* sp. (Auling 1994) et de la morphogénèse chez *Aspergillus nidulans* et *Pleurotus pulmonarius* (Auling 1994, Chiu et coll. 1998). Enfin, le manganèse est spécifiquement impliqué dans les synthèses de parois cellulaires et dans la sporulation (Papagianni 2004).

## 2.5 Conclusion

En conclusion, le zinc et le manganèse sont les molécules de l'extrait de levure qui sont responsables du changement métabolique de *P. flocculosa* lorsque cultivé en milieu minimal. En effet, l'ajout de ces deux éléments permet d'activer la croissance cellulaire et la production de conidies chez ce champignon au détriment du métabolisme de stress normalement obtenu en absence d'extrait de levure. Bien que le Zn et le Mn soient des stimulateurs de croissance connus dans la littérature, il est étonnant que la contribution de l'extrait de levure, riche en vitamines et cofacteurs organiques, ne soit liée qu'à l'apport de ces deux oligoéléments. Il semble donc que *P. flocculosa* soit capable de compléter un cycle de croissance normal sans l'apport supplémentaire de vitamines ou autre facteurs de croissance organiques ajoutés au milieu de culture. Cela dénote que *P. flocculosa* est vraiment un organisme capable de profiter de la frugalité de l'environnement d'où sa capacité de vivre en épiphyte.

### **CHAPITRE 3**

**DÉTERMINATION DE LA RELATION ENTRE LES BESOINS EN  
ZINC ET MANGANÈSE DE *PSEUDOZYMA FLOCCULOSA* ET SA  
CAPACITÉ À COLONISER LE BLANC**

### 3.1 Introduction

Récemment, des études ont montré que les conditions écologiques favorisant le développement de *Pseudozyma flocculosa* étaient liées à la présence ou non de colonies de blanc (Neveu et coll. 2007). Cet agent de lutte biologique semblait pouvoir se développer à la surface des feuilles de différentes espèces végétales en association exclusive avec le blanc. Il semblerait qu'une molécule signal ou de croissance provenant des exsudats de l'agent pathogène influence le développement de *P. flocculosa* (Clément - Mathieu et coll. 2008).

Il est connu que *P. flocculosa* en présence d'extrait de levure se développe comme s'il était sur une feuille infectée de blanc. Au chapitre précédent, il a été démontré que l'effet bénéfique de l'extrait de levure sur le métabolisme de croissance était relié à la présence de zinc (Zn) et de manganèse (Mn). Comment expliquer la croissance de *P. flocculosa* au contact des colonies de blanc et la relier à ses besoins en Zn et en Mn? Est-ce que le Zn et le Mn seraient les facteurs limitants dans la croissance de *P. flocculosa* lorsqu'il est appliqué sur une feuille saine? Le blanc serait-il une source de Zn et de Mn pour *P. flocculosa*?

Afin de répondre à ces questions, quelques expériences ont été effectuées sur des plants de tomate. Brièvement, la croissance de *P. flocculosa* a été étudiée en relation avec l'ajout de zinc et de manganèse en absence de blanc sur les feuilles. Les résultats obtenus ont permis de proposer un modèle simulant les mécanismes de colonisation du blanc par *P. flocculosa*.

## 3.2 Méthodologie

### 3.2.1 Bioessais *in vivo* avec *P. flocculosa*

Les feuilles d'un même plant de tomate, cultivé de façon conventionnelle en serre, étaient vaporisées avec l'une ou l'autre des solutions suivantes : 1) de l'eau ou 2) une solution de zinc et de manganèse (0,4 µg/ml de ZnSO<sub>4</sub> et 0,4 µg/ml de MnSO<sub>4</sub>). Après évaporation de la solution, les feuilles étaient vaporisées jusqu'à ruissellement d'une culture de *P. flocculosa* (ca. 1 X10<sup>6</sup> conidies /ml). Après évaporation du surplus d'eau (environ 10 minutes), les feuilles étaient recouvertes par des sacs de plastique partiellement scellés pour maintenir l'humidité relative à 100%. L'échantillonnage pour analyses microscopiques s'effectuait après 24 heures de croissance. L'expérience a été répétée deux fois.

### 3.2.2 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Un microscope électronique à balayage Jeol JSM6360LV (JEOL, Peabody, USA) a été utilisé en mode environnemental i.e. que les échantillons n'étaient pas fixés chimiquement avant les observations. La croissance de *P. flocculosa* a été observée.

