

CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET POUVOIR ANTAGONISTE DE  
SOUCHES DE *S. MELANOSPOROFACIENS*, AGENTS POTENTIELS DE LUTTE  
BIOLOGIQUE CONTRE DES AGENTS PHYTOPATHOGÈNES

par

Sonya Agbessi

Thèse présentée au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Août 2002



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-80518-2

Le 22 août 2002 ,  
date

*le jury a accepté la thèse de M. Sonya Agbessi dans sa version finale.*

### **Composition du jury**

Membre : Mme Carole Beaulieu  
Département de biologie

Membre : M. Claude Déry  
Département de biologie

Membre : M. Gilles Grenier  
Département de biologie

Membre externe : M. Rolf Morosoli  
INRS - IAF

Membre et  
président-rapporteur : M. Ryszard Brzezinski  
Département de biologie

## SOMMAIRE

La souche *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76 est un agent de lutte biologique prometteur et des études antérieures ont montré son aptitude à contrôler la pourriture des racines du framboisier causée par le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* ainsi, que son aptitude à inhiber la croissance d'une grande variété de bactéries Gram+ et de champignons. Des gènes vraisemblablement impliqués dans la biosynthèse de la geldanamycine ont été isolés chez la souche EF-76. Les évidences expérimentales supportant cette affirmation sont l'identification de la production de geldanamycine comme métabolite secondaire produit par EF-76, la présence parmi les gènes isolés d'une glycosyle transférase impliquée dans la résistance à la geldanamycine et enfin, la corrélation existant entre le phénotype d'une souche mutante sensible à la geldanamycine ne produisant plus l'antibiotique et les délétions qu'elle a subi au sein de ces mêmes gènes.

Deux souches recombinantes (FP-54 et FP-60) ont été obtenues par fusion de protoplastes intraspécifique et différaient quant à leurs propriétés antagonistes envers les souches *B. cereus* ATCC 14579, *S. scabies* EF-35 et *Phytophthora fragariae* var. *rubi* 390. FP-60 avait perdu sa capacité à inhiber la croissance de ces microorganismes alors que FP-54 possédait un plus grand pouvoir d'inhibition de croissance envers ces microorganismes. Alors que FP-60 ne produisait plus de geldanamycine, FP-54 produisait, en plus de la geldanamycine, au moins deux autres composés antimicrobiens absents du surnageant de culture de la souche EF-76. Tout comme la souche sauvage EF-76, FP-54 réduisait les symptômes causés par la gale commune de la pomme de terre mais il n'y avait aucune différence entre les index de la maladie, observés en présence de EF-76 et de FP-54. FP-60 ne possédait aucun effet protecteur contre la gale commune de la pomme de terre. Les résultats obtenus suggèrent que l'antibiose et en particulier la production de geldanamycine par la souche EF-76 est une propriété importante à l'efficacité de cette souche en lutte biologique.

## REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu, à témoigner ma gratitude à ma directrice de recherche, le docteur Carole Beaulieu, de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet stimulant touchant à divers aspects de la microbiologie. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a accordée dès le départ, pour les encouragements de chaque instant, sa patience et sa grande disponibilité et l'enseignement que j'ai reçu pendant ces années. Je suis très reconnaissante de cette opportunité qui m'a été offerte de participer à des congrès internationaux en Crête et à San Diego. J'ai pu y apprendre davantage sur ces fascinantes bactéries qui possèdent de nombreuses applications en biotechnologie.

Je tiens également à remercier mon codirecteur, le docteur Claude Déry, d'avoir stimulé mon sens critique et mon imagination.

Je remercie mes conseillers, les docteurs Ryszard Brzezinski et Gilles Grenier, pour leurs suggestions et précieux conseils.

Je remercie Carole Boulanger de m'avoir guidée dans mes premiers pas en biologie moléculaire. Je la remercie pour l'altruisme et la grande gentillesse dont elle a fait preuve.

Un grand merci à tous les stagiaires qui ont participé à ce projet. J'ai eu le plaisir de travailler avec des personnes compétentes et motivées. Je remercie mes collègues du laboratoire pour les discussions sérieuses et légères, les soirées, les encouragements et les rires. Merci également à mes amis de Sherbrooke pour leur soutien.

Enfin, je remercie du fond du coeur mes parents et ma famille pour l'appui qu'ils m'accordent depuis toujours.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	
1.1 Les inconvénients de la lutte chimique.....	1
1.2 La lutte biologique contre les champignons phytopathogènes du sol.....	5
1.2.1 Mécanismes d'antagonisme en lutte biologique.....	6
1.2.2 L'antibiose en lutte biologique.....	15
1.2.3 Les <i>Streptomyces</i> antagonistes de bactéries et champignons phytopathogènes.....	21
1.3 Biosynthèse des métabolites secondaires chez les <i>Streptomyces</i> .....	26
1.3.1 Généralités.....	26
1.3.2 Les polycétides.....	29
1.3.3 La geldanamycine.....	36
1.4 Buts du projet de recherche.....	38

## CHAPITRE 1

1.0 Analyse de séquences en amont du gène codant pour une polycétide synthase de type I chez la souche productrice de geldanamycine <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> EF-76 .....	40
1.1 AGBESSI, S., C. DÉRY et C. BEAULIEU. Analysis of genetic sequences lying upstream genes encoding a type-I polyketide synthase in the geldanamycin producer <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> EF-76 (submitted to Biotechnology Letters).....	42

## CHAPITRE 2

2.0 Propriétés antagonistes de deux souches recombinantes de <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> obtenues par fusion de protoplastes intraspécifique.....	70
2.1 AGBESSI, S., J.BEAUSÉJOUR, C. DÉRY et C. BEAULIEU. Antagonistic Properties of Two Recombinant Strains of <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> Obtained by Intraspecific Protoplast Fusion (submitted to applied and environmental microbiology).....	73

CHAPITRE 3: DISCUSSION.....	98
-----------------------------	----

CONCLUSION GÉNÉRALE.....	103
--------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE.....	105
--------------------	-----

## LISTE DES FIGURES

1. Formation du précurseur de l'érythromycine, le 6-désoxyérythronolide B (6-dEB) par une PKS de type I. (D'après Donadio et al., 1991).....34
2. Structure chimique de la geldanamycine.....36

Figures tirées de Agbessi et al., 2002. Soumis à Biotechnology Letters.

1. PCR amplification of genomic DNA from different actinomycete strains.....53
2. Nucleotide sequence of the truncated PKS .....56
3. Comparison of the amino acids sequence of the EF-76 KS domain with KS domains from erythromycin (Ery3, Q03132; Ery5, Q03133), rifamycin (Rif2, Q9F847; Rif3, Q52789) and a type I polyketide of *S. avermitilis* (Q93H83)..... 57
4. Comparison of the amino acids sequence of the EF-76 AT domain with methylmalonyl-CoA acyltransferase domains from erythromycin (Ery2, Q03131) and rifamycin (Rif1, O52790; Rif3, O52789)..... 59
5. Comparison of the amino acids sequence of the EF-76 DH domain with DH domains from erythromycin (Ery2, Q03131) and rifamycin (Rif1, O52790; Rif3, O52789)..... 60



6.	Gene arrangement and restriction sites in the DNA region encoding a type I PKS, isolated in EF76.....	61
7.	Assay of geldanamycin inactivation by <i>S. lividans</i> TK24 transformed with a gene encoding a glycosyl transferase.....	62
8.	Alignment of the amino acids sequence of the EF-76 glycosyltransferase with glycosyltransferases from <i>S. coelicolor</i> (O69854), <i>Shigella boydii</i> (Q93CS6), <i>Rhizobium meliloti</i> (Q92VF2), <i>Serratia marcescens</i> (Q9X978), <i>Caulobacter crescentus</i> (Q9A3M9) and <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AAL44372).....	64

Figures tirées de Agbessi et al., 2002. Soumis à Applied and Environmental Microbiology.

1.	Growth of <i>Streptomyces scabies</i> EF-35 in the presence of <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> strains FP-60 (A), EF-76 (B), and FP-54 (C).....	86
2.	Growth curves of <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> strain EF-76 (A) and of two fusant strains FP-60 and FP-54 in a complex medium.....	87
3.	Hybridization between <i>Bam</i> H1-digested genomic DNAs of <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> strains EF-76, FP-54 and FP-60 and probe Kp38.....	88
4.	Hybridization <i>Bam</i> H1-digested genomic DNAs and probes Bm27 (A), Bm3 (B), and BS15 (C).....	89

5. Effect of *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76 and of two  
fusant strains on common scab of potato. Assay in growth  
chamber (A) and in field (B)..... 91

## LISTE DES TABLEAUX

1. Exemple de composés libérés par les racines de plantes.....9

Tableau tiré de Agbessi et al., 2002. Soumis à Applied and Environmental Microbiology.

1. Antagonistic properties of EF-76 and fusant strains FP-54 and FP-60.....92

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA:	acide aminé/ amino acid
ACP:	acyl carrier protein
ADN:	acide désoxyribonucléique
AHBA:	acide 3-amino-5-hydroxybenzoïque
ARNr:	ARN ribosomique
AT:	acyl transferase
C:	degré celsius
cm:	centimeter
DEB(S):	désoxyérythronolide B (synthase)
DH:	déshydratase
DNA:	deoxyribonucleic acid
ER:	énoyle réductase
kb:	kilobase
KR:	keto reductase
KS:	keto synthase
kV:	kilovolt
l:	litre/ liter
µl:	microlitre/ microliter
µg:	microgramme
M:	molaire/ molar
mg:	milligramme
ml:	millilitre/ milliliter
mM:	millimolaire/ millimolar
mRNA:	messenger ribonucleic acid
ng:	nanogramme
ORF:	open reading frame
PCR:	polymerase chain reaction

PKS: polyketide synthase  
rRNA: ribosomal ribonucleic acid  
U: unit

## INTRODUCTION

### 1.1 Les inconvénients de la lutte chimique

Les maladies végétales causent des pertes économiques importantes aux producteurs agricoles. Les producteurs utilisent abondamment des produits chimiques de synthèse pour contrer le développement de maladies. L'utilisation de tels produits a des effets néfastes sur l'environnement et la santé des écosystèmes. La littérature sur le sujet est abondante. Dans ce travail, les inconvénients cités en exemple seront ceux rencontrés lors de l'utilisation des principaux fongicides pour lutter contre le *Phytophthora*, un agent pathogène important qui cause des pourritures racinaires et parfois des dommages aux parties aériennes des plantes. En dépit des résultats spectaculaires apportés par la lutte chimique dans la protection des plantes contre le *Phytophthora*, des inconvénients majeurs sont apparus tels que la présence de résidus chimiques sur les plantes et dans l'environnement ainsi que l'apparition de souches résistantes au métalaxyl (ridomyl) ou à l'aliette (phosétyl-aluminium ou phosétyl-Al). Le métalaxyl et l'aliette sont les deux principaux fongicides utilisés contre le *P. fragariae* au Canada (Bower et Coffey, 1985a; Davidse et al., 1981; Dolan et Coffey, 1985; Dowley et O'Sullivan, 1981; Erwin et Ribeiro, 1996; Fenn et Coffey, 1985; Veigh et al., 1977). Le métalaxyl est en réalité un agent fongistatique puisqu'il inhibe la prolifération du *Phytophthora* sans pour autant le tuer complètement. Il inhibe la sporulation et la croissance du mycélium à l'intérieur du tissu infecté mais a un effet limité sur la germination des sporanges ou des zoospores (Bruck et al., 1980; Davidse, 1987; Schwinn et Margot, 1991; Schwinn et Urech, 1986). Son mode d'action réside en l'inhibition collective de l'ARN ribosomique par interférence avec l'activité du complexe ARN polymérase-brin matrice d'ADN (Davidse, 1997, 1998; Davidse et al., 1991; Schwinn et Urech, 1986).

Le spectre d'activité biologique du phosétyl-Al est plus restreint que celui du métalaxyl (Cohen et Coffey, 1986). Le phosétyl-Al n'a aucun effet inhibiteur sur la croissance du mycélium fongique (Cohen et Coffey, 1986; Fernando et Linderman, 1994). Par contre, il possède un effet inhibiteur marqué envers la formation des sporanges du *P. citrophthora* et du *P. parasitica* (Farih et al., 1981). La production de chlamydospores par le *P. parasitica* et le *P. cinnamomi* était aussi inhibée par le phosétyl-Al (Farih et al., 1981; Coffey et Joseph, 1985). La cible cellulaire du phosétyl-Al n'est pas connue à ce jour.

Les pesticides chimiques, dans une large mesure, représentent une classe de composés qui, malgré leur aide incontestable apportée dans la protection des végétaux, produisent très souvent, voire systématiquement, une grande variété de résidus toxiques dans l'environnement. Ceux-ci ont une répercussion directe sur la santé des végétaux, des animaux et des êtres humains. Ces effets néfastes incluent des changements importants dans la variété des plantes autochtones, le déclin de la population de papillons, l'augmentation du nombre de malformations chez les amphibiens (Barinaga, 1990; Blaustein et Wake, 1990; Longley et Sotherton, 1997; Lowcock et al., 1997; Nemes-Kosa et Cserhati, 1995; Russel et al., 1997, Spawn et al., 1997), l'implication dans le cancer du sein chez la femme et la contamination du lait maternel (Backwood et al., 1998), ainsi que les effets associés à l'augmentation du nombre d'autres cancers et aux maladies génétiques, à la baisse de fertilité masculine et au vieillissement (Carbonell et al., 1995; Bain et LeBlanc, 1996; Ribas et al., 1997). De plus, Kolpin et al. (1998) ont montré que les produits de dégradation de certains herbicides sont non seulement persistants et stables dans l'environnement avant leur minéralisation complète, mais encore, parfois aussi toxiques que le composé d'origine.

Le bromure de méthyle utilisé comme gaz de fumigation des sols de fraisières et framboisières contre le *P. fragariae* et autres champignons, pose le problème de l'exposition des agriculteurs. Ce pesticide est toxique envers le système nerveux central et cause des dommages aux poumons, aux yeux et à la peau. L'exposition directe provoque des maux de

tête, un affaiblissement général, une vision floue, des vertiges, des symptômes de psychoses et léthargie, ainsi que des pneumonies, paralysies, problèmes cardiaques et possiblement le cancer (WHO, 1995). Une étude réalisée en Grèce a montré que le niveau d'exposition de fermiers au bromure de méthyle atteignait 3 fois la limite sécuritaire, soit  $60 \text{ mg/m}^3$  au lieu de  $20 \text{ mg/m}^3$  pour un temps d'exposition de 10 minutes, seuil fixé par l'International Labour Organization en 1993 (Dimitriou et Tsoukali, 1998a). Le bromure de méthyle est aussi responsable pour environ 15% de la destruction de l'ozone (Bojkov, 1995). Dans le sol, le bromure de méthyle est dégradé en ion bromure qui est capté par les plantes et y est accumulé (WHO, 1995). Il entre ensuite dans le corps humain par la chaîne alimentaire, avec les conséquences déjà mentionnées sur la santé. Bien qu'il soit volatile, le bromure de méthyle demeure dans le sol jusqu'à 16 jours (Dimitriou et Tsoukali, 1998b). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 1995), il peut même être détecté jusqu'à 3 semaines après la fumigation dans différents types de sols. La teneur maximale en bromure de méthyle se situe dans les 40 cm sous la surface du sol. À cause de ces inconvénients, l'utilisation du bromure de méthyle sera supprimée progressivement aux États-Unis dès 2001 (Burgess *et al.*, 2000).

Le métalaxyl, quant à lui, possède une grande solubilité dans l'eau ( $7,1 \text{ g/l}$ ) contrairement à de nombreux autres fongicides et pesticides dont la solubilité est de quelques  $\text{mg/l}$  (Greco *et al.*, 1998). Cette particularité lui procure le désavantage, plus que les autres pesticides, de se retrouver aussi bien dans les eaux souterraines que de surface. Or, les pratiques conventionnelles de traitement de l'eau n'enlèvent pas les pesticides solubles, ce qui diminue la qualité de l'eau potable (Thurman *et al.*, 1992). Outre ses effets polluants et toxiques, l'utilisation du métalaxyl a mené à la sélection de champignons phytopathogènes résistants. Cette sélection est favorisée par l'utilisation de fongicides spécifiques, des périodes de contact prolongées avec l'agent pathogène et l'administration de doses chimiques sub-létales (Erwin, 1973; Evans, 1971). La plupart des fongicides exercent leur effet en



interagissant avec une cible protéique spécifique et c'est paradoxalement par l'étude génétique de champignons phytopathogènes résistants que de nombreux mécanismes de toxicité ont été élucidés (Steffens et al., 1996). La résistance est donc généralement due à une mutation dans le gène ciblé par le poison ayant pour conséquence l'altération du ou d'un site d'action du fongicide.

Très peu de temps après la première introduction du métalaxyl en 1977, la résistance est apparue chez le *P. infestans* agent causal du mildiou chez la pomme de terre et la tomate (Davidse et al., 1981; Dowley et O'Sullivan, 1981; Erwin et Ribeiro, 1996). En étudiant la génétique de la résistance au métalaxyl, Lee et al. (1999) ont suggéré que la résistance au fongicide chez le *P. infestans* est contrôlée par un seul gène dominant et que cette résistance varie par l'effet d'autres gènes mineurs. Fabritius et al. (1997) ont mis en évidence que les gènes d'effets mineurs étaient impliqués dans l'expression de la résistance et que ceux-ci sont situés sur différents chromosomes dans plusieurs isolats du *P. infestans*. De plus, il a été rapporté que ces isolats ont un plus grand pouvoir infectieux manifesté par une large étendue des lésions, une plus grande vitesse de germination des spores du champignon, et une plus grande capacité à entrer en compétition en absence de métalaxyl (Kadish et Cohen, 1992). Ces faits peuvent être perçus comme un véritable désastre découlant de l'utilisation massive du métalaxyl. Stehmann et De Waard (1995) ont par ailleurs montré que chez le *Botrytis cinerea*, le transport actif du fongicide à l'extérieur de la cellule était augmenté chez la souche résistante comparativement à la souche sensible. Ce type de mécanisme diminuant la concentration du composé chimique à l'intérieur de la cellule peut mener à la résistance à une large gamme de fongicides. Il devient alors très difficile de lutter contre de telles souches phytopathogènes (Steffens et al., 1996).

L'aliette étant moins utilisé que le métalaxyl, les inconvénients liés à son utilisation sont moins documentés. La dégradation du phosétyl-Al dans le sol est extrêmement rapide. Sa demi-vie se situait entre 0,32 et 1,89 jours dans trois sols qui différaient par leur teneur en matière organique, et après quatre jours, il n'était plus détecté. Les principaux produits de dégradation du phosétyl-Al sont le  $H_3PO_3$  et le  $CO_2$  (Piedallu et Jamet, 1985). Les bactéries et champignons du sol sont capables d'oxyder les phosphites en phosphates (Adams et

Conrad, 1953). Généralement, le pouvoir fongicide du phosétyl-Al et de son produit de dégradation, le  $H_3PO_3$  persistent dans le sol pendant plusieurs mois (Veigh et al., 1977). La résistance au phosétyl-Al et au  $H_3PO_3$  a été démontrée en laboratoire chez plusieurs espèces de *Phytophthora* (Bower et Coffey, 1985a; Dolan et Coffey, 1985; Fenn et Coffey, 1985). Le taux de mutation de ces espèces isolées dans le sol ou sur les plantes était comparable à celui trouvé chez les souches mutantes résistantes au métalaxyl. Comme dans le cas du métalaxyl, les isolats de *Phytophthora* résistants au phosétyl-Al étaient plus aptes à entrer en compétition sur la plante et dans le sol que les isolats sensibles (Bower et Coffey, 1985b). Le premier cas relatant l'inefficacité du phosétyl-Al en nature a été rapporté par Vegh et al. (1985). Cela a eu lieu dans une pépinière où l'action du phosétyl-Al s'est révélée être inefficace après son utilisation prolongée dans le contrôle de l'infection causée par le *P. cinnamomi* sur le *Chamaecyparis lawsoniana*. Les auteurs ont récupéré un isolat du *P. cinnamomi* résistant au phosétyl-Al et au  $H_3PO_3$ .

Face aux nombreux inconvénients survenus après l'utilisation de fongicides ou de produits fongistatiques chimiques, d'autres alternatives ont été recherchées afin de protéger les végétaux contre leurs agents pathogènes. Elles tentent de relever un double défi, soit celui de limiter efficacement les pertes agricoles dues aux maladies végétales et de préserver l'environnement et la santé des êtres vivants. L'une de ces alternatives faisant l'objet d'une recherche intensive est la lutte biologique.

## 1.2 La lutte biologique contre les champignons phytopathogènes du sol

La destruction ou la stabilisation d'une population d'agents pathogènes par des champignons ou des bactéries antagonistes du sol survient communément dans la nature. Il existe des sols

où malgré des conditions de T°, de pH et de teneur en eau favorables, la présence de la plante hôte et de son agent pathogène, la maladie ne se développe pas. De tels sols sont appelés sols suppressifs et le phénomène décrit est la fongistase. Lorsque ces sols sont traités à la chaleur ou par fumigation, ce qui a pour effet d'éliminer les formes végétatives de champignons et de bactéries, la maladie se développe chez la plante suite à l'introduction de l'agent pathogène. Ces sols doivent donc leur caractéristique phytoprotectrice à la présence de microorganismes antagonistes à l'agent pathogène (Davet, 1996). Corbaz (1990) a défini la lutte biologique comme étant "toute action mettant en jeu des organismes ou modifiant l'hôte, y compris des méthodes culturales, qui permettent de diminuer, par voie directe ou indirecte, les dommages causés par un parasite". Dans le contexte de notre travail, nous limiterons cette définition à l'utilisation de microorganismes antagonistes protégeant la plante contre des microorganismes phytopathogènes.

### 1.2.1 Mécanismes d'antagonisme en lutte biologique

La première qualité que doit posséder un microorganisme antagoniste dans le sol est la capacité à coloniser la rhizosphère de la plante. Selon Weller (1988), les bactéries sont considérées colonisatrices de racines si dès qu'introduites dans le sol elles se distribuent le long des racines, se multiplient et survivent plusieurs semaines en dépit de la compétition due à la microflore rhizosphérique indigène. Cette définition élimine les bactéries transitoires de la rhizosphère ou celles qui ne s'établissent sur les racines qu'en absence de compétition.

Ahmad et Baker (1987) ont utilisé le terme rhizocompétence ou affinité rhizosphérique pour décrire la capacité des agents de lutte biologique à croître, à fonctionner et à se maintenir dans la rhizosphère au fur et à mesure que la racine s'allonge. L'affinité rhizosphérique peut aussi être définie comme la capacité relative d'une souche à coloniser les racines (de façon superficielle ou interne) ou le sol rhizosphérique.

Les facteurs menant à la répartition active ou passive des bactéries sont biotiques et abiotiques, et ils sont encore mal compris. L'eau de percolation joue probablement un rôle essentiel dans la distribution passive des bactéries sur les racines (Parke et al., 1986; Liddell et Parke, 1989). Ce mouvement des bactéries à travers le sol au moyen de l'eau est affecté par leur niveau de flottabilité et de motilité. La motilité n'est cependant pas systématiquement nécessaire à l'efficacité en lutte biologique (de Wegger et al., 1987; Bowers et Parke, 1993). L'osmotolérance, c'est-à-dire la tolérance aux sols secs et à fort potentiel osmotique est aussi corrélée à la capacité de colonisation de la rhizosphère (Loper et al., 1985). La composition de la surface cellulaire bactérienne, principalement les polysaccharides extracellulaires influence la colonisation (Vesper, 1987; Anderson et al., 1988). Bien que la plupart des exsudats soient facilement métabolisés par les bactéries du sol, peu d'organismes sont capables de dégrader les hydrates de carbone complexes comme la cellulose, l'hémicellulose et la pectine (Foster *et al.*, 1983). La capacité à utiliser ces hydrates de carbone peut procurer un avantage compétitif aux bactéries introduites dans le sol. Selon Ahmad et Baker (1988), la grande affinité rhizosphérique d'une de leurs souches de *Trichoderma harzianum* est due à son activité cellulolytique élevée lui permettant ainsi d'utiliser de façon compétitive les débris des cellules desquamées et sénescents abondantes dans la rhizosphère.

Les microorganismes capables d'hydrolyser les mucilages qui enrobent les cellules épidermiques racinaires sont également peu nombreux. Ces mucilages contiennent des glycoprotéines hydrosolubles de haut poids moléculaire (Weller, 1988; Davet, 1996) dont la présence procure un avantage aux bactéries capables de les utiliser.

Les mécanismes par lesquels un microorganisme exerce son effet antagoniste sont la compétition pour la même niche écologique, l'antibiose, le mycoparasitisme par l'excrétion d'enzymes hydrolytiques et la lyse. La production par un microorganisme d'enzymes capables d'inactiver ou de dégrader une phytotoxine bactérienne ou fongique, bien que

n'ayant aucun effet sur la population de l'agent pathogène demeure un mécanisme à considérer dans la protection des végétaux par la lutte biologique.

La compétition a été définie par Clark (1968) comme étant "l'effet nuisible direct d'un organisme sur un autre ou indirectement, par la suppression de certaines ressources de l'environnement".

La première étape menant à l'infection de l'hôte dans le sol est généralement la germination des spores ou la différenciation de certaines composantes du thalle du champignon pathogène. Les champignons étant hétérotrophes, ils doivent trouver dans l'environnement leurs sources d'azote et de carbone (Durrieu, 1993). Les agents pathogènes obligatoires des plantes nécessitent, *in vitro*, des nutriments exogènes pour germer. Les sources exogènes de carbone nécessaires à la germination et à la pénétration sont apportées par l'hôte sous forme d'exsudats produits par les graines, les racines ou les parties souterraines d'un organe de la plante (Schroth et Hildebrand, 1964). Ces composés solubles de faible poids moléculaire diffusés passivement hors des cellules végétales, peuvent aussi être des composés azotés et des vitamines (Corbaz, 1990). Les zoospores des champignons du genre *Pythium* et *Phytophthora* sont d'ailleurs attirées par les exsudats racinaires. L'exsudation racinaire concerne des racines vivantes. Cependant, le système racinaire est en perpétuel renouvellement et la plupart des racines fines meurent entièrement au bout de quelques semaines, ce qui procure une autre source importante de matières organiques dans le sol. De nombreuses molécules solubles, insolubles ou gazeuses sont donc disponibles à proximité immédiate des racines (Tableau 1) (Davet, 1996).

Tableau 1. Exemple de composés libérés par les racines de plantes

Composés les plus communs	Composés plus spécifiques
Acides aminés	Flavonoïdes
Glucides simples ou polymérisés	Thiophènes
Acides organiques	Benzofuranes
Enzymes	Sulfures organiques
Vitamines	Hétérosides
Stérols	
Dérivés nucléiques	
Protéines provenant de la lyse cellulaire	

Les microorganismes de la rhizosphère (bactéries et champignons) vont entrer en compétition lorsqu'un élément indispensable à leur développement y est présent en quantité insuffisante. L'organisme le plus apte à utiliser rapidement l'élément limitant ou à le rendre inaccessible aux autres, supplantera ses adversaires. La compétition est d'autant plus intense que les microorganismes ont des exigences semblables. Elle a lieu essentiellement au sein d'une même niche écologique et concerne davantage les éléments nutritifs que l'espace vital. Il y aura compétition pour l'espace lorsque les microorganismes sont en compétition pour des sites de pénétration à la surface des racines comme les jonctions cellulaires et les sites d'émergence de nouvelles racines latérales. Les exsudats racinaires sont abondants à ces endroits (Davet, 1996; Weller, 1988).

Bien que ce soit un phénomène considéré comme important en lutte biologique, la compétition est difficile à mettre en évidence (cela est reflété par le nombre restreint

d'articles de recherche traitant de ce sujet). Parmi tous les éléments présents dans le milieu, il faut réussir à identifier lesquels sont limitants. Pour cela, il faut connaître avec précision les besoins des microorganismes, être capable de mesurer les variations des populations présentes et de mesurer les facteurs limitants. Néanmoins, lorsque l'utilisation d'un élément par un microorganisme nécessite le recours à un mécanisme très particulier, la compétition peut être mise en évidence. C'est le cas de la lutte pour l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

Le fer inorganique est un élément important dans de nombreuses réactions enzymatiques où il intervient comme cofacteur, dans le stockage de l'énergie et dans les systèmes de transport d'électrons. Le fer est abondant dans la croûte terrestre mais il y est présent la plupart du temps sous forme d'hydroxyde ferrique. Ainsi, le fer est seulement disponible pour les organismes à des concentrations inférieures ou égales à  $10^{-8}\text{M}$  dans des sols à pH neutre. La disponibilité de l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  chute de façon logarithmique lorsque le pH du sol augmente (Handelsman et Stabb, 1996; Moat et Foster, 1995). Cela représente donc un véritable défi pour les microorganismes du sol qui ont besoin de fer à des concentrations micromolaires pour leur multiplication. Ils répondent à la carence en  $\text{Fe}^{3+}$  par la synthèse et l'excrétion de composés chélateurs à haute affinité, les sidérophores (Moat et Foster, 1995). Les sidérophores sont de petites protéines se liant fortement au fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Le complexe fer-sidérophore est transporté par d'autres protéines à l'intérieur de la cellule où le  $\text{Fe}^{3+}$  est réduit en  $\text{Fe}^{2+}$ . Les *Pseudomonas* fluorescents sont reconnus pour produire des sidérophores leur permettant, dans le sol, de limiter le développement de certains champignons phytopathogènes. L'effet fongistatique de sols infestés par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, agent causal de la fonte des semis de lin, a été levé lorsqu'il y fût introduit une solution de Fe-EDTA à une concentration de  $50\ \mu\text{m}$ . La survie des semis de lin était réduite de 47% après quatre semaines en champ comparativement au même sol infesté, mais non amendé de Fe-EDTA. Ces résultats suggèrent que des microorganismes présents dans ces sols suppressifs où le fer est rare produisaient des sidérophores rendant cet élément non

disponible pour l'agent pathogène (Kloepper et al., 1980). Les mêmes auteurs ont ensuite testé la possibilité de convertir un sol non fongistatique où la maladie peut se développer, en un sol fongistatique en ajoutant au premier sol, soit la souche B10 de *Pseudomonas* isolée du sol fongistatique, soit son sidérophore, la pseudobactine. L'inoculation des graines de lin avec une suspension de la souche B10, suivie par la plantation en sol infesté par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* augmentait la survie des graines de 48 à 87% en comparaison aux graines non inoculées (Kloepper et al., 1980). Bien que réel, le rôle des sidérophores de *Pseudomonas* dans l'antagonisme a été minimisé par Hamdan et al. (1991). Dans leur étude, les auteurs ont obtenu par mutagenèse au transposon deux mutants de *P. fluorescens* appelés 2-79 et M4-80R. Ces mutants, déficients dans la synthèse de sidérophores fluorescents (pyoverdine dans ce cas) et incapables de transporter le fer à l'intérieur de leurs cellules, possédaient un effet inhibiteur *in vitro* aussi important envers le *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (champignon s'attaquant aux racines du blé) que les souches parentales possédant toujours leurs sidérophores. Les deux souches mutantes de *P. fluorescens* avaient quasiment le même pouvoir antagoniste que les souches parentales sauvages.

Lorsque les sidérophores procurent un réel avantage aux microorganismes qui les synthétisent, les souches les plus compétitives dans des milieux où le fer est en concentration limitante seront celles qui posséderont un sidérophore ayant une très grande affinité pour le fer, une conformation que les autres souches ne pourront pas reconnaître et qui, en plus, disposeront d'un système de transport capable d'utiliser les sidérophores d'autres espèces (Leong, 1986).

Un autre mécanisme mis en évidence chez certains microorganismes du sol, leur procurant un effet phytoprotecteur le mycoparasitisme. Le mycoparasitisme nécessite un contact physique entre l'agent antagoniste et l'agent phytopathogène précédant la lyse cellulaire de ce dernier. Cependant, la lyse en elle même, étant le résultat de la production d'enzymes hydrolytiques par le microorganisme antagoniste, peut s'effectuer à distance sans aucun contact physique entre les deux organismes.



L'agent antagoniste le plus cité pour le mycoparasitisme est sans aucun doute le champignon du genre *Trichoderma* (Chet et Inbar, 1994; Haran, 1996). Le mycoparasitisme est un phénomène complexe qui se déroule en plusieurs étapes. La première étape est la stimulation par laquelle le *Trichoderma* identifie la présence de son hôte et dirige ses hyphes vers lui par chimiotropisme. La nature du stimulus est encore mal connue (Davet, 1996). Ensuite, vient la reconnaissance caractérisée par la détection de substances chimiques et d'éléments à la surface du futur champignon parasité. À ce sujet, Elad et al. (1983) ont découvert que des glycoprotéines appelées lectines étaient produites par certains agents pathogènes comme le *Rhizoctonia solani*. Ces lectines semblent être impliquées dans la reconnaissance et la spécificité de l'interaction entre le *Trichoderma* et son hôte fongique. Le rôle des lectines dans le mycoparasitisme et la lutte biologique a été prouvé et discuté par Inbar et Chet (1992, 1997). Le *T. harzianum* ne colonisait des fibres de nylon, que lorsqu'elles étaient enduites de concanavaline A ou de la lectine purifiée du *Sclerotium rolfsii*, et formait en plus des *appressoria* (structures caractéristiques des champignons en phase de parasitisme). Les fibres de nylon témoins non enduites de glycoprotéine n'étaient pas colonisées par le *T. harzianum* (Inbar et Chet, 1992). Après la reconnaissance de son hôte, les extrémités en crochet des hyphes de *Trichoderma* sécrètent des enzymes hydrolytiques telles que les chitinases et les glucanases, leur permettant de dégrader les parois cellulaires fongiques et d'envahir l'hôte. Les résultats obtenus par Lorito et al. (1993) ont démontré que l'endochitinase et l'exochitinase purifiées de *T. harzianum* inhibaient la germination des spores et l'élongation du tube germinatif des champignons *Fusarium* spp., *Ustilago avenae*, *U. necator* et *Botrytis cinerea*. Ils ont aussi montré que les deux enzymes purifiées et administrées à des concentrations supérieures à 1 mg/ml n'avaient aucun effet sur la germination des spores et l'élongation des hyphes du *Pythium ultimum* qui ne contient pas de chitine dans sa paroi. Cette concentration enzymatique était 6 à 22 fois plus élevée que celles nécessaires pour inhiber les autres genres de champignons testés. Les glucanases excrétées par le *T. harzianum* sont les  $\beta$ -1,3-exo-,  $\beta$ -1,3-endo- et  $\beta$ -1,6-endoglucanases (Haran et al., 1996). L'ultime étape du mycoparasitisme est la lyse du contenu cellulaire du champignon parasité provoquée par

la sécrétion d'autres enzymes extracellulaires de *Trichoderma* telles que les protéases et les lipases. Geremia et al. (1993) ont identifié une protéase alcaline (Prb1) chez le *T. harzianum*. Ils ont suggéré que Prb1 était impliquée dans le mycoparasitisme, puisqu'elle était induite par du mycélium stérilisé et réprimée par le glucose. Pour une efficacité hydrolytique maximale, toutes ces enzymes agissent en synergie (Haran et al., 1996; Lorito et al., 1993).

