

FACTEURS PHYSIOLOGIQUES MODULANT LA PRODUCTION DE  
THAXTOMINE CHEZ *STREPTOMYCES SCABIES*

par

Annie Lauzier

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

Pagination erronée  
La thèse est complète

---

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2007

111-1814



Library and  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*  
*ISBN: 978-0-494-48563-7*  
*Our file    Notre référence*  
*ISBN: 978-0-494-48563-7*

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

Le 14 septembre 2007

*le jury a accepté la thèse de Mme Annie Lauzier dans sa version finale.*

*Membres du jury*

Mme Carole Beaulieu  
Directrice  
Département de biologie

M. Brian Talbot  
Codirecteur  
Département de biologie

M. Kamal Bouarab  
Membre  
Département de biologie

Mme Danièle Prévost  
Membre externe  
Agriculture Canada

M. François Malouin  
Président-rapporteur  
Département de biologie

## SOMMAIRE

La thaxtomine est un facteur de virulence important dans le cadre de la gale commune de la pomme de terre, maladie végétale causée par *Streptomyces scabies* (*Streptomyces scabiei*). Dans les travaux de mon doctorat, nous avons démontré que la synthèse *in vivo* de la toxine était inhibée par trois acides aminés aromatiques, la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine. Nous avons démontré que l'inhibition par le tryptophane était un phénomène retrouvé chez cinq souches de *S. scabies* et qu'elle était dépendante de la dose de l'acide aminé. Par des tests d'incorporation de radioactivité, nous avons pu établir que le tryptophane et la phénylalanine étaient des précurseurs de synthèse de la thaxtomine A mais pas la tyrosine.

Nous savions que la thaxtomine n'était pas synthétisée dans un milieu minimal et que la bactérie avait besoin de la présence d'un composé végétal pour initier la synthèse de la toxine. La subérine est un polymère complexe retrouvé dans la paroi cellulaire végétale qui, lorsque ajouté au milieu de culture de *S. scabies*, permet la production de thaxtomine A. L'effet de la subérine sur la physiologie bactérienne n'est pas connu. Nous avons utilisé deux approches, la protéomique et la transcriptomique, pour analyser l'effet de ce composé végétal sur le métabolisme microbien de *S. scabies*.

L'électrophorèse en 2 dimensions suivie de l'analyse des protéines par séquençage N-terminal ou par spectre de masse (MS/MS), nous a permis d'identifier 20 protéines de *S. scabies* induites par la subérine. Parallèlement, plus de 50 gènes exprimés par le *S. scabies* en présence de subérine ont été identifiés par la construction d'une banque d'ADNc provenant des ARNm exprimés après 12H de croissance en présence du polymère. Nous avons confirmé que 10 de ces gènes étaient induits par la subérine à l'aide de la technique du PCR en temps réel.

Les deux approches ont permis d'identifier des protéines et des gènes de *S. scabies* régulés positivement par la présence de la subérine. Ces gènes et ces protéines sont impliqués dans le métabolisme énergétique, la synthèse ou la régulation des acides aminés et des acides nucléiques, les mécanismes de transport, l'hydrolyse de composés chimiques, les mécanismes de résistance au stress et le métabolisme secondaire.

## REMERCIEMENTS

Jamais je n'aurais pu réaliser cette recherche doctorale sans le support de madame Carole Beaulieu, directrice de recherche. Pendant ces années de thèse, j'ai eu la chance de profiter de ses grandes connaissances dans une variété de domaines, de ses idées enrichissantes et de son appui indéfectible. Malgré les hauts et les bas survenus au cours du projet, elle a su me faire confiance et me prodiguer idées et encouragements aux moments opportuns. Merci !

J'aimerais aussi remercier mes conseillers passés et présents pour leur contribution à l'avancement et à l'aboutissement de mes travaux. Merci à mon co-directeur, Brian Talbot, pour son engagement tout au long de ce projet de doctorat. Merci à Adrien Beaudoin, Gilles Grenier, Kamal Bouarab et François Malouin pour leur intérêt soutenu et leurs précieux conseils. Bien qu'il n'ait pas fait partie de mes conseillers, je veux remercier Ryszard Brezinski d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes nombreuses questions et généreux dans le partage de son expertise.

Au cours de mon doctorat j'ai eu le privilège de travailler au sein d'un laboratoire débordant d'énergie et d'entraide. Je tiens à remercier tous les membres présent et passé du laboratoire d'avoir rendu ce cheminement des plus agréables. Un merci tout particulier à Julie, Nathalie, Cyr, Élyse, Édith, Nancy, Gaby, Marie-Ève et Alain pour leur amitié, leurs conseils et leur soutien. Merci à tous les stagiaires qui ont chacun contribué à leur façon au progrès de mon projet de doctorat.

Je remercie finalement ma famille et mes amis qui m'ont supporté et encouragés pendant toutes ces années. Merci à Marianne et Yseult, vous arrivez à rendre les moments difficiles plus doux.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	ii
REMERCIEMENTS .....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES TABLEAUX .....	vii
LISTE DES FIGURES .....	ix
INTRODUCTION .....	1

### CHAPITRE 1

1.0 Effet des acides aminés sur la biosynthèse de la thaxtomine A par <i>S. scabies</i> .....	28
1.1 Lauzier, A., Goyer, C., Ruest, L., Brzezinski, R., Crawford, D.L., et Beaulieu, C. (2002). Effect of amino acids on thaxtomin A biosynthesis by <i>Streptomyces scabies</i> . Canadian Journal of Microbiology, 48(4), pp359-364.....	30

### CHAPITRE 2

2.0 Effet de la subérine de pomme de terre sur le protéome de <i>S. scabies</i> .....	47
---------------------------------------------------------------------------------------	----

2.1 Lauzier, A., Simao-Beauvoir, A.M., Bourassa, S., Poirier, G., Talbot B., et Beaulieu, C. Effect of potato suberin on <i>Streptomyces scabies</i> proteome. Molecular Plant Pathology (soumis pour publication) .....	49
 CHAPITRE 3	
3.0 Effet de la subérine de pomme de terre sur les gènes exprimés par <i>S. scabies</i> .....	78
3.1 Lauzier, A. et Beaulieu, C. Effet de la subérine de pomme de terre sur les gènes exprimés par <i>S. scabies</i> (à soumettre pour publication) .....	79
 CONCLUSION .....	112
BIBLIOGRAPHIE .....	117



## LISTE DES TABLEAUX

1. Gènes retrouvées sur le PAI de *S. turgidiscabies* ..... 23
2. Gènes retrouvées sur les PAI de *S. scabies* ..... 24

Tableaux tirés de Lauzier et al (2002).

1. Effect of different amino acids on thaxtomin A production in  
*S. scabies* strain EF-35 ..... 35
2. Effect of some amino acids on thaxtomin A production in  
different *Streptomyces scabies* strains ..... 36
3. Incorporation rate of  $^{14}\text{C}$  radiolabeled molecules in thaxtomin A  
produced by *S. scabies* strain EF-35 ..... 39

Tableaux tirés de Lauzier, A., Simao-Beauvoir, A.M., Bourassa, S., Poirier, G.,  
Talbot, B. and Beaulieu, C. Effect of potato suberin on *Streptomyces scabies*  
proteome. Molecular Plant Pathology (soumis pour publication).

1. Identification of protein spots up-regulated in the presence  
of suberin. .... 55
2. Identification of *S. scabies* genes containing the translated amino  
acid sequences of proteins up-regulated in the presence of suberin ..... 58

Tableaux tirés de Lauzier, A. et Beaulieu, C. Effet de la subérine de pomme de terre sur les gènes exprimés par *S. scabies* (à soumettre).

1. Séquence des amorces utilisées pour la PCR et la QPCR .....	89
2. Identification des gènes exprimés en présence de subérine .....	92

## LISTE DES FIGURES

1. Structure de la thaxtomine A .....	11
2. Structure de la concanamycine A et B .....	16

Figures tirées de Lauzier et al (2002).

1. Effect of tryptophan concentration on thaxtomin A production in suberin medium by <i>S. scabies</i> . Data are the mean of three replications. ....	38
2. <sup>13</sup> C NMR analysis of tryptophan incorporation assay. Partial <sup>13</sup> C NMR spectrum (75.47 MHz) of a) pure tryptophan and of b) L-tryptophan-indole-3- <sup>13</sup> C. Partial <sup>13</sup> C NMR spectrum (75.47 MHz) of c) thaxtomin A isolated from an oat bran broth culture of <i>S. scabies</i> and of d) thaxtomin A isolated from an oat bran broth culture of <i>S. scabies</i> grown in the presence of L-tryptophan-indole-3- <sup>13</sup> C. Inserts in panels b and d show the chemical structures of tryptophan and thaxtomin A, respectively. The arrows indicate the <sup>13</sup> C-labeled position. ....	40

Figures tirées de Lauzier, A., Simao-Beauvoir, A.M., Bourassa, S., Poirier, G., Talbot, B. and Beaulieu, C. Effect of potato suberin on *Streptomyces scabies* proteome. Molecular Plant Pathology (soumis pour publication).

1. Proteome map of *S. scabies* soluble internal proteins visualized with silver stain. Proteins were separated in the first dimension over a pH range of 4 to 7. .... 54
  
2. Comparative two-dimensional gel electrophoresis of soluble internal proteins of *S. scabies* stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The large gel image represents the MS proteome using IPG strips pH 5.5-6.7. Regions of interest are boxed (A-F) and shown below with their equivalent gel region of the MM proteome. Identified proteins are circled and identified on the excerpts from the MS proteome. .... 57

Figures tirées de Lauzier, A. et Beaulieu, C. Effet de la subérine de pomme de terre sur les gènes exprimés par *S. scabies* (à soumettre).