### 3.2.3 Détection de flocculosine *in situ* par spectrométrie de masse en phase liquide

Un spectromètre de masse (Modèle Unique; Leco, St. Joseph, Mi) en phase liquide a été utilisé afin de détecter la présence de flocculosine à la surface des feuilles de tomate traitées. Brièvement, les feuilles étaient préalablement pesées et ensuite rincées avec du MeOH. À la quantité de MeOH utilisée, le même volume d'eau était ajouté pour obtenir une solution 50 :50. Le mélange 50 :50 était ensuite élué sur SepPak C18 préalablement conditionné avec 3 ml de MeOH et 3 ml d'eau. L'éluion de flocculosine était effectuée avec 3 ml de MeOH 90%. Cette fraction était amenée au volume final de 5 ml avec du MeOH 90%. La présence de flocculosine était observée par spectrométrie de masse en mode infusion.

### 3.3 Résultats

#### 3.3.1 Observations par microscopie électronique à balayage (MEB)

Afin de déterminer si le zinc et le manganèse pouvaient expliquer la propension de *P. flocculosa* à croître abondamment sur les colonies de blanc et très peu ailleurs sur une feuille, des feuilles de tomate saines ont été vaporisées avec une solution des deux oligoéléments. Ces feuilles ont ensuite été vaporisées avec une solution de *P. flocculosa*. La croissance de ce dernier a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB). Ces observations ont montré une croissance très abondante de l'agent de lutte biologique en association avec la solution de zinc et manganèse (Figure 7). En effet, la stimulation de croissance était telle, que la surface de la feuille n'était même plus apparente (Figure 7).

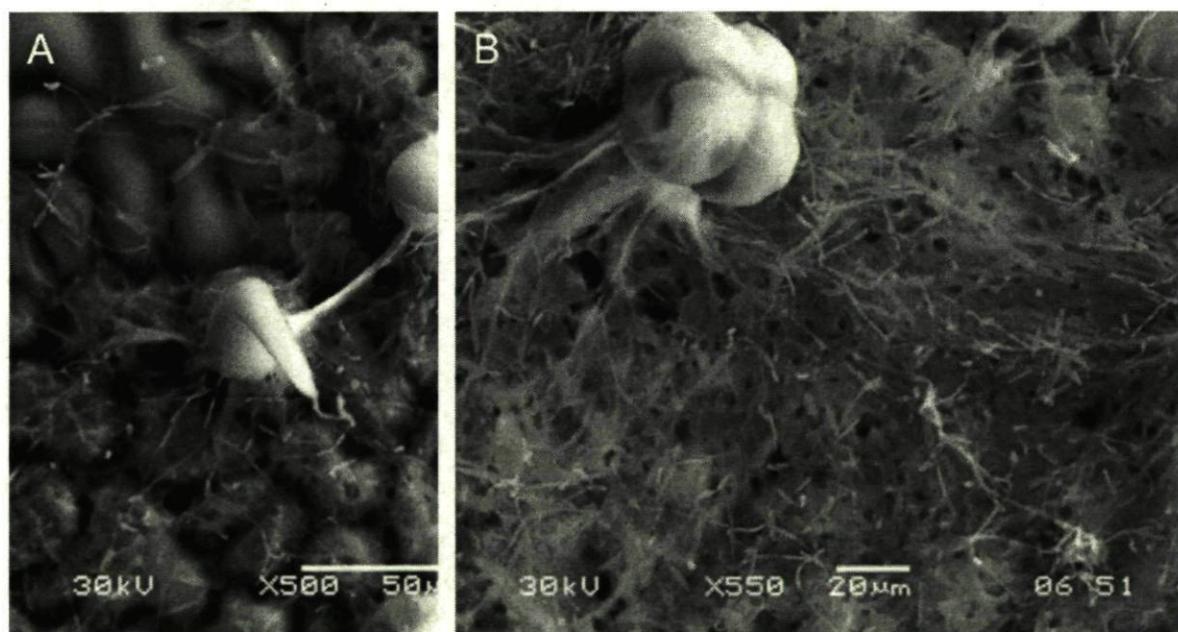


Figure 7. Observations de la croissance de *Pseudozyma flocculosa* 24 heures après une vaporisation de conidies du champignon sur des feuilles de tomate saines par microscopie électronique à balayage. Les feuilles avaient été préalablement vaporisées avec de l'eau (témoin) (A) ou avec une solution de zinc et de manganèse (B).

### 3.3.2 Détection de flocculosine *in situ* par spectrométrie de masse en phase liquide

Des analyses par spectrométrie de masse en phase liquide (mode infusion) ont été effectuées pour détecter de façon qualitative la présence ou non de flocculosine à la surface des feuilles traitées. Comme prévu, l'extrait de la feuille de tomate (figure 8A) n'indiquait aucun pic de flocculosine ( $m/z -1= 853$ ) (témoin négatif). La figure 8 (C, D et E), montre que la flocculosine était détectable après 24 heures de croissance chez tous les traitements de feuilles ayant été vaporisées avec *P. flocculosa*. Les conidies (figure 8B) ne semblaient pas contenir de flocculosine endogène avant la vaporisation. Cependant, une masse de 833 Da dans ce traitement pourrait correspondre à une molécule de flocculosine monoacétylée substituée par un atome de sodium dans la fonction acide (Figure 9).