Plusieurs études ont démontré l'utilisation efficace de sols amendés du *Trichoderma* dans la lutte contre le *Phytophthora parasitica* var. *piperina* (Mehrotra et Tiwara, 1976), le *Pythium splendens* (Bolton 1978), le *Pythium aphanidermatum* (Bolton, 1980), le *Rhizoctonia solani* et le *Sclerotium rolfsii* (Elad et al., 1983). Le *T. harzianum* est d'ailleurs l'agent actif du TRICHODEX utilisé contre la pourriture post-récolte des pommes et est combiné au *T. polysporum* dans le BINAB-T, utilisé contre la pourriture du bois (Esposito et da Silva, 1998; Ricard, 1981).

Turhan (1993), au moyen de la microscopie électronique, n'a tenu compte que du mycoparasitisme comme critère principal de sélection de nouvelles souches fongiques antagonistes à l'*Alternaria alternata*. Par cette méthode, 8 nouveaux mycoparasites d'*Alternaria* ont été identifiés comme agents de lutte biologique prometteurs.

En dehors des champignons mycoparasites, les bactéries antagonistes excrètent également des enzymes hydrolytiques responsables de la lyse des parois cellulaires du champignon. La lyse, en elle même, peut se manifester sans contact physique entre l'agent pathogène et le microorganisme antagoniste. Inbar et Chet (1991) ont isolé une souche chitinolytique d'*Aeromonas caviae* de racines de plants sains de haricots artificiellement infestés par le *Sclerotium rolfsii*. En serre, la bactérie démontrait une grande capacité à lutter contre le *Rhizoctonia solani* et le *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* agents pathogènes du coton. Les symptômes de la maladie étaient réduits de 57 à 78% respectivement. L'*A. caviae* était aussi antagoniste au *S. rolfsii* (réduction des symptômes de la maladie de 60%). Les auteurs ont montré que l'*A. caviae* lysait partiellement le mycélium vivant du *R. solani*, *S. rolfsii* et

du *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* lorsque celui-ci servait d'unique source de carbone en milieu liquide. Ils ont également observé une forte activité chitinolytique lorsque de la chitine colloïdale était utilisée comme source de carbone. L'activité chitinolytique étant reconnue comme mécanisme important dans la lutte contre les champignons à parois cellulaires chitineuses ou partiellement chitineuses (Herrera-Estrella et Chet, 1999), elle a été directement utilisée comme critère de criblage de bactéries antagonistes à certains champignons phytopathogènes (Gomes et al., 2000). Mahadevan et Crawford (1997) ont décrit le rôle d'une chitinase dans l'activité antifongique de *Streptomyces lydicus* WYEC108. Cette souche, en plus de produire des antibiotiques, avait la capacité d'excréter de grandes quantités de chitinase en présence de parois cellulaires du *Pythium* et de l'*Aphanomyces*. Grâce aux outils apportés par les techniques de biologie moléculaire, l'obtention de microorganismes mutants affectés négativement ou positivement dans la production d'enzymes hydrolytiques a permis de mettre en évidence de façon incontestable le rôle de la lyse dans l'antagonisme. Ainsi, au cours d'expériences réalisées en serre, Chernin et al. (1995) ont illustré l'efficacité de l'*Enterobacter agglomerans* pour lutter contre le *Rhizoctonia solani*, un agent pathogène du coton. L'effet antagoniste avait disparu lorsque les plantes étaient traitées avec la bactérie mutante ne produisant plus d'enzymes chitinolytiques. Le pourcentage de plants atteints était 3,5 fois plus faibles avec la souche sauvage d'*Enterobacter agglomerans* que celui obtenu avec des graines de coton inoculées avec la souche mutante.

Les champignons phytopathogènes à parois cellulaires glucaniques, quant à eux, peuvent être les victimes de nombreux microorganismes (le *Trichoderma*, *Streptomyces* et autres actinomycètes) possédant d'efficaces glucanases. Bien que faible *in vitro*, l'activité cellulolytique de *Micromonospora carbonacea* lui permettait aisément de dégrader les parois cellulaires des hyphes de *Phytophthora cinnamomi* et de protéger efficacement la plante *Banksia grandis* contre son agresseur, en serre (El-Tarabily et al., 1997). Bien qu'ils aient illustré le rôle des cellulases de *M. carbonacea*, les auteurs reconnaissent cependant, que l'antibiose joue aussi un rôle dans leurs essais d'antagonisme.

Trois activités glucanolytiques différentes ont été détectées chez des streptomycètes antagonistes au *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. Les bactéries possédaient les activités  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,4- et  $\beta$ -1,6-glucanases en présence de laminarine, cellulose et pustulane respectivement. De plus, elles produisaient des zones de dégradation sur milieu solide contenant comme source de carbone du mycélium fragmenté et autoclavé du *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. Les glucanases produites par ces mêmes souches lysaient les cellules vivantes du *Phytophthora* (Valois et al., 1996). Trejo-Estrada et al. (1998a) ont détecté outre l'activité chitinase, une activité  $\beta$ -1,3-glucanase chez le *Streptomyces violaceusniger* YCED9 isolé du sol, antagoniste au *Pythium ultimum* agent pathogène de la laitue. Selon les auteurs, l'enzyme était impliquée dans l'antagonisme au *P. ultimum*.

Même si les enzymes hydrolytiques contribuent à l'antagonisme, la lutte biologique est attribuée, la plupart du temps, à l'antibiose, sans doute parce que c'est un phénomène facilement mis en évidence *in vitro* et cela de façon spectaculaire. L'antibiose désigne la situation où un organisme exerce un effet inhibiteur sur la croissance d'un autre organisme dont il tend à limiter ou à éliminer la population.

### 1.2.2 L'antibiose en lutte biologique

L'antibiose repose donc sur l'émission par un microorganisme de métabolites secondaires solubles ou volatiles responsables de l'inhibition de la croissance d'un second microorganisme. Les cas les plus décrits d'antibiose impliquent une bactérie productrice de métabolites secondaires antagoniste à une autre bactérie ou champignon phytopathogène (Fravel, 1988; Handelsman et Stabb, 1996; Thomashow, 1996; Weller, 1988). La production d'antibiotiques requiert que le microorganisme producteur ait à sa disposition les éléments

nutritifs indispensables à la biosynthèse de ces substances (Baker, 1968). Les nutriments ne sont pas dispersés de façon uniforme dans le sol mais sont localisés dans la sphère, la rhizosphère et autour des débris végétaux et des lésions des plantes. L'extraction des antibiotiques du sol ou de fragments végétaux est souvent difficile. Les facteurs qui influencent l'efficacité de récupération des antibiotiques incluent la stabilité de l'antibiotique, ses interactions chimiques et physiques avec la matrice de l'échantillon et le solvant d'extraction, ainsi que les diverses manipulations effectuées tout au long du processus de récupération. Ce n'est qu'à partir de l'antibiotique produit *in vitro* que les autres caractéristiques comme la solubilité, la thermostabilité, la photosensibilité et la vulnérabilité à l'oxydation pourront être déterminées. Les antibiotiques produits dans le sol s'adsorbent instantanément sur les matières organiques et les groupements chargés à la surface du sol, rendant leur récupération davantage périlleuse (Blum et al., 1994; Chiou, 1989; Weber et Miller, 1989). Le pH du sol est un paramètre dont il faut aussi tenir compte car dans les sols où le pH se situe entre 4,5 et 6,5 par exemple, les formes non ioniques des acides organiques et composés phénoliques sont facilement et irréversiblement liés aux matières organiques du sol (Chiou, 1989; Hasset et Banwart, 1989) ou polymérisés à l'intérieur des substances humiques du sol (Dalton et al., 1983, 1987, 1989). Néanmoins, la détection et le dosage d'antibiotiques dans le sol a permis de démontrer, sans équivoque, leur biosynthèse *in situ* et leur contribution à l'antagonisme microbien. Thomashow et al. (1990) ont isolé l'antibiotique acide phénazine-1 carboxylique (PCA) produit par le *Pseudomonas fluorescens* 2-79 de racines de blé après le traitement des graines par la souche sauvage alors que ce n'était pas le cas avec la souche mutante ne produisant plus de PCA. Que cela soit en présence ou en absence de l'agent pathogène *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, des quantités similaires de PCA (28 à 43 ng/g racine avec la rhizosphère) étaient détectées avec la souche sauvage de *P. fluorescens* 2-79, même si la population bactérienne était 10 fois plus faible sur les racines en absence de l'agent pathogène. Lorsque le sol était traité à la vapeur avant les tests d'antagonisme, la quantité d'antibiotique récupérée était 10 fois plus grande (250 à 365 ng) et la population des bactéries introduites était également 10 fois plus importante. Les auteurs

ont démontré la corrélation entre la présence d'antibiotique et le contrôle de la maladie causée par le *G. graminis* var. *tritici*.

Le large spectre d'activité biologique associé aux phénazines est semble-t-il dû à leur capacité à subir un cycle d'oxydo-réduction en présence d'agents réducteurs variés et d'oxygène moléculaire. Cela mènerait à l'accumulation de superoxyde toxique, de peroxyde d'hydrogène et éventuellement à un stress oxydatif cellulaire voire à la mort (Britigan et al., Hassan et Fridovich, 1980).

Dans le cas où l'antibiotique produit dans le sol est trop instable ou trop peu abondant pour être détecté directement, une approche génétique permet de mettre en évidence l'expression *in situ* de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antibiotique. Cette approche nécessite au préalable une bonne connaissance de l'organisation des gènes codant pour la biosynthèse de l'antibiotique ainsi qu'une connaissance adéquate de leurs fonctions. Gutterson et al., (1986) ont isolé cinq gènes *afu* impliqués dans la biosynthèse de l'oomycine A, métabolite secondaire produit par le *P. fluorescens* Hv37a. Au moyen d'une souche génétiquement modifiée dans laquelle ils ont introduit un plasmide comportant la fusion du promoteur d'un gène *afu* (le gène *afuE*) et du gène rapporteur *lacZ* (codant pour la  $\beta$ -galactosidase), Howie et Suslow (1991) ont démontré l'expression *in vivo* des gènes de biosynthèse de l'oomycine A. L'expression du gène *afuE* a été détectée par l'activité  $\beta$ -galactosidase *in situ* chez la souche modifiée génétiquement inoculée sur des graines de coton plantées en sol. L'activité  $\beta$ -galactosidase était quasiment absente chez la souche qui comportait la même modification génétique ajoutée à la rupture génique par transposon d'un gène *afu*, la rendant incapable de produire l'oomycine A.

Des mutants du *P. fluorescens* 2-79 déficients dans la production de PCA ont été utilisés pour démontrer le rôle de l'antibiose dans la protection du blé contre le *G. graminis* var. *tritici* (Thomashow et Weller, 1988; Thomashow et al., 1990). Les mutants déficients dans la production de phénazine n'inhibaient plus la croissance du champignon *G. graminis* var. *tritici* et étaient beaucoup moins efficaces dans la protection du blé. Lorsque ces mutants étaient complétés génétiquement pour retrouver leur phénotype originel, ils retrouvaient leur activité antifongique *in vitro* et leur capacité à protéger le blé contre l'agent phytopathogène. D'après les travaux de Hamdan et al. (1991), les doubles mutants (déficients dans la production de PCA et de sidérophore pyoverdine) étaient toujours capables d'inhiber la croissance du champignon *in vitro* et de limiter, mais dans une moindre mesure, les symptômes de la maladie. Un deuxième facteur antifongique a été identifié chez le *P. fluorescens* 2-79 comme intermédiaire probable de la biosynthèse de PCA et capable d'augmenter le pouvoir d'antibiose de la bactérie. Toutefois, la biosynthèse de PCA demeure l'élément déterminant de contrôle de la maladie (Hamdan et al., 1991). Toujours par la même technique de mutagenèse au transposon Tn5, une autre souche, le *P. fluorescens* CHAO productrice du métabolite secondaire, 2,4-diacétylphloroglucinol (Phl), a été mutée. Une souche mutante déficiente dans la production de Phl perdait sa capacité à inhiber *in vitro* les champignons *Thielaviopsis basicola*, causant la pourriture noire des racines du tabac et le *G. graminis* var. *tritici*, agent pathogène du blé. Cette bactérie mutante était aussi fortement diminuée dans sa capacité à protéger les deux plantes contre leurs agents pathogènes respectifs. La complémentation génétique de la souche mutante lui a redonné sa capacité à produire le Phl, à inhiber la croissance des champignons *in vitro* et à contrôler la maladie chez les plantes. Le Phl a pu être extrait de la rhizosphère des plants inoculés (Keel et al., 1992)

Les mutants déficients dans la production d'antibiotique sont un outil de choix pour illustrer le rôle des antibiotiques dans la lutte biologique. Un autre moyen de mise en évidence génétique de l'antibiose est de montrer la relation quantitative qui existe entre la production d'antibiotique et la suppression de la maladie. La transformation génétique de *P. fluorescens* CHAO productrice de Phl et de pyolutéorine avec un fragment d'ADN provenant de son

propre génome a induit une augmentation de la biosynthèse des deux antibiotiques. Comparativement à la souche sauvage non transformée, la souche recombinante procurait une meilleure protection aux plants de concombre infectés par le *Pythium ultimum*, soit un poids frais végétal deux fois plus élevé deux semaines après l'infection fongique et trois semaines après la plantation des graines (Maurhofer et al., 1992).

Une multitude de gènes codant pour la biosynthèse de nombreux métabolites secondaires anti-fongiques d'origine bactérienne, impliqués dans la protection des végétaux ont déjà été caractérisés. Voici quelques uns des ces métabolites secondaires: le 2,4-diacétylphloroglicinol de *P. fluorescens* Q2-87 (Bangera et Thomashow, 1996); la pradimicine d'*Actinomadura hibisca* (dairi et al., 1997), un agent antifongique se liant au mannose à la surface des cellules; l'AFC-BC11 de *Burkholderia cepacia* BC11 (Kang et al., 1998), un lipopeptide causant des changements morphologiques, l'altération du pH intracellulaire et de l'organisation des mitochondries chez les champignons pathogènes (Thrane et al., 199;), la zwittermicine A de *Bacillus cereus* (Stohl et al., 1999) et la nystatine de *Streptomyces noursei* ATCC 11455 (Brautaset et al., 2000), dont la cible est l'ergostérol des membranes cellulaires (Wang et al., 1998). L'étude approfondie du rôle de ces gènes dans la régulation et la biosynthèse des antibiotiques ayant un rôle majeur en protection des végétaux ouvre de grandes possibilités tant dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'antibiose que dans l'amélioration des performances des agents de lutte biologique (Handelsman et Stabb, 1996; Thomashow, 1996).

L'antibiose dans le sol a aussi été observée dans d'autres systèmes. *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*, qui produit la geldanamycine, contrôlait la pourriture des racines de pois causée par le *Rhizoctonia solani* en sol stérile (Rothrock et Gottlieb, 1984). Trejo-Estrada et al. (1998a; b) ont rapporté l'implication possible de 3 composés antifongiques (la guanydyfungine A, la nigéricine, ionophore pour les cations monovalents dans les mitochondries (Zoratti et al., 1984) et la geldanamycine) dans l'antagonisme marqué de *Streptomyces violaceusniger* YCED9 envers des souches de champignons appartenant à divers groupes taxonomiques.



Bien que l'antibiose soit un mécanisme d'antagonisme important en lutte biologique, les microorganismes phytopathogènes soumis aux effets toxiques des antibiotiques produits dans le sol, sont eux aussi susceptibles de développer une résistance à ces composés. La résistance des microorganismes peut être (i) naturelle par l'existence d'un ou plusieurs mécanismes de résistance innés, donc propres à l'espèce; (ii) acquise, par l'acquisition d'un mécanisme de résistance chez une souche habituellement sensible; (iii) croisée, faisant référence au spectre d'inactivation d'un mécanisme de résistance vis-à-vis de divers antibiotiques appartenant à la même famille ou sous-groupe; (iv) chromosomique, lorsqu'elle est liée à une mutation située sur le chromosome; (v) extrachromosomique lorsqu'elle est liée à un fragment d'ADN généralement plasmidique; et (vi) associée quand il s'agit de résistance à des familles d'antibiotiques différentes causée essentiellement par des transposons ou éléments génétiques mobiles, situés sur le chromosome ou sur un plasmide.

Les mécanismes biochimiques impliqués dans la résistance aux antibiotiques sont: (i) l'inactivation ou la détoxification enzymatique du composé; (ii) l'interférence avec les mécanismes de transport (imperméabilité et efflux); et (iii) modification de la cible de l'antibiotique (Moat et Foster, 1995).

L'un des groupes de microorganismes les plus prometteurs en lutte biologique, essentiellement grâce à leur grande capacité de production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires et de métabolites secondaires toxiques est celui des *Streptomyces*.

### 1.2.3 Les *Streptomyces* antagonistes de bactéries et champignons phytopathogènes

Les *Streptomyces* sont des bactéries Gram + appartenant au grand groupe des actinomycètes, qui possède la particularité d'avoir une haute teneur en nucléotides G+C dans le génome. Ce sont des saprophytes du sol, environnement qu'ils colonisent grâce à leur croissance sous forme de filaments branchés constituant le mycélium. Les hyphes végétatifs sont unicellulaires et se différencient en conidies qui participent à la dissémination et à la persistance des *Streptomyces* dans le sol (Waksman, 1967). Les conidies de *Streptomyces* sont résistantes à la pénurie de nutriments et à la dessiccation, contrairement au mycélium sensible à la sécheresse (Karagouni et al., 1993). Les *Streptomyces* jouent un rôle essentiel dans la dégradation de la matière organique du sol en produisant de nombreuses enzymes extracellulaires. Ces dernières hydrolysent les polymères complexes que sont la chitine, la cellulose, le xylane, la lignine etc (McCarthy, 1987; McCarthy et Williams, 1992; Wang et al., 1989). Le genre *Streptomyces* est aussi remarquable par la diversité des métabolites secondaires bioactifs qu'il produit. Soixante et un pourcent des métabolites secondaires connus à ce jour chez les champignons et les bactéries sont produits par les actinomycètes dont 80% appartenant au genre *Streptomyces* (Kieser et al., 2000). Certaines études ont aussi relaté la grande capacité des *Streptomyces* à coloniser la rhizosphère de plantes. Le *Streptomyces griseoviridis* se retrouvait en plus haute densité dans la rhizosphère de plants de navets et de carottes que dans le reste du sol lorsque la souche était inoculée dans le sol avant la plantation des graines (Kortemaa et al., 1997). La capacité à coloniser la rhizosphère dépend des espèces végétales car d'après Kortemaa et al. (1994), les racines de navet étaient davantage colonisées que les racines de carottes. Les résultats obtenus par Elliott et al. (1994) suggèrent que diverses espèces de *Streptomyces* sont capables de coloniser les racines de blé et de s'y multiplier après que les graines aient été inoculées puis plantées en sol non stérile. Tous ces traits phénotypiques procurent aux *Streptomyces* un avenir prometteur comme agents de lutte biologique dans la protection des végétaux.

De nombreux auteurs ont expérimentalement démontré le rôle bénéfique que jouent les *Streptomyces* dans la protection des végétaux contre les champignons phytopathogènes. L'amendement de milieux de croissance artificiels pour géraniums avec des suspensions de spores et mycélium de *Trichoderma viride* ou de *Streptomyces* sp. retardait de 3 semaines à un mois les symptômes causés par le *Pythium splendens* (Bolton, 1978). De même, le degré de protection contre la pourriture des racines et la flétrissure soudaine de plants de poinsettia causée par le *Pythium aphanidermatum* était directement proportionnels à la quantité de microorganismes antagonistes incorporés (le *T. viride* ou le *Streptomyces* sp.) (Bolton, 1980). Une autre observation concernant la protection des plantes par les *Streptomyces* a été relatée par Tahvonen (1993). De la tourbe de sphaigne incorporée à des milieux de culture pour plantes protégeait le chou-fleur de la fonte des semis et la tomate de la flétrissure fusarienne. Cet effet disparaissait lorsque la tourbe était stérilisée et réapparaissait lorsqu'un peu de tourbe fraîche était ajoutée à celle stérilisée. Les microorganismes les plus souvent retrouvés dans cette tourbe de sphaigne étaient les bactéries *Streptomyces* spp. suivies des champignons *Penicillium* spp., *Motierella* spp. et *Trichoderma viride*. Plusieurs espèces de *Streptomyces* prises séparément inhibaient la croissance de nombreux champignons *in vitro*. L'auteur de cette étude a même observé une corrélation entre le niveau de production d'antibiotique des *Streptomyces* et leur capacité à protéger la plante contre les champignons phytopathogènes *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* et *Pythium* en sol stérile (Tahvonen, 1982b). L'une des souches de *Streptomyces* a été identifiée comme étant le *S. griseoviridis* (Tahvonen, 1982a). Un biofongicide commercial (Mycostop) a d'ailleurs été développé en Finlande à partir de cette souche (Lahdenperä, 1991). Les deux principaux mécanismes décrits, assurant aux *Streptomyces* leur aptitude à combattre la multiplication des champignons phytopathogènes sont la lyse et l'antibiose (Chamberlain et Crawford, 1999; El-Tarabily et al., 1997; Mahadevan et Crawford, 1997; Rothrock et Gottlieb, 1981; Toussaint et al., 1997; Trejo-Estrada et al., 1998a; b; Valois et al., 1996). D'autres facteurs pouvant affecter la protection des végétaux par les *Streptomyces* ou autres actinomycètes sont l'affinité rhizosphérique (Elliott et al., 1994; Kortemaa et al., 1994; 1997; Nemeč et al., 1996;

Ryan et Kinkel, 1997), l'hyperparasitisme dans le cas de *Micromonospora carbonacea* et de *Actinoplanes philippines* (El-Tarabily et al., 1997) ou la dégradation d'une phytotoxine (Doubou et al., 1998). Doubou et al. (1998) ont montré qu'une espèce de streptomycète avait la capacité de dégrader la thaxtomine, phytotoxine produite par *Streptomyces scabies*, agent causal de la gale commune de la pomme de terre. La dégradation de la phytotoxine pourrait conférer à l'agent antagoniste, l'aptitude à protéger la plante contre le microorganisme phytopathogène. Ce type de mécanisme en lutte biologique est cependant rarement rapporté dans la littérature.

L'antibiose et la lyse étant les deux principaux mécanismes d'antagonisme chez les *Streptomyces*, ils ont servi de critères de sélection pour le criblage de nombreuses espèces de *Streptomyces* phytoprotecteurs. Dans un premier temps, le criblage des souches s'effectue *in vitro* soit par des tests d'antibiose soit par des tests de croissance en milieu gélosé contenant le mycélium fragmenté du champignon phytopathogène. Ensuite, les souches sont testées en serre ou chambres de croissance en présence de la plante hôte avant d'être évaluées en champ où les facteurs climatiques et édaphiques seront les paramètres additionnels entrant en jeu. Toutes les méthodes de criblage sont sélectives. De ce fait, seulement une fraction de la microflore est détectée (Knudsen et al., 1997). D'après Crawford et al. (1993), les milieux de culture à faible teneur en nutriments organiques sont meilleurs pour isoler un grand nombre d'actinomycètes du sol. La majeure partie des actinomycètes qu'ils ont isolés étaient des *Streptomyces*. Afin d'isoler des actinomycètes antagonistes au *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, Valois et al. (1996) ont criblé des souches selon leur capacité à hydrolyser les parois cellulaires fragmentées du champignon en milieu gélosé. Ils ont ainsi, isolé des souches effectivement efficaces en chambre de croissance pour protéger les plants de framboisiers contre leur agresseur. D'autres méthodes de criblage utilisent directement la plante hôte comme substrat au lieu des substrats synthétiques habituels. El-Tarabily et al. (1997) ont modifié le test de pouvoir pathogène décrit par Groom et Perry (1985) pour évaluer directement sur des carottes, la capacité de 45 actinomycètes à inhiber la croissance du champignon *Pythium coloratum*. Cinq actinomycètes dont 2 *Streptomyces* prévenaient la formation de lésions sur le légume. Chamberlain et Crawford (1999) ont, quant à eux, réalisé

la croissance de souches de *Streptomyces* en milieu liquide directement en présence de chaume. Ils ont ensuite mélangé le filtrat de culture à un milieu gélosé sur lequel ils ont évalué, par rapport à des témoins, la capacité de champignons phytopathogènes du gazon à croître en présence des métabolites secondaires synthétisés par les *Streptomyces* en présence de chaume.

Bien qu'il arrive que des souches ayant des propriétés antagonistes spectaculaires *in vitro* démontrent une faible capacité à protéger les plantes en serre ou en chambre de croissance (Crawford et al., 1993; Rothrock et Gottlieb, 1981; Trejo-Estrada et al., 1998b; Yuan et Crawford, 1995), de nombreux exemples ont montré une corrélation positive entre les résultats obtenus *in vitro* et ceux obtenus *in vivo* (Chamberlain et Crawford, 1999; Jones et Samac, 1996; El-Tarabily et al., 1996; 1997; Tahvonen et al., 1993; Trejo-Estrada et al., 1998b; Valois et al., 1996). Cette corrélation positive sera d'autant plus grande que les conditions de criblages *in vitro* miment le plus possible les conditions retrouvées dans le sol, comme par exemple, le pH, ou la nature biochimique des exsudats racinaires ou des composés végétaux.

L'utilisation des *Streptomyces* peut parfois produire des effets indésirables sur les plantes cultivées. En effet, la germination des graines ou la croissance de certaines plantes peut être affectée par les métabolites secondaires produits par les *Streptomyces* dans la rhizosphère ou la spermosphère. Les résultats obtenus par Rothrock et Gottlieb (1984) ont démontré la phytotoxicité de la geldanamycine envers le pois (*Pisum sativum*) lorsque l'antibiotique purifié ou la souche productrice, le *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* étaient introduites dans le sol avant la transplantation des graines. Cet effet peut cependant, dépendre du stade de croissance de la plante ou de l'espèce végétale puisque Valois et al. (1996) n'ont remarqué aucun effet phytotoxique lorsque la même espèce bactérienne était introduite en sol avant la plantation de framboisiers plus mûres, âgés de 14 jours. On peut aussi suggérer que la biosynthèse de geldanamycine dans la rhizosphère ou la spermosphère dépend de la composition chimique ou biochimique du sol ainsi que de la nature des exsudats, variables d'une plante à l'autre. En effet, Trejo-Estrada et al. (1998a) n'ont observé aucun effet herbicide *in vivo* de la souche productrice de geldanamycine *S. violaceusniger* YCED9,

contrairement à Heisey et Putnam (1986) qui ont montré l'effet herbicide de *S. hygrosopicus* productrice du même antibiotique. Parmi les 12 souches d'actinomycètes antagonistes au *P. ultimum* isolées par Crawford *et al.* (1993), la moitié retardait la germination des graines de laitue et l'émergence des pousses de 1 à 3 jours. De plus, après 18 jours de croissance en pots, la biomasse de certains plants inoculés avec les actinomycètes et en absence de l'agent pathogène était réduite de façon significative comparativement aux plants témoins non traités du tout. Les plants traités par les actinomycètes conservaient malgré tout, le même aspect sain que les plants témoins. Au cours de la même expérience, les auteurs ont néanmoins observé qu'une de leurs souches augmentait significativement la biomasse des plants inoculés.

Les actinomycètes peuvent donc aussi avoir la capacité de promouvoir la croissance des plants dont ils colonisent la rhizosphère. À ce sujet, les résultats obtenus par Lahdenperä (1991) ont démontré que le biofongicide commercial, Mycostop dont l'agent bioactif est le *S. griseoviridis*, protégeait non seulement les fleurs de la flétrissure mais encore, augmentait leur production de 12 à 33% en comparaison aux fleurs saines non inoculées. Chamberlain et Crawford (1999) ont aussi observé que deux souches de *Streptomyces* YCED9 et WYE53 favorisaient la croissance du gazon en absence de champignon phytopathogène. El-Tarabily *et al.* (1996; 1997) quant à eux, ont décrit des exemples où l'augmentation de la croissance des plantes due à la présence de *Streptomyces* se produisait malgré la présence de l'agent pathogène. Selon El-Shanshoury (1994), cet effet favorable provoqué par ces rhizobactéries serait dû à la biosynthèse de régulateurs de croissance végétaux. Les résultats de son étude démontrent que l'enrobage des graines de coton avec de l'acide-3-indole acétique d'une part ou des cellules de *S. atroolivaceus* d'autre part, augmentait le poids frais des tiges et des feuilles de cotonnier par rapport aux graines non inoculées. L'auteur a cependant observé des effets moins prononcés lorsque les graines de coton étaient enduites de filtrat de culture ou de l'extrait à l'éther de diéthyle du surnageant de culture de la souche *S. atroovilaceus*. Outre la croissance des végétaux, des espèces de *Streptomyces* favoriseraient la germination de certains champignons mycorhiziens (Tylka *et al.*, 1991).

Bien que parfois controversés (Jones et Samac, 1996), des résultats obtenus lors d'études de terrain ont démontré le réel potentiel des *Streptomyces* comme agents de lutte biologique (Chamberlain et Crawford, 2000; Nemeč et al., 1996). Par exemple, le biofongicide qui a été élaboré en Finlande est efficace en champ contre de nombreux champignons phytopathogènes (Lahdenperä, 1991; Mohammadi, 1992). De même, la souche EF-76 isolée en 1992 d'un tubercule de pomme de terre dans notre laboratoire (Faucher et al., 1992) et qui, en serre, protège efficacement le framboisier contre la pourriture des racines causée par le *P. fragariae* var. *rubi* (Valois et al., 1996) est en bonne voie d'être utilisée en champ comme biofongicide.

### 1.3 Biosynthèse des métabolites secondaires chez les *Streptomyces*

#### 1.3.1 Généralités

La biosynthèse des métabolites secondaires chez les *Streptomyces* dépend généralement de la phase de croissance des cellules. Elle coïncide avec le début de la différenciation morphologique. En milieu liquide, la production d'antibiotique se produit dès la fin de la phase exponentielle de croissance et au cours de la phase de plateau. En milieu solide (milieu gélosé), la production d'antibiotique débute dès la formation du mycélium aérien (Bibb, 1996). La biosynthèse des métabolites secondaires est un processus complexe, hautement régulé dont il reste encore de nombreuses zones à éclaircir. Les gènes impliqués dans cette biosynthèse sont nombreux et regroupés au sein du génome de la bactérie. Cela comprend non seulement des gènes de structure directement impliqués dans la synthèse des molécules mais encore ceux impliqués dans la régulation de la synthèse de l'antibiotique, la résistance à l'antibiotique produit et l'export de ce dernier à l'extérieur de la cellule. On retrouve aussi dans cette portion du génome, des gènes de fonction inconnue et parfois des transposons. Ces gènes sont eux mêmes soumis au contrôle de gènes pléiotropes (Bibb, 1996). Le *S. coelicolor*

est l'actinomycète chez qui la régulation de la biosynthèse des antibiotiques a été le plus étudiée d'un point de vue génétique. Cette espèce a donc servi de modèle pour élucider les signaux physiologiques et les mécanismes de régulation responsables de la production d'antibiotiques (Adamidis et Champness, 1992; Adamidis et al., 1990; Bibb, 1996; Champness et al., 1992; Fernández-Moreno et al., 1992b; Floriano et Bibb, 1996; Fujii et al., 1996; Gramajo et al., 1993; Price et al., 1999). Chez le *S. coelicolor*, la transcription d'un gène codant pour un activateur spécifique de la biosynthèse d'un antibiotique donné ne se produit qu'en phase de transition et en phase stationnaire de croissance. Peu de temps après, suit la transcription des gènes de structure (Gramajo et al., 1993; Takano et al., 1992). Le début de la biosynthèse d'un antibiotique est influencée par d'autres facteurs physiologiques et environnementaux. De petites molécules de signalisation diffusibles jouent un rôle important dans le déclenchement de la production d'antibiotique. Par exemple, les mutants de *S. griseus* déficients dans la synthèse du facteur A, n'étaient plus capables de synthétiser la streptomycine (Hara et Beppu, 1981). De même six molécules de la même famille que le facteur A de *S. griseus* (famille des  $\gamma$ -butyrolactones) ont été purifiées chez *S. coelicolor*. L'une d'entre-elles, détectable seulement en phase de croissance transitoire ou stationnaire causait la production précoce d'actinorhodine ou d'undécylprodigiosine chez la souche sauvage (Anisova et al., 1984; Bibb, 1996; Efremenkova et al., 1985). Étant donné la synthèse localisée dans le temps de ce type de molécules, il apparaît qu'elles sont produites davantage en réponse à certains signaux physiologiques et environnementaux plutôt qu'agissant simplement comme indicateurs de la densité cellulaire comme les dérivés d'homosérine lactone fabriqués par les espèces de *Vibrio* (Bibb, 1996; Fuqua, 1994).

Un autre élément important dans le déclenchement de la biosynthèse des antibiotiques est le nucléoside tétraphosphorylé, ppGpp. Le ppGpp est synthétisé en grande quantité lorsque le milieu de culture est appauvri en acides aminés. De plus, il existe une corrélation positive entre la synthèse de ppGpp et la transcription des gènes codants pour les activateurs transcriptionnels des gènes de biosynthèse de l'actinorhodine (Strauch, 1991) et de l'undécylprodigiosine (Takano *et al.*, 1992) chez le *S. coelicolor*. Le ppGpp agit donc comme effecteur intracellulaire de la production d'antibiotique.



Toujours en ce qui concerne la régulation transcriptionnelle, l'hétérogénéité des facteurs  $\sigma$  chez le *S. coelicolor* possède manifestement un rôle important dans la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des antibiotiques. En analysant l'ARN polymérase isolée d'une culture de *S. coelicolor* en phase de transition, Brown et al. (1992) et Fujii et al. (1996) ont suggéré que les gènes de régulation spécifiques de la biosynthèse d'un antibiotique étaient transcrits par une holoenzyme différente de la forme majoritairement retrouvée.

D'autres facteurs environnementaux influencent le début de la biosynthèse des antibiotiques à savoir la répression nutritionnelle (Demain *et al.*, 1983; Demain, 1992; Demain et Fang, 1995) et les perturbations métaboliques pouvant mener à un stress physiologique (Hobbs et al., 1992; Hood et al., 1992; Yang et al., 1995). Il n'existe pas encore de modèles clairs intégrant ces nombreuses données afin d'élaborer un diagramme qui décrirait tous les facteurs et leurs interrelations induisant la biosynthèse des antibiotiques chez les *Streptomyces*.