1. Expression des gènes calculée par PCR en temps réel. Le ratio indique le niveau d'expression du gène en présence de subérine par rapport au niveau d'expression en absence de subérine. Les écarts-types indiquent la variation entre les résultats obtenus pour quatre extractions indépendantes..... 98

## INTRODUCTION

Les plantes sont des organismes vivants essentiels à la vie sur terre. Elles sont les seuls organismes complexes capables de convertir l'énergie de la lumière en matière organique utilisable. Elles sont donc la source de nourriture sur laquelle dépendent les animaux et les humains en plus d'être essentielles à la production de nombreux biens indispensables tels nos vêtements, nos meubles, abris, etc.

Pour croître, les plantes ont besoin d'un environnement adéquat (nutriments, eau, température, lumière). Cependant, certains facteurs biotiques et abiotiques peuvent interférer avec le développement et la croissance normale des plantes et causer des maladies végétales. Une plante devient malade lorsqu'elle ne fonctionne plus au meilleur de son potentiel génétique. La maladie se traduit par un changement défavorable de la forme, de la fonction ou de l'intégrité de la plante et mène à l'affaiblissement ou à la mort d'une partie ou de l'ensemble de la plante (Agrios, 2004).

La phytopathologie est la science qui étudie les microorganismes et les facteurs environnementaux qui causent des maladies chez les plantes, les mécanismes de virulence de ces derniers et les méthodes pour prévenir et contrôler la maladie et réduire les dommages causés (Agrios, 2004). Dans un contexte de croissance continue de la population mondiale et de ralentissement de l'expansion des terres cultivables, il est plus que jamais pertinent de tenter de faire plus avec moins. Le défi de la phytopathologie est de réduire les pertes de nourriture et d'augmenter sa qualité tout en protégeant l'environnement.

Jusqu'au milieu de 20<sup>e</sup> siècle, la méthode de choix pour contrer les maladies végétales était l'utilisation de composés chimiques. Ces composés étaient à large spectre et très efficaces. Cependant, les études démontrant leurs effets néfastes sur l'environnement et la santé se sont multipliées. Les conséquences des pesticides se retrouvent sous forme de toxicité dans la chaîne trophique (Konwick *et al.*, 2006; Naso *et al.*, 2003; Perez-Ruzafa *et al.*, 2000; Romaniuk *et al.*, 2004), de pollution des eaux (Bondarenko *et al.*, 2004; Sinclair *et al.*, 2006), de résidus sur les aliments (Minyard *et al.*, 1989) et d'intoxication par inhalation (Murphy and Haith, 2007). De plus, les cas de résistances chez les insectes et ravageurs sont de plus en plus nombreux (Horowitz *et al.*, 1998; Roush 1993). Il est donc essentiel de trouver de nouveaux moyens de lutte contre les maladies végétales. La lutte biologique est une de ces options. Elle consiste à utiliser des moyens biologiques pour contrôler les maladies. Elle inclut l'utilisation de méthodes culturales défavorisant les ravageurs des récoltes (Boisclair and Estevez, 2006), l'amélioration de la résistance des plantes (Bhargava *et al.*, 2007; Henderson and Walter, 2006; Huang *et al.*, 2006; Punja, 2006; Vanderschuren *et al.*, 2007), l'utilisation d'insecticides botaniques (Erler *et al.*, 2007; Oparaeke *et al.*, 2006; Prowse *et al.*, 2006; Tuncer *et al.*, 2007) et l'utilisation d'agents antagonistes. Cette dernière méthode consiste à combattre les ennemis de culture en utilisant leurs agents pathogènes, prédateurs ou parasites naturels (Agrios, 2004). Les agents antagonistes peuvent être des champignons, virus, bactéries, protozoaires, végétaux ou animaux. Ces méthodes de lutte sont beaucoup plus respectueuses de l'environnement mais elles ont cependant un spectre d'action assez étroit et nécessite une bonne connaissance des systèmes en jeu.

En l'absence d'une connaissance suffisante des causes des problèmes et des interactions au sein de l'agro-système, les mesures de lutttes demeurent simplistes et peu durables. Il est donc essentiel de continuer à augmenter nos connaissances à la fois sur les organismes phytopathogènes et sur les agents de lutte de façon à développer des systèmes de gestion des maladies végétales efficaces et durables.

## Les caractéristiques des streptomycètes

Les streptomycètes sont un groupe important de bactéries à Gram positif colonisant le sol. Elles sont caractérisées par leur développement sous forme mycéliale ainsi que par le taux élevé de G+C dans leur génome (environ 71%). La plupart des *Streptomyces* sont saprophytes, c'est-à-dire qu'ils sont capables de se nourrir de matière organique en décomposition. Le sol est un environnement difficile pour les organismes vivants qui le peuplent. En plus d'avoir à composer avec des variations importantes de température et d'humidité, les microorganismes doivent compétitionner pour le peu de nutriments disponibles dans le sol avec un grand nombre d'autres organismes. Puisque les *Streptomyces* sont non mobiles, ils ne peuvent se relocaliser et doivent donc faire face aux stress environnementaux. Ainsi, ils ont développé plusieurs adaptations qui leur permettent de réussir dans de telles conditions.

Les streptomycètes ont l'avantage de synthétiser et sécréter une grande variété d'enzymes cataboliques. Ils sont reconnus pour leur production d'enzymes hydrolitiques variés tels les cellulases (Semedo *et al.*, 2000), ligninases (Kirby, 2006), xylanases (Beg *et al.*, 2000), chitinases (Joo, 2005; Kawase *et al.*, 2006), qui leur permettent de dégrader des polymères biologiques complexes du sol. Les streptomycètes ont donc accès à plus de sources de nutriments dans le sol.

En plus de pouvoir accéder à un grand éventail de sources nutritionnelles, les *Streptomyces* produisent plusieurs composés biologiquement actifs qui leur permettent de limiter la croissance des autres organismes compétiteurs. Du total d'au moins 5000 antibiotiques découverts chez les bactéries et champignons jusqu'à maintenant (Demain and Fang, 2000), on estime à environ 50% la contribution des *Streptomyces* (Challis and

Hopwood, 2003). Chez *S. coelicolor*, 4,5% du génome séquencé compterait pour des gènes de synthèse de tels composés secondaires (Challis and Hopwood, 2003). Qu'une aussi importante partie du génome soit dédiée à la synthèse de molécules bioactives et que ces fonctions soient conservées chez les *Streptomyces* tendent à démontrer l'importance de ces composés dans l'adaptation et la survie de la bactérie.

Enfin, les streptomycètes ont un cycle de vie complexe qui leur permet aussi de faire face plus efficacement aux aléas de leur environnement. Lorsque ces bactéries colonisent un milieu favorable, elles se développent sous forme d'hyphes branchés multinucléés. Ce réseau se propage par extension de la paroi cellulaire au bout des hyphes et permet l'exploitation d'une grande partie du territoire disponible par la sécrétion d'enzymes cataboliques. Lorsque les ressources nutritives diminuent, on assiste à un ralentissement de la croissance dans les parties plus anciennes du mycélium. On observe alors à l'émergence du mycélium aérien qui est la deuxième forme de vie des streptomycètes. Les hyphes se détachent du plan de croissance pour croître à la verticale. Cette nouvelle poussée de croissance est accompagnée de la mort d'un nombre important de cellules du mycélium basal dont les composants serviraient à la croissance du nouveau mycélium. Cette élévation du mycélium basal en mycélium aérien demande plusieurs adaptations de la bactérie tels que la mise en place d'un potentiel osmotique par la dégradation de macromolécules (Bruton *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1997), la production d'agents de surface (protéines Sap) pour abaisser la tension à l'interface air/eau (Kodani *et al.*, 2004; Kodani *et al.*, 2005) et la constitution d'une enveloppe hydrophobe (Claessen *et al.*, 2004; Talbot, 2003) pour protéger et orienter l'hyphe aérien. Finalement, le bout des hyphes se cloisonne de façon synchronisée en compartiments mononucléés qui subiront une série de modifications pour donner une chaîne de spores matures. Vu sa résistance aux éléments adverses (sécheresse, chaleur), la spore est la forme idéale pour la dissémination de la bactérie (Djejeva *et al.*, 1990). De plus, vu son hydrophobicité, la spore peut facilement se déplacer dans l'eau mouvante ou être déplacée par des



organismes eucaryotes mobiles auquel elle adhère, ce qui permet une dissémination sur de grandes distances.

### **L'écologie des streptomycètes**

Vu leur grande capacité d'adaptation, il n'est pas étonnant de retrouver les streptomycètes dans un large éventail de niches écologiques. Ces bactéries sont retrouvées dans la plupart des sols à travers le monde. On les retrouve également en grand nombre au niveau de la rhizosphère de plusieurs espèces de plantes (Cao *et al*, 2007; Novorsuren *et al*, 2007; Shirokikh *et al*, 2006; Tian *et al*, 2007). Les recherches des dernières années ont commencé à mettre en évidence de plus en plus de cas d'interactions directes de *Streptomyces* avec des plantes ou des insectes.

Au niveau du règne animal, les *Streptomyces* peuvent être retrouvés dans des appendices spécialisés de certains insectes. Par exemple, une espèce indéterminée de *Streptomyces* est impliquée dans une association avec la guêpe de beewolf (Kaltenpoth *et al.*, 2005). Les femelles guêpes cultivent la bactérie dans des glandes spécialisées situées au niveau de leurs antennes. Les streptomycètes sont déposés par la guêpe pondreuse dans les cocons en même temps que les œufs de larve et protègent ces derniers des infestations fongiques.

Certaines espèces de *Streptomyces* peuvent coloniser les tissus végétaux. Par exemple, *Streptomyces lydicus* serait impliqué dans un cas de symbiose tripartite avec le pois (*Pisum sativum*). Dans cette association, le streptomycète favoriserait la croissance de la plante en aidant à la nodulation (Tokala *et al.*, 2002). Un point intéressant dans cette

étude est qu'elle démontre que le *Streptomyces* croît non seulement sur mais aussi à l'intérieur des cellules de surface des nodules du pois. L'exemple donné en est un de relation mutuellement bénéfique entre une plante et un streptomycète. Bien que peu de ces cas aient été étudiés et documentés jusqu'à maintenant, tout porte à croire que les associations bénéfiques entre les plantes et les streptomycètes sont nombreuses dans la nature.