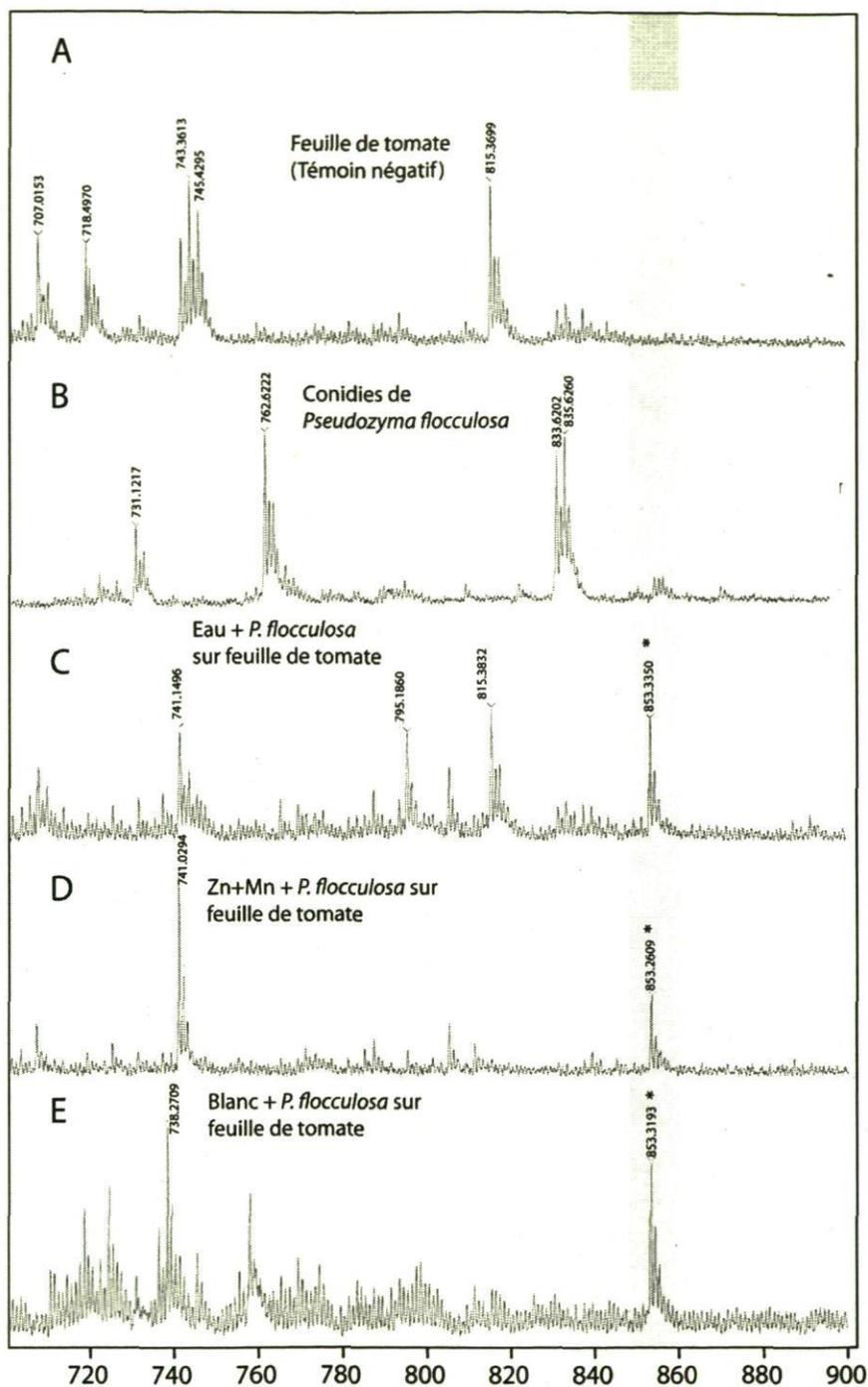


Figure 8. Profils LC-MS (entre 700 et 900 Da) de l'extraction de surface d'une feuille de tomate saine (témoin négatif) (A), de conidies de *Pseudozyma flocculosa* avant traitement foliaire (B), de feuilles de tomate saines traitées avec de l'eau et *P. flocculosa* (C), d'une solution zinc-manganèse et *P. flocculosa* (D), d'une feuille de tomate avec du blanc et *P. flocculosa* (E). À l'exception de B, tous les traitements ont été analysés après 24h de croissance.