Les *Streptomyces* produisent des milliers de métabolites secondaires d'une diversité incroyable. Nombreuses sont ces molécules dont les applications sont importantes en médecine humaine comme agents antibactériens, antifongiques, immunosuppresseurs, antitumoraux, hypocholestérolémiant et en agriculture comme fongicides, produits antiparasites, insecticides, herbicides et agents promouvant la croissance végétale. Les groupes chimiques dans lesquels ces métabolites secondaires sont retrouvés sont aussi divers que les polycétides, les peptides, les aminoglycosides, les glycopeptides, les lipopeptides, les  $\beta$ -lactames, les benzoquinones, les nucléosides, les aminocyclitols etc.

Parmi les 62 métabolites secondaires les plus utiles biosynthétisés par les actinomycètes, dont nombreux sont commercialisés, plus du tiers appartiennent au grand groupe des polycétides, lui même très diversifié tant par les structures chimiques qui y sont retrouvées

que par les applications et les modes d'actions des molécules (Kieser et al., 2000). La souche EF-76 produit la geldanamycine, un métabolite secondaire de type polycétide.

### 1.3.2 Les polycétides

Bien que la diversité chimique des polycétides soit remarquable, ils n'en partagent pas moins un patron commun de biosynthèse. Ces molécules sont aussi synthétisées par d'autres groupes bactériens, exemple les *Pseudomonas* (Blender et al., 1999), par les champignons et par les plantes (Rawlings, 1997). Les polycétides sont formés par la condensation d'acides carboxyliques à courte chaîne, comme par exemple les acides acétique, propionique, butyrique. Chaque unité contribue à l'allongement de la chaîne de carbones linéaire sur laquelle le carbone  $-\beta$  porte toujours un groupement céto. Certains de ces groupements céto sont réduits en groupements hydroxyles ou supprimés lors de l'ajout d'un nouveau résidu à la chaîne carbonée, mais la plupart subsistent. Cette persistance du groupement céto sur plusieurs carbones de la chaîne a donné le nom "polycétide" à cette famille de composés (Collie, 1907a; b). La diversité des polycétides vient de la nature des unités bâtissant la chaîne de carbones, de leur nombre, de leur ordre de succession, des oxydo-réductions et déshydratations successives, et enfin des modifications tardives comme la cyclisation, les méthylations et les ajouts de sucre. Toutes ces réactions biochimiques sont génétiquement programmées. Les enzymes responsables de l'allongement du squelette de carbones, des oxydo-réductions et déshydratations de la chaîne en formation sont les polycétides synthases (PKS). Les polycétides sont séparés en deux classes structurales: les polycétides complexes ou polycétides de type I, synthétisés par les PKSs de type I et les polycétides aromatiques ou polycétides de type II, synthétisés par les PKSs de type II. Cette distinction a été établie par analogie avec les synthases d'acides gras (FAS) (Birch, 1967; Hopwood et Sherman, 1990)

Les acides gras à longue chaîne résultent aussi de la condensation décarboxylative d'acides carboxyliques à courte chaîne. Les acides gras les plus abondants, c'est à dire ceux à carbones saturés non branchés, sont synthétisés d'une unité acétate comme unité de départ et d'unités de malonate pour l'extension de la chaîne. La chaîne de carbones, au cours de son élongation, subit les réactions cycliques de cétoréduction, déshydratation et énoylréduction. Les FASs qui synthétisent ces acides gras à longue chaîne sont regroupés en deux classes distinctes. Les FASs de type I sont caractéristiques des vertébrés. Elles sont constituées de gros polypeptides multifonctionnels contenant chacun plusieurs domaines catalytiques distincts. Par contre, les FASs de type II, caractéristiques des bactéries et des plantes supérieures, sont constituées de petits polypeptides libres dont chacun ne contient qu'une seule activité catalytique. Il y a en plus un petit polypeptide, la protéine porteuse d'acyle (ACP) sur laquelle est attachée la chaîne de carbones en élongation. Cependant, il y a une exception à cette classification: chez *Mycobacterium smegmatis* les FASs de type I et II coexistent (Bloch, 1977; Bloch et Vance, 1977). Les acides gras branchés résultent simplement de la sélection par les FASs, d'unités de départ (isopropionate ou isobutyrate au lieu d'acétate) ou d'extension (méthylmalonate au lieu de malonate) différentes (Hopwood et Sherman, 1990; Wakil, 1989).

Les polycétides sont produits par un mécanisme analogue à celui des acides gras à longue chaîne. Néanmoins, la biosynthèse des polycétides diffère de celle des acides gras à longue chaîne en 4 points: (i) diverses unités de départ sont utilisées pour former les polycétides (acides carboxyliques linéaires ou branchés, dérivés d'acides aminés, etc.) alors que l'acétate, le propionate ou parfois les carboxylates branchés sont utilisés dans la formation des acides gras à longue chaîne (Hopwood et Sherman, 1990); (ii) un nouveau cycle de condensation décarboxylative avec une unité d'extension peut se produire sur une chaîne qui a déjà subi les réactions de cétoréduction, de déshydratation ou d'énoylréduction; (iii) des centres chiraux sont introduits au cours de la biosynthèse, provenant de la présence d'une chaîne latérale sur l'unité d'extension ou de la conservation d'un groupement hydroxyle dans le polycétide (ainsi, la stéréochimie des résidus incorporés peut varier le long du squelette carboné); (iv) à la fin

de la synthèse de la chaîne de polycétide, suivent d'autres modifications comme le repliement de la chaîne et la cyclisation, la lactonisation, la glycosylation, etc. (Katz et Donadio, 1993).

Le développement de systèmes de clonage et d'expression génétique adaptés aux *Streptomyces* (Kieser et al., 2000) a permis de caractériser de nombreux gènes impliqués dans la biosynthèse de polycétides et d'élaborer des modèles mettant en oeuvre le fonctionnement des PKSs, ce qui aurait été quasiment impossible avec la biochimie classique.

Comme les FASs de type II, les PKSs de type II sont constituées de protéines monofonctionnelles séparées. Les premiers gènes isolés codant pour des PKSs de type II sont ceux impliqués dans la biosynthèse de l'actinorhodine chez *S. coelicolor* (Malpartida et Hopwood, 1984) et de la tétracénomycine chez *S. glaucescens* (Bibb et al., 1989; Motamedi et Hutchinson, 1987). Ces gènes sont organisés en cadres de lecture ouverts distincts codant soit pour l'ACP sur laquelle est lié le squelette carboné, soit une acyle transférase (AT) responsable du transfert de l'unité d'extension du coenzyme A à l'ACP, soit pour la  $\beta$ -cétoacyle ACP synthase (KS) enzyme de condensation décarboxylative entre l'unité d'extension liée à l'ACP et la chaîne en élongation, soit la  $\beta$ -cétoacyle ACP réductase (KR) responsable de la réduction de la fonction -céto distale en fonction hydroxyle, soit parfois une hydroxyacyle ACP déshydratase (DH) responsable de la formation d'une double liaison entre 2 atomes de carbone par déshydratation, soit le facteur de longueur de chaîne (CLF) de fonction mal connue mais ayant un haut degré d'homologie avec la protéine KS, soit une cyclase (CYC) responsable de la cyclisation en noyau non aromatique (Hutchinson et Fujii, 1995; Rawlings, 1997). Dans le cas de la biosynthèse de l'actinorhodine, le gène *actVII* code pour une aromatasase qui catalyse 2 déshydratations pour former le noyau aromatique de la molécule (Fernández-Moreno et al., 1992a; Sherman et al., 1991). Parmi les unités de départ retrouvées dans la formation des polycétides de type II, il y a l'acétate (actinorhodine, tétracénomycine), le propionate (daunorubicine), le butyrate (feudomycine) l'isobutyrate (13-

méthylaclacinomycine) entre autres, tandis que l'unité d'extension est toujours le malonate. La chaîne de carbones s'allonge donc de 2 carbones à chaque incorporation d'une unité d'extension (Bentley et Bennett, 1999; Katz et Donadio, 1993).

En somme, les voies de biosynthèse des polycétides aromatiques suivent le même schéma, à savoir, synthèse de la chaîne de carbones, repliement de la chaîne, condensations aldoliques et déshydratations pour former les noyaux aromatiques, hydroxylation à l'origine de la fonction quinone et enfin, modifications tardives du polycétide (Katz et Donadio, 1993).

Chez les polycétides de type I ou polycétides (Figure 1) complexes, les fonctions -céto de la chaîne polycétidique subissent beaucoup plus souvent une réduction que chez les polycétides aromatiques. Par ailleurs, ils possèdent généralement une chaîne de carbones bien plus longue que celle des polycétides de type II, donnant naissance à des molécules gigantesques qui peuvent posséder plus de 70 atomes de carbone et un poids moléculaire supérieur à 1500 comme dans le cas de la quinolidomycine produite par l'actinomycète *Micromonospora* sp. (Hayakawa et al., 1993). Le premier résidu incorporé dans la chaîne de polycétide peut être aussi variable que le propionate (érythromycine) (Cane et al., 1981; Kaneda et al., 1962), le piperolate (rapamycine) (Paiva et al., 1993a; 1993b), l'amino-hydroxybenzoate (rifamycine, geldanamycine) (Ghisalba et Nüesch, 1981). Les unités d'extension quant à elles sont beaucoup plus classiques, par exemple le butyrate, le malonate ou le malonate substitué (Bentley et Bennett, 1999; Rawlings, 1997). Chez de nombreux polycétides de type I, la chaîne de carbones n'est pas synthétisée par la condensation d'acides carboxyliques identiques comme dans le cas de l'érythromycine synthétisée à partir de la condensation décarboxylative de 6 méthylmalonates sur l'unité de départ, le propionate (Cane et al., 1986; Cane et Yang, 1987). Deux unités d'extension comme le malonate et le méthylmalonate peuvent entrer dans la composition d'un même polycétide. Leurs nombres et leurs combinaisons donneront deux molécules aussi différentes en ce qui concerne leurs formules chimiques et leurs modes d'action que l'immunosuppresseur rapamycine (7 acétates + 7 propionates incorporés) et l'antibiotique rifamycine (2 acétates + 8 propionates incorporés) (Lancini et Cavalleri, 1997). Chez les actinomycètes, les chaînes latérales -méthyle et -éthyle

du polycétide complexe résultent généralement de l'incorporation d'unités de propionate et de butyrate à l'intérieur du squelette carboné.

Les PKSs de type I sont des protéines multifonctionnelles géantes (Figure 1) dont la taille peut atteindre 1000 kDa (Cortes et al., 1990; Schwecke et al., 1995). Cortes et al. (1990) et Donadio et al. (1991) ont isolé les premiers gènes codant pour une PKS de type I. Il s'agit des gènes impliqués dans la biosynthèse du précurseur non glycosylé de l'érythromycine, le 6-désoxyérythronolide B (6dEB). L'organisation et la caractérisation approfondie de ces gènes et de leurs fonctions sert de modèle dans l'étude génétique de la biosynthèse des polycétides de type I.

La 6dEB synthase (DEBS) est constituée de 3 grandes protéines multifonctionnelles d'environ 300 kDa chacune. Au sein de chaque protéine, les sites actifs sont organisés en modules contenant chacun les sites KS, AT, KR, et ACP (le site KR est absent d'un module chez les PKSs impliqués dans la biosynthèse de la rapamycine (Schwecke et al., 1995), rifamycine (August et al., 1998), nystatine (Brautaset et al., 2000), et pykromycine (Xue *et al.*, 1998). Les sites DH et ER (énoyle réductase) sont alternativement présents selon les modifications requises sur la chaîne de polycétide en formation. Chaque module est responsable d'un cycle d'extension de la chaîne de polycétide, c'est à dire de l'incorporation d'un acide carboxylique à courte chaîne, et de la modification des groupements fonctionnels. La dernière protéine de la DEBS contient le site TE (Thioestérase) qui décroche le polycétide du domaine ACP lorsque sa synthèse est terminée. D'autres enzymes codées par des gènes séparés formeront l'érythromycine finale (Dhillon et al., 1989; Stassi et al., 1993; Weber et al., 1990). Le site TE est absent de la PKS formant la rapamycine (Schwecke et al., 1995), sa fonction étant assurée par une autre protéine distincte. La DEBS contient 2 modules (soit un total de 9 ou 10 sites actifs) par protéine multifonctionnelle, mais cela varie en fonction du polycétide formé. Ainsi, la PKS formant la rapamycine contient 4 ou 6 modules par protéine multifonctionnelle et chaque module contient 4 à 6 domaines catalytiques distincts (Schwecke et al., 1995). Le nombre de protéines multifonctionnelles nécessaires pour synthétiser un polycétide varie également. Il est de trois dans le cas de l'érythromycine (Donadio et al., 1991) mais atteint cinq dans le cas de la nystatine (Brautaset et al., 2000).

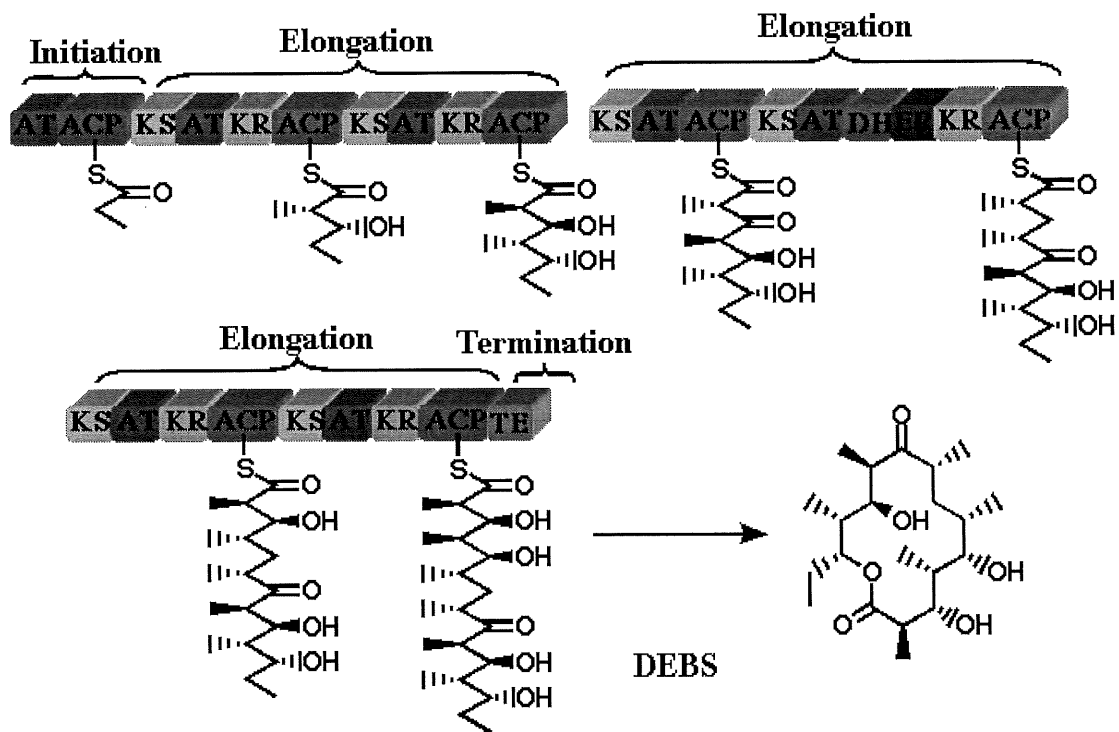


Figure 1. Formation du précurseur de l'érythromycine, le 6-désoxyérythronolide B (6-dEB) par une PKS de type I. (D'après Donadio et al., 1991).

Contrairement au cas de la DEBS, il y a un domaine de "chargement" identifié ("loading domain") en amont du premier module de la PKS, responsable de la fixation de l'unité de départ préalablement à l'incorporation des unités d'extension (Schwecke et al., 1995; Tang et al., 1998; Xue et al., 1998). Par contre, le domaine de chargement est constitué d'une protéine séparée dans le cas de la biosynthèse de la nysatine (Brautaset et al., 1998).

L'étude des séquences des nombreux gènes disponibles codant pour les PKSs de type I permet aujourd'hui d'attribuer à chaque domaine catalytique la réaction chimique qu'il opère avec un haut degré de certitude. Toutefois, la spécificité pour le substrat des différentes enzymes représentées dans la protéine multifonctionnelle varie beaucoup d'un domaine à un autre. L'acyl transférase du module de chargement tolère généralement une unité de départ différente de celle normalement requise pour initier la formation de la chaîne de polycétide. Par contre, la spécificité des autres domaines AT envers les unités d'extension est très grande et va même jusqu'à la stéréospécificité (Khosla et al., 1999). Les domaines KS, ACP, KR, ER, et DH peuvent aussi accepter des substrats vraiment différents de leurs substrats naturels. Khosla et al. (1999) suggèrent aussi que les modules sont tolérants à la substitution de domaines homologues (ouvrant ainsi la voie à la fabrication de nouvelles molécules par génie génétique) et que chaque domaine agit de façon autonome. Aucune interaction entre les activités enzymatiques des différents sites catalytiques d'une protéine multifonctionnelle n'a encore été décelée.

Pareillement au cas des polycétides de type II, les gènes de modifications tardives vont achever la biosynthèse du métabolite secondaire. Les gènes codant la régulation de la biosynthèse, l'export et l'autorésistance à la molécule produite sont aussi regroupés dans la même portion du génome bactérien. De nombreux cadres de lecture ouverts de fonctions inconnues se retrouvent également au sein du groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse des antibiotiques. Ces gènes couvrent une large portion du chromosome dont la taille dépasse 100 kb dans le cas de la rapamycine (Schwecke et al., 1995) et de la nystatine (Brautaset et al., 2000).



### 1.3.3 La geldanamycine

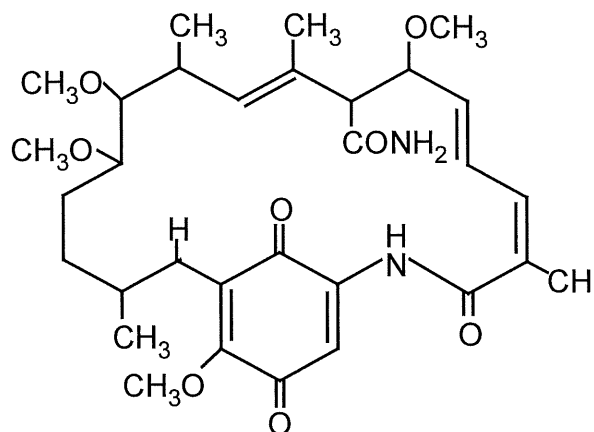


Figure 2. Structure chimique de la geldanamycine.

La geldanamycine est un métabolite secondaire isolé pour la première fois en 1970 de l'actinomycète *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* (DeBoer et al., 1970). D'après les résultats obtenus par ces auteurs, la geldanamycine possédait des activités antiprotozoaires, antibactériennes (contre les bactéries Gram + et Gram -), antifongiques et était capable d'inhiber la croissance de deux lignées cellulaires eucaryotes. Dans les conditions expérimentales décrites, la geldanamycine ne possédait aucune activité antivirale.

Le composé chimique est cristallisable, de couleur jaune et sa formule brute est  $C_{29}H_{40}N_2O_9$  pour une masse moléculaire de 560. Sasaki et al. (1970) ont caractérisé davantage cette molécule et en ont déduit sa formule éclatée. La geldanamycine est un polycétide de type I et appartient au sous groupe restreint des ansamycines. Elle est caractérisée par une chaîne de polycétide qui vient se cycliser autour du noyau benzoquinone. Une fonction amide et deux fonctions O-méthyle sont greffées sur la chaîne de polycétide. Une autre fonction O-méthyle est située sur le noyau benzoquinone. Grâce à l'utilisation de molécules précurseurs marquées au  $^{14}C$  ([méthyle- $^{14}C$ ]méthionine, [carboxy- $^{14}C$ ]propionate de sodium, [carboxy- $^{14}C$ ]acétate

de sodium, [carboxy<sup>14</sup>C]malonate de sodium et <sup>14</sup>C-formate de sodium) et la résonnance magnétique nucléaire (spectre de <sup>13</sup>C), Johnson et al. (1974) ont suggéré que le squelette carboné de la geldanamycine était formé de 3 unités d'acétate et de 4 unités de propionate. D'après les informations connues sur la biosynthèse des polycétides de type I, il est possible de suggérer avec un haut degré de sureté que les unités d'acétate formant la geldanamycine proviennent du malonylCoA et les unités de propionate du méthylmalonylCoA. Le noyau benzoquinone (C<sub>7</sub>N) sur lequel est attaché la chaîne de polycétide est l'acide 3-amino-5-hydroxybenzoïque (AHBA), à en croire les informations disponibles sur la biosynthèse de la rifamycine (un autre polycétide de type I du sous groupe des ansamycines) (Hunziker et al., 1998; Wehrli, 1977). L'AHBA est un dérivé de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique (Ghisalba et Nüesch, 1981; Kim et al., 1996) et est très certainement l'unité de départ dans la biosynthèse de la geldanamycine.

En plus des activités inhibitrices décrites par DeBoer et al. (1970), la geldanamycine possède aussi un pouvoir herbicide (Heisey et Putnam, 1986) et antitumoral (Neckers et al., 1999; Yamaki et al., 1989). Le mode d'action de la geldanamycine envers les bactéries n'est pas connu. Toutefois, par analogie avec le mode d'action connu de la rifamycine, la geldanamycine pourrait inhiber la transcription en se liant à l'ARN polymérase, empêchant cette dernière de se lier à l'ADN (Wehrli, 1977). Le mode d'action de la geldanamycine envers les champignons n'a jamais été étudié non plus. Par contre, les mécanismes par lesquels la geldanamycine contrôle la prolifération des cellules tumorales sont mieux connus. Cela fait d'ailleurs de cette molécule un agent chimique très prometteur dans la lutte contre le cancer. La geldanamycine se lie à la protéine de choc thermique Hsp90, l'une des protéines intracellulaires les plus abondantes. La présence de la protéine Hsp90 est nécessaire au bon fonctionnement des mécanismes de signalisation cellulaire médiés par plusieurs tyrosine et sérine/ thréonine kinases. La protéine Hsp90 est donc associée à de nombreuses autres protéines elles-mêmes impliquées dans la prolifération cellulaire, et conséquemment produites en plus grande quantité (2 à 10 fois plus) dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales. En se liant à l'Hsp90, la geldanamycine inhibe directement la prolifération

des cellules tumorales. Un analogue de la geldanamycine est actuellement en phase I d'étude clinique (Neckers et al., 1999).

#### 1.4 Buts du projet de recherche

Valois et al. (1996) ont isolé 11 souches d'actinomycètes ayant la capacité de protéger les plants de framboisiers contre le *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. Ces souches produisaient des glucanases hydrolysant *in vitro* les parois cellulaires du champignon et étaient capables d'inhiber sa croissance par la production de métabolites secondaires. L'une de ces souches, la souche EF-76 a été caractérisée par Toussaint et al. (1997) comme étant le *Streptomyces hygroscopicus* sbsp. *geldanus*, renommé *S. melanosporofaciens* par Doumbou et al. (2001). Le surnageant de culture de la souche EF-76 inhibait la croissance du *P. fragariae* var. *rubi* *in vitro* et l'antibiotique produit a été identifié comme étant la geldanamycine. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de la geldanamycine sont inconnus. Le premier objectif du projet est donc d'amorcer l'étude moléculaire sur la biosynthèse de l'antibiotique. Bien qu'Allen et Ritchie (1994) aient isolé des séquences d'ADN d'une souche de *S. hygroscopicus*, impliquées dans la biosynthèse de cette molécule, ils ne les ont pas séquencées et aucune information génétique n'est disponible sur la biosynthèse de la geldanamycine. La caractérisation de gènes impliqués dans la production de geldanamycine par la souche EF-76 permettra aussi d'illustrer la présence de modifications chromosomiques chez des souches mutantes affectées dans la production de geldanamycine et obtenues par recombinaison génétique.

Les deux mécanismes d'antagonisme identifiés chez la souche EF-76 sont fort probablement corrélés à son effet phytoprotecteur. Le deuxième but du projet de recherche est donc

d'obtenir des mutants altérés dans la production de geldanamycine, de partiellement les caractériser au point de vue phénotypique, biochimique et phytoprotecteur et de déterminer l'implication de la geldanamycine dans l'antagonisme envers différents microorganismes et la lutte biologique contre l'agent phytopathogène *S. scabies*.

## CHAPITRE 1

### 1.0 Analyse de séquences en amont du gène codant pour une polycétide synthase de type I chez la souche productrice de geldanamycine *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76

Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire ont montré que *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76 (Dombou et al., 2001), anciennement *Streptomyces hygrosopicus* var. *geldanus* EF-76 est un agent de lutte biologique prometteur (Toussaint et al., 1997; Valois et al., 1996). L'une des propriétés attribuées à la souche EF-76 est l'antibiose due notamment à la production de geldanamycine (Toussaint et al., 1997). D'autres auteurs ont également rapporté que des souches productrices de geldanamycine protégeaient certaines plantes contre des agents pathogènes (Rothrock et Gottlieb, 1984; Trejo-Estrada et al., 1998a). La geldanamycine a été décrite pour la première fois par DeBoer (1970) comme étant un antibiotique biosynthétisé par *Streptomyces hygrosopicus* var. *geldanus*. Elle possède un large spectre d'activité avec des effets antibactérien, antifongique, herbicide et antitumoral (DeBoer et al., 1970; Heisey et Putnam, 1986; Neckers et al., 1999; Yamaki et al., 1989). La geldanamycine appartient au grand groupe des polycétides de type I.

Aucune séquence génétique impliquée dans la biosynthèse de ce métabolite secondaire n'étant disponible, le but de cette étude était d'en amorcer l'étude moléculaire. Une sonde a été confectionnée à partir d'un fragment d'ADN de 1.3 kb produit de l'amplification par PCR d'une portion du génome codant pour la biosynthèse d'un polycétide de type I. Grâce à la sonde, un fragment d'ADN génomique a été isolé chez la souche EF-76. Il comprenait plusieurs gènes situés en amont d'un gène partiel codant pour une polycétide synthase. Il s'agit entre autres de gènes codant pour un represseur de la transcription, un système d'export actif de type ABC transporteur et une glycosyle transférase. L'expression hétérologue du gène codant la glycosyle transférase dans *S. lividans* a montré son implication

dans la résistance à la geldanamycine. La région génomique isolée chez EF-76 étant à la fois impliquée dans la biosynthèse d'un polycétide de type I, la régulation de sa biosynthèse, l'export du composé biosynthétisé et la résistance à la geldanamycine, elle appartient vraisemblablement au locus de biosynthèse de la geldanamycine. Des gènes de ce locus ont été utilisés afin de caractériser des souches mutantes affectées dans la production de geldanamycine et obtenues par recombinaison génétique.

Ces travaux sont décrits à la section 1.1. Cette section est constituée de l'article S. Agbessi, C. Déry et C. Beaulieu (2002). Analysis of genetic sequences lying upstream of genes encoding a type-I polyketide synthase in the geldanamycin producer strain *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76. Biotechnology Letters (soumis pour publication). J'ai effectué la totalité des travaux présentés dans cet article. J'ai rédigé cet article. C. Beaulieu et C. Déry ont supervisé les travaux présentés.

1.1 Analysis of genetic sequences lying upstream genes encoding a type-I polyketide synthase in the geldanamycin producer *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76

Sonya Agbessi, Claude Déry & Carole Beaulieu\*

*Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne, Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec), Canada, J1K 2R1*

*Author for correspondance (Fax: 819 821 8049; E-mail: [carole.beaulieu@courrier.usherb.ca](mailto:carole.beaulieu@courrier.usherb.ca))*

*Key words:* antibiotic, biological control, secondary metabolite, *Streptomyces hygroscopicus* sbsp. *geldanus*

**Abstract**

The strain *S. melanosporofaciens* EF-76, isolated in our laboratory was an efficient and promising biocontrol agent, that displays a significant ability to control strawberry root rot induced by *Phytophthora fragariae* var. *rubi* and was able to inhibit the growth of a wide range of Gram+ bacteria and fungi. The strain EF-76 produces geldanamycin, a type-I polyketide that is believed to play a significant role in pathogen antagonism. A DNA fragment possibly involved in geldanamycin biosynthesis was isolated from EF-76. This fragment comprises sequences upstream from the genes encoding a type-I polyketide synthase, as well as a glycosyltransferase involved in the resistance to geldanamycin. Some sequences which could be targeted for antibiotic biosynthesis, regulation and export are also present on that segment.

## Introduction

Polyketides are antibiotics produced by bacteria, fungi and plants. These compounds are divided into two groups: type-I polyketides are biosynthesized by type-I polyketide synthases (PKSs), composed of large multifunctional polypeptides, while type-II polyketides are biosynthesized by iterative type-II PKSs consisting of several monofunctional proteins (Hopwood and Sherman, 1990).

The type-I PKSs multifunctional enzymes have repetitive domains, each responsible for a single enzymatic reaction. The catalytic domains are organized into modules which determine the biochemical order of the substrate selection for the aliphatic chain elongation and also the degree of reduction of the chain during elongation. Genes encoding the type-I PKSs show strong amino acid sequence similarity between each other. Type-I polyketide biosynthetic genes in actinomycetes are clustered on a continuous segment of the genome (Katz and Donadio, 1993). In addition to PKSs genes, these biosynthetic gene clusters contain one or more regulatory genes (Bate et al., 1999), genes responsible for antibiotic export (August et al., 1998; Molnár et al., 1996), those for biosynthesis of the precursors (Molnár et al., 1996), those for production of oxidoreductases (August et al., 1998; Molnár et al., 1996) as well as some of the genes responsible for late modification of the antibiotic (Lomovskaya et al., 1999) and at least one gene for self-resistance (Hernandez et al., 1993; Jenkins and Cundliffe, 1991; Lomovskaya et al., 1996). The mechanisms of self-resistance fall into three general classes (Cundliffe, 1989): (i) inactivation of the antibiotic by chemical modification (Cundliffe, 1992; Stohl et al., 1999), (ii) rapid efflux of the antibiotic from the vicinity of the target site (Caballero et al., 1991) and (iii) modification of the sensitive target with an insensitive form (Xue et al., 1998).

Type-I polyketides include, erythromycin (Donadio et al., 1991; Bevitt et al., 1992; Donadio and Katz, 1992), avermectin (MacNeil et al., 1992), oleandomycin (Swan et al., 1994), rapamycin (Schwecke, 1995; Aparicio et al., 1996), rifamycin B (Tang et al., 1998) and



geldanamycin (Allen and Ritchie, 1994; Wehrli, 1977). Geldanamycin is a benzoquinone ansamycin polyketide produced by *Streptomyces hygroscopicus* sbsp. *geldanus* (DeBoer et al., 1970). It consists of an aromatic nucleus and a long aliphatic bridge (polyketide) joining two non-adjacent positions of the nucleus (Allen and Ritchie, 1994; Wehrli, 1977). Geldanamycin has antiprotozoal, antibacterial (DeBoer et al., 1970), herbicidal (Heisey and Putnam, 1986), antifungal (DeBoer et al., 1970) and antitumor activities (Neckers et al., 1999). Moreover, numerous studies were published about the anticancer activity of geldanamycin, making it a promising clinical drug candidate (Neckers et al., 1999). Although some of the DNA sequences involved in geldanamycin biosynthesis were cloned (Allen and Ritchie, 1994), no nucleotide sequence was ever published about the geldanamycin biosynthesis cluster.

*S. hygroscopicus* sbsp. *geldanus* was shown as a potential biocontrol agent of plant diseases (Rothrock and Gottlieb, 1981; 1984; Valois et al., 1996; Toussaint et al., 1997). We isolated a geldanamycin producing strain from a potato tuber (Faucher et al., 1992). *S. melanosporofaciens* strain EF-76 (Doumbou et al., 2001), formerly named *S. hygroscopicus* sbsp. *geldanus* EF-76 (Toussaint et al., 1997). This strain has demonstrated a good potential biocontrol agent (Valois et al., 1996). In this study, we report on the analysis of the genetic sequences lying upstream a type-I PKS encoding gene in the geldanamycin producer *S. melanosporofaciens* EF-76. The DNA fragment includes genes which might be components of a regulatory and export system and some that confer self-resistance to geldanamycin.

## **Materials and methods**

### *Bacterial strains and culture conditions*

*S. melanosporofaciens* EF-76 chromosomal DNA was used for the construction of the genomic library. *S. lividans* TK24 (Hopwood et al., 1985) was used as the recipient strain for heterologous expression of EF-76 genes. *S. hygroscopicus* sbsp. *geldanus* ATCC 55256, *S. hygroscopicus* sbsp. *hygroscopicus* ATCC 21240, *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2359, *S. lividans* TK24 and *S. melanosporofaciens* EF-76 were used as sources of genomic DNA for

PCR amplification. *Escherichia coli* JM109 F' (Promega Fisher scientific Ltd., Nepean, Canada) was used for plasmid library construction, subcloning and ssDNA for sequencing. *Streptomyces* strains were grown either in yeast malt extract medium (YME) (Pridham et al., 1956-1957) or in trypticase soy broth (TSB) (Difco Laboratories, Montreal, Canada) at 30°C. *E. coli* JM109F' was grown in Luria-Bertani (LB) broth or agar (Sambrook et al., 1989) at 30°C. Whenever necessary, culture media were supplemented with tetracycline (5 mg/l, final conc.), kanamycin (50 mg/l), ampicillin (100 mg/l), isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.2 mM) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galacturonic acid (X-gal, 40  $\mu$ g/ml).

#### *Construction of EF-76 genomic library*

Total genomic DNA was isolated from the EF-76 strain according to the procedure of Hopwood et al. (1985) and was partially digested with the restriction enzyme *Bam*HI. Digested DNA was ligated into the dephosphorylated *Bam*HI site of pAlter-1 (Promega). JM109F' electrocompetent cells were transformed by electroporation at 2.5 kV using a Biorad gene pulser transfection apparatus (Biorad, Mississauga, Canada). Plasmid preparation, DNA restriction digests, ligation reactions and gel electrophoresis were performed using standard procedures (Sambrook et al., 1989). DNA fragments were isolated from agarose gels with a gene clean kit and following the manufacturer's instructions (Bio/Can Scientific, Mississauga, Canada).

#### *Southern hybridization analysis*

For Southern blot analysis, DNA was transferred to Hybond N nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Canada) following the manufacturer's recommendations. The digoxigenin-dUTP labeling of probes, hybridization and blot development were performed with a labeling and colorimetric development kit as specified by the manufacturer (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada). The prehybridization (2h30) and hybridization (overnight) temperature were 68°C. After the incubation, the membranes were washed twice

in 2 X SSC (0.15M NaCl plus 0.015M sodium citrate) containing 0.1% SDS for 7 minutes at 68°C and twice in 0.1 X SSC containing 0.1% SDS for 20 minutes at 68°C.