Dans un système de lutte biologique, les agents antagonistes utilisés exercent leur effet par trois mécanismes principaux : la compétition, le parasitisme et l'antibiose. La compétition est définie comme un effet nuisible direct d'un organisme sur un autre ou indirectement par la suppression de certaines ressources de l'environnement (Clark, 1968). Les organismes entrent donc en compétition lorsqu'un élément indispensable à leur développement est présent en quantité limitante. Cet élément peut être une source de carbone, une source d'azote, le fer, les oligoéléments, etc. Vu leur niche écologique (rhizosphère), leur grande efficacité catabolique et leur production de molécules antibiotiques les *Streptomyces* répondent aux critères des bons agents de lutte biologique. Leur efficacité a d'ailleurs été testée dans différents modèles. Par exemple, au cours des dernières années, différentes espèces de streptomycètes ont démontré une efficacité de protection *in vivo* contre *Pythium alphanidermatum*, *Fusarium oxysporum f. sp. Cube*, *Rhizoctonia solani* et *S. scabies*, les agents responsables respectivement de la fonte des semis du concombre (El-Tarabily and McKenna, 2006), du flétrissement fusarien des racines (Cao *et al.*, 2005) et des plantules de bananier (Getha *et al.*, 2005), de la fonte des semis du chou chinois (Chung *et al.*, 2005) et de la gale commune de la pomme de terre (Agbessi *et al.*, 2003). Deux pesticides biologiques à base de *Streptomyces* sont également disponibles commercialement, le Mycostop<sup>tm</sup> et le Actino-Iron<sup>tm</sup> (Gracia-Garza *et al.*, 2003; Suleman *et al.*, 2002).

## Les streptomycètes phytopathogènes

Bien que plusieurs espèces de streptomycètes semblent être bénéfiques aux cultures végétales, certaines espèces sont nuisibles pour les plantes. Les agents phytopathogènes du genre des *Streptomyces* sont généralement classés en fonction des symptômes qu'ils causent. Ainsi, on reconnaît trois maladies importantes causées par les streptomycètes chez les plantes : la pourriture de la patate douce, la rousselure et gale réticulée et la gale commune.

La pourriture de la patate douce est causée par *Streptomyces ipomoeae*. C'est une maladie végétale qui cause des pertes de productivité des plants de patate douce (*Ipomoea batatas*) à cause de la décomposition du système racinaire et des nécroses au niveau des tubercules, racines et tiges souterraines (Bradbury, 1981). *S. ipomoea* peut également infecter d'autres membres de la famille des *Convolvulaceae* mais n'affecte pas la pomme de terre en nature (Zhang *et al.*, 2003). Il a été démontré que *S. ipomoeae* produisait 3 types de toxines de la famille des thaxtomines (King *et al.*, 1994). *Streptomyces ipomoeae* pénètre les tissus végétaux en dégradant la paroi cellulaire de son hôte (Locci, 1994). Les enzymes hydrolytiques sont très importantes dans le développement de la maladie.

La gale réticulée et la rousselure sont deux maladies de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). La gale réticulée est caractérisée par des lésions liégeuses en quadrillage et la rousselure par des lésions superficielles qui couvrent de grandes surfaces du tubercule. Vu que les pertes associées à ces maladies sont moins importantes que dans le cas de la gale commune, peu d'études ont porté sur ces maladies. Il a été démontré que la gale

réticulée est causée par *S. reticuliscabiei* (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000) et certaines souches de *S. europaeiscabiei* (Pasco *et al.*, 2005). La rousselure quant à elle est causée par une espèce non définie de *Streptomyces* (Faucher *et al.*, 1993). *S. aureofaciens* est l'espèce qui a le plus d'homologie (78%) avec le streptomycète causant la rousselure selon les critères de Lambert et Loria (Lambert and Loria, 1989a; Lambert and Loria, 1989b). Les facteurs de virulence de ces bactéries pathogènes ne sont pas encore connus.

La gale commune est une maladie bactérienne qui affecte plusieurs plantes à organes souterrains de réserve tels que la pomme de terre, la carotte, la betterave et le radis (Goyer and Beaulieu, 1997). La maladie se caractérise par des lésions plus ou moins profondes de tailles et d'aspect variés sur les tubercules. Vu l'importance économique des cultures de pomme de terre dans la plupart des pays, c'est surtout au niveau de cette culture que la maladie est la plus connue. La maladie ne cause pas de baisses importantes de rendement des plants et les pommes de terre atteintes restent comestibles. Cependant, la nature esthétique de la maladie réduit la valeur marchande des récoltes. Un tubercule dont la surface est atteinte à plus de 10% n'est pas acceptable pour la commercialisation. La gale commune cause donc des pertes économiques importantes pour les producteurs de pommes de terre à travers le monde. La gale commune est considérée comme une des quatre plus importantes maladies affectant la pomme de terre en Amérique du nord et son incidence au Québec est suffisamment importante pour qu'elle soit décrétée comme sujet d'étude prioritaire par le Conseil des productions végétales (CPVQ). Une étude de Hill et Lazarovits (2005) réalisé auprès d'un échantillonnage de producteurs de pomme de terre canadiens estime les pertes dues à la gale commune entre 15,3 et 17,3 millions de dollars pour l'année 2002 au Canada. La prévalence moyenne de la maladie est de 82%. L'Est du Canada est la région la plus touchée, le Québec rapportant les plus importantes pertes par hectare (Hill and Lazarovits, 2005).

La gale commune est donc une maladie qui n'est pas hôte spécifique et qui est causée par plusieurs espèces de *Streptomyces*. Voici un survol des différents agents causant la gale commune.

*Streptomyces scabies* est retrouvé un peu partout où la pomme de terre est cultivée. C'est l'espèce de streptomycètes la plus souvent retrouvée dans les cas d'infection de la pomme de terre et la première à avoir été caractérisée (Thaxter, 1892). Cette bactérie est retrouvée plus spécifiquement dans les sols secs, de pH neutre à alcalin et ne croît pas à un pH inférieur à 5,0 (Lambert and Loria, 1989a).

*Streptomyces acidiscabies* a été isolée de sols à pH acides dans le nord-est des États-Unis et au Canada (Faucher *et al.*, 1992; Lambert and Loria, 1989b). Elle a également été isolée en Corée et au Japon (Song *et al.*, 2004; Toth *et al.*, 2001). Sa distribution pourrait donc être assez étendue.

*Streptomyces caviscabies* est une espèce qui cause une gale profonde et qui a été isolée au Québec (Goyer *et al.*, 1996).

*Streptomyces turgidiscabies* est une espèce prévalente au Japon (Miyajima *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1996). Elle a également été identifiée en Finlande en co-infection ou non avec *S. scabies* (Kreuze *et al.*, 1999; Lehtonen *et al.*, 2004). Elle cause des gales en général plus profondes que *S. scabies*.

*Streptomyces europaeiscabiei* et *stelliscabiei* ont été isolées en France et dans d'autres pays d'Europe (Bouchek-Mechiche *et al.*, 2000). *S. europaeiscabiei* a été

isolé de lésions de gale sur les pommes de terre, carottes et betteraves. Il a également été identifié en Corée (Song *et al.*, 2004) et plus récemment aux États-Unis (Wanner, 2006). *S. stelliscabiei* cause une gale en forme d'étoile et son effet pathogène a été établi sur la pomme de terre, la carotte et le radis (Bouček-Mechiche *et al.*, 2000).

*Streptomyces luridiscabiei*, *S. puniscabiei* et *S. niveiscabiei* sont trois autres espèces qui causent la gale commune en Corée (Park *et al.*, 2003).

### **Les mécanismes de virulence des streptomycètes causant la gale commune**

Les mécanismes de virulence des streptomycètes causant la gale commune sont peu connus. Toutefois, plusieurs étapes doivent se succéder afin d'assister au développement de symptômes dans une relation plante/microorganisme. Dans un premier temps, l'agent pathogène doit entrer en contact avec la plante, réussir à s'attacher à la surface des tissus, puis y pénétrer via les blessures ou les lenticelles (Loria *et al.*, 1997). Chacune de ces étapes suppose une adaptation du microorganisme face à son hôte et donc la production de molécules spécifiques lui permettant de coloniser la plante. Puisque la relation qui nous intéresse est compatible, c'est à dire que la plante est sensible et le microorganisme virulent, l'environnement interne de la plante favorisera la croissance et le développement de l'agent pathogène. Pendant l'infection, l'agent pathogène sécrète plusieurs molécules bioactives qui affecteront l'intégrité des cellules ou leur fonctionnement. Les armes chimiques utilisées par les agents pathogènes sont généralement classées en quatre catégories: les toxines, les enzymes, les polysaccharides et les régulateurs de croissance (Agrios, 2004). Certains de ces facteurs seraient potentiellement impliqués dans le développement des symptômes de la gale commune.

## Le rôle des toxines dans le pouvoir pathogène des streptomycètes

En 1989, l'équipe de R.R. King a réussi à isoler des composés nitroaromatiques produits par *S. scabies* qui ont un effet phytotoxique sur la pomme de terre. Ces composés ont été nommés thaxtomines. Les thaxtomines sont produites par la plupart des espèces de *Streptomyces* causant la gale commune. Cependant, la production de thaxtomine n'a pas encore été démontrée chez *S. puniscabiei* et *S. niveiscabiei* (Park *et al.*, 2003). Dans une étude récente, Wanner (2004) a isolé une souche de *Streptomyces* causant la gale qui ne possède pas un des gènes de synthèse de la thaxtomine. L'identité taxonomique de cette souche n'a cependant pas été déterminée au niveau de l'espèce. La structure de base des thaxtomines est un cyclo-(L-4-nitrotryptophyl-L-phenylalanyl) (King *et al.*, 1992). Les thaxtomines varient dans leur structure au niveau des méthylations et des hydroxylations mais l'on sait que le groupement nitro est essentiel à la toxicité de ces molécules (King *et al.*, 1992). La thaxtomine A est la toxine prédominante produite par *S. scabies* au site d'infection (fig. 1).