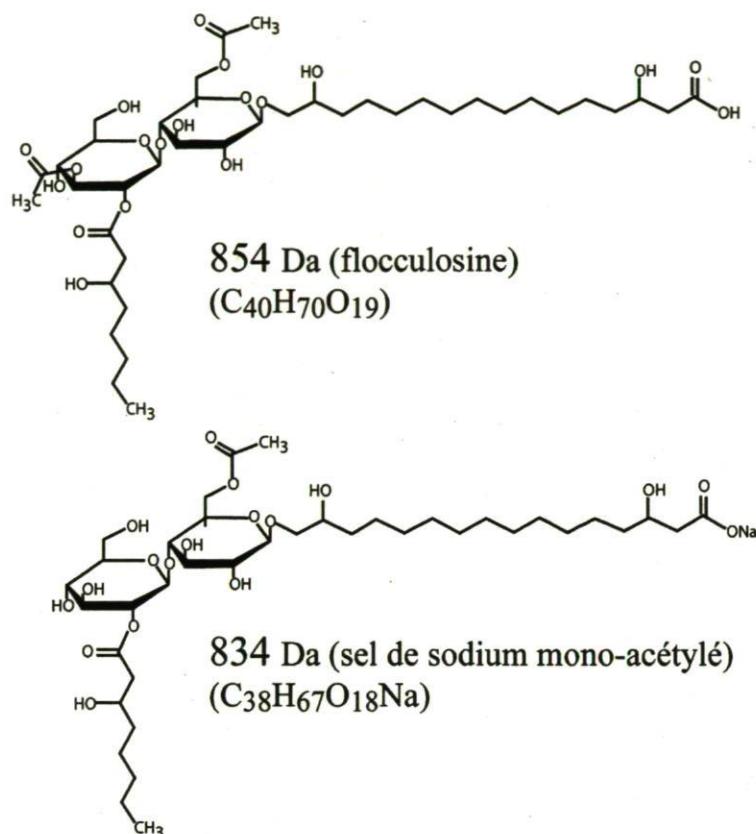


Figure 9. Structures et masses moléculaires respectives de la flocculosine et d'une molécule dérivée, monoacétylée dont la masse de l'ion moléculaire ( $m/z-1$ ) serait égale à 833.

### 3.4 Discussion

Afin de comprendre la relation entre le zinc, le manganèse et le blanc, des expériences *in situ* ont été réalisées. Dans un premier temps, la croissance de *P. flocculosa* a été observée après 24 heures de croissance sur des feuilles de tomate ayant été vaporisées avec de l'eau (témoin négatif) et une solution de Zn et de Mn. Les feuilles traitées ont été maintenues à 100% d'humidité relative, pour s'assurer que la croissance observée n'était pas due à des différences de disponibilité en eau à la surface des feuilles entre les deux traitements. Les résultats obtenus ont montré que l'apport de Zn et de Mn stimulait grandement la croissance de *P. flocculosa* à la surface d'une feuille saine (sans blanc) indiquant par le fait même que tous les autres éléments requis pour sa croissance (azote, sucre, P, Mg) n'étaient pas limitant. Cet effet sur la croissance de *P. flocculosa* reproduisait de façon surprenante celui que l'on observe typiquement en présence de colonies de blanc (Neveu et al. 2007). Le blanc pourrait donc être la source de ces éléments nutritifs pour *P. flocculosa*.

Afin de comparer et d'observer la dynamique *P. flocculosa*-blanc ou encore *P. flocculosa*-Zn-Mn *in situ*, des feuilles de tomate ont été traitées en surface avec du méthanol pur de façon à solubiliser totalement la flocculosine, si présente. En effet, il semblait intéressant de relier la production de la flocculosine, puisque c'est la molécule antibiotique présumée responsable de l'antibiose exercée par *P. flocculosa* contre le blanc, à la croissance du champignon en présence de blanc ou encore en présence de Zn et de Mn. Les résultats obtenus ont montré que les conidies de *P. flocculosa*, avant d'être appliquées et laissées à germer sur les feuilles de tomate, ne contenaient pas de flocculosine mais peut-être une molécule précurseur de 834 Da ( $m/z-1=833$ ) qui pourrait être une molécule de flocculosine mono-acétylée sous forme de sel de sodium (figure 9). Des expériences plus complètes pourraient confirmer cette hypothèse. Par contre, 24 heures après la germination, le champignon relâchait une quantité minimale de flocculosine à la surface des feuilles que ce soit en présence d'eau, de blanc ou de Zn et Mn. Il semble donc que la production de flocculosine, du moins dans ces conditions, soit initiée par la germination. De plus, Clément-Mathieu et coll. (2008) et Marchand et coll. (2009) ont démontré que la production de flocculosine ne pouvait expliquer, du moins à elle seule, l'effet antagoniste de *P. flocculosa* en présence de blanc. Nos résultats semblent donc confirmer ce constat qui

remet en question le mode d'action de l'agent de lutte biologique. Par ailleurs, nos travaux offrent une première explication à ce phénomène en suggérant que le Zn et le Mn puisés à même les colonies de blanc stimuleraient la croissance de *P. flocculosa* causant ainsi son effet délétère sur l'agent pathogène.