#### *Polymerase chain reaction*

PCR reactions were carried out in 50 µl of a reaction mixture containing 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% dimethyl sulfoxide, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 5 pmol of each oligonucleotide primer, 0.2 µg of chromosomal DNA and 2.5U of Taq DNA polymerase. Two degenerate primers designed from the conserved regions of the active sites of ketoacylsynthase (KS primer) and acyltransferase (AT primer) genes of some type-I polyketide synthase genes available from the Genbank database were used to amplify the genomic DNA. The sequences of the primers used were as follows: KS primer: 5'-GCTCTAGAGCTGYTCGTCGCTGGTSGCG-3' and AT primer: 5'-GCTCTAGAGCGATCTCGCCCTGCGARTGGCC-3'. The degenerate bases follow the standard code. A five minutes predenaturation step at 95°C was followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 57°C for 1 minute and extension at 72°C for 2 minutes, with a final extension at 72°C for 10 minutes. The amplicon obtained from EF-76 DNA was digested with *Xba*I, cloned into the dephosphorylated *Xba*I site of pUC119 (Stratagene, La Jolla, California), partially sequenced for verification and then digoxigenin-dUTP labelled for use as a probe.

#### *DNA sequencing and sequence analysis*

Sequencing templates were obtained by random subcloning in pAlter-1 of small fragments generated by *Kpn*I, *Sph*I, *Pst*I, *Sal*I, *Sma*I, *Bam*HI, *Nae*I, *Sac*I and *Sau*3A digestions. Single stranded DNAs were prepared from the series of subclones by using the R408 helper phage (Promega). The DNA inserts were sequenced on both strands by the dideoxynucleotide chain termination method using the ALFexpress DNA analysis system and the Autocycle Sequencing kit (Amersham pharmacia biotech). DNA and protein sequence homology searches were done by using the BLAST programs (Altschul et al., 1990). Sequences were

analysed by using the University of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG, Madison, Wisconsin, USA) programs.

#### *Assay for geldanamycin resistance*

Geldanamycin producer EF-76 was streaked in the center of YME plates and was incubated 5 days before being overlaid with molten TSA (0.3% agar) containing the wild strain *S. lividans* TK24 or recombinant strains of TK24 carrying either pFD666 (Denis and Brzezinski, 1991) or pFDBm3. The plasmid pFDBm3 was constructed by ligating a 3 kb *Bam*H1 insert carrying a glycosyltransferase gene and a chitosanase obtained from the EF-76 40kb fragment into pFD666. The recombinant strains were obtained by protoplast transformation (Hopwood et al. 1985). Growth inhibition was recorded after 48h growth.

## **Results**

**Isolation of DNA encoding type-I PKS from EF-76.** Type-I PKS-encoding genes have highly conserved sequences (Hopwood and Sherman, 1990; Tang et al., 1998; Schwecke et al., 1995). Therefore, a 1.3 kb fragment was amplified from EF-76 DNA by PCR using two degenerate primers designed from the conserved regions of the active sites of ketoacylsynthase and acyltransferase of some type-I polyketide synthase genes. The same two primers were used to amplify the genomic DNAs from *S. hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 (an other geldanamycin producer strain), *S. hygroscopicus* var. *hygroscopicus* ATCC 21240 (not a type-I PKS producer), *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2359 (erythromycin type-I PKS producer) and *S. lividans* TK24 (actinorhodin type-II PKS producer). No amplification product was observed among non producers of type I-PKS (Fig. 1, lanes 4, 5), whereas the expected 1.3 kb amplicon was obtained from type-I PKS producers (Fig. 1, lanes 1, 2, 3). These results demonstrate the specificity of the 1.3 kb amplicon. The partial sequencing of this fragment (data not shown) confirmed that it belongs to the type-I PKS genes. This 1.3 kb PCR fragment was labelled and used as a probe to screen a plasmid library constructed with the EF-76 DNA in order to identify subclones containing PKS genes. One positive clone carrying a 40

kb insert was identified. The 40kb insert was first subcloned and randomly sequenced to evaluate the coverage of the polyketide synthase encoding genes. The PKS-gene region was actually represented by a 2.7 kb truncated ORF with high homology to type-I PKS genes (Fig. 2) Three enzymatic domains were present on the portion obtained: KS, AT and DH.

The KS domain showed a high degree of identity with those from other type-I PKSs (Fig. 3). Moreover, the active site cysteine (C) and the sequences around DTACSSsL were perfectly conserved. The AT domain has the active site sequence GHSXG (Fig. 4) in which the serine (S) is the active site residue. The other conserved amino acids were tyrosine (Y) and histidine (H) in the motif YasHs. Comparison of the active site amino acid sequences of acyltransferase domains from biosynthetic clusters coding for erythromycin and rapamycin biosynthesis with those of the partial PKS ORF of *S. melanosporofaciens* EF-76 (Fig. 4) suggests that methylmalonyl-CoA is the substrate of the acyltransferase of EF-76, as it is the case for erythromycin and rapamycin producers. The partial PKS ORF of *S. melanosporofaciens* EF-76 is terminated by part of a DH domain. The consensus sequence HXXXGXXXXP (where X stands for any a.a), present in the DH domain from rapamycin and erythromycin is absent here. The histidine (H) is part of the active site and the glycine (G) is replaced by an aspartate (D) like in the eighth and tenth module of the rifamycin polyketide synthase (Fig. 5, Tang et al., 1998).

**Deduced functions of genes lying upstream the PKS part.** Analysis of the upstream DNA sequence shows four ORFs(ORF2 to ORF5) that extend beyond the 5' terminus of the EF-76 truncated ORF. All these 4 ORFs are transcribed in the same direction and are in the opposite direction of the PKS partial ORF. Database searches revealed that ORF2 is homologous to a *S. coelicolor* putative transcriptional regulator of the *lacI* family. The ORFs 3, 4 and 5 encode a membrane protein, an ATP binding protein and a transporter respectively. Two other potential genes were found downstream this export/regulation region. ORF6 lied immediately downstream to ORF5 and its deduced protein product shows sequence identity to members of the family of long-chain alcohol dehydrogenases. The ORF7 encodes a putative protein of unknown function.

Although geldanamycin is not known to be a glycosylated compound, a glycosyltransferase (GTF) was identified approximately 14 kb upstream of the PKS region and may still belong to the biosynthetic cluster. A putative role for the glycosyltransferase was investigated. A 3kb *Bam*HI fragment containing the glycosyltransferase and a chitosanase was subcloned in the pFD666 plasmid and transformed in *S. lividans* TK24. The TK24 recombinant strain was then spread on a plate around a 5-days old inoculum of the geldanamycin producer strain, EF-76. TK24 and TK24 carrying pFD666 without insert were used as controls. The strain TK24 containing the plasmid with the glycosyltransferase (TK24+pFD666:GTF) was resistant to geldanamycin, but not TK24 and TK24(pFD666), as shown in Fig. 7. Sequence analysis indicates that the enzyme encoded by the glycosyltransferase gene could be flexible with regards to its substrate. This enzyme would catalyze the biosynthesis of lipopolysaccharides or that of disaccharides (Fig. 8). The chitosanase gene next to the glycosyltransferase gene may provide aminosugars as substrates for the glycosyltransferase.

## Discussion

We have sequenced a region of DNA from the geldanamycin producer strain, *S. melanosporofaciens* EF-76, that is involved in the biosynthesis of a type I polyketide. This PKS region exhibited the typical modular organization found in type I multifunctional polyketide synthases (Katz and Donadio, 1993). Although the KS domain is shorter than usual (Aparicio et al., 1996; Tang et al., 1998), the putative ribosome binding site sequence GAGG located 12 nucleotides upstream of the GTG initiation codon indicates the probable starting point of the ORF mRNA translation (Strohl, 1992) and brings evidence of the integrity of the beginning of the ORF. According to the sequence homologies, the KS domain may be involved in decarboxylative condensation instead of precursor loading since a cysteine residue is present in the active site (Bisang et al., 1999). Nevertheless, it may be inactive or still have a loading function. The AT domain immediately following it is an AT specific domain for the

incorporation of a propionate unit in the compound. The DH domain appears complete and functional according to the comparative sequence analysis.

There are some experimental evidences supporting the hypothesis that this chromosomal PKS region could be involved in the biosynthesis of geldanamycin. A mutant with a deletion of this DNA region, obtained by protoplast fusion, is deficient in geldanamycin production (Agbessi et al., submitted for publication). This 3-kb PKS region will be used as a probe to find the remaining part of this gene cluster by chromosome walking. This approach should allow us to elucidate the nature of the polyketide biosynthesized by this cluster.

The genetic information accumulated so far has demonstrated that most genes encoding enzymes for secondary metabolites biosynthesis, regulation, export and self-resistance are clustered on the *Streptomyces* genome (August et al., 1998; Bate et al., 1999; Hernandez et al., 1993; Jenkins and Cundliffe, 1991; Lomovskaya et al., 1996; 1999; Molnár et al., 1996). The genes flanking the PKS 5' region that we isolated here seem strong candidates for transcription regulation, antibiotic export and self-resistance, in view of their putative activities and location. The ORF2 is a putative transcriptional regulator. The ORFs 3, 4 and 5 found upstream of the PKS genes of EF-76 encode a membrane protein, an ATP utilizing protein and a transporter, respectively. It is a gene organization similar to that of the efflux system and found at the relative same position. The efflux system consists of an active transport made of two components: a membrane protein (ORF 3) and an ATP utilizing protein (ORF4) as found in the members of the ABC transporter superfamily (Mendez and Salas, 1998). The presence of efflux proteins encoding genes in polyketides and other actinomycete secondary metabolites encoding genes has been reported by Aparicio et al., 2000; August et al., 1998; Brautaset et al., 2000; Piel et al., 2000 and Schwecke et al., 1995. When there is no other gene candidates for the antibiotic self-resistance like a rRNA methyl-transferase (Xue et al., 1998), a phosphotransferase (Kobayashi et al., 2000) or an acetyltransferase (Strohl et al., 1999) for instance, the efflux proteins are usually associated to both antibiotic export and self-resistance (Aparicio et al., 2000; August et al., 1998; Piel et al., 2000). The gene arrangement

found upstream of the PKS for the sequence studied here fits well with the efflux proteins characteristics.

The modification of secondary metabolites by neighbouring glycosyltransferases is usually essential for the bioactivity of the metabolite (Bechthold et al., 1995; Fernández et al., 1998; Gaisser et al., 1997; Gandecha et al., 1997; Merson-Davies and Cundliffe, 1994; Summers, et al., 1997; Vara et al., 1989). On the other hand, two glycosyltransferases have been reported to be involved in macrolide inactivation: *mgt* from *S. lividans* (Cundliffe, 1992; Jenkins and Cundliffe, 1991) and *OleD* from *S. antibioticus*, the oleandomycin producer (Hernández et al., 1993; Quirós et al., 1998). *OleD* inactivates oleandomycin by addition of glucose to the 2'-OH group of the desosamine attached to the macrolactone ring (Vilches et al., 1992). Geldanamycin is not known as a glycosylated compound but the glycosyltransferase gene in the flanking region of the PKS modules may still belong to this biosynthetic cluster. The cloning of this glycosyltransferase gene from EF-76 in *S. lividans* TK24 allowed the growth of this strain in the presence of geldanamycin. This suggests that this specific glycosyltransferase can inactivate geldanamycin. Since the self resistance genes are usually located in proximity to the antibiotic biosynthetic cluster, the fact that the EF-76 glycosyltransferase gene confers resistance towards geldanamycin provides an additional indication that the partial PKS cluster identified in this study is involved in geldanamycin production or modification. The cloning of antibiotic resistance genes followed by investigation of adjacent DNA sequences for presence of structural and/or regulatory genes was reported to be an effective strategy for the identification of secondary metabolites gene clusters in actinomycetes (Butler et al., 1989; Donadio et al., 1991; Motamedi and Hutchinson, 1987; Vara et al., 1985). The role of the chitosanase gene located next to the glycosyltransferase gene will have to be elucidated.

*S. melanosporofaciens* EF-76 is an efficient and promising biocontrol agent, that displayed a significant ability to control both strawberry root rot induced by *Phytophthora fragariae* var. *rubi* (Valois et al., 1996) and common scab of potato (Agbessi et al., submitted for publication). This strain was also shown to be able to inhibit the growth of a wide range of



Gram-positive bacteria and fungi (Toussaint et al., 1997; Valois et al., 1996) and produces geldanamycin. Since antibiosis appears to play a significant role in pathogen antagonism, the isolation of the antibiotic biosynthesis genes from EF-76 will bring tools to further evaluate their role in biocontrol. In this work, we isolated a DNA fragment from *S. melanosporofaciens* EF-76 that is strongly believed to be involved in the biosynthesis of geldanamycin. Deletion of part of this chromosomal region causes the loss of both geldanamycin self-resistance and production (Agbessi et al. submitted for publication). This implies that resistance genes and biosynthesis genes are clustered in the EF-76 genome. Further genetic information will confirm the correlation between the DNA fragment characterized in this study and the geldanamycin biosynthetic cluster.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the Conseil de recherches en pêches et en agroalimentaire du Québec.

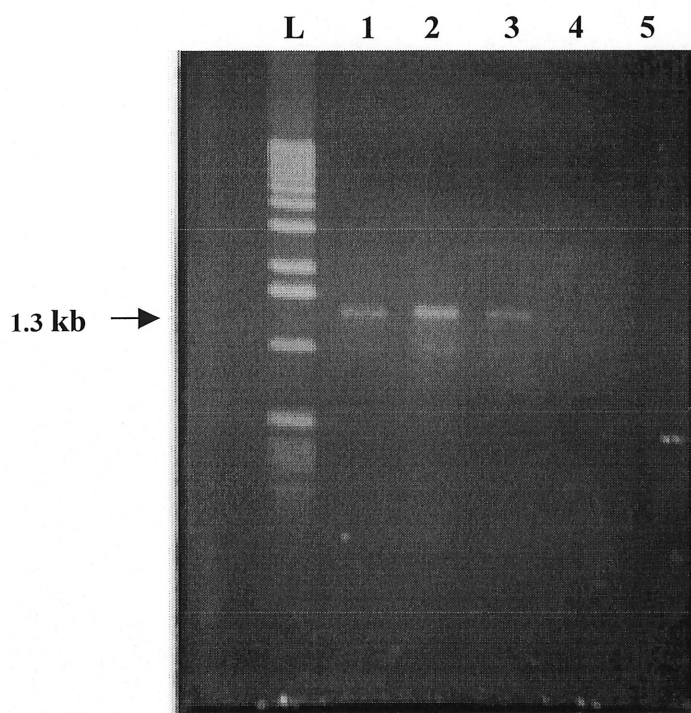


FIG. 1. PCR amplification of genomic DNA from different actinomycete strains. The 1.3 kb fragment indicated by an arrow was amplified only from type I polyketide producer strains. 1. EF-76; 2. *S. hygrosopicus var. geldanus* ATCC 55256; 3. *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2359; 4. *S. hygrosopicus var. hygrosopicus* ATCC 21240; 5. *S. lividans* TK24.

						V	T	I	D	T	A	C	S	S	S	L	V	A	13	
						GGTCTCGAGGGCCCGGCC	GTG	ACC	ATC	GAC	ACC	GCC	TGC	TCG	TCG	TCG	CTG	GTG	GCG	40
L	H	L	A	A	Q	A	L	R	Q	G	E	C	S	L	A	L	A		31	
CTG	CAC	CTT	GCC	GCG	CAG	GCG	CTG	CGG	CAG	GGT	GAA	TGC	TCG	CTG	GCG	CTG	GCG		94	
G	G	V	A	V	M	S	T	P	G	T	F	V	E	F	S	R	Q		49	
GGC	GGG	GTG	GCC	GTG	ATG	TCC	ACC	CCC	GGC	ACC	TTC	GTG	GAG	TTC	AGC	CGT	CAG		148	
R	G	L	A	P	D	G	R	C	K	A	F	A	A	A	A	D	G		67	
CGG	GGT	CTT	GCG	CCG	GAC	GGC	CGG	TGC	AAG	GCG	TTC	GCG	GCG	GCA	GCG	GAC	GGT		202	
T	G	W	G	E	G	V	G	M	L	L	L	E	R	L	S	D	A		85	
ACG	GGC	TGG	GGC	GAG	GGT	GTG	GGC	ATG	CTG	CTG	CTG	GAG	CGG	CTG	TCG	GAC	GCG		256	
R	R	N	G	H	Q	I	L	A	V	V	R	G	S	A	V	N	Q		103	
CGG	CGC	AAC	GGA	CAC	CAG	ATC	CTC	GCG	GTG	GTA	CGC	GGC	TCC	GCC	GTC	AAC	CAG		310	
D	G	A	S	N	G	L	T	A	A	Q	W	P	S	Q	Q	R	V		121	
GAC	GGT	GCG	AGC	AAC	GGG	CTC	ACC	GCG	GCC	CAA	TGG	CCC	TCG	CAA	CAG	CGG	GTG		364	
I	R	A	A	L	A	N	A	R	L	S	A	A	E	V	D	V	V		139	
ATC	CGG	GCG	GCG	CTG	GCC	AAC	GCG	CGG	CTG	TCG	GCG	GCC	GAG	GTG	GAC	GTG	GTC		418	
E	A	H	G	T	G	T	T	L	G	D	P	I	E	A	Q	A	L		157	
GAG	GCG	CAT	GGT	ACG	GGT	ACC	ACG	CTG	GGC	GAC	CCG	ATC	GAG	GCG	CAG	GCG	CTT		472	
L	A	T	Y	G	R	E	H	T	D	D	Q	P	L	W	L	G	S		175	
CTT	GCC	ACG	TAC	GGC	CGT	GAA	CAC	ACC	GAC	GAC	CAG	CCC	CTG	TGG	CTC	GGC	TCG		526	
I	K	S	N	I	G	H	T	Q	A	A	A	G	V	A	G	I	M		193	
ATC	AAG	TCC	AAC	ATC	GGG	CAC	ACC	CAG	GCC	GCG	GCC	GGT	GTC	GCG	GGC	ATT	ATG		580	
K	M	V	L	A	M	R	H	G	L	L	P	Q	T	L	G	V	D		211	
AAG	ATG	GTG	CTT	GCC	ATG	CGG	CAT	GGT	CTG	TTG	CCG	CAG	ACG	CTG	GGC	GTC	GAC		634	
E	P	S	P	H	I	D	W	T	A	G	A	S	K	L	L	T	E		229	
GAA	CCG	TCG	CCG	CAC	ATC	GAC	TGG	ACG	GCG	GGA	GCC	TCG	AAG	CTG	CTC	ACC	GAG		688	
A	R	A	W	P	E	T	D	R	P	R	R	A	G	V	S	S	F		247	
GCC	AGG	GCC	TGG	CCC	GAG	ACC	GAC	CGC	CCA	CGG	CGG	GCG	GGC	GTC	TCG	TCC	TTC		742	
G	L	S	G	T	N	G	H	I	I	L	E	Q	E	P	P	T	E		265	
GGC	CTC	AGC	GGC	ACC	AAC	GGC	CAC	ATC	ATT	CTC	GAA	CAG	GAG	CCG	CCG	ACC	GAG		796	
A	D	E	E	T	S	Q	E	D	A	Q	L	P	P	A	V	V	P		283	
GCC	GAC	GAG	GAA	ACC	TCC	CAG	GAG	GAC	GCG	CAA	CTT	CCT	CCC	GCC	GTC	GTG	CCA		850	
W	V	L	S	A	K	S	D	A	G	V	R	G	Q	A	A	R	L		301	
TGG	GTG	CTG	TCG	GCG	AAG	TCC	GAT	GCC	GGT	GTG	CGG	GGG	CAG	GCC	GCG	CGA	CTG		904	
Q	S	A	V	A	G	D	T	S	P	G	M	T	D	I	G	L	S		319	
CAG	TCG	GCG	GTG	GCC	GGG	GAT	ACC	AGC	CCG	GGG	ATG	ACG	GAC	ATC	GGT	CTG	TCG		958	
L	V	T	T	R	A	A	F	E	R	R	A	V	V	L	G	G	D		337	
CTG	GTC	ACC	ACG	CGT	GCG	GCG	TTC	GAG	CGG	CGG	GCG	GTG	GTA	CTG	GGT	GGT	GAC		1012	
R	A	A	L	V	S	G	L	T	A	L	T	E	G	R	E	A	T		355	
CGT	GCC	GCG	CTC	GTC	AGT	GGC	CTG	ACC	GCG	CTG	ACC	GAG	GGC	CGG	GAG	GCG	ACG		1066	

G	V	V	R	G	A	V	V	G	S	D	A	R	V	A	F	V	F	373
GGC	GTG	GTG	CGG	GGG	GCC	GTG	GTC	GGC	TCC	GAT	GCC	CGA	GTG	GCC	TTT	GTC	TTT	1120
P	G	R	G	V	A	V	G	G	D	G	G	W	V	A	G	V	F	391
CCT	GGT	CGA	GGG	GTC	GCA	GTG	GGT	GGG	GAT	GGC	GGC	TGG	GTT	GCT	GGA	GTC	TTC	1174
A	G	V	R	G	A	I	G	E	C	A	A	A	S	A	P	F	V	409
GCC	GGT	GTT	CGC	GGA	GCG	ATT	GGT	GAG	TGT	GCG	GCG	GCT	TCG	GCG	CCG	TTC	GTC	1228
D	W	S	L	G	D	V	L	R	G	G	K	G	A	A	E	A	L	427
GAC	TGG	TCG	CTC	GGG	GAT	GTG	TTG	CGG	GGT	GGG	AAG	GGT	GCT	GCG	GAG	GCG	TTG	1282
E	R	V	D	V	V	Q	P	V	L	W	A	V	M	V	S	L	A	445
GAG	CGG	GTG	GAT	GTG	GTG	CAG	CCG	GTG	TTG	TGG	GCG	GTG	ATG	GTG	TCG	TTG	GCG	1336
E	L	W	R	S	Y	G	V	E	P	A	A	V	I	G	H	S	Q	463
GAG	CTG	TGG	CGT	TCG	TAC	GGT	GTG	GAG	CCT	GCG	GCC	GTT	ATC	GGT	CAT	TCG	CAG	1390
G	E	I	A	A	A	C	V	A	G	A	L	S	L	E	D	A	A	481
GGT	GAG	ATC	GCG	GCG	GCG	TGT	GTG	GCG	GGT	GCG	TTG	TCG	CTG	GAG	GAC	GCC	GCG	1444
R	V	V	A	L	R	S	Q	A	L	R	A	L	S	G	G	G	G	499
CGC	GTG	GTG	GCG	TTG	CGA	AGC	CAA	GCA	CTG	CGG	GCG	TTG	TCC	GGC	GGT	GGT	GGC	1498
M	V	S	V	S	L	P	V	K	A	V	R	E	R	L	V	R	W	517
ATG	GTG	TCG	GTA	TCA	CTG	CCC	GTG	AAG	GCG	GTA	CGA	GAG	CGG	CTG	GTC	CGG	TGG	1552
G	E	R	L	S	V	A	A	V	N	G	P	S	A	V	V	V	S	535
GGT	GAG	CGG	CTG	TCG	GTG	GCA	GCG	GTG	AAC	GGG	CCC	TCG	GCG	GTT	GTT	GTC	TCG	1606
G	D	A	D	A	L	D	E	L	L	A	V	C	E	G	E	E	I	553
GGT	GAC	GCG	GAC	GCG	TTG	GAC	GAG	CTG	CTG	GCG	GTG	TGC	GAG	GGC	GAG	GAG	ATC	1660
R	A	R	R	I	P	V	D	Y	A	S	H	C	A	H	V	E	E	571
CGG	GCC	CGT	CGC	ATC	CCC	GTG	GAC	TAC	GCC	TCG	CAC	TGC	GCC	CAT	GTG	GAG	GAA	1714
I	E	E	T	L	L	R	E	L	A	D	I	A	P	R	A	S	S	589
ATC	GAG	GAG	ACG	TTG	TTG	CGG	GAG	CTG	GCG	GAT	ATC	GCT	CCC	CGG	GCG	TCG	TCG	1768
V	P	F	Y	S	R	V	T	A	G	V	L	D	T	T	G	L	D	607
GTG	CCG	TTC	TAC	TCC	AGG	GTC	ACG	GCA	GGC	GTG	CTC	GAT	ACG	ACC	GGA	CTG	GAC	1822
A	G	Y	W	Y	R	N	L	R	Q	T	V	R	F	D	E	T	V	625
GCC	GGG	TAC	TGG	TAC	CGG	AAT	CTG	CGT	CAG	ACG	GTC	CGC	TTC	GAT	GAG	ACC	GTA	1876
R	T	L	L	A	D	G	F	Q	V	F	I	E	A	S	A	H	P	643
CGC	ACC	CTC	CTG	GCC	GAC	GGC	TTC	CAG	GTG	TTC	ATC	GAG	GCC	AGC	GCC	CAC	CCC	1930
V	L	T	M	G	V	E	Q	T	A	E	D	H	G	T	R	V	T	661
GTC	CTG	ACG	ATG	GGA	GTG	GAG	CAG	ACG	GCC	GAG	GAC	CAC	GGC	ACC	CGC	GTC	ACC	1984
A	V	G	S	L	R	R	D	D	G	G	P	D	R	F	A	T	S	679
GCC	GTC	GGT	TCC	CTG	GCG	GCG	GAC	GAT	GGC	GGT	CCC	GAC	CGG	TTC	GCC	ACC	TCC	2038
L	A	E	A	Y	V	G	G	A	P	V	D	W	A	R	M	F	A	697
CTC	GCC	GAG	GCG	TAT	GTC	GGC	GGC	GCG	CCC	GTC	GAC	TGG	GCG	AGG	ATG	TTC	GCC	2092
G	T	G	A	E	R	A	D	L	P	T	Y	A	F	Q	R	T	H	715
GGA	ACG	GGC	GCG	GAG	CGG	GCC	GAT	CTG	CCG	ACG	TAT	GCC	TTC	CAG	GCG	ACG	CAC	2146

F	W	L	E	S	E	T	V	E	A	G	D	V	P	S	V	G	L	733
TTC	TGG	CTG	GAG	TCC	GAG	ACG	GTC	GAG	GCC	GGT	GAT	GTG	CCG	TCG	GTG	GGG	CTG	2200
D	S	A	G	H	P	L	L	G	A	A	V	P	L	P	D	S	D	751
GAC	TCG	GCC	GGG	CAT	CCG	TTG	CTG	GGT	GCC	GCC	GTG	CCG	CTG	CCC	GAC	TCC	GAC	2254
G	F	L	L	T	G	R	L	S	L	R	T	H	P	W	V	A	D	769
GGC	TTC	CTG	CTC	ACC	GGC	CGG	CTG	TCG	CTC	CGT	ACC	CAT	CCC	TGG	GTC	GCC	GAC	2308
H	A	V	A	D	V	T	L	L	P	G	T	A	F	V	E	L	L	787
CAC	GCG	GTG	GCG	GAT	GTA	ACG	CTG	CTG	CCC	GGG	ACG	GCC	TTC	GTG	GAG	CTG	CTG	2362
M	R	A	G	D	A	V	G	C	D	R	V	D	E	L	T	L	G	805
ATG	CGG	GCC	GGT	GAC	GCG	GTC	GGC	TGC	GAC	CGG	GTG	GAC	GAA	CTG	ACC	CTG	GGA	2416
A	P	L	V	L	P	E	Q	G	T	V	R	L	Q	V	A	V	G	823
GCA	CCG	CTT	GTG	CTG	CCC	GAG	CAG	GGC	ACG	GTC	CGG	CTG	CAG	GTC	GCC	GTC	GGC	2470
G	P	D	E	A	G	R	R	S	V	G	V	Y	A	Q	T	E	D	841
GGC	CCC	GAC	GAG	GCG	GGG	CGG	CGC	TCG	GTC	GGT	GTG	TAC	GCG	CAG	ACG	GAG	GAC	2524
G	P	W	T	Q	H	A	T	G	V	L	G	G	G	V	L	G	G	859
GGC	CCC	TGG	ACG	CAG	CAC	GCG	ACC	GGT	GTG	CTC	GGC	GGC	GGT	GTG	CTC	GGC	GGC	2578
G	S	S	S	A	D	R	V	T	E	T	E	A	W	P	P	T	G	877
GGC	AGC	AGC	TCG	GCC	GAT	CGC	GTC	ACT	GAG	ACG	GAG	GCA	TGG	CCA	CCG	ACT	GGT	2632
A	E	A	V	D	V	A	G	L	Y	E	R	F	A	R	T	G		894
GCG	GAG	GCC	GTT	GAT	GTC	GCC	GGG	CTC	TAC	GAG	AGG	TTC	GCC	CGG	ACC	GGA		2683

FIG. 2. Nucleotide sequence of the truncated PKS part. The putative ribosomal-binding site is underlined.



EF-76 AT	.....EE	TSQEDAQLPP	...AVVPWVL		
Rif1	RDWPRGDRPR	RAGVSSFGVS	GTNVHLIEE	APEEPAAAVP	TSADVPLVV
Rif3	REWPRNGRPR	RAGVSAFGVS	GTNAHLIEE	APAEFPVPTP	.EVPLVPVVV
Ery2	VPWPAGERPR	RAGVSSFGVS	GTNAHVIVEE	APAEQEART	.ERGPLPFVL
Consensus	..W.....	.....EE	...E.....	.....V.	
EF-76 AT	SAKSDAGVRG	QAARLQSAVA	GDTSPGMTDI	GLSLVTTRAA	FERRAVVLGG
Rif1	SARSTGSLAG	QADRLT...E	VDVP..LGHL	AGALVAGRAV	LEERAVVVAG
Rif3	SARSRASLAG	QAGRLAGFVA	GDAS..LAGV	ARALVTNRAA	LTERAVMMVG
Ery2	SGRSEAVVAA	QARALAEHLR	DTPELGLTDA	AWTLATGRAR	FDVRAAVLGD
Consensus	S..S.....	QA..L.....	.....L....	RA..RA.....	
EF-76 AT	DRAALVSGLT	ALTEGREATG	VVRGAVVGS	ARVAFVFPGR	GVAVGGDGGW
Rif1	SAEEARAGLG	ALARGEAAPG	VVTG.TAGKP	GKVVWVFPQ	GTQWVGMGRE
Rif3	SREEAVTNLE	ALARGEDPAA	VVTG.RAGSP	GKLVWVFPQ	GSQWIGMGRE
Ery2	DRAGVCAELD	ALAEGRPSAD	AVAP.VTSAP	RKPVLVFPQ	GAQWVGMARD
Consensus	.....AL..G.....	.V.....	.....VFPG.	G....G....	
EF-76 AT	VAGVFAGVRG	AIGECAAASA	PFVDWSLGDV	LRGGKGAAEA	LERVDVVQP
Rif1	LLDASPVFAE	RIKECAAALD	QWTDWSLLDV	LRG...DGD.	LDSVEVLQPA
Rif3	LLDSSPVFAE	RVAECAAALE	PWIDWSLLDV	LRG...ESDL	LDRVDVQPA
Ery2	LLESSEVFAE	SMSRCAEALS	PHTDWKLLDV	VRG.DGGPDP	HERVDVLQPV
Consensus	.....CA.A..	...DW.L.DV	.RG.....	...V.V.QP.	
EF-76 AT	LWAVMVSLAE	LWRSYGVPEPA	AVIGHSQGEI	AAACVAGALS	LEDAARVVAL
Rif1	CFAVMVGLAA	VWESAGVRPD	AVVGHSQGEI	AAACVSGALT	LDDAAKVVVAL
Rif3	SFAMMVGLAA	VWQSVGVRPD	AVVGHSQGEI	AAACVSGALS	LQDAAKVVVAL
Ery2	LFSIMVSLAE	LWRAHGVTPA	AVVGHSQGEI	AAAHVAGALS	LEAAAKVVVAL
Consensus	....MV.LA.	.W...GV.P.	AV. <u>GHSQGEI</u>	AAA.V.GAL.	L..AA.VVAL
EF-76 AT	RSQALRA.LS	GGGGMVSVSL	PVKAVRERLV	RWGERLSVAA	VNGPSAVVVS
Rif1	RSQAIARLS	GRGGMASVAL	SEDEANARLG	LWDGRIEVAA	VNGPASVVIA
Rif3	RSQAIATRLA	GRGGMASVAL	SEEDATAWLA	PWADRVQVAA	VNSPASVVIA
Ery2	RSQVLRE.LD	DQGGMVSVGA	SRDELETVLA	RWDGRVAVAA	VNGPGTSVVA
Consensus	RSQ.....L.	..GGM.SV..	.....W.....	VAA.VN.P...V..	
EF-76 AT	GDADALDELL	AVCEGEEIRA	RRIPVYASH	CAHVEEIEET	LLRELADIAP
Rif1	GDAQALDEAL	EVLADGVRV	RQVAVDYASH	TRHVEDIRDT	LAETLAGITA
Rif3	GEAQALDEVV	DALSGQEVV	RRVAVDYASH	TNQVEAIEDL	LAETLAGIEA
Ery2	GPTAELDEFF	AEAEAREMKP	RRIAVRYASH	SPEVARIEDR	LAAELGTITA
Consensus	G....LDE..	.....R...V.Y. <u>SH</u>	...V..IE..	L...L..I..	
EF-76 AT	RASSVPFYSR	VTAG.VLDTT	GLDAGYWYRN	LRQTVRFDET	VRTLLADGFQ
Rif1	QAPDVPFRST	VTGGWVRDAG	VLDGGYWYRN	LRNQVRFGPA	VAELLEQGHG
Rif3	QAPKVPFYST	LIGDWIRDAG	IVDGGYWYRN	LRNQVGFQPA	VAELVRQGHG
Ery2	VRGSVPLHST	VTGE.VIDTS	AMDASYWYRN	LRRPVLFEQA	VRGLVEQGF
Consensus	....VP.....	D....D..YWYRN	LR..V.F...	V..L...G..	

EF-76 AT	VFIEASAHPV	LTMGVEQTAE	DHGTRVTAVG	SLRRDDGGPD	RFATSLAEAY
Rif1	VFVEVSAHPV	LVQPISELT.	....DAVVTG	TLRRDDGGLR	RLLTSMAELE
Rif3	VFVEVSAHPV	LVQPLSELS	....DAVVTG	SLRREDGGLR	RLLTSMAELE
Ery2	TFVEVSPHPV	LLMAVEETA	HAGAEVTCVP	TLRREQSGPH	EFLRNLLRAH
Consensus	.F.E.S.HPV	L.....	.....	.LRR...G..	.....
EF-76 AT	VGGAPVDWAR	MFAGTGAERA	DLPTYAFQRT	HFWLESETVE	AGDVPSVGLD
Rif1	VRGVRVDWAT	LVP...PARV	DLPTYAFDHO	HFWLR.PAAQ	A.DAVSLGQA
Rif3	VQGVPLDWT	VLPR..TGRV	DLPKYAFDHR	HYWLR.PAES	ATDAASLGQA
Ery2	VHGVGADLRP	AVAG..GRPA	ELPTYPFEHQ	RFWPR..PHR	PADVSALGVR
Consensus	V.G...D...	.....	..P.Y.F...	..W.....D....G..	.....
EF-76 AT	SAGHPLLGA	VPLPDS....	.....	.....	.....
Rif1	AAEHPLLGA	VRLPQSDGLV	FTSRLSLRTH	PWLADHTIGG	VVLFPGTGLV
Rif3	AADHPLLGA	VELPQSDGLV	FTSRLSVRTH	PWLADHAVGG	VVILPGSGLA
Ery2	GAEHPLLAA	VDVPGHGGAV	FTGRLSTDEQ	PWLAEHVVGG	RTLVPGSVLV
Consensus	...HPLL.A.	V..P.....V	FT.RLS....	PWLA.H..GG	.....