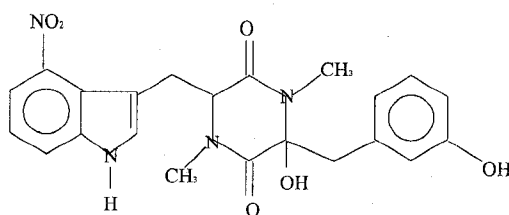


Figure 1: Structure de la thaxtomine A  
(King *et al.*, 1992)

En phytopathologie, quatre facteurs sont déterminants pour évaluer l'importance d'une toxine dans le pouvoir pathogène (Agrios, 2004). Les études sur la thaxtomine ont permis de démontrer que la molécule répond aux quatre facteurs:

- la toxine est produite pendant la vie active de l'agent pathogène *in planta* (King *et al.*, 1989)
- la toxine purifiée reproduit les symptômes de l'infection causée par *S. scabies* (Lawrence *et al.*, 1990)
- il y a corrélation entre la quantité de toxine appliquée sur le tissu et l'importance des symptômes (Kinkel *et al.*, 1998)
- il y a absence de virulence chez les mutants de *S. scabies* ayant perdu la capacité de produire la toxine (Goyer *et al.*, 1998; Healy *et al.*, 2000)

La thaxtomine peut être biosynthétisée *in vitro* dans divers milieux contenant des composés végétaux (Babcock *et al.*, 1993; Beausejour *et al.*, 1999). Une équipe de chercheurs a identifié deux gènes codant pour des peptides synthétases, soit *txtA* et *txtB*, qui seraient impliqués dans la synthèse de la thaxtomine (Healy *et al.*, 2000). En effet, ils ont obtenu deux mutants de *S. acidiscabies* dont le gène *txtA* avait été muté par insertion. Ces mutants cessaient de produire les thaxtomines et devenaient avirulents sur les tubercules de pomme de terre. Ces mêmes mutants, lorsque complétés avec un plasmide contenant les gènes *txtAB* retrouvaient leur capacité à produire la thaxtomine ainsi que leur pouvoir pathogène (Healy *et al.*, 2000). Le squelette bi-peptidique cyclisé de la thaxtomine serait donc biosynthétisé par 2 peptides synthétases non ribosomales. Les deux synthétases ont 44% d'homologie entre elles au niveau de la séquence en acides aminés. On ne sait pas si les deux enzymes sont nécessaires à la biosynthèse. Cependant, l'absence de région intergénique et la position du site d'attachement du ribosome, suggère que *txtA* et *txtB* soient traduits de façon simultanée (Healy *et al.*, 2000). L'étude des séquences en 3' des gènes *txtAB* a permis d'identifier une



cytochrome p450 monooxygénase (*txtC*). La rupture génique de *txtC* chez *S. acidiscabies* a permis de mettre en évidence le rôle de cette protéine dans l'hydroxylation post-cyclisation de la thaxtomine (Healy *et al.*, 2002). Tel que mentionné précédemment, la nitration de la thaxtomine est essentielle à son effet toxique. Un candidat pour cette nitration a également été retrouvé dans la même région que *txtABC*. Il s'agit d'un homologue du domaine oxygénase d'une nitric oxide synthase (NOS). Les NOS ont été retrouvées chez plusieurs bactéries telles *Bacillus* (Pant *et al.*, 2002), *Nocardia* (Chenm et Rosazza 95), *Streptomyces coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002) et *Staphylococcus aureus* (Bird *et al.*, 2002) mais aucune fonction spécifique ne leur a été assignée. Le NOS de *S. turgidiscabies* a été sous-cloné et surexprimé chez *E. coli*. Lors de l'ajout de N-hydroxy-L-arginine, la protéine recombinante pouvait synthétiser le nitrite dans une solution oxygénée (produit final de la réaction du NO ou des espèces reliées) et cette synthèse était inhibée par les inhibiteurs de NOS. La délétion du gène *nos* chez *S. turgidiscabies* cause la perte presque totale de production de thaxtomine A (Kers *et al.*, 2004). Une version dénitrifiée de thaxtomine n'est pas non plus détectable dans le milieu de production.

Tel que mentionné plus haut, la thaxtomine A reproduit les symptômes de gale commune. En effet, on peut assister à l'apparition de nécrose de manière dose-dépendante lorsque la toxine est appliquée sur des tissus végétaux sains et elle reproduit les symptômes d'infection lorsque appliquée sur des mini-tubercules stériles (Lawrence, 1990). Une étude en microscopie de l'effet de la thaxtomine sur les tissus matures de pomme de terre montre une désorganisation générale des cellules (Goyer *et al.*, 2000).

La thaxtomine inhibe aussi la croissance des plantules et serait donc également impliquée dans l'infection de plantules appartenant aussi bien aux monocotylédones qu'aux dicotylédones (Leiner *et al.*, 1996). Dès 1949, Hooker avait démontré que *S. scabies*

pouvait infecter plusieurs types de plantules en plus de causer la gale commune. Le poids de racines de soya, de pois, de blé, de radis et de betterave était réduit lorsque les plantules étaient cultivées en présence de *S. scabies*. Les symptômes incluaient des ralentissements de croissance des racines, de la nécrose des pointes racinaires et la mort des plantules. L'étude de Lawrence (1990) sur les tubercules stériles a mis en évidence que dans les premières étapes d'infection, on assistait à la prolifération cellulaire et à l'expansion des cellules du tubercule avant l'irruption des tissus et la nécrose. Cette hypertrophie cellulaire fut également constatée lors de l'infection des plantules (Leiner *et al.*, 1996).

Cette suppression de la croissance des plantules et l'hypertrophie des cellules laissent supposer un effet de la toxine au niveau de la division cellulaire. Une étude sur les cellules racinaires d'oignon a permis de constater que la thaxtamine causait la formation de cellules binucléées et à des patrons de croissance anormaux (Fry and Loria, 2002). Les cellules progressaient normalement à travers l'anaphase mais pas la cytokinèse. L'hypertrophie constatée chez les cellules d'oignon, de radis et de tabac laissait présager une cible répandue à travers les espèces. Une étude sur *Arabidopsis* a finalement réussi à démontrer que la thaxtamine est un inhibiteur de synthèse de la cellulose (Scheible *et al.*, 2003). Les études d'incorporation de glucose marqué au C<sub>14</sub> ont démontré une nette diminution de l'incorporation de radioactivité dans la fraction cellulosique suite à une pré-incubation des plantules avec la thaxtamine A. De plus, la microspectroscopie à infrarouge transformé de Fourier (FTIR) sur les hypocotyles traités à la thaxtamine a démontré une forte corrélation des spectres FTIR avec des hypocotyles traités avec des inhibiteurs de synthèse de cellulose (isoxaben et dichlorobenil) et des hypocotyles de mutants déficients dans la synthèse de cellulose (Scheible *et al.*, 2003).

La thaxtomine serait activement transportée dans la cellule végétale. Cette même équipe de chercheurs a réussi à isoler un groupe de mutants d'*Arabidopsis* résistants à des concentrations jusqu'à 10 fois plus importante de toxine que la souche sauvage. Le gène muté (*txr1*) a des homologues dans la plupart des espèces végétales vérifiées. Les mutants *txr1* avaient une croissance réduite dans des conditions environnementales variées. La résistance à la thaxtomine serait due à une baisse de l'entrée de la toxine dans la cellule, transport dans lequel serait impliqué Txr1.

La thaxtomine n'induit pas les mécanismes de défense classiques d'une réaction d'hypersensibilité chez des cellules en suspension d'*Arabidopsis* (Duval *et al.*, 2005). Aucun effet n'a été observé sur les niveaux d'alcalinité, la flambée oxydative et l'expression des gènes de défense PR1 et PDF1 2. Cependant, la thaxtomine induit la mort cellulaire programmée. La même réponse est observée chez les cellules traitées à l'isoxaben (inhibiteur de synthèse de cellulose).

En plus de la thaxtomine, les concanamycines sont un autre type de toxines qui pourraient être impliquées dans la pathogenèse des streptomycètes. En effet, Natsume et al (1996) ont isolé une souche de *Streptomyces* (IFO 13767) virulente sur la pomme de terre mais qui ne produisait pas de thaxtomine. Par extractions séquentielles du surnageant de culture de cette souche, ils ont isolé deux composés ayant un effet phytotoxique sur la pomme de terre: les concanamycines A et B. Les concanamycines sont des antibiotiques de la classe des macrolides caractérisés par un anneau tetraenic de 18 carbones incorporant un methyl enoyl éther et une chaîne latérale  $\beta$ -hydroxyhemiactal (fig. 2) (Westley *et al.*, 1984). La concanamycine A agit comme un inhibiteur sélectif des ATPases du système vacuolaire (Mousavi *et al.*, 2001). Une étude portant sur la production des composés phytotoxiques chez cinq souches de streptomycètes causant la gale commune suggère que les concanamycines ainsi que la

thaxtomine sont produites par *S. scabies* alors que seulement la thaxtomine est produite par *S. acidiscabies* (Natsume *et al.*, 1998).