### 3.5 Conclusion

Dans cette dernière partie, il a été montré que *P. flocculosa*, lorsque vaporisé sur une feuille saine de tomate en combinaison avec une solution de Zn et de Mn, se développait à la surface des feuilles saines et ce, aussi bien que si le blanc avait été présent. Il apparaît donc que les autres molécules nécessaires à sa croissance étaient présentes en quantité suffisante sur les feuilles. De ce fait, il semble que le blanc soit la source de Zn et de Mn pour *P. flocculosa* puisque ce dernier se développe uniquement sur les colonies de blanc en conditions naturelles (sans apport exogène de Zn et de Mn).

Selon les résultats, il a été également montré que le champignon ne possédait pas de flocculosine endogène lors de la vaporisation sur les feuilles. Tout au plus possédait-il une molécule voisine (précurseur?) dans l'extrait. Cependant, après 24 heures de croissance, il était possible de détecter une quantité minimale de flocculosine à la surface des feuilles traitées avec *P. flocculosa*. Le rôle de cet antibiotique dans l'antibiose de *P. flocculosa* contre le blanc reste hypothétique. En effet, on aurait pu croire que sa présence à la surface des feuilles pouvait différer entre les traitements eau, Zn-Mn ou blanc. Les données obtenues, bien que principalement qualitatives, ne semblent pas différer entre les trois traitements. Étonnamment, cela s'accorde avec les résultats qRT-PCR obtenus par Marchand et coll. 2009 où il est démontré, contre toute attente, que l'activation de la voie de synthèse de la flocculosine est réprimée partiellement (par la diminution des transcrits du gène *Cyp I* impliqué dans la biosynthèse) lors de la croissance de *P. flocculosa* sur le blanc. Comment alors expliquer le rôle de la flocculosine dans l'antibiose de *P. flocculosa* sur le blanc? Est-ce que la quantité produite lors des 24 premières heures de germination serait suffisante pour provoquer une fuite d'éléments nutritifs des colonies de blanc? Comme *P. flocculosa* se nourrirait à partir de ces exsudats, serait-ce ce facteur qui détruirait les colonies de blanc dans un contexte de lutte biologique?

## DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Les travaux réalisés dans le cadre de cette recherche visaient à trouver un facteur de croissance commun à l'extrait de levure et au blanc (un parasite obligatoire) pour expliquer la croissance exclusive de *Pseudozyma flocculosa* sur les colonies de blanc (Neveu et coll. 2007). Les travaux ont été effectués sur l'extrait de levure YNB puisque Hammami et coll. (2008) avaient démontré que la croissance de *P. flocculosa* était stimulée par son ajout au milieu de culture tout comme s'il avait été en contact avec des colonies de blanc.

Les facteurs de croissance isolés de l'extrait de levure ont été identifiés comme étant deux oligoéléments soit le zinc et le manganèse. En effet, l'ajout de ces deux éléments à un milieu de culture minimal permettait d'inhiber le métabolisme de stress, normalement obtenu sous ces conditions, et d'augmenter la croissance cellulaire du champignon et la production de conidies. Le rôle du zinc et du manganèse dans la transition métabolique du champignon reste à déterminer. La littérature abonde sur l'essentialité de ces deux éléments pour la croissance des champignons et autres organismes, mais ne permet pas de cibler exactement sur quels enzymes ces éléments ont le pouvoir de changer l'activité.

Lors de ces travaux, la preuve circonstancielle que le blanc pouvait être la source de zinc et de manganèse pour *P. flocculosa* a été établie. En effet, comme les quantités nécessaires pour éliciter la croissance de *P. flocculosa* à la surface des feuilles relèvent de l'ordre de pico-grammes, et que ce ne sont pas des quantités détectables par les appareils analytiques à notre disposition, il a été décidé d'ajouter de façon exogène des quantités minimales (moins de 0,4 µg/l) de zinc et de manganèse sur des feuilles de tomate saines. La croissance obtenue grâce à l'ajout d'une faible vaporisation de ces éléments a stimulé de façon extraordinaire la croissance de *P. flocculosa* et ce, en absence de colonies de blanc. Il semble donc que le blanc soit la source de zinc et de manganèse pour *P. flocculosa*.