FIG. 4. Comparison of the amino acid sequence of the EF-76 AT domain with the methylmalonyl-CoA acyltransferase domains from erythromycin (Ery2, Q03131) and rifamycin (Rif1, O52790; Rif3, O52789). The conserved amino acids of the active site (August et al., 1998, Donadio and Katz, 1992) are underlined and the serine residue of the active site is shown in bold character.



EF-76 DH	....DGFLLT	GRLSLRTHPW	VAD <b>H</b> AVADVT	LLPGTAFVEL	LMRAGDAVGC
Rif3	LPQSDGLVFT	SRLSLKSHPW	LAG <b>H</b> AIGGVV	LIPGTVYVDL	ALRAGDELGF
Rif1	LPQSDGLVFT	SRLSLRTHPW	LAD <b>H</b> TIGGVV	LFPGTGLVEL	AVRAGDEAGC
Ery2	.....	.....W	TP.....	.....IEK	PE.SGNLDG.
Consensus	LPQSDG...T	.RLSL..HPW	... <u><b>H</b></u> ... <u><b>V</b></u> . <u><b>L</b></u> .PGT.....	..R.G...G.	
EF-76 DH	DRVDELTLGA	PLVLPEQGTV	RLQVAVGGPD	EAGRRSVGVY	AQTEDG.PWT
Rif3	GVLEELVIEA	PLVLGERGGV	RVQVAVSGPN	ETGSRAVDVF	SMREDGDEWT
Rif1	PVLDELVTEA	PLVVPQGQGV	NVQVTVSGPD	QNGLRTVDIH	SQRDD..VWT
Ery2	....DWLVVT	PLISP.....	.....	.....	.....EWT
Consensus	.....	PL.....V	..QV.V.GP.	..G.R.V...	....D...WT
EF-76 DH	QHATGVLGGG	.....	.....	.....	.....
Rif3	RHATGLLGAS	TSREPSRFD	AAWPPAGAEP	IDVENFYTDL	TERGYAYSGA
Rif1	RHATGTVSAT	PASSPG.FDF	TAWPPPDGQR	VEIGDFYADL	AERGYAYGPL
Ery2	EMLCEAINAN	.....	.....GG..	.....	.....
Consensus	.....	.....FDF	.AWPP.....	.....FY.DL	.ERGYAY...
EF-76 DH	.....	.....	.....	.....	.....
Rif3	FQGMRAVWRR	GDEVFAEVAL	PDDHREDAGK	FGLHPALLDA	ALHTNAFANP
Rif1	FQGVRAVWQR	GEDVFAEVAL	PEDRREDAAR	FGLHPALLDA	ALQGTIAAAA
Ery2	....RALR..	.....CEVDT	S.....ASR	TEMAQAVAQA	G...TGFRG.
Consensus	FQG.RA...R	G..VF.EV..	....REDA..	.....A	.....
EF-76 DH	.....	.....	.....	.....	.....VLGGGSSSA
Rif3	DDD...RSVL	PFAWNGLVLH	AVGASALRVR	VAPGGPDALT	FQAADETGGL
Rif1	ASGQPGKSVM	PFSWNRLALH	AVGAAGLRVR	VAPGGPDALT	VEAADETGAP
Ery2	.....	.....VLSLL	SSDESACRPG	VPAGAVGLLT	LVQALGDAG.
Consensus	.....SV.	PF.WN.L.L.	.....	V..G....LT	.....
EF-76 DH	DRVTETE...	.....	.....	.....	.....
Rif3	VVTMDSLVS	EVSAAQLETA	AGEERDSLFO	VDWIEVPATE	TAATEH.AEV
Rif1	VLTMDSLILR	EVALDQLDTA	RAG...SLYR	VDWTPLPTVD	SAVPAGRAEV
Ery2	.....	.VDAPVWCLT	QGA.....	...VRTPADD	DLARPA.QTT
Consensus	.....	EV.....	.....	VDW.....	.....

FIG. 5. Comparison of the amino acids sequence of the EF-76 DH domain with the DH domains from erythromycin (Ery2, Q03131) and rifamycin (Rif1, O52790; Rif3, O52789). The conserved amino acids of the active site (see Results section) are underlined and the active site site is shown in bold.

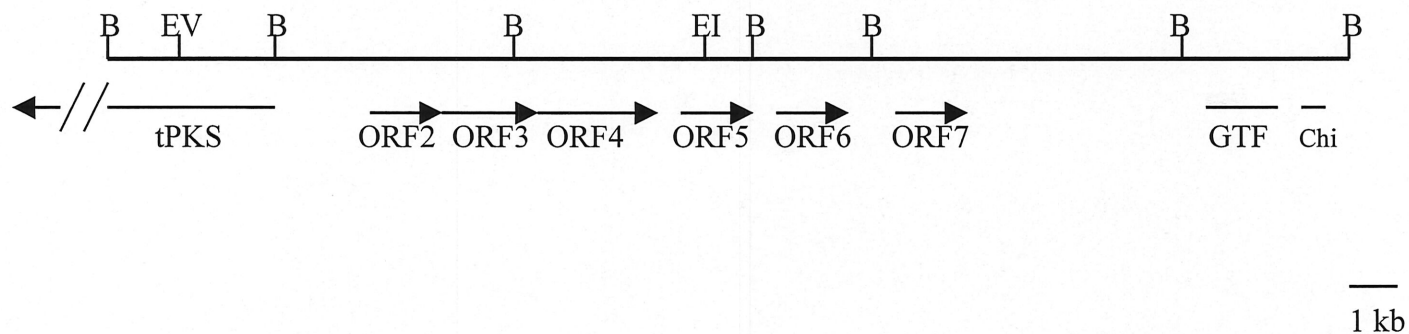


FIG. 6. Gene arrangement and restriction sites in the DNA region encoding a type I PKS, isolated in EF76.

The EF-76 DNA fragment is shown by the heavy line. The arrows are used to indicate the gene position and size.

The restriction enzymes are designated as follows: B, *Bam*HI; EV, *Eco*RV; EI, *Eco*RI. The ORFs are designated as follows: tPKS, truncated PKS; ORF2, transcription regulator; ORF3, membrane protein; ORF4, ATP binding protein; ORF5, transporter; ORF6, alcohol dehydrogenase; ORF7, unknown; GTF, glycosyltransferase and Chi, chitosanase.

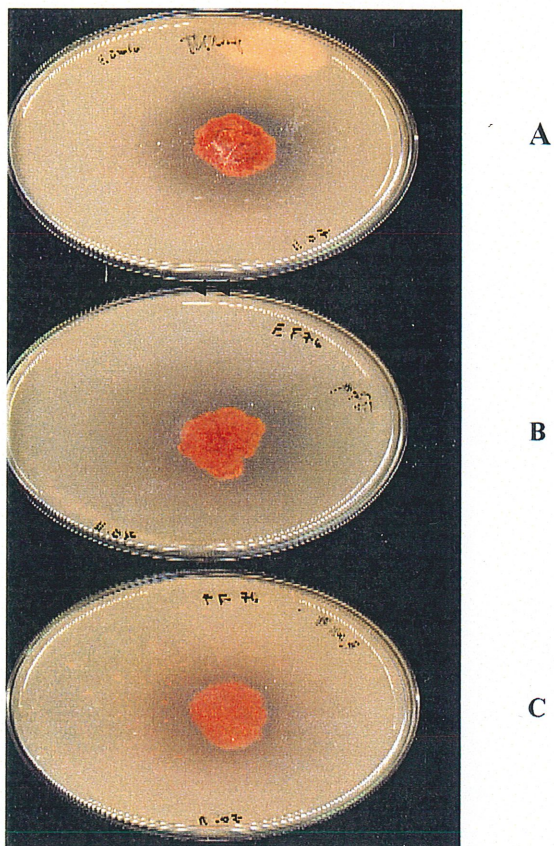


FIG. 7. Assay of geldanamycin inactivation by *S. lividans* TK24 transformed with a gene encoding a glycosyl transferase. The geldanamycin producer strain EF-76 is streaked in the middle of the plate and the indicator strain is spread around it (see Material and Methods for more details). *S. lividans* TK24 wt (A) is sensitive to geldanamycin. *S. lividans* TK24 (pFD666) (B) is sensitive to geldanamycin. *S. lividans* TK24 (pFDBm3) (C) is resistant to geldanamycin and is even able to biosynthesize its red pigment, actinorhodin.

EF-76 GTF ..... **GGTISTTLNL** **AAALADR.HE** **VTIVSMLRHR** **THPRFVIDPR**  
*St. coel* ..... **GGTNRTVINL** **AEALSVQ.HD** **VEIVSVFERRA** **NATKFEISPR**  
*Sh. boyd* ..... **GGTERVIANV** **ANSLSEI.YD** **IRIYSLSTTE** **GECFYPLNER**  
*R. meli* VTIVLPLGLGA **GGTEHVNVNLV** **ANHWVRRGCK** **VTIITLEPPD** **AKPYALDPK**  
*Se. marce* ..... **.GAEKVVLTL** **CQGMQQQGH** **VSLISL...R** **DVCNYPIPSG**  
*C. cres* ..... **LGGLEQVFLDY** **QPILEAW...** **.....AARRG** **GRCVGVVRKG**  
*A. tume* ..... **GGAELEFLADL** **VKAGPHSWRA** **CFLSGGATAE** **DLAEAGRPPV**

Consensus ..... **GG**.....

EF-76 GTF **VTXVPLVDIH** **ADAADP...L** **LHQPAEVFPT** **AEKRYRQYSR** **LTDQRAREYL**  
*St. coel* **ITVRALVDLR** **PGSSDRGAAG** **SDEPSAVVPR** **QEEFFAQYSR** **FTDERIIRD**  
*Sh. boyd* **IHIKHMGMCM** **YEHEKS...V** **LKKTFFKKLIN** **VFYSINEFKK** **IRSNYIIGVN**  
*R. meli* **ISIERLG.LP** **PQRAGK...** **IEAGLLVLKR** **IYRLRSAIRR** **SQPDFVLSFL**  
*Se. marce* **IDYQVVADRS** **RAPWRK...** **LTELSRRAAA** **LDRAIAEHER** **QHGAFDLVFS**  
*C. cres* ..... **GKMA** **VAQANR...** **.TPPLSAMP.** **...ALTDWDP** **ITVGAARALV**  
*A. tume* **MLSAGEKMLS** **IRRNSS...** **FGALARGAAD** **VMAVAWQLSR** **EAKHFDVICA**

Consensus ..... .

EF-76 GTF **RSCDADVIIG** **TRPGINVYLA** **RFAPPRALR.** **IAQEHLTHDT** **HTKRLRQAQLA**  
*St. coel* **RRTDADVVG** **TRPSLNLFVA** **AHTREGALR.** **VAQEHMTHLA** **IPPAVRAEMA**  
*Sh. boyd* **KNINILLVLS** ..... **FLL** **NYKRKRDKL** **IGWEHFHNA** **PMSLFTRILR**  
*R. meli* **TRTNVLTLLA** **T.....I** **GLQAPVIVS.** **.ERNNPALQP** **FGPVWQVQR**  
*Se. marce* **NLHKTDRIVS** **RSKRLASDRL** **WFCIHGILS.** **..TSYLGRHK** **GLDRWLKQRK**  
*C. cres* **KTYRPALIFS** ..... **H** **GQRPARVFD.** **...KAAPADV** **VRAVCLHKPS**  
*A. tume* **NSQKALFVCA** ..... **LA** **AKLSRRPLVW** **ILHDIVTDTA** **FSATNRRASL**

Consensus ..... .

EF-76 GTF **R.QYRDLESV** **VTTEADAAV** **YRARMRLPGG** **RILAI PNSVP** **DPGPPPTAA**  
*St. coel* **R.VYPRDAI** **TTVTEADAGS** **FMENTPIPGI** **TVVGIPNSVP** **RPSVQP..SD**  
*Sh. boyd* **ELLYKYLDL** **IVLTKFDEEY** **YKAKK...I** **KTTVIENAYT** **AMDVDNLKTV**  
*R. meli* **R.LYPRAFGL** **VTMTKGALDY** **FPEKMR...S** **RGWVIANAVD** **LPGEWQ..KR**  
*Se. marce* **IANVYQGRNI** **VAVSQAVGGD** **LQONLPIRPR** **RLAVINPF** **IDAIRQAAA**  
*C. cres* **FDVTPGTHYV** **CVGQHLAALA** **IERGAP..AD** **HVWLVPNAVK** **PPGVEAQPFA**  
*A. tume* **AFARIFARLV** **AVNSEETGRA** **FIEAGG.EAD** **KVRIVYNGFD** **PAKAKLHDAG**

Consensus ..... **N**.....

EF-76 GTF **PTSSP.....** ..... **RRTA** **GARQAVRPAH** **RGVHRRRQA** **.PGLVSARLW**  
*St. coel* **CTRKI.....** ..... **VVSA** **GRMHVVKRYD** **LLIRAFGSLA** **.DEFPDWQLR**  
*Sh. boyd* **SKGNV.....** ..... **ILSI** **GRHTSQKRF** **KLLHIWKEIV** **.KKNLGLKLR**  
*R. meli* **RGNNI.....** ..... **LAAV** **GRLTRQKGF** **LLIEAFARIA** **.TRHPEWKL**  
*Se. marce* **PCELAGQDY.** ..... **LVHV** **GRFHATKRHD** **RLKAYVQSG** **.IQAP.LALI**  
*C. cres* **EAGRPIR...** ..... **IVAA** **GRLHPKKGFD** **VLIHAVGKLR** **.AWDYEVTC**  
*A. tume* **MAARLRAELG** **LGPQPLVGLF** **GRLSEWKGQH** **VFLDALAAME** **GVQAVIVGGA**

Consensus ..... **G**.....

EF-76 GTF **LGRGQGAAPG** **AD...QEAGP** **GPGGADGAV** **SPIEAEFAKA** **SIVASAS.DA**  
*St. coel* **IYGDGGEAGK** **LRTLVTLEGL** **SGRALLMGGF** **SPIDSEWAKG** **SIAAVTS.SA**  
*Sh. boyd* **IVGDGPLLDE** **NKKLAQKLN** **SDSVVFAPPT** **KKINEEYQNA** **SLFLMTS.DY**  
*R. meli* **IWGEDDRKS** **LEALRDALD** **RDRVELPGVT** **QRPGLWVETA** **DVFLVSS.RY**  
*Se. marce* **GTGDDARVAE** **VKRLAALGI** **AERVLFLGFQ** **ANPYPFIRHA** **SLLVLSS.DS**  
*C. cres* **IAGEGDERGA** **LEGLIRDLDL** **EASVTLKGWT** **GDVAGFLATG** **DLFAFPS.HQ**  
*A. tume* **LFGQEAYEAR** **IREQASRLGL** **DGRVRFGLFR** **SDVPELMASM** **DVVAHTSIVA**  
Consensus ..... **S**.....

EF-76 GTF	<b>ESFGMTLVEA</b>	<b>MRCGTPVVAT</b>	<b>DCPLGPAEII</b>	<b>NDGVDGRLVP</b>	<b>MGDRQALAVA</b>
<i>St. coel</i>	<b>ESFGMTLVEA</b>	<b>MRCGLPVVST</b>	<b>DCPVGPREIL</b>	<b>SDGEDGFLVP</b>	<b>NGQVSGIAWG</b>
<i>Sh. boyd</i>	<b>EAFPMVLLEA</b>	<b>LKNGLPCIAF</b>	<b>DCDTGPRDII</b>	<b>VNGVDGFLVIP</b>	<b>INDSLKFVEK</b>
<i>R. meli</i>	<b>EGWGIVLLEA</b>	<b>MAAGLPVVSF</b>	<b>ACEWGPSDMV</b>	<b>KHGEDGILVP</b>	<b>SNNVDALAEA</b>
<i>Se. marce</i>	<b>EGFGNVLVES</b>	<b>LLCGTPVVST</b>	<b>RCPGGPAEIL</b>	<b>EKAGMANALA</b>	<b>ELNAASLAEK</b>
<i>C. cres</i>	<b>EGFPLTLLEA</b>	<b>MAVGLPVVAS</b>	<b>EID.GPLEIL</b>	<b>TDGRDGRLLVP</b>	<b>DNDPDRLAEA</b>
<i>A. tume</i>	<b>EPFGRVVVEA</b>	<b>MMCGRPVVAT</b>	<b>RGG.GVTEII</b>	<b>RDGETGLLVP</b>	<b>PGDASALAAA</b>
Consensus	<b>E.....E.</b>	<b>...G.....</b>	<b>....G.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>
EF-76 GTF	<b>LCDLIADepD</b>	<b>RHRMGKAARA</b>	<b>AAR.RFDPAH</b>	<b>VARAYEELFG</b>	<b>DLAATRSARA</b>
<i>St. coel</i>	<b>LRRMLADEVL</b>	<b>RRDMGEAALR</b>	<b>NAA.RYDPAA</b>	<b>VADRYVRLFE</b>	<b>DAARRRAAAV</b>
<i>Sh. boyd</i>	<b>TIDVMNENL</b>	<b>RYQLSSNAKV</b>	<b>NVE.RFNEEH</b>	<b>ISKKWLIKLK</b>	<b>QLQ.....</b>
<i>R. meli</i>	<b>LSRMLGDGEL</b>	<b>RSRLAANAFA</b>	<b>SAK.RYLPER</b>	<b>ILSQWDAVAS</b>	<b>SALKHSAEH</b>
<i>Se. marce</i>	<b>MAEIIYANPP</b>	<b>.....QINQQ</b>	<b>QLL.SYGLEP</b>	<b>ICRQYIELKE</b>	<b>K.....</b>
<i>C. cres</i>	<b>LAELISDRET</b>	<b>AVRLGAAARQ</b>	<b>QVLTEYSPQE</b>	<b>LARRLEAALD</b>	<b>GMTSRA....</b>
<i>A. tume</i>	<b>LGTILSDPAL</b>	<b>AQRLGQSGRE</b>	<b>DVSDRFSLQE</b>	<b>TCRSVSALLT</b>	<b>EAA.....</b>
Consensus	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>
EF-76 GTF	<b>WQRRK..GPG</b>	<b>RPRGPGPAPP</b>	<b>APLTPATP..</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>
<i>St. coel</i>	<b>RGYRAPAGSR</b>	<b>RTGAPATVPP</b>	<b>VGIGAATVDV</b>	<b>VADGAGWLRV</b>	<b>STEGPGDGRH</b>
<i>Sh. boyd</i>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>
<i>R. meli</i>	<b>.....</b>	<b>.ARAVSAAEP</b>	<b>G...SA...</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>
<i>Se. marce</i>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>
<i>C. cres</i>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>
<i>A. tume</i>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>
Consensus	<b>...R...G..</b>	<b>R.....P</b>	<b>.....AT...</b>	<b>.....</b>	<b>.....</b>

FIG. 8. Alignment of the amino acids sequence of the EF-76 glycosyltransferase (GTF) with those from *S. coelicolor* (*St. coel*, O69854), *Shigella boydii* (*Sh. boyd*, Q93CS6), *Rhizobium meliloti* (*R. meli*, Q92VF2), *Serratia marcescens* (*Se. marce*, Q9X978), *Caulobacter crescentus* (*C. cres*, Q9A3M9) and *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tume*, AAL44372). The amino acids identical to those of the EF-76 GTF sequence are shown in bold.

## References

- Allen, I.W. and D.A. Ritchie.** 1994. Cloning and analysis of DNA sequences from *Streptomyces hygroscopicus* encoding geldanamycin biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 243: 593-599.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Aparicio, J.F., I. Molnár, T. Schwecke, A. König, S.F. Haydock, L.E. Khaw, J. Staunton and P.F. Leadlay.** 1996. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene.* 169: 9-16.
- Aparicio, J.F., R. Fouces, M.V. Mendes, N. Olivera, and J.F. Martín.** 2000. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*. *Chem. Biol.* 7: 895-905.
- August, P.R., L. Tang, Y.J. Yoon, S. Ning, R. Müller, T.-W. Yu, M. Taylor, D. Hoffmann, C.-G. Kim, X. Zhang, C.R. Hutchinson and H.G. Floss.** 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deduction from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.* 5: 69-79.
- Bate, N., A.R. Buttler, A.R. Gandecha, E. Cundliffe.** 1999. Multiple regulatory genes in the tylosin biosynthetic cluster of *Streptomyces fradiae*. *Chem. Biol.* 6: 617-624.
- Bechthold, A., J.K. Sohng, T.M. Smith, X. Chu and H.G. Floss.** 1995. Identification of *Streptomyces violaceoruber* Tu22 genes involved in the biosynthesis of granaticin. *Mol. Gen. Genet.* 248: 610-620.
- Bevitt, D.J., J. Cortes, S.F., Haydock, P.F. Leadlay.** 1992. 6-Deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*. Cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme. *Eur. J. Biochem.* 204: 39-49.
- Bisang, C., P.F. Long, J. Cortes, J. Westcott, J. Crosby, A.L. Matharu, R.J. Cox, T.J. Simpson, J. Staunton and P.F. Leadlay.** 1999. A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide polyketide synthases. *Nature.* 401: 502-505.
- Brautaset, T., O.N. Sekurova, H. Sletta, T.E. Ellingsen, A.R. Strøm, S. Valla and S.B. Zotchev.** 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* 7: 395-403.

- Butler, M.J., F.J. Friend, I.S. Hunter, F.S. Kaczmarek, D.A. Sugden and M Warren.** 1989. Molecular cloning of resistance genes and architecture of a linked gene cluster involved in biosynthesis of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *Mol. Gen. Genet.* 215: 231-238.
- Caballero, J.L., F. Malpartida and D.A Hopwood.** 1991. Transcriptional organization and regulation of an antibiotic export complex in the producing *Streptomyces* culture. *Mol. Gen. Genet.* 228: 372-380.
- Cundliffe, E.** 1992. Glycosylation of macrolide antibiotics in extracts of *Streptomyces lividans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 348-352.
- Deboer, C., P.A. Meulman, R.J. Wnuck and D.H. Peterson.** 1970. Geldanamycin, a new antibiotic. *J. Antibiot.* 23: 442-447.
- Denis, F., and R. Brzezinski.** 1991. An improved aminoglycoside resistance gene cassette for use in Gram-negative bacteria and *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Letters.* 81: 261-264.
- Donadio, S. and L. Katz.** 1992. Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* 1992. 111: 51-60.
- Donadio, S., M.J. Staver, J.B. McAlpine, S.J. Swanson and L. Katz.** 1991. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science.* 251: 675-679.
- Doumbou, C.L., V.V. Akimov, M. Côté, P.M. Charest and C. Beaulieu.** 2001. Taxonomic study on non pathogenic streptomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 451-456.
- Faucher, E., T. Savard and C. Beaulieu.** 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 197-202.
- Fernandez, E., U. Weissbach, C. Sanchez Reillo, A.F. Brana, C. Mendez, J. Rohr and J.A.Salas.** 1998. Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J. Bacteriol.* 180: 4929-4937.
- Gaisser, S., A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning and A. Bechthold.** 1997. Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tu57. *J. Bacteriol.* 179: 6271-6278.
- Gandecha, A.R., S.L. Large, and E. Cundliffe.** 1997. Analysis of four tylosin biosynthetic genes from the tyLLM region of the *Streptomyces fradiae* genome. *Gene* 184: 197-203.

- Heisey, R.D. and A.R. Putnam.** 1986. Herbicidal effects of geldanamycin and nigericin, antibiotics from *Streptomyces hygroscopicus*. J. Nat. Products. 49: 859-865.
- Hernández, C., C. Olano, C. Mendez and J.A. Salas.** 1993. Characterization of a *Streptomyces antibioticus* gene cluster encoding a glycosyltransferase involved in oleandomycin inactivation. Gene 134: 139-140.
- Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Keiser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward and H. Schrempf.** 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. F. Crowe and Sons Ltd. The John Innes Foundation. Norwich. England. 355p.
- Hopwood, D.A. and D.H. Sherman.** 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. Annu. Rev. Genet. 24: 37-66.
- Jenkins, G. and E. Cundliffe.** 1991. Cloning and characterization of two genes from *Streptomyces lividans* that confer inducible resistance to lincomycin and macrolide antibiotics. Gene 108:55-62.
- Katz, L. and S. Donadio.** 1993. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. Ann. Rev. Microbiol. 47: 875-912.
- Kobayashi, S., T. Kuzuyama, and H., Seto.** 2000. Characterization of the *fomA* and *fomB* gene products from *Streptomyces wedmorensis*, which confer fosfomicin resistance to *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 647-650.
- Lomovskaya, N., S.-K., Hong, S.-U. Kim, L. Fonstein, K. Furuya and C.R. Hutchinson.** 1996. The *Streptomyces peuceitius dnrC* gene encodes a UvrA-like protein involved in daunorubicin resistance and production. J. Bacteriol. 178: 3238-3245.
- Lomovskaya, N., S.L. Otten, Y. Doi-Katayama, L. Fonstein, X.C. Liu, T. Takatsu, A. Inventi-Solari, S. Filippini, F. Torti, A.L. Colombo and C.R. Hutchinson.** 1999. Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peuceitius*: cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. J. Bacteriol. 181: 305-18
- MacNeil, D.J., J.L. Occi, K.M. Gewain, T. MacNeil, P.H. Gibbons, C.L. Ruby and S.J. Danis.** 1992. Complex organization of the *Streptomyces avermitilis* genes encoding the avermectin polyketide synthase. Gene 115: 119-125.
- Merson-Davies, L.A. and E. Cundliffe.** 1994. Analysis of five tylosin biosynthetic genes from the *tylBA* region of the *Streptomyces fradiae* genome. Mol. Microbiol. 13: 349-355.



- Molnár, I., J.F. Aparicio, S.F. Haydock, L.E. Khaw, T. Schwecke, A. König, J. Staunton and P.F. Leadlay.** 1996. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene* 169: 1-7.
- Motamedi, H. and C.R. Hutchinson.** 1987. Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4445-4449.
- Neckers, L., T.W. Schulte and E. Mimnaugh.** 1999. Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity. *Investigational New Drugs.* 17: 361-373.
- Piel, J., C., Hertweck, P.R., Shipley, D.M. Hunt, M.S., Newman and B.S. Moore.** 2000. Cloning, sequencing and analysis of the enterocin biosynthesis gene cluster from the marine isolate '*Streptomyces maritimus*': evidence for the derailment of an aromatic polyketide synthase. *Chem. Biol.* 7: 943-955.
- Pridham, T.G., P. Anderson, C. Foley, L.A. Lindenfelser, C.W. Hesse and R.G. Benedict.** 1957-1957. A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes. *Antibiot. Annu.* 1956-1957: 947-953.
- Quirós, L.M., I. Aguirrezabalaga, C. Olano, C. Mendez and J.A. Salas.** 1998. Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* 28: 1177-1185.
- Rothrock, G.S. and D. Gottlieb.** 1981. Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. *J. Antibiot.* 34: 830-835
- Rothrock, G.S. and D. Gottlieb.** 1984. Role of antibiosis of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.* 30: 1440-1447.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schwecke, T., J.F. Aparicio, I. Molnár, A. König, L.E. Khaw, S.F. Haydock, M. Oliynyk, P. Caffrey, J. Cortés, J.B. Lester, G.A. Böhm, J. Staunton and P.F. Leadlay.** 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 7839-7843.
- Stohl, E.A., S.F. Brady, J. Clardy and J. Handelsman.** 1999. ZmaR, a novel and widespread antibiotic resistance determinant that acetylates zwittermycin A. *J. Bacteriol.* 181: 5455-5460.

**Strohl, W. R.** 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* 20: 961-974.

**Summers, R.G., S. Donadio, M.J. Staver, E. Wendt-Pienkowski, C.R. Hutchinson and L. Katz.** 1997. Sequencing and mutagenesis of genes from the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* that are involved in L-mycarose and D-desosamine production. *Microbiology* 143: 3251-3262.

**Swan, D.G., A.M. Rodriguez, C. Vilches, C. Mendez and J.A. Salas.** 1994. Characterisation of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. *Mol. Gen. Genet.* 242: 358-362.

**Tang, L., Y.J. Yoon, C.-Y. Choi and C.R. Hutchinson.** 1998. Characterization of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase involved in rifamycin B biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei*. *Gene.* 216: 255-265.

**Toussaint, V., D. Valois, M. Dodier, E. Faucher, C. Déry, R. Brzezinski, L. Ruest and C. Beaulieu.** 1997. Characterization of actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Phytoprotection.* 78: 43-51.

**Valois, D. K., Fayad, T. Barasubiye, M. Garon, C. Déry, R. Brzezinski and C. Beaulieu.** 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1630-1635.

**Vara, J., M. Lewandowska-Skarbek, Y.G. Wang, S. Donadio and C.R. Hutchinson.** 1989. Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J. Bacteriol.* 171: 5872-5881.

**Vara, J., J.A. Perez-Gonzales and A. Jimenes.** 1985. Biosynthesis of puromycin by *Streptomyces alboniger*: characterization of puromycin N-acetyltransferase. *Biochemistry* 24: 8074-8081.

**Vilches, C., C. Hernandez, C. Mendez and J.A. Salas.** 1992. Role of glycosylation and deglycosylation in biosynthesis of and resistance to oleandomycin in the producer organism, *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* 174: 161-165.

**Wehrli, W.** 1977. Ansamycins. Chemistry, biosynthesis and biological activity. *Topics in current chemistry.* 72: 21-49.

**Xue, Y., L. Zhao, H.-W. Liu and D.H. Sherman.** 1998. A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12111-12116.

## CHAPITRE 2

### 2.0 Propriétés antagonistes de deux souches recombinantes de *Streptomyces melanosporofaciens* obtenues par fusion de protoplastes intraspécifique

Des études menées antérieurement ont permis d'isoler une souche d'abord identifiée comme *S. hygroscopicus* var. *geldanus* EF-76 capable de protéger, en serre, le framboisier contre la pourriture des racines causée par le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* (Toussaint et al., 1997; Valois et al., 1996). La souche EF-76 a été renommée *S. melanosporofaciens* (Doumbou et al., 2001). Parmi les mécanismes d'antagonisme mis en évidence chez EF-76, l'antibiose par la production de geldanamycine lui permettait d'inhiber la croissance du champignon (Toussaint et al., 1997; Valois et al., 1996). La geldanamycine est un métabolite secondaire à large spectre d'activité, qui inhibe la prolifération des bactéries, des champignons, de certaines cellules végétales et de cellules tumorales de mammifères (De Boer et al., 1970; Heisey et Putnam, 1986; Neckers et al., 1999; Yamaki et al., 1989).

Le but de cette étude était de déterminer le rôle de la geldanamycine dans l'antagonisme envers *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Phytophthora fragariae* var. *rubi* P390 et *Streptomyces scabies* EF-35 et dans la lutte biologique contre la gale commune de la pomme de terre causée par *S. scabies*. La fusion de protoplastes intraspécifique a été utilisée pour générer par recombinaison des mutants stables et prototrophes de la souche EF-76, affectés dans leurs propriétés antagonistes envers les trois microorganismes utilisés. La souche FP-60 qui ne produisait plus aucun métabolite secondaire toxique détectable, était également incapable d'inhiber la croissance des microorganismes. Par contre, FP-54 possédait un pouvoir antagoniste supérieur à la souche sauvage envers les mêmes microorganismes. L'extraction et la séparation des produits extraits du surnageant de culture de FP-54 a montré que ce mutant produisait au moins deux autres nouveaux composés toxiques en plus de la

geldanamycine. Des sondes réalisées à partir de séquences provenant d'une région chromosomique impliquée dans la biosynthèse d'un polycétide de type I chez EF-76, n'ont pas permis de détecter des délétions majeures dans les gènes de biosynthèse chez FP-54. Par contre, les mêmes sondes ont permis de mettre en évidence le réarrangement génétique survenu au niveau des gènes de biosynthèse et des gènes adjacents chez FP-60. Les essais de lutte biologique réalisés en champ ont montré que tant EF-76 que FP-54 protégeaient de façon significative la pomme de terre contre la gale commune causée par *S. scabies* sans pour autant observer un effet plus marqué pour la souche FP-54. Le mutant FP-60, quant à lui, ne possédait aucun effet phytoprotecteur et augmentait même le pouvoir pathogène de la souche *S. scabies*. Cela suggère l'existence d'une communication biochimique entre les souches FP-60 et *S. scabies* dans la rhizosphère des tubercules de pommes de terre.

Cette étude suggère que l'antibiose due à la production de geldanamycine chez EF-76 joue un rôle capital dans la lutte biologique contre *S. scabies*. De plus, la fusion de protoplastes intraspécifique s'est révélée être une excellente méthode non seulement pour améliorer certaines propriétés des souches antagonistes mais encore pour générer des nouvelles molécules bioactives chez les *Streptomyces*.

Ces travaux sont décrits à la section 2.1. Cette section est constituée de l'article S. Agbessi, J. Beauséjour, C. Déry et C. Beaulieu. (2002). Antagonistic Properties of Two Recombinant Strains of *Streptomyces melanosporofaciens* Obtained by Intraspecific Protoplast Fusion. Applied and Environmental Microbiology. (soumis pour publication). J'ai réalisé les expériences qui ont trait à la création et à la caractérisation des mutants par fusion de protoplastes intraspécifique. Julie Beauséjour a effectué les essais sur plantes. J'ai rédigé cet

article en collaboration avec J. Beauséjour et C. Beaulieu. C. Beaulieu et C. Déry ont supervisé le travail.

2.1 Antagonistic Properties of Two Recombinant Strains of *Streptomyces melanosporofaciens* Obtained by Intraspecific Protoplast Fusion.

RUNNING TITLE: RECOMBINANT STRAINS OF *STREPTOMYCES MELANOSPOROFACIENS*

SONYA AGBESSI, JULIE BEAUSÉJOUR, CLAUDE DÉRY AND CAROLE BEAULIEU\*.  
*Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne, Département de biologie,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada*

---

Corresponding author. Mailing address: Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1K 2R1. Phone: (819) 821 8000 ext. 2997. Fax: (819) 821 8049. Email: [carole.beaulieu@courrier.usherb.ca](mailto:carole.beaulieu@courrier.usherb.ca)

## ABSTRACT

Intraspecific protoplast fusion was used to produce stable prototrophic recombinants of *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76, a biocontrol agent of plant disease producing geldanamycin. Two recombinant strains (FP-54 and FP-60) that differed with regard to their antagonistic properties against *Bacillus cereus* ATCC 14579, *S. scabies* EF-35 and *Phytophthora fragariae* var. *rubi* 390 were characterized. FP-60 lost the ability to inhibit the growth of these microbial strains while FP-54 exhibited higher antagonistic activities against them. FP-60 was deficient in geldanamycin biosynthesis whereas FP-54 was shown to produce, in addition to geldanamycin, at least two other antimicrobial compounds that were absent in the culture supernatants of EF-76. As the wild strain EF-76, FP-54 reduced common scab symptoms on potato tuber but no significant difference was observed between the disease index attributed to tubers treated with EF-76 or with FP-54. FP-60 showed no protective effect against common scab. The disease index of tubers treated with this recombinant was worse than the index associated with potato tubers from control treatments.