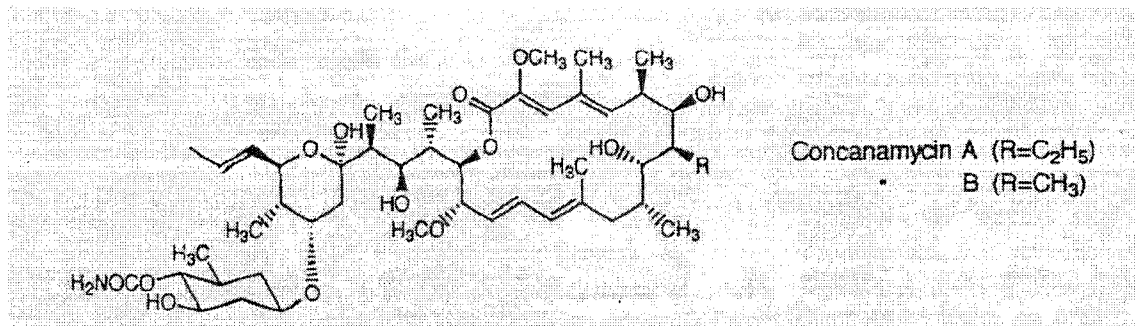


Figure 2: Structure de la concanamycine A et B.  
 (Natsume *et al.*, 1998)

### Le rôle du gène *necl* dans le pouvoir pathogène des streptomycètes

En 1997, l'équipe de Bukhalid et Loria a cloné un fragment d'ADN provenant d'une souche de *S. scabies*. Introduit dans *S. lividans* (souche non-pathogène), le fragment permettait à la souche réceptrice de causer la nécrose des tubercules de pomme de terre. Le plus petit fragment qui donnait l'activité nécrotique a été nommé *necl*. Par hybridation, *necl* a été identifié chez 42 souches pathogènes de *S. scabies*, *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies* alors qu'il était absent chez *S. ipomoeae* (agent causal de la pourriture molle de la patate douce et productrice de thaxtomine) et chez 19 souches non-pathogènes de streptomycètes (Bukhalid and Loria, 1997; Bukhalid *et al.*, 1998). La présence de *necl* semble corrélérer avec la production de thaxtomine sauf dans le cas de *S. ipomoeae*.

Chez *S. turgidiscabies* la délétion de *nec1* n'empêche pas la production de thaxtomine. Le gène *nec1* a un taux de G+C beaucoup plus bas que le reste du génome des *Streptomyces* (54% versus 71%). La fonction de la protéine Nec1 n'est pas connue mais elle est sécrétée en début de phase logarithmique lorsque *S. turgidiscabies* est cultivée en milieu liquide. Lorsque *nec1* est inactivé on observe une inhibition de croissance un peu moins importante des plantules d'*Arabidopsis* qu'en présence de la souche sauvage de *S. turgidiscabies* (Loria *et al.*, 2006).

### **Le rôle des enzymes hydrolytiques dans le pouvoir pathogène des streptomycètes**

Les enzymes hydrolytiques sont très importantes au stade de l'infection car elles permettent de dégrader les différents constituants de la paroi cellulaire de la plante et, par le fait même, donne accès aux nutriments et permet l'invasion des tissus par l'agent pathogène (Agrios, 2004).

Les streptomycètes produisent plusieurs enzymes hydrolytiques telles que les cellulases, ligninases, xylanases, endoglucanases (Beg *et al.*, 2000; Irdani *et al.*, 1996; Semedo *et al.*, 2000; Tamburini *et al.*, 2004). Toutefois, les enzymes hydrolytiques ont été peu étudiées chez les souches pathogènes de streptomycètes.

Les estérases permettent d'hydrolyser les liens esters et donc de dégrader une grande variété de composés naturels. McQueen et Schottel (1987) ont isolé une estérase de *S. scabies* dont la biosynthèse est induite par la subérine. Ils ont également démontré que l'estérase de *S. scabies* utilisait la subérine comme substrat. La subérine est un polymère hydrophobe complexe faisant partie intégrante du périderme et des cellules subérisées des

tissus souterrains des plantes (épiderme, exoderme, endoderme, suber racinaire et tubercules) (Esau, 1977). Elle est constituée d'un domaine polyaromatique et d'un domaine polyaliphatique reliés par des liens covalents. Le domaine aliphatique est une structure tri-dimensionnelle composée d'acides  $\alpha,\omega$ -dioïques, d'acides  $\omega$ -hydroxy, d'acides gras à très longues chaînes, d'acides gras oxydés à moyennes chaînes et d'acides hydroxycinnamique estérifiés (Kolattukudy, 1980; Kolattukudy, 1984). Le glycérol est aussi présent en quantité importante dans la partie aliphatique de la subérine extraite des tubercules de pomme de terre (Moire *et al.*, 1999). Le domaine aromatique est composé principalement d'acides hydroxycinnamique et dérivés (acide férulique et feruloyltyramine) et de monolignols (Bernards, 2002). Cette partie est ancrée dans la paroi cellulaire primaire et est rattachée à la partie aliphatique par des liens esters et par attachement au glycérol. Le glycérol servirait également à lier les groupements acyls de la partie aliphatique entre eux de façon à créer la structure tridimensionnelle du polymère (Graca and Pereira, 2000; Schmutz *et al.*, 1994). Le rôle physiologique de la subérine serait la rétention d'eau à l'intérieur des cellules (Bernards, 2002). De plus, elle agirait comme barrière à l'infection par les agents pathogènes dans l'ensemble des tissus subérisés et lorsque déposée successivement à une blessure (Lulai and Corsini, 1998). McQueen et Schottel (1987) ont isolé une estérase commune à deux souches de *S. scabies* pathogènes et absente chez deux *Streptomyces* non pathogènes, ce qui suggère que l'estérase aurait un rôle dans le pouvoir pathogène en facilitant la pénétration dans les tissus.

Au cours du processus d'infection, les bactéries phytopathogènes reconnaissent certains composés produits par la plante qui servent d'inducteurs aux mécanismes de virulence. Par exemple chez *Agrobacterium tumefaciens*, agent causal de la gale du collet, plusieurs gènes de virulence sont activés par des molécules phénoliques produites par la plante, tel l'acétosyringone (Melchers *et al.*, 1989). Aussi, des composés phénoliques et des sucres spécifiques de la plante induisent l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de

syringomycine et de syringopeptine, des facteurs de virulence importants chez la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (Mo and Gross, 1991; Quigley and Gross, 1994; Wang and Yuan, 2005).

Il a été démontré que la thaxtomine A était produite par *S. scabies* lors de l'infection des tissus de pomme de terre (King *et al.*, 1989). *In vivo*, la bactérie ne produit pas de toxine dans un milieu minimal. Un élément de la plante est donc essentiel à l'induction de la biosynthèse de la thaxtomine. La toxine est produite par *S. scabies* dans des milieux à base de gruau et de son d'avoine (Babcock *et al.*, 1993; Goyer *et al.*, 1998) et dans des milieux supplémentés de chair ou de pelures de pomme de terre ainsi que de pelures de radis et de patate sucrée (Beausejour *et al.*, 1999). L'ajout de cellulose, pectate et d'amidon à un milieu minimal n'induit pas la production de thaxtomine (Beausejour *et al.*, 1999). Le composé spécifique qui permet l'induction de la production de thaxtomine n'a pas été identifié. Jusqu'à récemment, la subérine était le composé le plus simple qui permettait la production de la toxine *in vitro* (Beausejour *et al.*, 1999). Une étude de Wach *et al.*, (2007) a démontré que le cellobiose permettrait la production de thaxtomine chez certaines espèces de *Streptomyces* pathogènes. Cependant, le cellobiose n'est pas suffisant pour induire la production de la toxine chez plusieurs souches de *S. scabies* (Lerat, Beaudoin et Beaulieu, non publié). La présence du disaccharide augmente cependant la production de thaxtomine dans un milieu supplémenté de subérine (Lerat, Beaudoin et Beaulieu, non publié).

### **Le rôle des inhibiteurs des mécanismes de défenses dans le pouvoir pathogène des streptomycètes**

Les saponines sont des hétérosides produits par de nombreuses espèces de plantes. Elles sont issues de la combinaison d'un sucre et d'un stéroïde ou tri terpène (Luger *et al.*,

1996). Vu leurs propriétés tensioactives, elles interagissent avec les stérols de la membrane des eucaryotes et causent la perte d'intégrité de leurs membranes, protégeant la plante des agressions fongiques. Les saponinases sont les enzymes de défense produites par les champignons qui permettent de dégrader les saponines. Des homologues de saponinases ont récemment été mis en évidence chez *S. scabies*, *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies* (Loria *et al.*, 2006). Un homologue est également retrouvé dans le génome séquencé d'une autre bactérie phytopathogène à Gram +, *Clavibacter michiganensis* (Kaup *et al.*, 2005). Leur rôle n'est pas connu puisque les bactéries ne possèdent pas de stérols dans leur membrane. Cependant, la conservation de ce gène chez plus d'une espèce de bactéries phytopathogènes laisse présumer un rôle au niveau de la relation plante-microorganisme.

### **Le rôle des régulateurs de croissance dans le pouvoir pathogène des streptomycètes**

Il a été rapporté par Manulis *et al.*, (1994) que plusieurs *Streptomyces*, incluant *S. scabies*, produisait une phytohormone de croissance (auxine): l'acide indole-3-acétique (AIA). L'auxine est une hormone naturelle retrouvée en très faible quantité dans les tissus de la plante. Elle cause une augmentation de la respiration, elle favorise la synthèse d'ARNm et de protéines (Agrios, 2004). L'AIA a été détectée aussi bien chez des bactéries pathogènes que chez des bactéries non-pathogènes ou symbiotiques (Manulis *et al.*, 1994). L'implication de l'auxine dans le pouvoir pathogène de *S. scabies* n'a pas encore été étudiée.