En introduction générale, il avait été admis que l'efficacité de *P. flocculosa* comme agent de lutte biologique contre le blanc ne dépendait pas uniquement de sa faculté à synthétiser de la flocculosine, son antibiotique, mais également de sa spécificité à croître sur les

colonies de blanc. Lors de ces travaux, il a été démontré que même si *P. flocculosa* colonisait des feuilles de tomate, que ce soit en présence de blanc ou encore de zinc et de manganèse, les quantités de flocculosine produites étaient relativement semblables à celle observée en absence de blanc ou de zinc et manganèse. Cependant, comme les conidies de *P. flocculosa* ne contenaient pas de flocculosine endogène avant les traitements, il semble donc qu'un peu de flocculosine soit synthétisée lors de la germination et la croissance du champignon. La libération de la flocculosine lors de la germination de *P. flocculosa* serait, même en faible quantité, probablement suffisante pour provoquer une fuite de composés nutritifs de la part du blanc. En effet, le mode d'action de cet antibiotique contre les champignons serait d'altérer l'intégralité de la membrane plasmique et de provoquer une fuite d'électrolytes massive (Mimee et coll. 2009). De ce fait, il semble tout à fait raisonnable d'expliquer la croissance de *P. flocculosa* au contact des colonies de blanc par la libération d'éléments nutritifs divers dans le milieu dont les ions zinc et manganèse grâce à la production de flocculosine.

La spécificité de *P. flocculosa* à coloniser le blanc est-elle expliquée par les résultats obtenus? Comme ce champignon ne semble pas affecté par l'absence de facteurs de croissance complexes tels les vitamines, les hormones, les acides aminés etc., contrairement à d'autres organismes producteurs de glycolipides, ce résultat pourrait à lui seul expliquer le succès de *P. flocculosa* à coloniser le blanc.

## **Perspectives**

Avoir ciblé le zinc et le manganèse comme facteurs clés pour la croissance cellulaire de *P. flocculosa* est une percée de première importance pour la production de cet agent de lutte biologique en fermenteur où l'obtention de conidies est primordiale pour l'utilisation du champignon dans un biofongicide. De plus, comme la croissance de *P. flocculosa* a vraiment été stimulée par l'ajout de micro quantités de zinc et de manganèse à la surface des feuilles de tomate, il serait intéressant d'intégrer ces résultats dans une éventuelle formulation du biofongicide.

Enfin, identifier les voies métaboliques régulées par le zinc et le manganèse dans la croissance de *P. flocculosa* est un défi pour les prochaines générations d'étudiants et devrait nous permettre d'obtenir des découvertes importantes sur la biologie de ce champignon.

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Agrios G.N. 2005. Plant Pathology 5<sup>ème</sup> édition. *Elsevier Academic press*. 385-397
- (2) Auling G. 1994 Manganese: Function and transport *dans*: Metal ions in fungi. Winge R.D., Winkelmann G., éditeurs. *CRC Press*. 215-236
- (3) Bélanger R.R., Benyagoub, M. 1997. Challenges and prospects for integrated control of powdery mildews in the greenhouse. *Can. J. Plant Pathol.* **19**: 310-14
- (4) Bélanger R.R., Labbé C. 2002. Control of powdery mildews without chemicals: prophylactic and biological alternatives for horticultural crops *dans*: Powdery mildews: A comprehensive treatise. *APS Press, St. Paul Minnesota*. 256-267
- (5) Bélanger R.R., Bushnell W.R, Dik A.J., Carver T. 2002. The Powdery mildews a comprehensive treatise. *APS Press, St. Paul Minnesota*. 1-11
- (6) Bélanger R.R. 2004. Dossiers Biocontrôle. Le bulletin canadien de l'écogestion des insectes, des mauvaises herbes et des maladies des plantes. No.1
- (7) Beran M., Stahl R., Beran M.Jr. 1995. Glycaemic activity of chromium III- $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate complex and its presence in yeast extract. *Analyst*. **120**: 979-981
- (8) Boekhout T. 1995. *Pseudozyma* Bandoni emend Boekhout, a genus for yeast – like anamorphs of the Ustilaginales. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **41**: 359-366
- (9) Bölker M. 2001. *Ustilago maydis* - A valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*. **147**: Issue 6, 1395-1401
- (10) Bölker M., Basse W.C., Schirawski J. 2008. *Ustilago maydis* secondary metabolism—from genomics to biochemistry. *Fungal Genet. Biol.* **45**: S88-S93
- (11) Borges-Walmsley I., Walmsley A.R. 2000. cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol.* **8**:133-140