## INTRODUCTION

Biological control brings a promising alternative to chemical control of plant diseases. Soil ecosystems have been an extraordinary source of potential biocontrol agents (18, 49) and *Streptomyces* species are among the most promising antagonistic microorganisms (8, 11). *Streptomyces* species are Gram-positive, sporulating bacteria that represent a high proportion of the soil microbial biomass. They produce numerous extracellular enzymes involved in the decomposition of soil organic matter (31, 32, 48) as well as bioactive secondary metabolites (22). Furthermore, some reports show that streptomycetes colonize plant rhizosphere with high efficiency (2, 7, 9, 24, 25).

Several studies demonstrated the ability of *Streptomyces* strains to protect plants against pathogens. Mechanisms involved in actinomycete-plant pathogen antagonism were described as antibiosis and lysis (5, 10, 30, 39, 44-47), phytotoxin degradation (6) and rhizocompetence (9, 24, 25, 35, 41). Mycostop is an example of biopesticides available on the market that are made out of *Streptomyces* spores or mycelium (26, 33).

In our laboratory, we are studying *S. melanosporofaciens* strain EF-76 (7, 47). This strain, isolated from a potato tuber (12), has been selected after a screening for both the ability to lyse *Phytophthora fragariae* cell walls and the capacity to inhibit *P. fragariae* growth (47). The antagonistic property of EF-76 was not restricted to oomycete pathogens as *Phytophthora* but extended to most fungi and Gram-positive bacteria (44). The wide range of microbial antagonism attributed to EF-76 is apparently due to geldanamycin production (44). As EF-76, other geldanamycin-producing strains were shown to protect plants against pathogens (40, 46).

Gene manipulation provides a way to investigate the importance of genetic traits of biocontrol agents. Protoplast fusion is a method commonly used with *Streptomyces* species to modify their phenotypic traits. For example, Pettey and Crawford (36) obtained the recombinant strain *Streptomyces* SR10 by an interspecific protoplast fusion between *S. viridosporus* T7A and *S. setonii* 75 vi2. The recombinant *Streptomyces* SR10 was a better lignin decomposer than the two parental strains. Recombination frequency is much lower in intraspecific crosses (1).



Intraspecific crosses have been used to increase antibiotic production (19, 23, 42) and to construct complex genotypes to facilitate genetic mapping (1).

The purpose of this study was to use intraspecific protoplast fusion of *S. melanosporofaciens* EF-76, formerly *S. hygroscopicus* var. *geldanus*, to produce stable genetic modifications, to compare the phenotypic properties of the recombinant strains to the ones of EF-76 and to evaluate their ability to control common scab of potato caused by *S. scabies*.

## MATERIAL AND METHODS

**Microbial strains and culture media.** *S. melanosporofaciens* EF-76 and *S. scabies* EF-35 were isolated in our laboratory from potato tubers (12). EF-76 is an effective biocontrol agent (47) that produces geldanamycin (44). EF-35 is a plant pathogen causing common scab of potato (16). Strains FP-54 and FP-60 were obtained by the intraspecific protoplast fusion of the wild type strain EF-76. Antagonistic property of protoplastic fusants was tested on two indicator species *Bacillus cereus* ATCC 14579 and *P. fragariae* var. *rubi* 390 (47). *Streptomyces* strains, *B. cereus* and *P. fragariae* var. *rubi* were grown on yeast malt extract (YME) broth or agar (15 g/l) (37), on trypticase soy broth (TSB) (Difco Laboratories, Montréal, Canada) and on potato dextrose agar (PDA, Difco Laboratories, Montréal, Canada), respectively.

**Protoplastic fusion.** Protoplasts of the strain EF-76 were made according to the procedure described by Hopwood et al. (20). A solution of 50 % PEG in P buffer (20) was added to  $10^8$  protoplasts. These protoplasts were resuspended by pipetting, and kept 5 minutes at room temperature. Samples of this suspension were plated on R2YE medium (20) and incubated at 30°C. After their regeneration on R2YE plates, colonies were streaked on YME medium for the screening of strains improved or deficient in antibiotics production.

**In vitro antibiosis assays.** The ability of *Streptomyces* fusant strains to inhibit the growth of *B. cereus* ATCC 14579 and of *S. scabies* EF-35 was tested on YME plates as follows. *Streptomyces* strains ( $10^8$  spores) were streaked in the center of YME plates. The plates were

incubated 5 days at 30°C and were then covered with an overlay of soft trypticase soy agar medium (TSA, 0.3 % agar) containing *B. cereus* ATCC 14579 or *S. scabies* EF-35 (500 µl of an overnight culture in 4 ml of soft TSA). After 24 h at 30°C, the diameter of the antibiosis zones around the *Streptomyces* inoculum was recorded. This experiment was carried out in five replicates.

Crossed resistance tests between EF-76 and two fusant strains (FP-54 and FP-60) were carried out as described above except that YME was used instead of TSA and that plates were incubated 48 h following the overlay.

Ability of the fusant strains to inhibit *P. fragariae* var. *rubi* was tested as follows. Fusant strains were streaked ( $10^8$  spores) in the center of PDA plates and incubated for 2 days at 30°C. A piece of PDA medium (8 mm-diameter) from a 7-day-old culture of *P. fragariae* var. *rubi* 390 was then placed at 1 cm from the border of the *Streptomyces* inoculum. *Phytophthora* growth inhibition was recorded after 5-7 days of incubation at 15°C.

Antibiotics were isolated from YME cultures of the fusant strains and of the wild strain EF-76 grown 96 h at 30°C. Cultures (0.5 l) were centrifuged at 5000 X g for 15 min and the supernatants were filtered through paper (Osmonics, Minnetonka, MN). The filtrates were extracted three times with 1/3 volume of chloroform. The chloroform fractions were evaporated on a Büchi Rotavapor R-14 (Büchi Laboratoriums Technik AG., Flawil, Switzerland). The resulting material was then dissolved in chloroform and separated by thin layer chromatography on glass plates precoated with 0.5 mm silica gel 60F-250 (EM science, Zurich, Switzerland) using chloroform:methanol (95:5). After migration, the TLC was air dried and overlaid with soft TSA containing *B. cereus* ATCC 14579. The TLC plate was then incubated overnight at 30°C and the presence or absence of zones of growth inhibition was then recorded.

**Phenotypic properties of the fusant strains.** The taxonomic identity of two selected fusant strains (FP-54 and FP-60) was determined by partial sequencing of their 16S rRNA gene (7). The phenotypic stability of FP-54 and FP-60 was assessed by streaking one colony of each strain on a fresh YME medium. A new transfer was made every week for a six-week period.

Colony aspect and antagonistic properties of fusant strains were examined after this six-week period.

Prototrophy of FP-54 and FP-60 was verified by inoculating them on minimal medium [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0.2 g/l, FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0.01 g/l, glucose 5 g/l and agarose 15 g/l]. Bacterial growth was observed after 5 days of incubation at 30°C. The prototrophic wild strain EF-76 was used as a positive control. The ability of the two fusant strains to produce β-1,3-glucanase, β-1,4-glucanase and β-1,6-glucanase was tested in the same minimal medium containing, instead of glucose, 0.4 % laminarin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1 % carboxymethylcellulose (Fluka, Buchs, Switzerland) and 1 % pustulan (Calbiochem, San Diego, CA), respectively. The plates were incubated 5 days at 30°C and were then overlaid with a solution of Congo red 0.2 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) during 10 min followed by 2 washes with a 1 M NaCl solution. A clear zone appeared around colonies when the carbohydrates had been degraded.

Growth curves of EF-76, FP-54 and FP-60 were established as follows. Two-day old dense cultures were used after standardization to inoculate 100 ml of a fresh YME medium. The flasks were incubated with shaking at 30°C. Ten ml samples were then taken out periodically. The dry weight of cells recovered from these samples was determined. This experiment was carried out in triplicate.

**Southern blot analysis.** *Bam*H1-digested genomic DNAs was transferred onto Hybond N nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Canada) following manufacturer recommendations. Genomic DNAs were hybridized with four probes (Kp38, Bm27, Bm3, BS15). These probes all came from a contiguous 40 kb DNA fragment of EF-76 genome that has been cloned in a plasmid vector (unpublished data). Kp38 contains a 1.3 kb sequence involved in a type-I polyketide synthase biosynthesis. The 2.2 kb Bm27 probe carries a 1.2 kb sequence encoding a putative formaldehyde dehydrogenase. Bm3 contains a 3 kb sequence encoding a putative transporter, a chitosanase and a glycosyl transferase. BS15 contains a 2.2 kb sequence encoding a putative alcohol dehydrogenase and a methyl malonate-semialdehyde dehydrogenase. Digoxigenin-dUTP labeling of probes was performed with a labeling kit according to manufacturer specifications (Roche Molecular Biochemicals, Laval,

Canada). Prehybridization (150 min) and hybridization (overnight) were done at 68°C. After the incubation, the membranes were washed twice in 2 X SSC (150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate) containing 0.1 % SDS for 7 min at 68°C and twice in 0.1 X SSC containing 0.1% SDS for 20 min at 68°C. Blot development was performed with a colorimetric development kit according to manufacturer specifications (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Canada).

**Biocontrol assay in controlled and field conditions.** The ability of the fusant strains to reduce common scab symptoms was tested both in controlled and field conditions. Bacterial inocula for the growth chamber assay were prepared by growing the pathogenic strain *S. scabies* EF-35 for 2 weeks at 30 C, in 50 ml tubes containing vermiculite saturated with Say-solution composed of 20 g sucrose, 1.2 g L-asparagine, 0.6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 10 g yeast per liter of water (12). Antagonistic strain EF-76 and fusant strains FP-54 and FP-60 were grown on YME agar for 10 days at 30 C. Their spores were collected and mixed with talc (10<sup>8</sup> spores/g talc). Scab-free potato tubers (*Solanum tuberosum* cv. Green Mountain) were planted in 25 cm diameter pots containing sterile sand and vermiculite (2:1) mixed with the inoculum. At plantation, 0.5 g of talc with or without an actinomycete strain was sprinkled on the top of each tuber. Pots were randomly distributed in a growth chamber. Potatoes were grown at 25 C with a 16 h-photoperiod. Plants were watered every three days and a soluble fertilizer (20-20-20) was added every two weeks. Progeny tubers were harvested after 12 weeks and were examined visually for common scab symptoms. A disease index (1 to 10) corresponding to the surface of coverage by common scab lesions was assigned to each infected tuber. The experiment was carried out in five replicates.

The field experiment was carried out in a field naturally infested by *S. scabies* (L'Assomption, Canada). Plots consisting of 4 rows of 0.5 m X 4 m were planted with 104 seed potatoes (*Solanum tuberosum* cv. Shepody). Plots were arranged as a completely randomized block with four replicates. The inoculum to be applied on the tubers was prepared as follows. Strains EF-76, FP-54 and FP-60 were grown 7 to 10 days in a 5 l bioreactor, in YME supplemented with 10 mM CaCO<sub>3</sub> to improve sporulation. The cultures were then centrifuged and the pellets were freeze-dried for 18 hours. Dried biomass (1g) were mixed with talc (300 g). Talc containing lyophilized spores (0.5 g) was sprinkled on the top of each tuber at plantation. In

control plots, talc without spores was applied on potato seeds. At harvest, tubers were examined for common scab symptoms as described above.

## RESULTS

***In vitro* antibiosis.** Several hundreds colonies were recovered from the protoplast fusion experiment. Among these colonies, 100 were streaked on YME medium and tested for their ability to inhibit the growth of *B. cereus* ATCC 14579. Seven isolates were positively or negatively affected in their inhibition power against *Bacillus* when compared to the wild strain EF-76. Two fusants (FP-54 and FP-60) were more deeply studied. FP-60 lost the ability to inhibit the growth of *B. cereus* ATCC 14579 as well as the growth of *P. fragariae* var. *rubi* 390 and *S. scabies* EF-35 (Fig. 1). FP-54 exhibited higher antagonistic activities against *B. cereus* ATCC 14579, *P. fragariae* var. *rubi* 390 and *S. scabies* EF-35 than the wild strain EF-76 (Fig. 1).

FP-60 lost the ability to synthesize geldanamycin (Table 1) and its growth was inhibited in the presence of EF-76 as well as of FP-54. In addition to geldanamycin (Rf 0.51), FP-54 produced two toxic compounds (Rf 0.82 and 0.72) that were absent in the supernatant of the wild strain grown in the same conditions (Table 1). Crossed resistance experiments established that growth of FP-54 and EF-76 were not affected by the presence of each other or by the presence of FP-60.

**Stability, prototrophy, growth curves and gluconolytic activities of the fusants.** After 5 successive plate transfers, FP-54 and FP-60 kept the same morphological aspect and retained their antagonistic properties. As the wild type strain, FP-54 and FP-60 were prototrophic and were able to grow on a minimal medium. FP-54 and FP-60 retained their  $\beta$ -1,3;  $\beta$ -1,4- and  $\beta$ -1,6-gluconolytic activities as shown by their ability to catabolize laminarin, cellulose, and pustulan, respectively. FP-54 and FP-60 had growth patterns different from the wild type strain. At stationary phase, the biomass reached by FP-54 and FP-60 was significantly smaller than the one of EF-76 (Fig. 2). FP-54 and FP-60 exhibited a 16S rDNA sequence identical to

the one of *S. melanosporofaciens* EF-76 on the 600 bp region sequenced for the three strains (7).

**Genetic characterization of FP-54 and FP-60.** The fact that new toxic compounds were detected in FP-54 and that geldanamycin was not produced anymore by FP-60 suggested that genetic modifications occurred in the genome of the fusants. Probes Kp38, Bm27, Bm3 and BS15 (see materials and methods for more details) were used in hybridization with the genomic DNAs of EF-76, FP-54 and FP-60. No genetic modification was identified in the genome of FP-54 using Kp38, a probe that contains sequences of a type I polyketide synthase (Fig. 3). In contrast, the hybridization pattern obtained with FP-60 was quite different from the ones of EF-76 and FP-54. FP-60 was also the only strain displaying no hybridization signal with the probes Bm3, Bm27 and BS15 (Fig. 4)

**Biocontrol assay.** *S. melanosporofaciens* EF-76 had the capacity to reduce common scab as shown by the biocontrol assays carried out in controlled and field conditions. The disease index was reduced from 6.30 to 4.81 and from 2.83 to 2.49 in growth chamber and field experiments, respectively (Fig. 5). Strain FP-54 also reduced common scab severity on potato tuber but no significant difference was observed between the disease index attributed to tubers treated with EF-76 or with FP-54 (Fig. 5). In field trials, FP-60 showed no protective effect against common scab; worse the disease index of tubers treated with this recombinant was higher than the index associated with potato tubers from control treatment (Fig. 5).

## DISCUSSION

Several authors showed that protoplast fusion is a genetic recombination technique that could provide stable changes in the genome of *Streptomyces* species (14, 38, 50). In this study, we used *S. melanosporofaciens* strain EF-76, a geldanamycin producer (44) and a biocontrol agent of plant diseases (47) to carry out intraspecific protoplast fusion. Two stable

prototrophic recombinants for which taxonomic identity was confirmed by a partial sequencing of their 16S rDNA (7) were characterized for their antagonistic properties and their efficiency to control common scab of potato.

The two fusants (FP-54 and FP-60) differed in their antagonistic properties against Gram-positive bacteria and fungi. FP-54 exhibited a higher ability to inhibit the growth of *B. cereus*, *S. scabies* and *P. fragariae* var. *rubi* than did the wild strain *S. melanosporofaciens* EF-76. In contrast, FP-60 displayed no antagonistic activity against the same microbial species. Robinson et al. (38) showed that it was possible to increase the level of antibiotic production by protoplast fusion. However, the higher antagonistic activity of FP-54 observed *in vitro* was not attributable to an increase in geldanamycin production (data not shown). Higher antagonism towards *B. cereus*, *S. scabies* and *P. fragariae* var. *rubi* could be the consequence of a cumulative toxic effect of various secondary metabolites. Indeed, FP-54 was shown to produce, in addition to geldanamycin, at least two other antimicrobial compounds that were absent in culture supernatants of EF-76 grown in the same conditions. Chemical characterization of these compounds is in progress. Biosynthesis of new toxic compounds by recombinant strains obtained by intraspecific protoplast fusion of *S. antibioticus* (13) as well as by interspecific protoplast fusion of *S. hygrosopicus* var. *yingchengensis* with *S. qingfengmyceticus* (50) has been previously reported. The recovery of fusant strains deficient in antibiotic biosynthesis has also been reported by Fujimoto et al. (13). The inability of FP-60 to inhibit the growth of *B. cereus*, *S. scabies* and *P. fragariae* var. *rubi* coincided with the absence of geldanamycin in its supernatant.

Intraspecific protoplast fusion might affect more than one phenotypic trait (13). In this study, FP-54 and FP-60 were affected in their antibiosis properties but were still prototrophic and retained their  $\beta$ -1,3-;  $\beta$ -1,4- and  $\beta$ -1,6 glucanolytic activities. However, FP-60 exhibited other phenotypic properties that distinguished it from the wild strain. FP-60 spores did not turn black at maturity and this strain was sensitive to geldanamycin.

As other genetic recombination processes, protoplast fusion involves crossing-over at one or several points of the bacterial chromosome with a high recombination frequency (14, 19, 42). Differences observed in the hybridization patterns obtained when the probe Kp38 was

hybridized to DNA digests from EF-76 and FP-60 demonstrated that FP-60 underwent genetic recombination. DNA deletions appear to take place during the recombination event since no hybridization signals were detected when three other DNA fragments (Bm27, Bm3 and BS15) were used as probe. The four probes used in the hybridization study all came from a 40kb contiguous DNA fragment of EF-76 genome. There is some evidence that this 40 kb fragment could be involved in geldanamycin biosynthesis. The fragment contains sequences encoding a type I polyketide antibiotic biosynthesis and alterations in this fragment coincided with sensitivity to geldanamycin and deficiency in geldanamycin production.

Even though, FP-54 exhibited a higher antagonistic activity against some microbial species, the fusant strain was not altered in its capacity to produce geldanamycin and was resistant to the antibiotic. Probes used in this study were not useful to monitor the genetic recombination events that occurred in FP-54.

Previous greenhouse trials showed that EF-76 was an efficient biocontrol agent against raspberry root rot induced by *Phytophthora fragariae* var. *rubi* (47). This strain was also shown to be able to inhibit the growth of a wide range of Gram-positive bacteria and fungi (44, 47). In this study, we demonstrated that EF-76 could inhibit the growth of *S. scabies*, a causal agent of common scab. Inoculation of potato seeds with this strain reduced the common scab index both in growth chamber and field conditions. Geldanamycin-producing strains were previously shown to be efficient in the control of fungal plant diseases (40, 45). This study is to our knowledge the first demonstration of biocontrol by a geldanamycin-producing strain against a bacterial disease. However, other *Streptomyces* strains have been shown useful to control potato scab (6, 29). This study also represents the first attempt to evaluate protoplast fusion as a way to modify the biocontrol efficiency of a *Streptomyces* strain. The effect on potato scab of seed inoculation with two fusants exhibiting higher or null antagonistic properties against *S. scabies* was analyzed. FP-54, the fusant exhibiting a higher antagonistic activity against *S. scabies in vitro* reduced common scab severity on potato tubers but no significant difference was observed between the disease index attributed to tubers treated with FP-54 or with the wild strain in both controlled and field conditions. These results indicate that FP-54 survived in soil but the higher antagonistic activity displayed by the strain *in vitro* did



not contribute to an improvement of its biocontrol capacity. Mukherjee et al. (34) reported that some artificially induced mutations affecting microbial growth may have negative consequence in field trials.

FP-60, the fusant deficient in geldanamycin production, lost the capacity to protect potato against common scab suggesting that geldanamycin biosynthesis is a mechanism associated with biocontrol. Antibiosis has been previously shown to play a major role in biocontrol (4, 17, 21, 43). In field trials, FP-60 is not only ineffective as biocontrol tool but potatoes treated with this fusant had a disease index higher than potatoes from control treatment. How this fusant did stimulate common scab infection has not been elucidated yet but it has been established that FP-60 is nonpathogenic by itself on potato (data not shown). Preliminary data indicated that sterile culture supernatants from FP-60 induced an increase in thaxtomin A production when added to *S. scabies* cultures. Thaxtomin A production by *S. scabies* contributes to the development of common scab symptoms (15, 27) and symptom severity (28). Moreover, this phytotoxin is essential to *S. scabies* pathogenicity (16). Evidence for interspecies communication between streptomycetes has been brought by Becker et al. (3) who showed that some streptomycetes were able to produce diffusible chemicals that trigger secondary metabolites production in other species. As the streptomycetes analyzed by Becker et al. (3) were isolated from potato scab suppressive and conductive soils, these authors suggested that interspecies communication may affect disease incidence.

Several streptomycetes have been reported to be efficient biocontrol agents of plant disease and some of them are commercially available (8). In this study, we showed that intraspecific protoplast fusion can be used to modify the efficiency of a biocontrol agent. An extended screening could thus be undertaken with the objective to look for more efficient biocontrol tools. Interspecific protoplast fusion between two *Streptomyces* strains displaying complementary properties should also be considered as a potential way to increase the efficiency of biocontrol agents and their range of action.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the Conseil de recherches en pêches et en agroalimentaire du Québec. J. B. gratefully acknowledges the receipt of a scholarship from The Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide à la recherche du Gouvernement du Québec.

We thank R. Brzezinski and P. Bécharde for critical review of the manuscript.

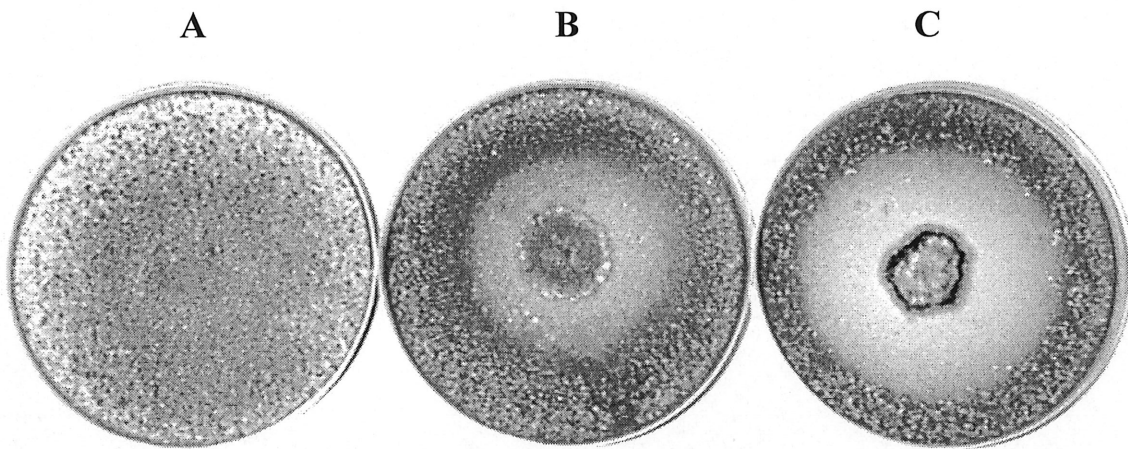


FIG. 1. Growth of *Streptomyces scabies* EF-35 in the presence of *Streptomyces melanosporofaciens* strains FP-60 (A), EF-76 (B), and FP-54 (C).

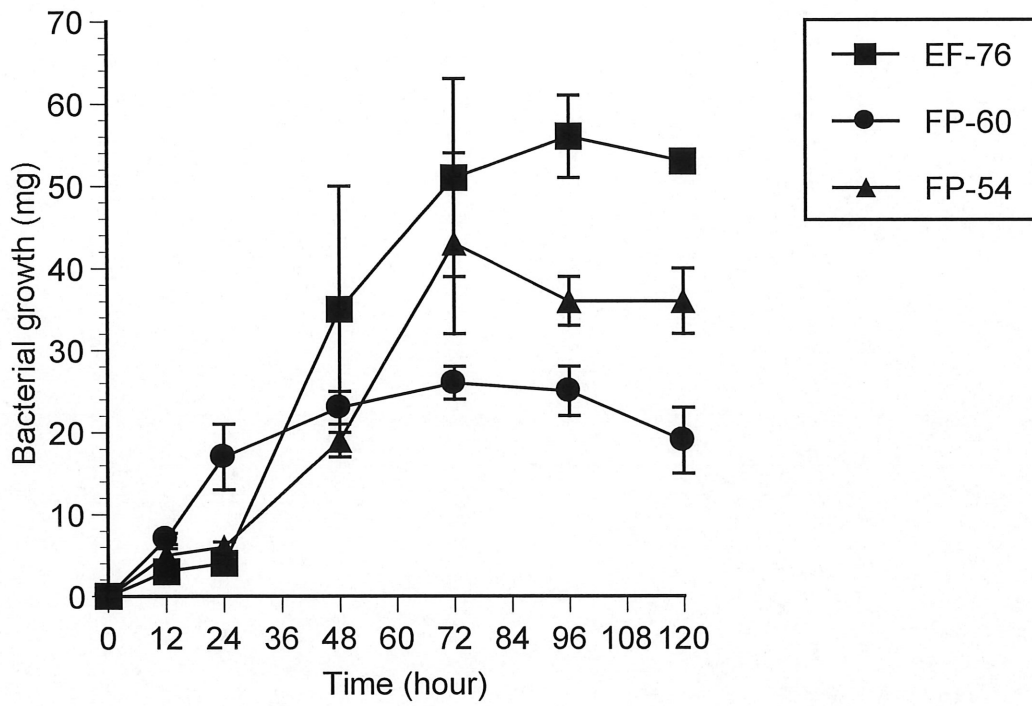


FIG. 2. Growth curves of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76 (A) and of two fusant strains FP-60 and FP-54 in a complex medium.

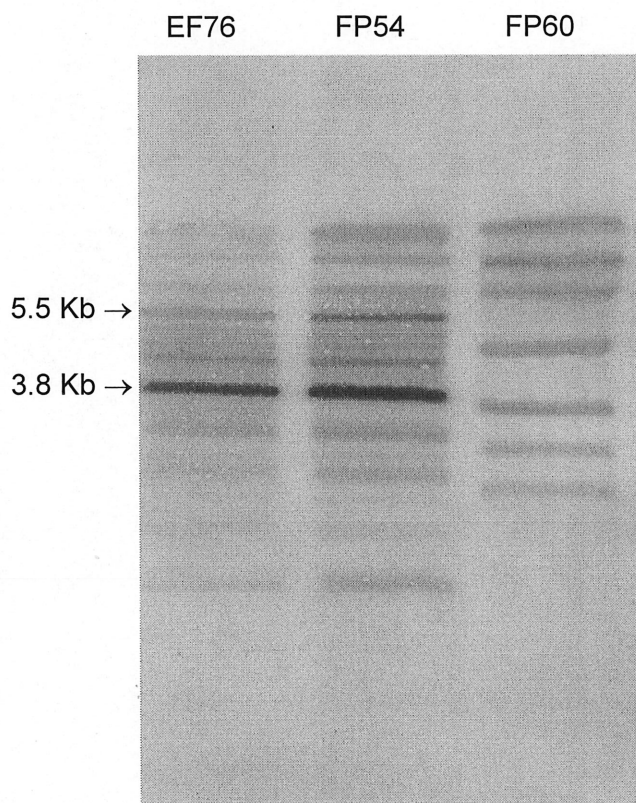
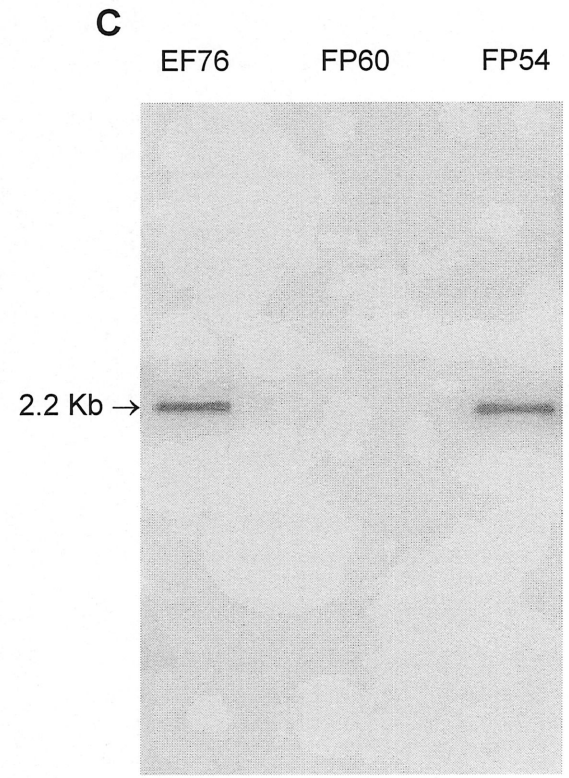
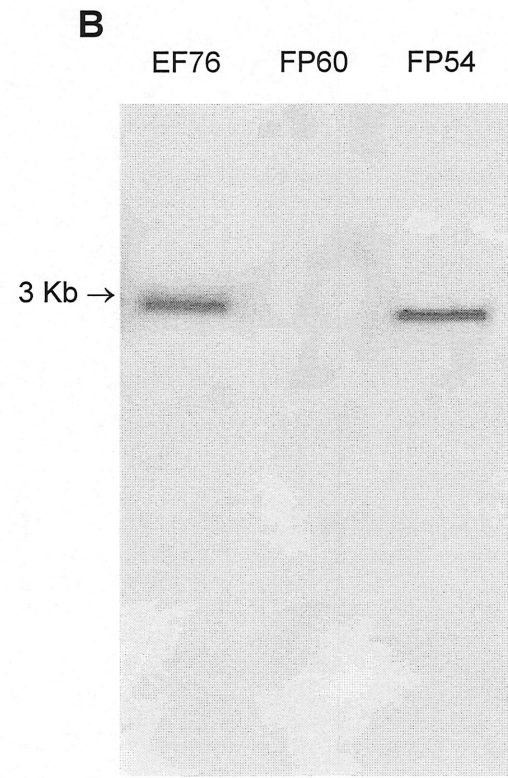
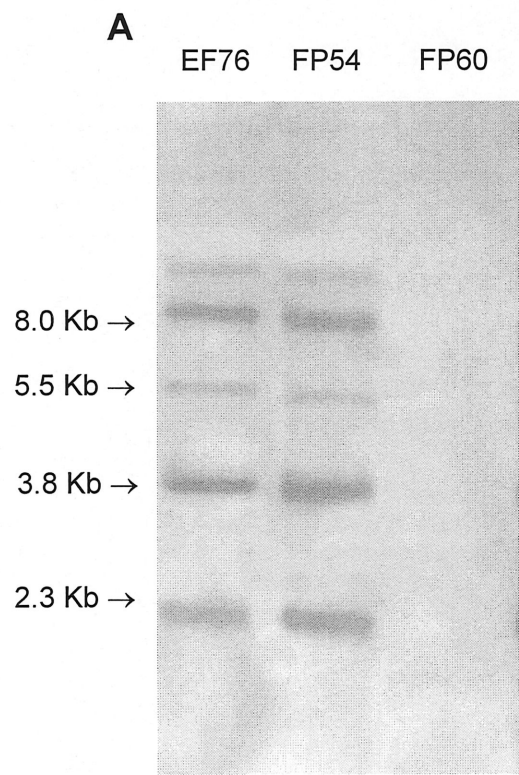


FIG. 3. Hybridization between *Bam*H1-digested genomic DNAs of *Streptomyces melanosporofaciens* strains EF-76, FP-54 and FP-60 and probe Kp38. This probe contains regions of the ketoacylsynthase and acyltransferase domains of type-I polyketide synthase (PKS) genes. Since type-I PKSs multifunctional enzymes have repetitive domains, hybridization between *S. melanosporofaciens* genomic DNA and probe Kp38 gives several signals. The two most intense signals that correspond to the 3.8 and 5.5 *Bam*H1 fragments of EF-76 were absent in FP-60 hybridization pattern.

FIG. 4. Hybridization *Bam*H1-digested genomic DNAs and probes Bm27 (A), Bm3 (B), and BS15 (C). Bm27 contains a sequence encoding a putative formaldehyde dehydrogenase. Bm3 contains some sequences encoding a putative transporter, a chitosanase, and a glycosyl transferase. BS15 contains some sequences encoding a putative alcohol dehydrogenase and a methyl malonate-semialdehyde dehydrogenase.



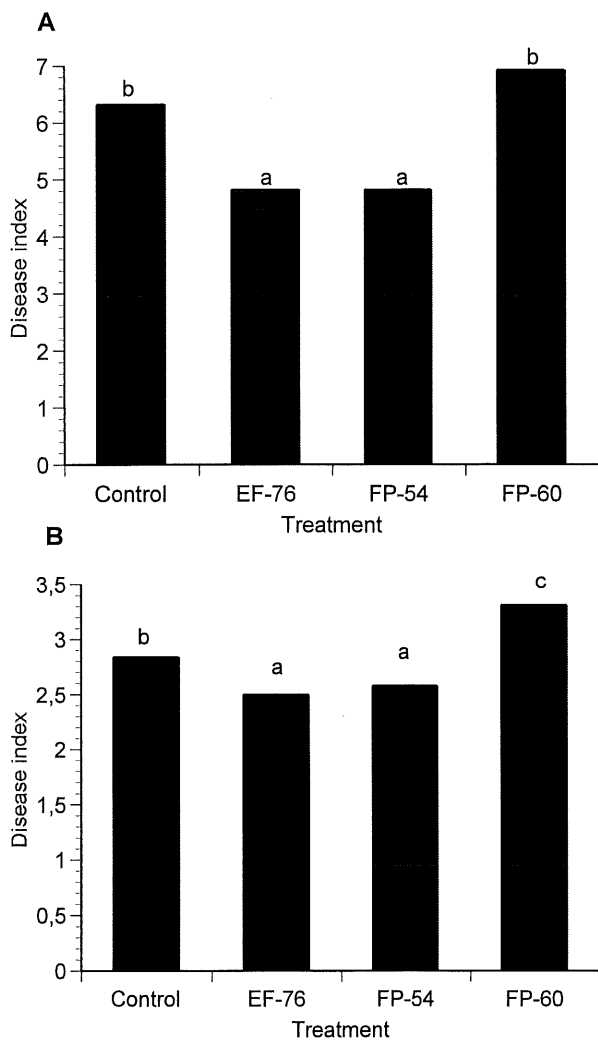


FIG. 5. Effect of *Streptomyces melanosporofaciens* EF-76 and of two fusant strains on common scab of potato. Assay in growth chamber (A) and in field (B). Bars accompanied by a same letter indicate that the corresponding treatments did not significantly differ ( $p < 0.05$ ).