De plus, *S. turgidiscabies* produirait une autre phytohormone, la cytokinine. En effet, des gènes homologues aux gènes de fasciation (anomalie de croissance de certaines tiges qui se soudent pour former un faisceau unique) de *Rhodococcus fascians* ont été retrouvés



dans le génome de *S. turgidiscabies* près des gènes de biosynthèse de la thaxtomine (Loria *et al.*, 2006). *R. fascians* est un actinomycète qui cause des tumeurs foliaires sur une grande variété d'espèces végétales (Bradbury 86). Essentiel à son pouvoir pathogène sont les gènes *fas* codant pour les enzymes de la voie de synthèse de la cytokinine (Crespi *et al.*, 1992). Le développement de tumeurs n'a jamais été observé chez les organismes infectés par les streptomycètes causant la gale commune. En utilisant une souche de *S. turgidiscabies* mutée au niveau du gène *nos* (i.e. produisant une quantité négligeable de thaxtomine), Loria *et al.* (2006) ont réussi à démontrer le développement de tumeurs sur des plantules d'*Arabidopsis* infectés. Contrairement aux gènes de synthèse de la thaxtomine et à *necl*, l'opéron *fas* n'est pas conservé chez *S. scabies* ou *S. acidiscabies* (Loria *et al.*, 2006).

### **Îlots de pouvoir pathogène (Pathogenicity Islands - PAI)**

Les bactéries acquièrent de nouvelles caractéristiques qui leur permettent une meilleure adaptation à leur niche écologique ou l'exploitation d'une nouvelle niche écologique à travers l'évolution génomique. Plusieurs mécanismes participent à l'évolution génomique tels les mutations ponctuelles, la conversion génique, les réarrangements d'ADN, les délétions et l'acquisition d'ADN exogène. L'acquisition et la perte de matériel génétique permettent une évolution génétique très rapide et semblent être le mécanisme principal par lequel les bactéries s'adaptent génétiquement à de nouveaux environnements et qui amène à la divergence des populations bactériennes en groupe évolutifs distincts (Schmidt and Hensel, 2004). Le transfert horizontal de gènes peut se faire via plusieurs éléments génétiques mobiles tels les plasmides conjugatifs, les bactériophages, les transposons, les éléments d'insertion, les îlots génomiques et la recombinaison d'ADN étranger.

Les bactéries pathogènes exercent leur effet sur leur hôte par l'expression de gènes de virulence. Les facteurs de virulence sont les éléments qui participent à la capacité de l'organisme à infecter et à provoquer une maladie dans une ou plusieurs espèces données. Les îlots de pouvoir pathogène (PAI) sont un sous-groupe des îlots génomiques (éléments génétiques mobiles) qui jouent un rôle important dans la virulence bactérienne. Les PAI ont les caractéristiques suivantes :

- leur séquence génétique inclut au moins un gène de virulence
- ils sont retrouvés seulement dans le génome des organismes pathogènes
- ils couvrent une grande région génomique (10 à 200kb)
- ils peuvent avoir une composition de base (taux G+C) ainsi que l'usage des codons différents de ceux de la bactérie hôte
- ils sont souvent insérés à proximité des gènes d'ARNt
- ils sont associés à des éléments génétiques mobiles. Ils sont généralement bordés de séquences de répétition directe et codent souvent pour des intégrases (enzymes d'intégration des bactériophages lysogènes) et/ou des transposases (enzymes de mobilisation des transposons). Des séquences d'insertion sont également fréquemment retrouvées
- ils sont instables et la perte de leurs fonctions associées est statistiquement plus fréquente que le taux normal de mutation chez l'organisme
- ils sont souvent des mosaïques de gènes acquis à des moments et d'organismes différents (Schmidt and Hensel, 2004).

La cartographie des gènes de virulence chez *S. turgidiscabies* a permis de mettre en évidence la présence d'un élément génétique mobile de type PAI dans le génome de cette bactérie. Le PAI de *S. turgidiscabies* inclut les gènes de virulence *necl1* ainsi que les gènes de biosynthèse de la thaxtomine (Tableau 1).

Tableau 1 : Gènes retrouvés sur le PAI de *S. turgidiscabies*

(tableau tiré de Kers *et al.*, 2005)

Locus	Nom du gène	Fonction probable
1		$\beta$ -Glucosidase, pseudogène
2	<i>tomA</i>	Tomatinase
3		Régulateur transcriptionnel de la famille LacI
4		Transposase
5		Protéine hypothétique
6	IS 1629	Transposase
7	<i>nec1</i>	Protéine de nécrose
8	ORF <i>tnp</i>	Transposase, pseudogène
9		Resolvase
10		Transposase
11	<i>fas5</i>	Cytokinine oxydase
12	<i>fas4</i>	Isopentyl transférase
13	<i>fas3</i>	Transkétolase
14	<i>fas2</i>	Ferredoxine transkétolase
15	<i>fas1</i>	Cytochrome P450
16		Méthyltransférase
17		Méthyltransférase
18		Protéine de transport transmembranaire
19	<i>fas6</i>	Protéine hypothétique
20		Transposase
21	<i>nos</i>	Nitric oxide synthase
22		Cytochrome P450
23		Transposase, séquence codante partielle
24		Transposase, séquence codante partielle
25		Transposase, séquence codante partielle
26		Transposase
27		Protéine régulatrice de la famille AraC
28		Transposase, pseudogène
29	<i>txtA</i>	Thaxtomine synthétase A
30	<i>txtB</i>	Thaxtomine synthétase B
31	<i>txtC</i>	Cytochrome P450

Il couvre une région de 325 à 660kb (Kers *et al.*, 2005). On peut constater que le taux G+C des différents gènes du PAI varient de 54,2 à 73,2%, le taux moyen des Streptomycètes étant d'environ 71%. Ces disparités semblent suggérer que les gènes du

PAI proviennent d'espèces bactériennes différentes. Les gènes *nec1*, le gène de la tomatinase et les gènes de synthèse de la thaxtomine sont présents chez les trois principales espèces de *Streptomyces* phytopathogènes et absents chez *S. coelicolor* et dix autres espèces de *Streptomyces* non pathogènes (Kers *et al.*, 2005). Chez *S. scabies*, le PAI est également présent mais est organisé différemment (Tableau 2). On peut voir que les gènes *txtAB* et *C* ainsi que le gène *nos* sont regroupés dans la première partie du PAI, alors que le reste des gènes est retrouvé près de 6M pb plus loin sur le génome, fragmentation du PAI qui n'est pas observée dans le génome de *S. turgidiscabies*.

Tableau 2 : Gènes retrouvés sur les PAI de *S. scabies*

Locus	Position sur génome publié par Sanger (1)	Fonction probable
PAI1	3 596 331	Hydrolase
PAI1	3 596 902	AviX4
PAI1	3 597 669	Transposase de la famille IS21
PAI1	3 598 169	ThaxtC cytochrome P450 monooxygénase
PAI1	3 600 117	Homologue de Mbth
PAI1	3 600 404	Thaxt B
PAI1	3 604 918	Thaxt A
PAI1	3 610 981	Protéine régulatrice de la famille AraC
PAI1	3 615 230	Nos Nitric oxyde synthase
PAI2	8 349 368	gène impliqué dans la synthèse d'auxine <i>iaaM</i>
PAI2	8 506 508	transposase
PAI2	8 507 212	Rien
PAI2	8 507 544	Régulateur transcriptionnel ( <i>tetR</i> )
PAI2	8 508 272	Oxidoreductase liant le zinc
PAI2	8 509 360	estérase/lipase
PAI2	8 510 348	Déhydrogénase (courtes chaînes)
PAI2	8 511 707	Résolvase/invertase [ <i>Streptomyces turgidiscabies</i> ]
PAI2	8 512 702	Transposase de la famille IS256
PAI2	8 513 433	Transposase de la famille IS256
PAI2	8 514 341	Protéine <i>Nec1</i>
PAI2	8 515 249	Protéine hypothétique <i>stPAI005</i>
PAI2	8 515 735	Transposase
PAI2	8 517 441	Régulateur transcriptionnel

PAI2	8 518 354	Protéine hypothétique [Mycobacterium sp. MCS]
PAI2	8 518 790	Enoyl-CoA hydratase/isomerase
PAI2	8 519 576	Rien
PAI2	8 519 972	acyl-CoA déshydrogénase [Mycobacterium tuberculosis
PAI2	8 520 597	Rien
PAI2	8 520 801	oxidoreductase, pyridine nucleotide-disulphide, FAD-dependante
PAI2	8 521 084	Protéine régulatrice MarR (résistance antibiotiques)
PAI2	8 522 311	Oxydoréductase dépendante du FAD (Mycobacterium)
PAI2	8 523 508	Protéine régulatrice IciR : régulation de l' Isocitrate lyase (Mycobacterium)
PAI2	8 524 745	Régulateur transcriptionnel de la famille PadR ([Streptomyces avermitilis])
PAI2	8 525 112	Protéine sécrétée [Streptomyces coelicolor A3(2)]
PAI2	8 528 065	Protéine hypothétique MAP_0578 ( <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>Paratuberculosis</i> )
PAI2	8 528 829	glycosyl hydrolase famille 35
PAI2	8 530 643	Glycoside hydrolase, famille 3
PAI2	8 533 104	Glycoside hydrolase, famille 3
PAI2	8 535 067	Système de transport du cellobiose de type ABC, perméase [Streptomyces avermitilis]
PAI2	8 535 978	Système de transport du cellobiose de type ABC, perméase BglA [Thermobifida fusca]
PAI2	8 537 129	Système de transport du cellobiose de type ABC, protéine liant le soluté
PAI2	8 538 672	Régulateur transcriptionnel (tetR)
PAI2	8 539 457	Cutinase ( <i>Mycobacterium</i> )
PAI2	8 539 752	LacI:Protéine périplasmique
PAI2	8 541 165	Glycosyl hydrolase
PAI2	8 542 763	Tomatinase
PAI2	8 544 809	Régulateur transcriptionnel de la famille LacI
PAI2	8 546 032	Rien
PAI2	8 548 114	Déshydrogénase de la famille 2-hydroxyacid

(1) Sanger Institute. The Wellcometrust Sanger Institute [en ligne]. Disponible sur :

<http://www.sanger.ac.uk>

Kers et al (2005) ont transféré le PAI de *S. turgidiscabies* chez deux souches de *Streptomyces* non pathogènes : *S. coelicolor* et *S. diastochromogenes*. L'intégration du PAI chez *S. coelicolor* ne lui a pas conféré le phénotype pathogène contrairement à *S. diastochromogenes*, chez qui les transconjugants produisent de la thaxtomine et sont capable de coloniser les tissus de tubercule de pomme de terre. Il semble donc que les gènes de virulence peuvent être mobilisés entre différentes espèces de streptomycètes. Cependant, l'acquisition du PAI n'est pas suffisante pour rendre une souche virulente tel que démontré dans le cas de *S. coelicolor*.