- (12) Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254
- (13) Burkeholder J., Mertz W. 1967. Effect of yeast fractions on glucose utilization by yeast and mammalian systems. *Fed. Proc.* **26**: 307
- (14) Casas J.A, Garcia-Ochoa F. 1999. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. *J. Biosci. Bioeng.* **88**:488–494
- (15) Cheng Y.L., Mc Nally D.J., Labbé C., Voyer N, Belzile F., Bélanger R.R. 2003. Insertional mutagenesis of fungal biocontrol agent led to discovery of a rare cellobiose lipid with antifungal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2595-2602
- (16) Chiu S.W., Chan Y., Law S., Cheung K.T., Moore D. 1998. Cadmium and manganese in contrast to calcium reduce yield and nutritional values of the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Mycol. Res.* **102** : 449 - 457
- (17) Clément-Mathieu G., Chain F., Marchand G., Bélanger R.R. 2008 Leaf and powdery mildew colonization by glycolipid producing *Pseudozyma* species. *Fungal Ecol.* **1**, 69-77
- (18) Demain A.L, Sanchez S. 2002. Metabolic regulation of fermentation. *Enzyme Microb. Tech.* **31**: 895–906
- (19) Desai. J., Banat I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **61**: 47-64
- (20) Edens N.K., Reaves L.A., Bergana M.S., Reyzer I.L., O'Mara P., Baxter J.H., Snowden M.K. 2002. Yeast extract stimulates glucose metabolism and inhibits lipolysis in rat adipocytes in vitro. *J. Nutr.* **132**: 1141–1148
- (21) Falcone G. 1956. Enzymatic reduction of disulfide bonds in cell wall protein of bakers yeast. *Science.* **124**: 722

- (22) Gab-Gyun S., Meguro S., Kawach S. 1997. The active constituent in yeast extract for fruit body formation of *Lentinula edodes*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 1202-1204
- (23) Geng X., Zhang S., Wang Q., Zhao Z. 2008. Determination of organic acids in presence of inorganic anions by ion chromatography with suppressed conductivity detection. *J. Chromatogr. A.* **1192**: 187-190
- (24) Gold S., Duncan G., Barrett K., Kronstad J. 1994. cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Gene dev.* **8**: 2805-2816
- (25) Hajlaoui M.R., Benhamou N., Bélanger R.R. 1992. Cytochemical study of antagonistic activity of *Sporothrix flocculosa* on rose powdery mildew, *Sphaerotheca pannosa* var *rosae*. *Phytopathology.* **82**: 583-589
- (26) Hajlaoui M.R., Traquair J.A., Jarvis W., Bélanger R.R. 1994. Antifungal activity of extracellular metabolites produced by *Sporothrix flocculosa*. *Biocontrol Sci. Tech.* **4**: 229-237
- (27) Hammami W., Labbé C., Chain F., Mimee B., Bélanger R.R. 2008. Nutritional regulation and kinetics of flocculosin synthesis by *Pseudozyma flocculosa*. *Appl. Microbiol. Biot.* **80** : 307-315
- (28) Hofsten A.V., Hofsten B.V. 1958. Factors influencing cell division and vegetative morphogenesis of *Ophiostoma multiannulatum*. *Physiol. Plantarum.* **11**: 106-117
- (29) Jarvis, W. R., Shaw L. A., Traquair J. A. 1989. Factors affecting antagonism of cucumber powdery mildew by *Stephanoascus flocculosus* and *Stephanoascus rugulosus*. *Mycol. Res.* **92**:162-165
- (30) Lengeler K.B., Davidson R.C., D'Souza C., Harashima T. 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol Biol. R.* **64**: 746-785
- (31) Madhani H., Fink G. 1998. The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol.* **8**: 348-353

- (32) Marchand G., Rémus-Borel W., Chain F., Hammami W., Belzile F., Bélanger R.R. 2009. Identification of genes potentially involved in the biocontrol activity of *Pseudozyma flocculosa*. *Phytopathology In press*
- (33) Mendoza-Cozatl D., Butko E., Springer F., Torpey J., Komives E., Kehr J., Schroeder J. 2008. Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J.* **54**, 249–259
- (34) Mimee B., Labbé C., Pelletier R., Bélanger R.R. 2005. Antifungal activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa*. *Antimicrob. Agents Che.* **49**: 1597–1599
- (35) Mimee, B., Pelletier, R., Bélanger R.R. 2009. In vitro antibacterial activity and antifungal mode of action of flocculosin, a membrane-active cellobiose lipid. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04280.x
- (36) Mirsky N., Weiss A., Dori Z. 1980. Chromium in biological systems, some observations on glucose tolerance factor in yeast. *J. Inorg. Biochem.* **13**: 11-21
- (37) Nagunuma T., Yamaguchi T., Uzuka Y. 1989. Effects of  $Zn^{+2}$  and  $Mn^{+2}$  on the growth of genera *Lipomyces* and *Waltomyces*. *J. Gen. App. Microbiol.* **35**: 481-485
- (38) Neveu B., Labbé C., Bélanger R.R. 2007. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: A case study with *Pseudozyma flocculosa*. *J. Microbiol. Meth.* **68**: 275–281
- (39) De Nicola R., Hazelwood L.A., De Hulster E.A.F., Walsh M.C., Knijnenburg T., Reinders M., Walker G., Pronk J., Daran J-M., Daran- Lapujade P. 2007. Physiological and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to zinc limitation in chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7680-7692
- (40) Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* **22**: 189-259