TABLE 1. Antagonistic properties of EF-76 and fusant strains FP-54 and FP-60

Strains	Antagonistic properties against <i>B. subtilis</i> , <i>S. scabies</i> and <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> <sup>a</sup>	Rf of products inhibiting the growth of <i>B. subtilis</i>
EF-76	+	0.51 <sup>b</sup> , 0.44 <sup>c</sup>
FP54	++	0.85, 0.72, 0.51 <sup>b</sup> , 0.44 <sup>c</sup>
FP60	-	

<sup>a</sup> -, no growth inhibition; +, growth inhibition; ++, higher level of growth inhibition

<sup>b</sup> Rf corresponding to geldanamycin (Toussaint et al. 1997)

<sup>c</sup> Rf corresponding to an oxydized product of geldanamycin

## REFERENCES

1. **Baltz, R.H.** 1999. Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces*. J. Ind. Microbiol. Biotech. **22**:460-471.
2. **Barakate, M., Y. Ouhdouch, K.H. Oufdou, and C. Beaulieu.** 2002. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antibiotics activities. World J. Microbiol. Biotechnol. **18**:49-54.
3. **Becker, D.M., L.L. Kinkel, and J.L. Schottel.** 1997. Evidence for interspecies communication and its potential role in pathogen suppression in a naturally occurring disease suppressive soil. Can. J. Microbiol. **43**:985-990.
4. **Carroll, H., Y. Moënne-Loccoz, D. N. Dowling, and F. O’Gara.** 1995. Mutational disruption of the biosynthesis genes coding for the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol does not influence the ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* F113 in the rhizosphere of sugarbeets. Appl. Environ. Microbiol. **61**:3002-3007.
5. **Chamberlain, K., and D. L. Crawford.** 1999. *In vitro* and *in vivo* antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **23**:641-646.
6. **Doumbou, C. L., V.V. Akimov, and C. Beaulieu.** 1998. Selection and characterization of microorganisms utilizing thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies* Appl. Environ. Microbiol. **64**:4313-4326.
7. **Doumbou, C. L., V. V. Akimov, M. Côté, P. M. Charest, and C. Beaulieu.** 2001. Taxonomic study on non pathogenic streptomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. Syst. Appl. Microbiol. **24**:451-456.
8. **Doumbou, C. L., M. K. Hamby Salove, D. L. Crawford, and C. Beaulieu.** 2002. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. Phytoprotection (in press).

9. **Elliott, M. L., E. A. Des Jardin, and R. Di Bonito.** 1994. Reisolation and enumeration of transformed *Streptomyces* strains from plant roots. *J. Appl. Bacteriol.* **77**:80-87.
10. **El-Tarabily, K. A., G. E. S. J. Hardy, K. Sivasithamparam, A. M. Hussein, and D. I. Kurtböke.** 1997. The potential for the biological control cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. *New Phytol.* **137**:495-507.
11. **Emmert, E. A. B., and J. Handelsman.** 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Let.* **171**:1-9.
12. **Faucher, E., T. Savard, and C. Beaulieu.** 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant Pathol.* **14**:197-202.
13. **Fujimoto, Y., A. Imamura, C. Iyeiri, S. Shoji, Y. Kubota, and M. Shibata.** 1990. Features of regenerated clones with or without fusion treatment between auxotrophic mutants of *Streptomyces antibioticus* and their antibiotic productivity. *Agric. Biol. Chem.* **54**:2855-2861.
14. **Godefroy, O., L. Ford and M. L. B. Huber.** 1978. Interspecies matings of *Streptomyces fradiae* with *Streptomyces bikiniensis* mediated by conventional and protoplast fusion techniques. *Can. J. Microbiol.* **24**:994-997.
15. **Goyer, C., P.-M. Charest, V. Toussaint, and C. Beaulieu.** 2000. Ultrastructural effect of thaxtomin A produced by *Streptomyces scabies* on mature potato tuber tissues. *Can. J. Bot.* **78**:374-380.
16. **Goyer, C., J. Vachon, and C. Beaulieu.** 1998. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology* **88**:442-445.
17. **Hamdan, H., D. M. Weller, and L. S. Thomashow.** 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3270-3277.
18. **Handelsman, J., and E. V. Stabb.** 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell.* **8**:1855-1869.

19. **Hopwood, D. A., H. M. Wright, and M. J. Bibb.** 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. *Nature* **168**:171-174.
20. **Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Keiser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, and H. Schrempf.** 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a Laboratory Manual. The John Innes Foundation. Norwich, England.
21. **Keel, C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville, U. Burger, P. Wirthmer, D. Haas, and G. Défago.** 1992. Suppression of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant Microbe Interact.* **5**:4-13.
22. **Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood.** 2000. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, England..
23. **Kolhekar S., R. A. Narayanan, and P. S. Borkar.** 1986. Newer approaches for improving *Streptomyces* strains. I. Studies on protoplast fusion of *S. griseus*. *Hind. Antibiot. Bull.* **28**:42-43.
24. **Kortemaa, H., T. Pennanen, A. Smolander, and K. Haahtela.** 1997. Distribution of antagonistic *Streptomyces griseoviridis* in rhizosphere and non-rhizosphere sand. *J. Phytopathol.* **145**:137-143.
25. **Kortemaa, H., H. Rita, K. Haahtela, and A. Smolander.** 1994. Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant & Soil.* **163**:77-83.
26. **Lahdenperä, M.-L.** 1991 *Streptomyces* – A new tool for controlling plant diseases. *Agro-Ind. Hi-Teck.* **6**:25-27.
27. **Lawrence, C. H., M. C. Clark, and R. R. King.** 1990. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* **80**:606-608.
28. **Leiner R. H., B. A. Fry and R. Loria.** 1996. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *Phytopathology* **86**:709-713.
29. **Liu, D., N. A. Anderson, and L. L. Kinkel.** 1995. Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* **85**:827-831.

30. **Mahadevan, B., and D. L. Crawford.** 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microb. Technol.* **20**:489-493.
31. **McCarthy, A. J.** 1987. Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**:145-163.
32. **McCarthy, A. J., and S. T. Williams.** 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment: a review. *Gene* **115**:189-192.
33. **Mohammadi, O.** 1992. Mycostop biofungicide, present status. p. 2017-210 *In* E. S. Tjamos, G. C. Papavizas et R. J. Cook(ed.), *Biological control of plant diseases*. Plenum Press. New York, N.Y.
34. **Mukherjee, P. K., P. D. Sherkhane, and N. B. K. Murthy.** 1999. Induction of stable benomyl-tolerant phenotypic mutants of *Trichoderma pseudokoningii* MTCC 3011, and their evaluation for antagonistic and biocontrol potential. *Ind. J. Exp. Biol.* **37**:710-712.
35. **Nemec, S., L. E. Datnoff, and J. Strandberg.** 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protection.* **15**:735-742.
36. **Petty, T. M. and D. L. Crawford.** 1984. Enhancement of lignin degradation in *Streptomyces* spp. by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:439-440.
37. **Pridham, T. G., P. Anderson, C. Foley, L. A. Lindenfelser, C. W. Hesse, and R. G. Benedict.** 1956-1957. A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes. *Antibiot. Annu.* **1956-1957**:947-953.
38. **Robinson, M., E. Lewis, and E. Napier.** 1981. Occurrence of reiterated DNA sequences in strains of *Streptomyces* produced by an interspecific protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* **182**:336-340.
39. **Rothrock, G. S., and D. Gottlieb.** 1981. Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. *J. Antibiot.* **34**:830-835.
40. **Rothrock, G. S., and D. Gottlieb.** 1984. Role of antibiosis of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.* **30**:1440-1447.

41. **Ryan, A. D., and L. L. Kinkel.** 1997. Inoculum density and population dynamics of suppressive and pathogenic *Streptomyces* strains and their relationship to biological control of potato scab. *Biol. Control* **10**:180-186.
42. **Ryu, D. D. Y., K. S. Kim, N. Y. Cho, and H. S. Pai.** 1983. Genetic recombination in *Micronospora rosaria* by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1854-1858.
43. **Thomashow, L. S.** 1996. Biological control of plant root pathogens. *Curr. Opin. Biotech.* **7**:343-347.
44. **Toussaint, V., D. Valois, M. Dodier, E. Faucher, C. Déry, R. Brzezinski, L. Ruest and C. Beaulieu.** 1997. Characterization of actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Phytoprotection* **78**:43-51.
45. **Trejo-Estrada, S. R., A. Paszczyński, and D. L. Crawford.** 1998a. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**:81-90.
46. **Trejo-Estrada, S. R., I. R. Sepulveda, and D. L. Crawford.** 1998b. *In vitro* and *in vivo* antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **14**:865-872.
47. **Valois, D., K. Fayad, T. Barasubiye, M. Garon, C. Déry, R. Brzezinski, and C. Beaulieu.** 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1630-1635.
48. **Wang, Z., D. L. Crawford, A. L. Pometto III and F. Rafii.** 1989. Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant *Streptomyces* in a soil ecosystem. *Can. J. Microbiol.* **35**:535-543.
49. **Weller, D. M.** 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **26**:379-407.
50. **Xiufen, Z., and Z. Qi.** 1989. Interspecific protoplast fusion of *Streptomyces hygroscopicus* var. *yingchengensis* with *Streptomyces qingfengmyceticus* and biological characterization of their recombinants. *Chin. J. Biotech.* **5**:161-166.

### CHAPITRE 3: DISCUSSION

Le premier objectif de ce projet était d'amorcer l'étude moléculaire de la biosynthèse de la geldanamycine. Bien que le composé chimique soit connu depuis 1970 (DeBoer et al., 1970) et que plusieurs études aient mentionné tant son implication potentielle dans la protection des végétaux, (Rothrock et Gottlieb, 1984; Trejo-Estrada et al., 1998a) que son activité antitumorale (Neckers et al., 1999; Yamaki et al., 1989), aucune information n'est à ce jour disponible sur les gènes impliqués dans sa biosynthèse. Allen et Ritchie (1994) furent les premiers à isoler des séquences d'ADN de la souche *S. hygroscopicus* 3602 impliquées dans la biosynthèse de ce métabolite secondaire, sans toutefois les avoir caractérisées. De nombreuses séquences génétiques codant pour des polycétides de type I, groupe de métabolites secondaires auquel appartient la geldanamycine, sont disponibles dans les banques de données. La stratégie choisie et décrite dans ce projet pour isoler des gènes impliqués dans la biosynthèse de la geldanamycine fut donc d'utiliser une sonde d'ADN obtenue par le marquage d'un fragment du génome de la souche *S. melanosporofaciens* EF-76, par PCR. Les deux amorces ayant servi à amplifier le fragment génomique ont été confectionnées d'après les homologues de séquences observées au niveau des sites actifs présents chez les polycétides synthases de type I. Les sites actifs choisis appartenaient aux domaines enzymatiques KS et AT. Un clone possédant un insert de 40 kb a été détecté avec la sonde. La région codant la biosynthèse du squelette de polycétide ne comprenait que les trois premiers domaines, KS, AT et DH, d'un cadre de lecture ouvert. La spécificité du domaine AT pour une méthylmalonyl-CoA coïncide avec la possibilité d'incorporation d'unités de propionates dans la molécule de geldanamycine.

Bien que le gène codant la PKS soit incomplet, les gènes adjacents apportent de l'information pertinente sur la fonction du gène codant pour la PKS. En effet, la plus importante généralisation qui peut être faite sur tous les loci impliqués dans la biosynthèse des métabolites secondaires chez les streptomycètes et par analogie chez les autres bactéries, est qu'ils comprennent aussi les gènes de régulation, d'export et de résistance à la molécule produite. On peut citer en exemple l'actinorhodine (Fernandes-Moreno et al., 1992a), la

rapamycine (Schwecke et al., 1995), la rifamycine (August et al., 1998) et la nystatine (Brautaset et al., 2000). Ainsi les gènes retrouvés en amont de la région PKS chez la souche EF-76, soit ceux codant pour un répresseur de la transcription et un système de transport actif sont susceptibles d'appartenir au locus de biosynthèse d'un polycétide et pourraient être impliqués dans l'exportation de la molécule. Par contre, l'appartenance au locus de la glycosyle transférase localisée à 14 kb en amont de la région PKS pourrait être mise en doute, d'autant plus qu'il n'a jamais été rapporté que la geldanamycine était un composé glycosylé (DeBoer, et al., 1970; Johnson et al., 1974; Sasaki et al., 1970). Nous croyons que le gène de la glycosyle transférase pourrait appartenir au locus de biosynthèse. Les résultats obtenus dans cette étude ont démontré que l'acquisition du gène de la glycosyle transférase rendait *S. lividans* résistant à la geldanamycine. Comme les gènes de résistance côtoient généralement les gènes de biosynthèse de l'antibiotique, ceci est une indication que le gène de PKS identifié dans cette étude code effectivement pour la geldanamycine. Le mécanisme par lequel la glycosyle transférase confère la résistance à la geldanamycine demeure inconnu. La résistance procurée par les glycosyle transférases survient généralement chez les antibiotiques glycosylés (Cundliffe, 1992; Hernández et al., 1993; Jenkins et Cundliffe, 1991; Quirós et al., 1998; Vilches et al., 1992). Des études supplémentaires doivent être effectuées pour déterminer la fonction précise et les substrats de la glycosyle transférase. Un mécanisme de résistance par transglycosylation serait inédit à la geldanamycine puisqu'il n'a pas été rapporté pour la rifamycine, un autre antibiotique du sous-groupe des ansamycines (August et al., 1998).

Un autre résultat expérimental vient supporter l'idée selon laquelle la séquence génétique isolée chez EF-76 est impliquée dans la biosynthèse de la geldanamycine. Le mutant FP-60 qui a été obtenu par fusion de protoplastes intraspécifique de la souche EF-76 et qui est incapable de produire la geldanamycine a subi des réarrangements génétiques de la région



PKS identifiée. De plus, elle porte une délétion qui s'étend au gène codant pour la glycosyle transférase ce qui pourrait être relié à sa perte de résistance envers la geldanamycine.

Le fragment d'ADN de 40 kb isolé chez *S. melanosporofaciens* EF-76 servira maintenant de point de départ à l'obtention de la totalité du locus. L'obtention du locus entier permettra de confirmer le rôle de cette région génétique dans la biosynthèse de la geldanamycine. De plus, il fournira des outils moléculaires (fragments spécifiques d'ADN pour des expériences de rupture génique) qui permettront d'élucider le rôle de l'antibiose et de la production de geldanamycine dans la lutte biologique contre différents agents pathogènes.

Des résultats préliminaires ont démontré que la souche EF-76 est un agent prometteur de lutte biologique. Elle possédait la capacité de protéger les plants de framboisier contre le *P. fragariae* var. *rubi* en produisant des glucanases qui hydrolysaient les parois cellulaires du champignon et étaient capables d'inhiber sa croissance par la production de geldanamycine (Valois et al., 1996; Toussaint et al., 1997). Les deux mécanismes d'antagonisme identifiés chez la souche étaient certainement corrélés à son effet phytoprotecteur, le deuxième objectif du projet était d'obtenir des mutants altérés dans la production de geldanamycine, de les caractériser et de déterminer l'implication de la geldanamycine dans l'antagonisme envers différents microorganismes et dans la lutte biologique contre l'agent phytopathogène *S. scabies*. La fusion de protoplastes intraspécifique de la souche sauvage s'est avérée être une technique efficace permettant d'obtenir des recombinants phénotypiquement stables. Après le criblage des recombinants pour les phénotypes recherchés, deux souches mutantes ont été étudiées davantage: FP-54 dont le pouvoir inhibiteur envers les souches *B. cereus*, *S. scabies*, et *P. fragariae* var. *rubi* était augmenté *in vitro*, et FP-60 qui ne possédait plus aucun effet inhibiteur envers les mêmes microorganismes. FP-54 et FP-60 avaient néanmoins conservé

leur caractère prototrophe et leurs activités enzymatiques glucanolytiques. L'effet antagoniste amplifié de la souche FP-54 *in vitro* pourrait être attribué à l'effet toxique cumulatif des nouveaux métabolites secondaires qu'elle produit. Par contre, l'effet antagoniste annulé de la souche FP-60, pourrait être dû à sa déficience dans la production de geldanamycine. Les sondes d'ADN obtenues à partir des séquences d'ADN impliquées dans la biosynthèse d'un polycétide de type I, n'ont pas permis de détecter des délétions majeures dans les gènes de biosynthèse chez FP-54. Les réarrangements génétiques survenus chez cette souche auraient néanmoins pu être mis en évidence par la technique de l'électrophorèse à champ pulsé, qui aurait permis de mieux séparer les gros fragments d'ADN. Des études supplémentaires sont requises pour identifier les modifications génétiques qui sont survenues lors de la fusion de protoplastes.

Lors des essais effectués en serre et en champ, contre *S. scabies*, FP-60 n'était pas apte à protéger la pomme de terre contre la gale commune et augmentait même le pouvoir pathogène de *S. scabies*, ce qui suggère l'existence d'une communication biochimique entre FP-60 et *S. scabies*. La communication entre deux genres microbiens différents a été mise en évidence par Fedi et al. (1997). Dans leurs travaux, les auteurs ont démontré que le champignon phytopathogène *Pythium ultimum* réprimait l'expression de gènes chez *Pseudomonas fluorescens* F113 et altérait sa capacité à coloniser la rhizosphère. Nos résultats préliminaires suggèrent aussi une communication interspécifique entre FP-60 et *S. scabies*. En effet, FP-60 produirait un métabolite extracellulaire qui éliciterait la production de thaxtomine chez la souche pathogène. Si ce signal de communication est produit chez la souche sauvage EF-76, son action serait masquée par la production de geldanamycine qui inhibe la croissance de l'agent pathogène. Il apparaît donc que l'antibiose due à la production de geldanamycine est une propriété essentielle au pouvoir antagoniste de la souche EF-76 envers les agents pathogènes responsables de la gale commune. L'antibiose est d'autant plus importante dans le cas de la gale commune que la production par la souche EF-76 de  $\beta$ -glucanases qui s'avèrent capables de lyser la paroi glucanique des champignons pathogènes tels les oomycètes, n'a pas d'effet sur les parois bactériennes. Par contre, la souche FP-54 qui montrait une habileté plus élevée à inhiber la croissance de *S. scabies in vitro* ne procurait

pas un meilleur effet protecteur en champ comparativement à la souche sauvage EF-76. Des facteurs incontrôlables peuvent en effet atténuer les résultats parfois spectaculaires obtenus *in vitro*. Il peut s'agir de la biodiversité microbienne du sol et des conditions environnementales (Jones et Namac, 1996; Knudsen et al., 1997), par exemple. Mais en premier lieu, une affinité rhizosphérique adéquate de l'agent de lutte biologique est primordiale pour contrer les maladies racinaires des végétaux. Elle est variable selon les espèces de microorganismes antagonistes (Miller et al., 1990) et dépend de facteurs aussi divers que le stade de croissance de la plante, son espèce, son cultivar et le type de sol lors de la plantation (Kortemaa et al., 1994; Kortemaa et al., 1997; Miller et al., 1990; Nemeč et al., 1996; Ryan et Kinkel, 1997). En ce qui concerne le cas particulier des microorganismes antagonistes modifiés génétiquement, leur croissance pourrait être affectée négativement par les mutations induites, ayant pour conséquence des résultats mitigés lors des essais en champ (Mukherjee et al., 1999). Carroll et al. (1995) ont néanmoins démontré qu'une rupture génique au transposon dans les gènes de biosynthèse du métabolite secondaire 2,4-diacétylphloroglucinol, produit par la souche *P. fluorescens* F113 n'avait pas d'effet néfaste sur sa survie dans la rhizosphère de la bettrave sucrière.

Les résultats obtenus ont montré que la fusion de protoplastes est une méthode performante pour modifier les caractéristiques antagonistes d'un *Streptomyces*. Cette méthode possède en plus l'avantage de n'utiliser aucun marqueur génétique, comme la résistance à un antibiotique, qui pourrait être propagé dans l'environnement. La fusion de protoplastes intra comme interspécifique permet également de générer de nouvelles molécules bioactives par la modification des gènes de biosynthèse ou la dérégulation de gènes silencieux (Fujimoto et al., 1990; Xiuefen et Qi, 1989; Yamashita et al., 1985). Dans une perspective de lutte intégrée impliquant l'utilisation conjointe d'un biofongicide et d'un fongicide chimique, la tolérance au fongicide chimique devrait être un critère additionnel lors du criblage de souches antagonistes améliorées (Mukherjee et al., 1999).

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Une portion du génome de la souche *S. melanosporofaciens* EF-76 appartenant vraisemblablement au locus de biosynthèse de la geldanamycine a été isolée. Elle comprend en amont de la section codant pour une polycétide synthase de type I, une glycosyle transférase responsable de la résistance à la geldanamycine. De plus, la portion d'ADN isolée chez EF-76 a subi des délétions majeures chez une souche recombinante qui ne produit plus de geldanamycine et qui est en plus, devenue sensible à l'antibiotique. Il y a donc une corrélation entre les gènes délétés chez la souche mutante et le phénotype observé.

Les résultats obtenus suggèrent que l'antibiose et en particulier la production de geldanamycine chez EF-76 est une propriété essentielle à l'efficacité de la souche en lutte biologique, c'est à dire à sa capacité à réduire de façon significative les symptômes causés par l'agent phytopathogène chez la plante. En effet, la souche recombinante FP-60 déficiente dans la production de geldanamycine, était inapte à protéger la pomme de terre contre la gale commune, mais pire, augmentait le pouvoir pathogène de la souche *S. scabies* EF-35. Les interactions entre les espèces microbiennes dans l'environnement étant complexes, il est donc important de bien les comprendre afin de développer des biopesticides efficaces en champ.

La fusion de protoplastes intraspécifique s'avère être une méthode avantageuse dans une perspective d'amélioration des *Streptomyces* utiles en lutte biologique, dans la mesure où elle n'implique pas la propagation de marqueurs génétiques dans l'environnement. Elle permet d'obtenir des recombinants phénotypiquement stables et prototrophes et elle permet de générer des phénotypes complexes dont ceux désirés seront retenus après un criblage adéquat.

D'après les résultats obtenus au cours de ce projet, la fusion de protoplastes intraspécifique est également une méthode puissante pour générer de nouvelles molécules bioactives, dont certaines peuvent être plus toxiques que celle produite par la souche sauvage. De plus, la stabilité des modifications génomiques survenues induit la constance des molécules extraites du surnageant de culture bactérienne, ce qui représente un avantage appréciable en vue de la caractérisation chimique de ces nouvelles molécules. Enfin, les séquences génétiques isolées, impliquées dans la biosynthèse de la geldanamycine pourront aussi fournir des outils moléculaires en vue du suivi du phénotype et de la survie des souches dans la rhizosphère des plants au cours du temps.

De nouvelles perspectives de travail s'offrent à nous suite à la réalisation de ce travail: (i) l'isolement de la totalité du locus de biosynthèse de la geldanamycine chez EF-76 par la technique de "marche sur le chromosome", (ii) la caractérisation chimique des nouveaux métabolites secondaires produits par la souche FP-54 ainsi que l'évaluation de leur pouvoir antimicrobien et antitumoral, (iii) l'utilisation de la fusion de protoplastes intra et interspécifique tant pour améliorer les performances des souches utiles en lutte biologique que pour générer des nouveaux antibiotiques ou des antibiotiques hybrides, et enfin, (iv) l'amorce d'un nouvel axe de recherche sur la communication entre les souches pathogènes causant la gale commune de la pomme de terre et les autres actinomycètes du sol.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADAMIDIS, T. et W. CHAMPNESS. 1992. Genetic analysis of *absB*, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation. *J. Bacteriol.* 174: 4622-4628.
- ADAMIDIS, T., P. RIGGLE et W. CHAMPNESS. 1990. Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. *J. Bacteriol.* 172: 2962-2969.
- ADAMS, F. et J.P. CONRAD. 1953. Transition of phosphite to phosphate in soils. *Soil Sci.* 75: 361-371.
- AHMAD, J.S. et R. BAKER. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182-189.
- AHMAD, J.S. et R. BAKER. 1988. Growth of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum* on carbon substrates. *Can. J. Microbiol.* 34: 807-814.
- ALLEN, I.W. et D.A. RITCHIE. 1994. Cloning and analysis of DNA sequences from *Streptomyces hygroscopicus* encoding geldanamycin biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 243: 593-599.
- ANDERSON, A.J., P. HABIBZADEGAH-TARI et C.S. TEPPER. 1988. Molecular studies on the role of a root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 375-380.
- ANISOVA, L.N., I.N. BLINOVA, O.V. EFREMENKOVA, YU, P., KOZ'MIN, V.V. ONOPRIENKO, G.M. SMIRNOVA et A.S. KHOKHLOV. 1984. Regulators of the development of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Izv. Akad. SSSR Ser. Biol.* 1: 98-108.
- APARICIO, J.F., I. MOLNÁR, T. SCHWECKE, A. KÖNIG, S.F. HAYDOCK, L.E. KHAW, J. STAUNTON et P.F. LEADLAY. 1996. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* 169: 9-16.
- AUGUST, P.R., L. TANG, Y.J. YOON, S. NING, R. MÜLLER, T.-W. YU, M. TAYLOR, D. HOFFMANN, C.-G. KIM, X. ZHANG, C.R. HUTCHINSON et H.G. FLOSS. 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deduction from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.* 5: 69-79.
- BAIN, L.J. et G.A. LeBLANC. 1996. Interaction of structurally diverse pesticides with the human *MDRI* gene product P-glycoprotein. *Toxicol. Applied Pharm.* 141: 288-298.

- BAKER, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 67-85.
- BAKER, R. 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 11: 263-294.
- BANGERA, M.G. et L.S. THOMASHOW. 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.
- BARINAGA, M. 1990. Where have all the froggies gone? *Sci.* 247: 1033-1034.
- BENTLEY, R. et J.W. BENNETT. 1999. Constructing polyketides: from Collie to combinatorial biosynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 411-446.
- BIBB, M. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142: 1335-1344.
- BIBB, M.J., S. BIRO, H. MOTAMEDI, J.F. COLLINS et C.R. HUTCHINSON. 1989. Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens tcmI* genes provides key information about the enzymology of polyketide tetracenomycin C antibiotic biosynthesis. *EMBO J.* 8: 2727-2736.
- BIRCH, A.J. 1967. Biosynthesis of polyketides and related compounds. *Science* 156: 202-206.
- BLACKWOOD, A., M. WOLF, A. RUNDLE, A. EASTABROOK, F. SCHNABEL, L.A. MOONEY, M. RIVERA, K.M. CHANNING et F.P. PERERA. 1998. Organochlorine compounds (DDE and PCB) in plasma and breast cyst fluid of women with benign breast disease. *Cancer epidemiology.* 7: 579-583.
- BLAUSTEIN, A.R. et D.B. WAKE. 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends Ecol. Evo.* 5: 203-205.
- BLENDER, C.L., V. RANGASWAMY et J. LOPER. 1999. Polyketide production by plant-associated. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 175-196.
- BLOCH, K. 1977. Control mechanisms for fatty acid synthesis in *Mycobacterium smegmatis*. Pp. 2-84 dans *Advances in enzymology*, Vol. 45. A. Meisler. New York.
- BLOCH, K. et D. VANCE 1977. Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 263-298.

- BLUM, U., A.D. WORSHAM, L.D. KING et T.M. GERIG. 1994. Use of water and EDTA extractions to estimate available (free and reversibly bound) phenolic acids in Cecil soils. *J. Chem. Ecol.* 20: 341-359.
- BOJKOV, R.D. 1995. The changing ozone layer. WMO and UNEP.
- BOLTON, A.T. 1978. Effects of amending soilless growing mixtures with soil containing antagonistic organisms on root rot and blackleg of geranium (*Pelargonium hortorum*) caused by *Pythium splendens*. *Can. J. Plant Sci.* 58: 379-383.
- BOLTON, A.T. 1980. Control of *Pythium aphanidermatum* in poinsettia in a soilless culture by *Trichoderma viride* and a *Streptomyces* sp. *Can. J. Plant Sci.* 2: 93-95.
- BOWER, L.A. et M.D. COFFEY. 1985a. Development of tolerance to phosphorous acid, fosetyl-Al, and metalaxyl in *Phytophthora capsici*. *Can. J. Plant Pathol.* 7: 1-6.
- BOWER, L.A. et M.D. COFFEY. 1985b. Competitive fitness and survivability of metalaxyl-tolerant and phosphorous acid-tolerant isolates of *Phytophthora capsici* on green peppers and in soil. *Phytopathology* 75: 1330 (Abstract).
- BOWERS, J.H. et J.L. PARKE. 1993. Colonization of pea (*Pisum sativum* L.) taproots by *Pseudomonas fluorescens*: Effect of soil temperature and bacterial motility. *Soil Biol. Biochem.* 25: 1693-1701.
- BRAUTASET, T., O.N. SEKUROVA, H. SLETTA, T.E. ELLINGSEN, A.R. STRØM, S. VALLA et S.B. ZOTCHEV. 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nysatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* 7: 395-403.
- BRITIGAN, B. E., G. T. RASMUSSEN et C. D. COX. 1997. Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infect. Immun.* 65:1071-1076.
- BROWN, K.L., S. WOOD et M.J. BUTTNER. 1992. Isolation and characterization of the major vegetative RNA polymerase of *Streptomyces coelicolor* A3(2) – renaturation of a sigma-subunit using GroEL. *Mol. Microbiol.* 6: 1133-1139.
- BRUCK, R.I., W.E. FRY et A.E. APPLE. 1980. Effect of metalaxyl, an acylalanine fungicide, on developmental stages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology.* 70: 597-601.



BRUEHL, G.W. et P. LAI. 1967. Prior colonization as a factor in the saprophytic survival of several fungi in wheat straw. *Phytopathology* 56: 766-768.

BUDDENHAGEN, I.W. 1983. Breeding strategies for stress and disease resistance in developing countries. *Ann. Rev. Phytopathology* 21: 385-409.

BURGESS, J.L., B. MORRISSEY, M.C. KEIFER et W.O. ROBERTSON. 2000. Fumigant-related illnesses: Washington state's five-year experience. *Clinical toxicology*. 38: 7-14.

CANE, D.E., H. HASLER et T.-C. LIANG. 1981. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 5960-5962.

CANE, D.E., T.-C. LIANG, P.B. TAYLOR, C. CHANG et C.-C. YANG. 1986. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 4957-

CANE, D.E. et C. YANG. 1987. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 1255-

CARBONELL, E., N. XAMENA, A. CREUS et R. MARCOS. 1995. Chromosomal aberration and sister-chromatid exchanges as biomarkers of exposure to pesticides. *Clinical Chem.* 41: 1917-1919.

CARROLL, H.,Y. MOENNE-LOCCOZ, D. N. DOWLING, and F. O'GARA. 1995. Mutational disruption of the biosynthesis genes coding for the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol does not influence the ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* F113 in the rhizosphere of sugarbeets. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3002-3007.

CHAMBERLAIN, K. et D.L. CRAWFORD. 1999. *In vitro* and *In vivo* antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygrosopicus* strains YCED9 and WYE53. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23: 641-646.

CHAMBERLAIN, K. et D.L. CRAWFORD. 2000. Thatch biodegradation and antifungal activities of two lignocellulolytic *Streptomyces* strains in laboratory cultures and in golf green turfgrass. *Can. J. Microbiol.* 46: 550-558.

CHAMPNESS, W., P. RIGGLE, T. ADAMIDIS et P. VANDERVERE. 1992. Identification of *Streptomyces coelicolor* genes involved in regulation of antibiotic synthesis. *Gene* 115: 55-60.

CHATER, K.F. 1989. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Science* 60: 389-420.

CHERNIN, L., Z. ISMAILOV, S. HARAN et I. CHET. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1720-1726.

CHET, I. et J. INBAR. 1994. Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotech. 48: 37-43.

CHIOU, C.T. 1989. Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. Pp. 1-29 dans Reactions and movement of organic chemicals in soils. B.L. Sawhney et K. Brown. SSSA special publication 22. Soil science society of America. Madison, Wisconsin.

CLARK, F.E. 1968. Ecological associations among soil microorganisms. Rev. Soil. Microbiol. Unesco Paris.

COFFEY, M.D. et M.C. JOSEPH. 1985. Effects of phosphorous acid and fosetyl-Al on the life cycle of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola*. Phytopathology. 75: 1042-1046.

COHEN, Y. et M.D. COFFEY. 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. Ann. Rev. Phytopathol. 24: 311-338.

COLLIE, J.N. 1907a. Derivatives of the multiple ketene group. Proc. Chem. Soc. 23: 230-231.

COLLIE, J.N. 1907b. Derivatives of the multiple ketene group. Proc. Chem. Soc. 91: 1806-1813.

CORBAZ, R. 1990. Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne. 286p.

CORTES, J., S.F. HAYDOCK, G.A. ROBERTS, D.J. BEVITT et P.F. LEADLAY. 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. Nature 348: 176-178.

CRAWFORD, D.L., J.M. LYNCH, J.M. WHIPPS et M.A. OUSLEY. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. Appl. Environ. Microbiol. 59:3899-3905.

CUNDLIFFE, E.. 1992. Glycosylation of macrolide antibiotics in extracts of *Streptomyces lividans*. 1992. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 348-352.

DAIRI, T., Y. HAMANO, Y. IGARASHI, T. FURUMAI et T. OKI. 1997. Cloning and nucleotide sequence of the putative polyketide synthase genes for pradimicin biosynthesis from *Actinomadura hibisca*. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 1445-1453.

DALTON, B.R., U. BLUM et S.B. WEED. 1983. Allelopathic substances in ecosystems: effectiveness of sterile soil components in altering recovery of ferulic acid. J. Chem. Ecol. 9: 1185-1201.

DALTON, B.R., U. BLUM et S.B. WEED. 1989. Differential sorption of exogenously applied ferulic, p-coumaric, p-hydroxybenzoic, and vanillic acids in soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 53: 757-762.

DALTON, B.R., S.B. WEED et U. BLUM. 1987. Plant phenolic acids in soils: a comparison of extraction procedures. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 1515-1521.

DAVET, P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique. Mieux comprendre. Paris. 383p.

DAVIDSE, L.C., D. LOOIJEN, L.J. TURKENSTEEN et D. VAN DER WAL. 1981. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. Neth. J. Plant Pathol. 87: 65-68.

DAVIDSE, L.C. 1987. Biochemical aspects of phenylamide fungicides action and resistance. Pp. 275-282 dans Modern selective fungicides. H. Lyr. Longman scientific & technical. New York.

DAVIDSE, L.C. 1988. Phenylamide fungicides: mechanism of action and resistance. Pp. 63-65 dans Fungicide resistance in North America. C.J. Delp. Phytopathological society. St Paul, Minnesota.