La présence des gènes de virulence sur un élément mobile d'ADN pourrait expliquer la grande variabilité génétique entre les espèces causant la gale commune de la pomme de terre. Pour le transfert horizontal de gène, la proximité physique des espèces est un facteur déterminant dans l'acquisition du phénotype de même que la capacité à obtenir, maintenir et exprimer efficacement les gènes de virulence présents sur le PAI, plus que la stricte parenté génétique. Ceci expliquerait comment des espèces variées de streptomycètes peuvent exprimer un phénotype pathogène semblable alors que d'autres espèces beaucoup plus près génétiquement sont non-pathogènes.

### **Objectifs du projet de doctorat**

Afin de développer des méthodes de lutte efficaces contre *S. scabies*, il est essentiel de bien connaître la bactérie et la façon qu'elle interagit avec son environnement et son hôte. La thaxtomine est un facteur de virulence important impliqué dans l'apparition des symptômes causés par plusieurs *Streptomyces* phytopathogènes. Nous avons donc mis l'accent sur certains éléments environnementaux qui modulent la biosynthèse de la thaxtomine chez *S. scabies*.

La thaxtomine étant dérivé de divers acides aminés, nous avons dans un premier temps voulu déterminer l'effet de ces composés sur la production de thaxtomine par différentes souches de *S. scabies*.

Dans un deuxième temps, nous avons axé notre étude sur la subérine, un polymère qui induit la biosynthèse de la thaxtomine chez *S. scabies*. Pour analyser la réponse physiologique de la bactérie à l'ajout de subérine, nous avons utilisé la protéomique et la transcriptomique. Dans le cadre de ce projet, des protéines spécifiquement produites en présence de subérine ont été identifiées. De plus, plusieurs gènes exprimés après une induction par la subérine ont été identifiés et les patrons d'expression de certains de ces gènes vérifiés en présence et en absence de subérine.

## CHAPITRE 1

### 1.0 Effet des acides aminés sur la biosynthèse de la thaxtomine A par *S. scabies*

Des études préliminaires ont démontré que certains composés avaient un effet sur la production de thaxtomine par *S. scabies*. Babcock et al (1993) ont été les premiers à rapporter que deux acides aminés, le tryptophane et la tyrosine, réprimaient la production de la thaxtomine A chez la souche *S. scabies* RB2 dans un milieu à base d'avoine. Ils ont également remarqué que la synthèse de la toxine était réprimée par le glucose, répression également signalée par Loria (1995) chez la souche 87-22.

Dans les travaux qui suivent, nous avons poursuivi la vérification de l'effet de plusieurs acides aminés ainsi que d'un acide aminé modifié sur la production de thaxtomine A par la souche *S. scabies* EF-35 dans un milieu minimal supplémenté de subérine. Nous avons constaté que seulement les trois acides aminés aromatiques, tyrosine, tryptophane et phénylalanine, avaient un effet répresseur sur la biosynthèse de la thaxtomine A. L'acide glutamique, la méthionine et la sérine n'avaient pas d'effet inhibiteur. La méthylation du tryptophane était suffisante pour lever l'effet inhibiteur de la molécule. Nous avons également démontré que l'effet du tryptophane était dépendant de la concentration de l'acide aminé ajoutée au milieu de culture avec une inhibition presque complète à une concentration de 5mM. De plus, nous avons démontré que l'effet inhibiteur des acides aminés aromatiques était observable pour cinq souches de *S. scabiei*, incluant la souche type ATCC 49173.



Par des tests d'incorporation de radioactivité, nous avons démontré que le phénylalanine et le tryptophane sont des précurseurs de la synthèse de la thaxtomine A. Ce qui n'est pas le cas de la tyrosine. La radioactivité associée à la méthionine est également fortement incorporée, suggérant un rôle de donneur de méthyles à cet acide aminé dans la biosynthèse de la toxine.

Ces travaux sont décrits à la section 1.1. Cette section est constituée de l'article A. Lauzier, C. Goyer, L. Ruest, R. Brzezinski, D. Crawford et C. Beaulieu (2002). Effect of amino acids on thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces scabies*. Canadian Journal of Microbiology, 48(4), pp 359-364. La production et les dosages de thaxtomine pour les souches ATC 49173, CG1, CG11 et CG12 ont été faits par C. Goyer. J'ai effectué la production et les dosages de thaxtomine pour la souche EF-35, les tests de concentration de tryptophane ainsi que les test d'incorporation de radioactivité. J'ai purifié la thaxtomine marquée et non marquée en vue de l'analyse RMN qui a été faite par L. Ruest. J'ai rédigé cet article. Les travaux ont été faits sous la supervision de R. Brzezinski, D. Crawford et C. Beaulieu.

1.1 Effect of amino acids on thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces scabies*.

Annie Lauzier<sup>1</sup>, Claudia Goyer<sup>1</sup>, Luc Ruest<sup>2</sup>, Ryszard Brzezinski<sup>1</sup>, Don L. Crawford<sup>3</sup> and Carole Beaulieu<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne, Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada.

<sup>2</sup> Département de chimie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada.

<sup>3</sup> Department of microbiology, molecular biology and biochemistry, University of Idaho, Moscow, ID83844, USA

Corresponding author

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

## Abstract

The regulatory effect of amino acids on the production of thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies*, was investigated. Tryptophan had an important inhibitory effect on the toxin biosynthesis in all five strains of *S. scabies* tested. Two other aromatic amino acids (tyrosine and phenylalanine) also inhibited thaxtomin A biosynthesis while aliphatic amino acids did not cause an important decline in thaxtomin A production. Methylation of tryptophan prevented or reduced the inhibitory effect on thaxtomin A biosynthesis. In spite of the inhibitory action of tryptophan and phenylalanine on thaxtomin A production, incorporation of these radiolabeled molecules into thaxtomin A confirmed that they are metabolic precursors for the biosynthesis of the phytotoxin.

Keywords: Thaxtomin A, phytotoxin, *Streptomyces scabies*, common scab, nitroaromatic compounds, amino acids

## Introduction

The genus *Streptomyces* is composed of bacterial species inhabiting soil (Loria *et al.*, 1997). These interesting procaryotes have a complex life cycle that includes the development of a substrate mycelium from which arises an aerial mycelium that fragments into spores. The streptomycetes are also well-known as producers of biologically active secondary metabolites. Most *Streptomyces* species are saprophytic, but some are important plant pathogens (Locci, 1994).

*Streptomyces scabies* is the major causal organism of common scab (Lambert and Loria, 1989). This economically important disease is characterized by shallow, raised or deep-pitted corky lesions (Locci, 1994) on potato tubers and on tap roots such as carrot, turnip, and beet (Goyer and Beaulieu, 1997). The virulence mechanisms used by this pathogen include the secretion of nitroaromatic compounds exerting toxicity on plant tissues (Loria *et al.*, 1997; Goyer *et al.*, 2000). These 4-nitro-3-yl containing dioxopiperazines were named thaxtomins (King, 1989), and thaxtomin A represents the predominant form of the toxin produced by *S. scabies*. The biochemical steps involved in thaxtomin A biosynthesis have not been completely elucidated yet. Acuna *et al.*, (2001) showed that phenylalanine was a metabolic precursor of thaxtomin A biosynthesis. Furthermore, isolation and characterization of compounds extracted from a culture media of *Streptomyces scabies* allowed King and Lawrence (1996) to predict the later steps in thaxtomin A synthesis. Recently, Healy *et al.*, (2000) identified two genes involved in thaxtomin A biosynthesis. These two genes code for peptide synthetase homologues.

Thaxtomin A is an essential factor of *S. scabies* pathogenicity. The toxin reproduced symptoms of common scab on aseptic potato tubers (Lawrence *et al.*, 1990). Symptom severity correlated to the quantity of thaxtomin A applied on plant tissues (Kinkel *et al.*, 1998) and mutants deficient in their capacity to synthesize the toxin were nonpathogenic (Goyer *et al.*, 1998).

Environmental conditions affect thaxtomin A production. Beauséjour *et al.*, (1999) demonstrated that the presence of plant extracts was essential to the *in vitro*

production of thaxtomin A. These authors identified suberin, a complex plant polymer composed of fatty acid polyesters linked to phenolic compounds (Kolattukudy and Agrawal, 1974), as a product allowing thaxtomin A production when introduced into a minimal culture medium. It was also noted that thaxtomin synthesis was repressed by glucose (Loria *et al.*, 1995; Babcock *et al.*, 1993). Tryptophan and tyrosine also had an inhibitory effect on the production of the toxin in *S. scabies* strain RB2 (Babcock *et al.*, 1993).

The aim of this study was to pursue investigations on the role of amino acids on the biosynthesis of thaxtomin A by *S. scabies* strains. Involvement of various amino acids in the phytotoxin synthesis was first analyzed in regard to their effect on the level of production and second in regard to their incorporation into thaxtomin A.

## **Material and methods**

*Bacterial strains and culture conditions:* Five *Streptomyces scabies* strains were used in this study: *S. scabies* ATCC 49173<sup>T</sup> (Lambert and Loria, 1989) and *S. scabies* strains EF-35, CG1, CG11 and CG12. Strains EF-35, CG11 and CG12 were isolated from common scab lesions on potato tubers in Canada (Faucher *et al.*, 1992; unpublished data) while strain CG1 was isolated from a radish lesion (Beauséjour *et al.*, 1999).