- (41) Paulitz T.C., Bélanger R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 103-133
- (42) Pócsi I., Pradee R., Penninckx M. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **49**: 1-76
- (43) Punja Z.K., Utkhede R. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.* **21**:400-407
- (44) Réseau d'avertissement phytosanitaire 2007. Insecticides et fongicides homologuées pour les cucurbitacées. *Bulletin d'information* No.04-2007
- (45) Ross I. 1994. Uptake of zinc by fungi *dans*: Metal ions in fungi. Winge R.D, Winkelmann G., éditeurs. *CRC Press.* 237-255
- (46) Smith P.F, Lanrworthy T.A., Smith M. 1975. Polypeptide nature growth requirement in yeast extract for *Thermoplasma acidophilum*. *J. Bacteriol.* **2**: 884-892
- (47) Scott R., Jones A., Gaucher. L. 1984. A manganese requirement for patulin biosynthesis in culture of *Penicillium urticae*. *Biotechnol. lett.* **6** : 231-236
- (48) Traquair, J.A., Shaw, L.A., Jarvis W.R. 1988. New species of *Stephanoascus* with *Sporothrix* anamorphs. *Can. J. Bot.* **66**: 926-933
- (49) Walker, G. De Nicola, R., Anthony, S., Learmonth, R.P. 2006 Yeast-metal interactions: impact on brewing and distilling fermentations *dans*: Institute of Brewing & Distilling Asia Pacific Section 2006 Convention, 19-24 mars 2006, Hobart, Tasmania. 1-19
- (50) Watson J.R, Heys R., Martin T., Savard M. 2001. *Sinorhizobium meliloti* cells require biotin and either cobalt or methionine for growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3767-3770

- (51) Zetic G.V., Stehlik-Thomas V., Grba S., Lutinsky L., Kozlek D. 2001. Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. *J. Biosciences* **26**: 217-233
- (52) Zheng Y., Kief J., Auffarth K., Farfsing J.W., Mahlert M., Nieto F., Basse C. 2008. The *Ustilago maydis* Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Type zinc finger transcription factor Mzr 1 regulates fungal gene expression during the biotrophic growth stage. *Mol. Microbiol.* **68**: 1450-1470

**ANNEXE**

Figure A1 : Structure chimique de la flocculosine

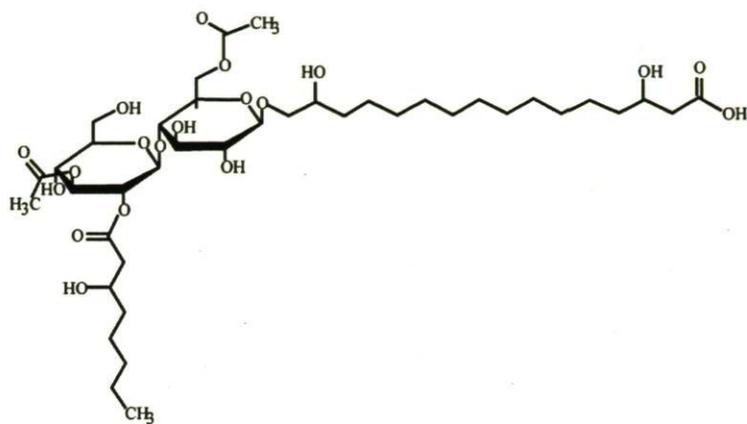


Tableau A1. Fiche signalétique de l'extrait de levure YNB Difco. Liste des composants de l'extrait de levure YNB de Difco

<b>Composantes</b>	<b>Concentration/l</b>
<b>Vitamines</b>	
Biotine	2 µg
Pantothenate de Calcium	400 µg
Acide folique	2 µg
Inositol	2000 µg
Niacine	400 µg
Acide p-Amin benzoïque	200 µg
Hydrochlorate de pyridoxine	400 µg
Riboflavine	400 µg
Hydrochlorate de thiamine	400 µg
<b>Trace éléments</b>	
Acide borique	500 µg
Sulfate de cuivre	40 µg
Iodide de potassium	100 µg
Chlorure de fer	200 µg
Sulfate de manganèse	400 µg
Molybdate de sodium	200 µg
Sulfate de zinc	400 µg
<b>Sels</b>	
Phosphate de mono potassium	1.0 g
Sulfate de magnésium	0.5 g
Chlorure de sodium	0.1 g
Chlorure de calcium	0.1 g
<b>Final pH</b>	4.3 à 4.7