DAVIDSE, L.C., G.C.M. VAN DEN BERG-VELTHUIS, B.C. MANTEL et A.B.K. JESPERS. 1991. Phenylamides and *Phytophthora*. Pp. 349-360 dans *Phytophthora*. J.A. Lucas, R.C. Shattock, D.S. Shaw et L.R. Cooke. British mycological society. Cambridge Univ. Press. Cambridge.

DEBOER, C., P.A. MEULMAN, R.J. WNUCK and D.H. PETERSON. 1970. Geldanamycin, a new antibiotic. J. Antibiot. 23: 442-447.

DEMAIN, A.L. 1992. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. Ciba Found. Symp. 171: 3-23.

DEMAIN, A.L. et A. FANG. 1995. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetological*. 9: 98-117.

DEMAIN, A.L., Y. AHARONOWITZ et J.-F. MARTÍN. 1983. Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. Pp. 49-72 dans *Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics*. L.C. Vining. Addison-Wesley. London

DENIS, F, et R. BRZEZINSKI. 1991. An improved aminoglycoside resistance gene cassette for use in Gram-negative bacteria and *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Letters*. 81: 261-264.

DE WEGER, L.A., C.I.M VAN DER VLUGT, A.H.M. WIJFJES, P.A.H.M. BAKKER, B. SCHIPPERS et B. LUGTENBERG. 1987. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* 169: 2769-2773.

DHILLON, N., R.S. HALE, J. CORTES et P.F. LEADLAY. 1989. Molecular characterization of a gene from *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus*) which is involved in erythromycin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 3: 1405-1414.

DIMITRIOU, A. et H. TSOUKALI. 1998a. Personal and environmental air sampling of methyl bromide during experimental greenhouse fumigation. *J. Environ. Sci. Health*. 33: 267-277.

DIMITRIOU, A. et H. TSOUKALI. 1998b. Methyl bromide and bromide ion in soil after experimental greenhouse fumigation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61: 695-701.

DOLAN, T.E. et M.D. COFFEY. 1985. *In vitro* and *In vivo* assessment of *Phytophthora palmivora* strains resistant to phosphorous acid. *Phytopathology* 75: 1330 (Abstract).

DONADIO, S., M.J. STAVER, J.B. McALPINE, S.J. SWANSON et L. KATZ. 1991. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* 251: 675-679.

DOUMBOU, C.L., V.V. AKIMOV et C. BEAULIEU. 1998. Selection and characterization of microorganisms utilizing thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies* Appl. Environ. Microbiol. 64: 4313-4326.

DOUMBOU, C.L., V.V. AKIMOV, M. CÔTÉ, P.M. CHAREST et C. BEAULIEU. 2001. Taxonomic study on non pathogenic streptomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 451-456.

DOWLEY, L.J. et E. O'SULLIVAN. 1981. Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ireland. *Potato Res.* 24: 417-421.

DUNCAN, J.M., D.M. KENNEDY et E. SEEMÜLER. 1987. Identities and pathogenicities of *Phytophthora* spp. causing root rot of red raspberry. *Plant Pathol.* 36: 276-289.

DURRIEU, G. 1993. *Écologie des champignons*. Masson. Paris. 207p.

EFREMENKOVA, O.V., L.N. ANISOVA et Y.E. BARTOSHEVICH. 1985. Regulators of differentiation in actinomycetes. *Antibiot. Med. Bioteknol.* 9: 787-707.

ELAD, Y., R. BARAK et CHET I. 1983. Possible role of lectins in mycoparasitism. *J. Bacteriol.* 154: 1431-1435.

ELLIOTT, M.L., E.A. DES JARDIN et R. DI BONITO. 1994. Reisolation and enumeration of transformed *Streptomyces* strains from plant roots. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 80-87.

EL-SHANSHOURY, A.E-R.R. 1994. *Azotobacter chroococum* and *Streptomyces atroolivaceus* as biocontrol agents of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Acta Microbiologica Polonica.* 43: 79-87.

EL-TARABILY, K.A., G.E.St.J. HARDY, K. SIVASITHAMPARAM, A.M. HUSSEIN et D.I. KURTBÖKE. 1997. The potential for the biological control cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. *New. Phytol.* 137: 495-507.

EL-TARABILY, K.A., M.L. SYKES, I.D. KURTBÖKE, G.E.St.J. HARDY, A.M. BARBOSA et R.F.H. DEKKER. 1996. Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an antibiotic-producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Banksia grandis*. *Can. J. Bot.* 74: 618-624.

ERWIN, D.C. 1973. Systemic fungicides: disease control, translocation, and mode of action. *Ann. Rev. Phytopathol.* 389-422.

ERWIN, D.C. et O.K. RIBEIRO. *Phytophthora*. Diseases worldwide. 1996. APS Press. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota.

ESPOSITO, E. et M. DA SILVA. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.* 24: 89-98.

EVANS, E. 1971. Systemic fungicides in practice. *Pestic. Sci.* 2: 192-196.

FABRITIUS, A.L., R.C. SHATTOCK et H.S. JUDELSON. 1997. Genetic analysis of metalaxyl insensitivity loci in *Phytophthora infestans* using linked DNA markers. *Phytopathology* 87: 1034-1040.

FARIH, A., P.H. TSAO et J.A. MENGE. 1981. Fungitoxic activity of efosite aluminium on growth, sporulation, and germination of *Phytophthora parasitica* and *P. citrophthora*. *Phytopathology*. 71: 934-936.

FAUCHER, E., T. SAVARD et C. BEAULIEU. 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 197-202.

FEDI, S., E. TOLA, Y. LOCCOZ-MOENNE, D.N. DOWLING, L.M. SMITH et F. O'GARA. 1997. Evidence for signaling between the phytopathogenic fungus *Pythium ultimum* and *Pseudomonas fluorescens* F113: *P. ultimum* represses the expression of genes in *P. fluorescens* F113, resulting in altered ecological fitness. *Appl Environ Microbiol.* 63: 4261-4266.

FENN, M.E. et M.D. COFFEY. 1985. Further evidence for the direct mode of action of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology* 75: 1064-1068.

FERNÁNDEZ-MORENO, M.A., E. MARTINEZ, L. BOTO, D.A. HOPWOOD et F. MALPARTIDA. 1992a. Nucleotide sequence and deduced functions of a set of co-transcribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. *J. Biol. Chem.* 267: 19278-19290.

FERNÁNDEZ-MORENO, M.A., A.J. MARTÍN-TRIANA, E. MARTÍNEZ, J. NIEMI, H.M. KIESER, D.A. HOPWOOD et F. MALPARTIDA. 1992b. *abaA*, a new pleiotropic regulatory locus for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 174: 2958-2967.

FERNANDO, W.G.D. et R.G. LINDERMAN. 1994. Chemical control of stem and root rot of cowpea caused by *Phytophthora vignae*. *Plant Dis.* 78: 967-971.

FLORIANO, B. et M. BIBB. 1996. *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 21: 385-396.

FOSTER, R.C., A.D. ROVIRA et T.W. COCK. 1983. Ultrastructure of the root-soil interface. *Am. Phytopathol. Soc. St Paul. USA.* 157p.

FRAVEL, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathology* 26: 75-91.

FUJII, T., H.C. GRAMAJO, E. TAKANO et M.J. BIBB. *redD* and actII-ORF4, pathway-specific regulatory genes for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), are transcribed in vitro by an RNA polymerase holoenzyme containing  $\sigma^{hrdD}$ . 1996. J. Bacteriol. 178: 3402-3405.

FUJIMOTO, Y., A. IMAMURA, C. IYEIRI, S. SHOJI, Y. KUBOTA, and M. SHIBATA. 1990. Features of regenerated clones with or without fusion treatment between auxotrophic mutants of *Streptomyces antibioticus* and their antibiotic productivity. Agric. Biol. Chem. 54:2855-2861.

FUQUA, W.C., S.C. WINANS et E.P. GREENBERG. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J. Bacteriol. 176: 269-275.

GENTRY, D.R., V.J. HERNANDEZ, L.H. NGUYEN, D.B. JENSEN et M. CASHEL. 1993. Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  is positively regulated by ppGpp. J. Bacteriol. 175: 7982-7989.

GEREMIA, R., G.H. GOLDMAN, D. JACOBS, W. ARDILES, S.B. VILA, M. VAN MONTAGU et A. HERRERA-ESTRELLA. 1993. Molecular characterization of the proteinase encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Mol. Microbiol. 8: 603-613.

GHISALBA, O. et J. NÜESCH. 1981. A genetic approach to the biosynthesis of the rifamycin chromophore in *Nocardia mediterranei*. III Isolation and identification of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid as a direct precursor of the seven carbone amino starter-unit. J. Antibiot. 34: 64-71.

GILBERT, M., R. MOROSOLI, F. SHARECK et D. KLUEPFEL. 1995. Production and secretion of proteins by streptomycetes. Crit. Rev. Biotech. 15: 13-39.

GODIARD, L., M.R. GRANT, R.A. DIETRICH, S. KIEDROWSKI et J.L. DANGL. 1994. Perception and response in plant disease resistance. Curr. Opin. Genet. Dev. 4: 662-671.

GOMES, R.C., L.T.A.S. SEMÊDO, R.M.A. SOARES, C.S. ALVIANO, L.F. LINHARES et R.R.R. COELHO. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. Let. Appl. Microbiol. 30: 146-150.

GRAMAJO, H.C., E. TAKANO et M.J. BIBB. 1993. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. Mol. Microbiol. 7: 837-845.

GRECO, R.J., M.G. ROBSON, L.W. MEYER et D. RUSSELL. 1998. Hydrocoolers: are they a mechanism for pesticide transfer? Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60: 685-692.

GROOM, M.R. et D.A. PERRY. 1985. Induction of 'cavity spot-like' lesions on roots of *Daucus carota* by *Pythium violae*. Trans. British Mycol. Soc. 84: 755-757.

GUPTA, R., R.K. SAXENA, P. CHATURVEDI et J.S. VIRDI. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. Appl. Bacteriol. 78: 378-383.

GUTTERSON, N.I., T.J. LAYTON, J.S. ZIEGLE et G.J. WARREN. 1986. Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent pseudomonad. J. Bacteriol. 165: 696-703.

HALVERSON, L.J. et G. STACEY. 1986. Signal exchange in plant-microbe interactions. Microbiol. Rev. 50: 193-225.

HAMDAN, H., D.M. WELLER et L.S. THOMASHOW. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3270-3277.

HANDELSMAN, J. et E.V. STABB. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. Plant Cell. 8: 1855-1869.

HARA, O. et T. BEPPU. 1981. mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus* – The role of A-factor. J. Antibiot. 35: 349-358.

HARAN, S., H. SCHICKLER et I. CHET. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142: 2321-2331.

HASSAN, H. M., et I. FRIDOVICH. 1980. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. J. Bacteriol. 141:156-163.

HASSET, J.J. et W.L. BANWART. 1989. The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. Pp. 31-44 dans Reactions and movement of organic chemicals in soils. B.L. Sawhney et K. Brown. SSSA special publication 22. Soil science society of America. Madison. Wisconsin.

HAYAKAWA, K., K. SHIN-YA, K. FURIHATA et H. SETO. 1993. J. Am. Chem. Soc. 115: 3014-



HERNÁNDEZ, C., C. OLANO, C. MENDEZ et J.A. SALAS 1993. Characterization of a *Streptomyces antibioticus* gene cluster encoding a glycosyltransferase involved in oleandomycin inactivation. *Gene* 134: 139-140.

HERRERA-ESTRELLA, A. et I. CHET. 1999. Chitinases in biological control. Pp. 171-184 dans *Chitin and chitinases*. P. Jollès et R.A.A Muzzarelli. Birkhäuser Verlag Basel. Switzerland.

HEISEY, R.D. et A.R. PUTNAM. 1986. Herbicidal effects of geldanamycin and nigericin, antibiotics from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Nat. Prod.* 49: 859-865.

HOBBS, G., A.I.C. OBANYE, J. PETTY, J.C. MASON, E. BARRATT, D.C.J. GARDNER, F. FLETT, C.P. SMITH, P. BRODA et S.G. OLIVIER. 1992. An integrated approach to studying regulation of production of the antibiotic methylenomycin by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 174: 1487-1494.

HOOD, D.W., R. HEIDSTRA, U.K. SWOBODA et D.A. HODGSON. 1992. Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) – interaction between primary and secondary metabolism – a review. *Gene* 115: 5-12.

HOPWOOD, D.A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. F. Crowe and Sons Ltd. The John Innes Foundation. Norwich. England. 355p.

HOPWOOD, D.A. et D.H. SHERMAN. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 24: 37-66.

HORINOUCI, S. 1996. *Streptomyces* genes involved in aerial mycelium formation. *FEMS Microbiol. Letters.* 141: 1-9.

HOWIE, W.J. et T. V. SUSLOW. 1991. Role of antibiotic biosynthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 393-399.

HUNZIKER, D., T.-W. YU, C.R. HUTCHINSON, H.G. FLOSS et C. KHOSLA. 1998. Primer unit specificity in rifamycin biosynthesis principally resides in the later stages of the biosynthetic pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 1092-1093.

HUTCHINSON, C.R. et I. FUJII. 1995. Polyketide synthase gene manipulation: a structure function approach in engineering novel antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 201-238.

INBAR, J. et I. CHET. 1991. Detection of chitinolytic activity in the rhizosphere using image analysis. *Soil Biol. Biochem.* 23: 239-242.

INBAR J. et I. CHET. 1992 Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers. *J. Bacteriol.* 174: 1055-1059.

INBAR J. et I. CHET. 1997. Lectins and biocontrol. *Crit. Rev. Biotech.* 17: 1-20.

International Labour Organization (ILO). 1993. Encyclopedia of occupational health and safety.

JENKINS, G. et E. CUNDLIFFE. 1991. Cloning and characterization of two genes from *Streptomyces lividans* that confer inducible resistance to lincomycin and macrolide antibiotics. *Gene* 108:55-62.

JOHNSON, R.D., A. HABER et K.L. RINEHART, Jr. 1974. Geldanamycin biosynthesis and carbon magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* 96: 3316-3317.

JONES, C.R. et SAMAC D.B. 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease suppressive strain of *Streptomyces*. *Biological control.* 7: 196-204.

KADISH, D. et Y. COHEN. 1992. Over seasoning of metalaxyl-sensitive and metalaxyl resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato tubers. *Phytopathology* 82: 887-889.

KANEDA, T., J.C. BUTTE, S.B., TAUBMAN et J.W. CORCORAN. 1962. *J. Biol. Chem.* 237: 322-328.

KANG, Y., R. CARLSON, W. THARPE et M.A. SCHELL. 1998. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3939-3947.

KARAGOUNI, A.D., A.P. VIONIS, P.W. BAKER et E.M.H. WELLINGTON. 1993. The effect of soil moisture content on spore germination, mycelium development and survival of a seeded streptomycete in soil. *Microbiol. Releases.* 2: 47-51.

KATZ, L. et S. DONADIO. 1993. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* 47: 875-912.

KEEL C., U. SCHNIDER, M. MORHOFFER, C. VOISARD, J. LAVILLE, U. BURGER, P. WIRTHNER, D. HAAS et G. DÉFAGO. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 4-13.

- KEEN, N.T. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24: 447-463.
- KHOSLA, C., et R.S. GOKHALE, J.R. JACOBSEN et D.E. CANE. 1999. Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 219-253.
- KIESER, T., M.J. BIBB, M.J. BUTTNER, K.F. CHATER et D.A. HOPWOOD. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation. Norwich. England.
- KIM, C.-G., H.G. FLOSS. 1996. Biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of mC<sub>7</sub>N units in ansamycin antibiotics. *J. Amer. Chem. Soc.* 118: 7486-7491.
- KLOEPPER, J.W., J. LEONG, M. TEINTZE et M.N. SCHROTH. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 4: 317-320.
- KNUDSEN, I.M.B., J. HOCKENHULL, D.F. JENSEN, B. GERHARDSON, M. HÖKEBERG, R. TAHVONEN, E. TEPERI, L. SUNDHEIM et B. HENRIKSEN. 1997. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 775-784.
- KOLPIN, D.W., E.M. THURMAN et S.M. LINHART. 1998. The environmental occurrence of herbicides: the importance of degradates in ground water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 385-390.
- KORTEMÄÄ, H., T. PENNANEN, A. SMOLANDER et K. HAAHTELA. 1997. Distribution of antagonistic *Streptomyces griseoviridis* in rhizosphere and non-rhizosphere sand. *J. Phytopathol.* 145: 137-143.
- KORTEMÄÄ, H., H. RITA, K. HAAHTELA et A. SMOLANDER. 1994. Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant and Soil.* 163: 77-83.
- KUHLMAN, E.G. et F.F. Hendrix. 1963. *Phytophthora* root rot of Fraser fir. *Plant Dis. Rep.* 47: 552-553.
- LANCINI, G. et B. CAVALLERI. 1997. Rifamycins. Pp. 521-549 dans *Biotechnology of antibiotics*, 2<sup>nd</sup> Ed. W.R. Strohl. Dekker, New York.
- LAHDENPERÄ, M-L. 1991 *Streptomyces* – A new tool for controlling plant diseases. *Agro-Industry Hi-Teck.* 6: 25-27.

LEE, T.Y., E. MIZUBUTI et W.E. FRY. 1999. Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. Fungal genetics and biology. 26: 118-130.

LEONG, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 24: 187-209.

LIDDELL, C.M. et J.L. PARKE. 1989. Enhanced colonization of pea taproots by a fluorescent pseudomonad biocontrol agent by water infiltration into soil. Phytopathology 79: 1327-1332.

LIMÓN, M.C., J.A. PINTOR-TORO et T. BENFTEZ. 1999. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. Phytopathology 89: 254-261.

LONGLEY, M. et N.W. SOTHERTON. 1997. Factors determining the effects of pesticides upon butterflies inhabiting arable farmland. Agric. Ecosyst. Environ. 61: 1-12.

LOPER, J.E., C. HAACK et M.N. SCHROTH. 1985. Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). Appl. Environ. Microbiol. 49: 416-422.

LORITO, M., G.E. HARMAN, C.K. HAYES, R.M. BROADWAY, A. TRONSMO, S.L. WOO et A. DI PIETRO. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology 83: 302-307.

LOWCOCK, L.A., T.F. SHARBEL et J.L. DES GRANGES. 1997. Flow cytometric assay for *in vivo* genotoxic effects of pesticides in green frogs (*Rana Clamitans*). Aquatic Toxicol. 38: 241-255.

MAHADEVAN, B et D.L. CRAWFORD. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. Enz. Microbiol. Technol. 20: 489-493.

MALPARTIDA, F. et D.A. HOPWOOD. 1984. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. Nature 309: 462-464.

MAUROFER, M., C. KEEL, U. SCHNIDEER, C. VOISARD, D. HAAS et G. DÉFAGO. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. Phytopathology 82: 190-195.

McALPINE, J.B., S.J. SWANSON, M. JACKSON et D.N. WHITTERN. 1991. J. Antibiot. 44: 688-

McCARTHY, A.J. 1987. Lignocellulose-degrading actinomycetes. FEMS Microbiol. Rev. 46: 145-163.

McCARTHY, A.J. et S.T. WILLIAMS. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. Gene 115: 189-192.

McINTYRE, J.L. et L. HANKIN. 1978. An examination of enzyme production by *Phytophthora* spp. on solid and liquid media. Can. J. Microbiol. 24: 75-78.

MEHROTTA, R.S. et D.P. TIWARI. 1976. Organic amendments and control of foot rot of *Piper Betle* caused by *Phytophthora parasitica* var. *Piperina*. Ann. Rev. Microbiol. 127: 415-421.

MOAT, A.G. et FOSTER. 1995. Microbial physiology. Wiley-Liss. New York. 580p.

MOHAMMADI, O. 1992. Mycostop biofungicide – present status. Pp. 2017-210 dans Biological control of plant diseases. E.S. Tjamos, G.C. Papavizas et R.J. Cook. Plenum Press. New York.

MOLNÁR, I., J.F. APARICIO, S.F. HAYDOCK, L.E. KHAW, T. SCHWECKE, A. KÖNIG, J. STAUNTON et P.F. LEADLAY. 1996. Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. Gene 169: 1-7.

MOTAMEDI, H. et C.R. HUTCHINSON. 1987. Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 4445-4449.

MOTAMEDI, H., E. WENDT-PIENKOWSKI, et C.R. HUTCHINSON. 1986. Isolation of tetracenomycin C-nonproducing *Streptomyces glaucescens* mutants. J. Bacteriol. 167: 575-580.

MUKHERJEE, P. K., P. D. SHERKANE, et N. B. K. MURTHY. 1999. Induction of stable benomyl-tolerant phenotypic mutants of *Trichoderma pseudokoningii* MTCC 3011, and their evaluation for antagonistic and biocontrol potential. Ind. J. Exp. Biol. 37:710-712.

NECKERS, L., T.W. SCHULTE et E. MIMMAUGH. 1999. Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity. Investigational New Drugs. 17: 361-373.

NEMEC, S., L.E. DATNOFF et J. STRANDBERG. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop protection* 15: 735-742.

NEMES-KOSA, S. et T. CSERHATI. 1995. Quantitative structure-activity relationship study on the inhibitory effect of some herbicides on the growth of soil micro-organisms. *J. Applied Bact.* 79: 483-491.

PAGET, M.S.B., E. LEIBOVITZ et M.J. BUTTNER. 1999. A putative two-component signal transduction system regulates  $\sigma^E$ , a sigma factor required for normal cell wall integrity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 33: 97-107.

PAIVA, N.L., A.L. DEMAINE et M.F. ROBERTS. 1991. *J. Nat. Prod.* 54: 167-

PAIVA, N.L., A.L. DEMAINE et M.F. ROBERTS. 1993a. The immediate precursor of the nitrogen-containing ring of rapamycin is free pipercolic acid. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 581-585.

PAIVA, N.L., M.F. ROBERTS et A.L. DEMAINE. 1993b. The cyclohexane moiety is derived from shikimic acid in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. ind. Microbiol.* 12: 423-428.

PAPAVIZAS, B.C. et C.B. DAVEY. 1962. Activity of *Rhizoctonia* in soil as affected by carbon dioxide. *Phytopathology* 52: 759-766.

PARKE, J.L., R. MOEN, A.D. ROVIRA et G.D. BOWEN. 1986. Soil water flow affects the rhizosphere distribution of a seed-borne biological control agent, *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 583-588.

PIEDALLU, M.-A. et P. JAMET. 1985. Cinétique de disparition et dégradation du phosétyl-Al dans le sol en conditions contrôlées. Pp 297-300 dans *Fungicides for crop protection, 100 years of progress*, Monogr. No 31, ed. I.M. Smith. Croydon, England: Br. Crop Prot. Counc. Publ. 503p.

PRICE, B., T. ADAMIDIS, R. KONG et W. CHAMPNESS. 1999. A *Streptomyces coelicolor* antibiotic regulatory gene, *absB*, encodes an Rnase III homolog. *J. Bacteriol.* 181: 6142-6151.

QUIRÓS, L.M., I. AGUIRREZABALAGA, C. OLANO, C. MENDEZ et J.A. SALAS. 1998. Two glycosyltransferases and a glycosidase are involved in oleandomycin modification during its biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* 28: 1177-1185.

- RAWLINGS, B.J. 1997. Biosynthesis of polyketides. Nat. Prod. Rep. 523-556.
- RIBAS, G., E. CARBONELL, A. CREUS, N. XAMENA et R. MARCOS. 1997. Genotoxicity of humic acid in cultured human lymphocytes and its interaction with the herbicides alachlor and maleic hydrazide. Environ. Mol. Mutag. 29: 272-276.
- RICARD, J.L. 1981. Commercialization of a Trichoderma-based myofungicide, some problems and solutions. Biocontrol News and Information. 2: 95.
- ROTHROCK, G.S. et D. GOTTLIEB. 1981. Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. J. Antibiot. 34: 830-835.
- ROTHROCK, G.S. et D. GOTTLIEB. 1984. Role of antibiosis of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. Can. J. Microbiol. 30: 1440-1447.
- RUSSELL, R.W., K.A. GILLAN et G.D. HAFFNER. 1997. Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in southern Ontario, Canada, green frogs. Environ. Toxicol. Chem. 16: 2258-2263.
- RYAN, A.D. et L.L. KINKEL. 1997. Inoculum density and population dynamics of suppressive and pathogenic *Streptomyces* strains and their relationship to biological control of potato scab. Biological control. 10: 180-186.
- SASAKI, K., K.L. RINEHART, Jr., G. SLOMP, M.F. GROSTIC et E.C. OLSON. 1970. Geldanamycin. I. Structure assignment. J. Am. Chem. Soc. 92: 7591-7593.
- SCHROTH, M.N. et D.C. HILDEBRAND. 1964. Influence of plant exudates on root infecting fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 2: 101-132.
- SCHWECKE, T., J.F. APARICIO, I. MOLNÁR, A. KÖNIG, L.E. KHAW, S.F. HAYDOCK, M. OLIYNYCK, P. CAFFREY, J. CORTÉS, J.B. LESTER, G.A. BÖHM, J. STAUNTON et P.F. LEADLAY. 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 7839-7843.
- SHERMAN, D.H., M.J. BIBB, T.J. SIMPSON, D. JOHNSON, D. MALPARTIDA. 1991. Molecular genetic analysis reveals a putative bifunctional polyketide cyclase/ dehydrase gene from *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces violaceoruber*, and a cyclase/ O-methyltransferase from *Streptomyces glaucescens*. Tetrahedron 47: 6029-6043.

SCHWINN, F.J. et P. MARGOT. 1991. Control with chemicals. Pp. 225-265 dans *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. D.S. Ingramet P.H. Williams. Academic Press. London.

SCHWINN, F.J. et P.A. URECH. 1986. Progress in the chemical control of diseases caused by oomycetes. Pp. 89-106 dans Fungicide chemistry. Advances and practical applications, ACS symposium series. M.B. Green et D.A. Spilker. American chemical society.

SPAWN, R., K.D. HOAGLAND et B.D. SIEGFRIED. 1997. Effects ofalachlor on an algal community from a midwestern agricultural stream. Environ. Toxicol. Chem. 16: 785-793.

STASSI, D., S. DONADIO, M.J. STAVER et L. KATZ. 1993. Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis. J. Bacteriol. 175: 182-189.

STEFFENS, J.J., E.J. PELL et M. TIEN. 1996. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. Curr. Opin. Biotech. 7: 348-355.

STEHMANN, C. et M.A. DE WAARD. 1995. Accumulation of tebuconazole by isolates of *Botrytis cinerea* differing in sensitivity to sterol demethylation inhibiting fungicides. Pest. Sci. 45: 311-318.

STOHL, E.A., J.L. MILNER et J. HANDELSMAN. 1999. Zwittermycin A biosynthetic cluster. Gene 237: 403-411.

STRAUCH, E., E. TAKANO, H.A. BAYLIS et M.J. BIBB. 1991. The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol. Microbiol. 5: 289-298.

TAHVONEN, R. 1982a. The suppressiveness of Finnish light coloured *Sphagnum* peat. J. Scient. Agric. Soc. Finl. 54: 345-356.

TAHVONEN, R. 1982b. Preliminary experiment into the use of *Streptomyces* spp. isolated from peat in the biological control of soil and seed-borne diseases in peat culture. J. Scient. Agric. Soc. Finl. 54: 357-369.

TAHVONEN, R. 1988. Microbial control of plant diseases with *Streptomyces* spp. EPPO bulletin. 18: 55-59.

TAHVONEN, R. 1993. The disease suppressiveness of light-coloured sphagnum peat and biocontrol of plant diseases with *Streptomyces* Sp. Acta Horticulturae. 342: 37-42.



TAKANO, E., H.C. GRAMAJO, E. STRAUCH, N. ANDRES, J. WHITE et M.J. BIBB. 1992. Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 6: 2797-2804.

TANG, L., Y.J. YOON, C.-Y. CHOI et C.R. HUTCHINSON. 1998. Characterization of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase involved in rifamycin B biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei*. *Gene* 216: 255-265.

THOMASHOW, L.S. 1996. Biological control of plant root pathogens. *Curr. Opin. Biotech.* 7: 343-347.

THOMASHOW, L.S. et D.M. WELLER. 1988. Role of phenazine antibiotic in suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* 170: 3499-3508.

THOMASOW, L.S., D.M. WELLER, R.F. BONSALE et L.S. PIERSON III. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 908-912.

THRANE C., S. OLSSON, T.H. NIELSEN et J. SØRENSEN. 1999. Vital fluorescent strains for detection of stress in *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* challenged with viscosinamide from *Pseudomonas fluorescens* DR54. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 11-23.

THURMAN, E.M., D.A. GOOLSBY, M.T. MEYER, M.S. MILLS, M.L. POMES et D.W. KOLPIN. 1992. *Environ. Sci. Technol.* 26: 2440-

TOUSSAINT, V., D. VALOIS, M. DODIER, E. FAUCHER, C. DÉRY, R. BRZEZINSKI, L. RUEST et C. BEAULIEU. 1997. Characterization of actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. *Phytoprotection.* 78: 43-51.

TREJO-ESTRADA, S.R., A. PASZCZYNSKI et D.L. CRAWFORD. 1998a. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 81-90.

TREJO-ESTRADA, S.R., I.R. SEPULVEDA et D.L. CRAWFORD. 1998b. *In vitro* and *In vivo* antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 865-872.

TURHAN, G. 1993. Mycoparasitism of *Alternaria alternata* by an additional eight fungi indicating the existence of further unknown candidates for biological control. J. Phytopathol. 138: 283-292.

TYLKA, G.L., R.S. HUSSEY et R.W. RONCARDI. 1991. Axenic germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: effects of selected *Streptomyces* Species. Phytopathology 81: 754-759.

UEKI T, K. NUMATA, Y. SAWADA, T. NAKAJIMA, Y. FUKAGAWA et T. OKI. 1993 Studies on the mode of antifungal action of pradimicin antibiotics. I. Lectin-mimic binding of BMY-28864 to yeast mannan in the presence of calcium. J. Antibiot. (Tokyo) 46:149-61.

VALOIS, D. K., FAYAD, T. BARASUBIYE, M. GARON, C. DÉRY, R. BRZEZINSKI et C. BEAULIEU. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Appl. Environ. Microbiol. 62:1630-1635.

VASSILAKIS, I., D. TSIPI et M. SCOULLOS. 1998. Determination of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction, gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection, and high performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. J. Chromatogr. 823: 49-58.

VEGH, I., F. BAILLOT et J. ROY. 1977. Étude de l'activité de l'éthylphosphite d'aluminium (LS 74.783) vis-à-vis de *Phytophthora cinnamomi* Rands, agent du dépérissement des arbustes d'ornement. Phytiatr. Phytopharm. 26: 85-95.

VEGH, I., P. LEROUX, A. LEBERRE et C. LANEN. 1985. Détection sur *Chamaecyparis lawsoniana* 'Ellewoodi' d'une souche de *Phytophthora cinnamomi* Rands résistante au phosétyl-Al. P. H. M. Rev. Hort. 262: 19-21.

VESPER, S.J. 1987. Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1397-1405.

VILCHES, C., C. HERNANDEZ, C. MENDEZ and J.A. SALAS. 1992. Role of glycosylation and deglycosylation in biosynthesis of and resistance to oleandomycin in the producer organism, *Streptomyces antibioticus*. J. Bacteriol. 174: 161-165.

WAKIL, S.J. 1989. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. Biochemistry 28: 4523-4530.

WAKSMAN, S.A. 1967. The actinomycetes: a summary of current knowledge. Ronald. New York, 280p.

- WANG, M.M., I.P. SUGAR, P.L. CHONG. 1998. Role of the sterol superlattice in the partitioning of the antifungal drug nystatin into lipid membranes. *Biochemistry* 34:11797-805.
- WANG, Z., D.L. CRAWFORD, A.L. POMETTO III et F. RAFII. 1989. Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant *Streptomyces* in a soil ecosystem. *Can. J. Microbiol.* 35: 535-543.
- WATSON, R.D. 1964. Eradication of soil fungi by a combination of crop residues, flooding and anaerobic fermentation. *Phytopathology* 54: 1437.
- WEBER, J.M., J.O. LEUNG, G.T. MAINE, R.H.B. POTENZ, T.J. PAULUS et J.P. DeWITT. 1990. Organization of a cluster of erythromycin genes in *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Bacteriol.* 172: 2372-2383.
- WEBER, J.B. et C.T. MILLER. 1989. Organic chemical movement over and through soil. Pp. 305-334 dans *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. B.L. Sawhney et K. Brown. SSSA special publications 22. soil science society of America. Madison. Wisconsin.
- WEHRLI, W. 1977. Ansamycins. Chemistry, biosynthesis and biological activity. *Topics In Current Chemistry* 72: 21-49.
- WELLER, D.M. et R.J. COOK. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73: 463-469.
- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.
- World Health Organization (WHO). 1995. Methyl bromide, environmental health. *Criteria* 166. Geneva.
- XIUFEN, Z., et Z. QI. 1989. Interspecific protoplast fusion of *Streptomyces hygroscopicus* var. *yingchengensis* with *Streptomyces qingfengmyceticus* and biological characterization of their recombinants. *Chin. J. Biotech.* 5:161-166.
- XUE, Y., L. ZHAO, H.-W. LIU et D.H. SHERMAN. 1998. A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 12111-12116.
- YAMAKI, H., S.M.M. IGUCHI-ARIGA et H. ARIGA. 1989. Inhibition of *c-myc* gene expression in murine lymphoblastoma cells by geldanamycin and herbimycin, antibiotics of benzoquinoid ansamycin group. *J. Antibiot.* 62: 604-610.

YAMASHITA, F., K. HOTTA, Y. OKAMI et H. UMEZAWA. 1985. The generation of additional antibiotic resistance by protoplast regeneration of a *Streptomyces griseus* strain. *J. Antibiot.* 38: 126-127.

YANG Y.K., H. SHIMUZU, S. SHIOYA, K. SUGU, T. NIHARA et Y. Yamada. 1995. Optimum autoregulator addition strategy for maximum virginiamycin production in batch culture of *Streptomyces virginiae*. *Biotech. Bioeng.* 46: 437-442.

YUAN, W.M. et D.L. CRAWFORD. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3119-3128.

YUE, S., MOTAMEDI, H. WENDT-PIENKOWSKI et C.R. HUTCHINSON. 1986. Anthracycline metabolites of tetracenomycin C-non-producing *Streptomyces glaucescens* mutants. *J. Bacteriol.* 167: 581-586.

ZORATTI, M., M. FAVARON, D. PIETROBON et V. PETRONILLI. 1984. Nigericin-induced transient changes in rat-liver mitochondria. *Biochim Biophys* 26:231-239.

ZOTCHEV, S., K. HAUGAN, O. SEKUROVA, H. SLETTA, T.E. ELLINGSEN et S. VALLA. 2000. Identification of a gene cluster for antibacterial polyketide-derived antibiotic biosynthesis in the nysatin producer *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Microbiology* 146: 611-619.