*Thaxtomin production and quantification:* Strains were grown aerobically in a rotary shaker at 30°C in tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.) for 48 hours. The cultures were centrifuged and resuspended in five volumes of fresh TSB before being transferred to the production medium (1/50, vol/vol). The production medium consisted of oat bran broth and was prepared according to Goyer *et al.*, (1998). When necessary, radiolabeled glucose, labeled amino acids, or non labeled amino acids were added to the production medium prior to inoculation. Non labeled amino acids (Sigma, St-Louis Missouri, U.S.) were added at a concentration varying between 1 µM and 20 mM.

For the incorporation assay, radiolabeled amino acids or glucose (1  $\mu$ Ci) was added to the production medium. L-[ $^{14}$ C(U)]-phenylalanine, L-[ $^{14}$ C(U)]-tyrosine, L[side chain-3- $^{14}$ C]-tryptophan and L-[methyl- $^{14}$ C]-methionine were from NEN (Boston, Massachusetts, U.S.) while  $^{14}$ C-glucose was from Sigma (St-Louis, Missouri, U.S.). L-tryptophan-indole-3- $^{13}$ C (Cambridge Isotope Laboratories, MA, U.S.) was added to oat bran broth at a final concentration of 0.5 mM. All cultures were incubated in a rotary shaker at 30°C for 7 days before thaxtomin A extraction.

Thaxtomin A was purified from culture supernatants as previously described by Goyer *et al.*, (1998). Briefly, thaxtomin A was extracted from culture supernatants using ethyl acetate. Compounds extracted by ethyl acetate were separated on TLC. The yellow spots exhibiting the same R<sub>f</sub> as purified thaxtomin A were eluted from the silica gel using chloroform:methanol (7:3). Thaxtomin A was then quantified by high-performance liquid chromatography. For the incorporation assay, radioactivity associated with purified thaxtomin A was quantified using a Beckman LS 6000SC liquid scintillation counter (Fullerton, California, U.S.). Each experiment was carried out in triplicate. For the  $^{13}$ C incorporation assay, thaxtomin A was purified by three TLC using consecutively chloroform:methanol (95:5), chloroform:methanol (90:10) and ethyl acetate:water:formic acid: acetic acid (100:10:10:10) as migrating solvents. Thaxtomin A was eluted from silica gel and then washed twice with benzene. All NMR spectra were recorded for solutions in deuterated methanol with a Brüker AC-300 NMR analyzer operating at 330.13 MHz for  $^1$ H and 75.47 MHz for  $^{13}$ C. Chemical shifts were calculated based on the signal for the solvent (7.26 ppm for CDCl<sub>3</sub> and 77.0 ppm for  $^{13}$ CDCl<sub>3</sub>).

## Results

### *Effect of different amino acids on thaxtomin A production in S. scabies strain EF-35.*

To study the effect of amino acids on the biosynthesis of thaxtomin A in *S. scabies* EF-35, oat bran broth was supplemented with amino acids at a concentration of 2.5 mM. Aliphatic amino acids such as glutamic acid, methionine and serine did not have a

marked effect on thaxtomin A biosynthesis in EF-35. While EF-35 produced an average of 17  $\mu\text{g}$  of thaxtomin A per mg of bacterial cells (dry weight) in oat bran broth, the level of production ranged from 15.6 to 23.1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  in the same medium supplemented with one of the three amino acids (Table 1). In contrast, the three aromatic amino acids (tryptophan, phenylalanine and tyrosine) each strongly inhibited thaxtomin A production in oat bran broth. Thaxtomin A was undetectable in cultures supplemented with phenylalanine and tryptophan and only trace amounts were detected in media containing tyrosine (Table 1).

**Table 1.** Effect of different amino acids on thaxtomin A production in *S. scabies* strain EF-35

Amino acid <sup>a</sup>	Thaxtomin A production <sup>b</sup>
Control <sup>c</sup>	1.00 <sup>d</sup>
Glutamic acid	1.09
Methionine	0.92
Serine	1.36
Phenylalanine	0.00
Tryptophan	0.00
Tyrosine	0.01
N-methyl-2-tryptophan	0.98

<sup>a</sup> Amino acids were added at a final concentration of 2.5 mM.

<sup>b</sup> Thaxtomin A production was expressed relative to the control culture.

<sup>c</sup> Control consisted of oat bran broth.

<sup>d</sup> The amount of thaxtomin A produced in the control culture was 17  $\mu\text{g}/\text{mg}$  of bacterial cells (dry weight). The data are the mean of three replications.

Methylation of tryptophan prevented the inhibitory effect observed with aromatic amino acids since addition of 2.5 mM of N-methyl-L-tryptophan in oat bran broth did not markedly affect thaxtomin A production in EF-35 (Table 1).

*Effect of some amino acids on thaxtomin A production in S. scabies strain EF-35, CG1, CG11, CG12 and ATCC 49173.*

Inhibition of thaxtomin A production by tryptophan was observed in all *S. scabies* strains. Thaxtomin A production ranged from 1 to 22 µg/mg of bacterial cells (dry weight) among the *S. scabies* strains in oat bran medium (Table 2). Thaxtomin A biosynthesis

**Table 2.** Effect of some amino acids on thaxtomin A production in different *Streptomyces scabies* strains

Amino acid <sup>a</sup>	Thaxtomin A production (ng/mg) <sup>c,d</sup>				
	ATCC 49173	CG1	CG11	CG12	EF-35
Control <sup>b</sup>	1000 a	21497 a	2073 a	1687 a	1743 a
Serine	23 b	32978 b	1440 b	1029 b	2373 b
Tryptophan	2.8 b	290 c	25 c	8.1 c	0.0 c
N-methyl-L-	1738 c	17501 a	1150 b	2737 d	1867 a

<sup>a</sup> Amino acids were added at a final concentration of 2.5 mM.

<sup>b</sup> Control consisted of oat bran broth.

<sup>c</sup> Data are the means of three replications.

<sup>d</sup> Values accompanied by a same letter are not significantly different (Duncan;  $p < 0.05$ ).

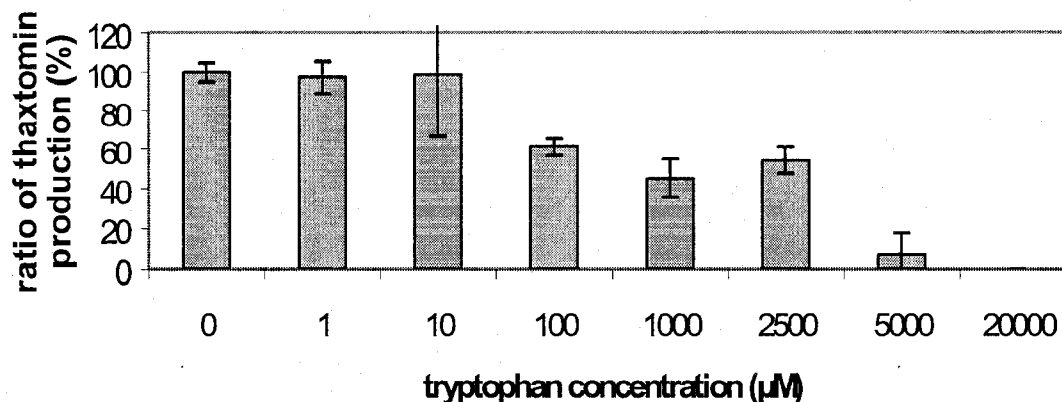
was reduced at least seventy-four times when oat bran broth was supplemented with tryptophan. Addition of N-methyl-L-tryptophan into culture medium did not inhibit thaxtomin A production in any strain except CG-11. Even then, the reduction was not as



great as the one caused by tryptophan (Table 2). The amount of thaxtomin A recovered from an oat bran culture containing serine varied between 0.023 and 33  $\mu\text{g}/\text{mg}$  for all *S. scabies* strains tested. These amounts were similar or higher to the production levels in the control for all strains except strain ATCC 49173 (Table 2). In this strain, the presence of serine in the culture medium reduced the synthesis of thaxtomin A from 1000 to 23  $\text{ng}/\text{mg}$ .

*Effect of tryptophan concentration on thaxtomin A production in S. scabies strain EF-35.*

The general inhibitory effect of tryptophan on thaxtomin A production was not only observed in oat bran broth. Tryptophan also reduced thaxtomin A biosynthesis in a medium containing suberin. The inhibitory effect of this aromatic amino acid correlated with the quantity of tryptophan added to the suberin medium. The results illustrated in Figure 1 show that tryptophan had no effect on thaxtomin A production at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  or lower concentrations. A 40 % reduction in thaxtomin A production was observed when the amino acid was supplemented at a concentration of 100  $\mu\text{M}$ . The degree of inhibition became greater with increasing tryptophan concentration. Thaxtomin A production was completely inhibited when tryptophan was added at a 20  $\text{mM}$  concentration (Figure 1). Similar results were obtained in oat bran broth (results not shown).



**Fig. 1.** Effect of tryptophan concentration on thaxtomin A production in suberin medium by *S. scabies*. Data are the mean of three replications.

*Integration of labeled molecules during thaxtomin A synthesis in S. scabies strain EF-35.*

Different  $^{14}\text{C}$ -labeled molecules were added to oat bran broth to determine if they were metabolic precursors of the thaxtomin A biosynthetic pathway in *S. scabies* EF-35. The percentage of incorporation of labeled phenylalanine, methionine and tryptophan into thaxtomin A varied between 3.6 and 5.8% (Table 3). This represented an incorporation of 195 to 367 dpm per  $\mu\text{g}$  of thaxtomin A produced. In contrast, the level of incorporation of radioactivity into thaxtomin A was negligible when tyrosine or glucose were used as labeled precursors. The efficiency of incorporation of these labeled compound into thaxtomin A was lower than 0.3% ( $< 18$  dpm/ $\mu\text{g}$  of thaxtomin A).

**Table 3.** Incorporation rate of  $^{14}\text{C}$  radiolabeled molecules in thaxtomin A produced by *S. scabies* strain EF-35

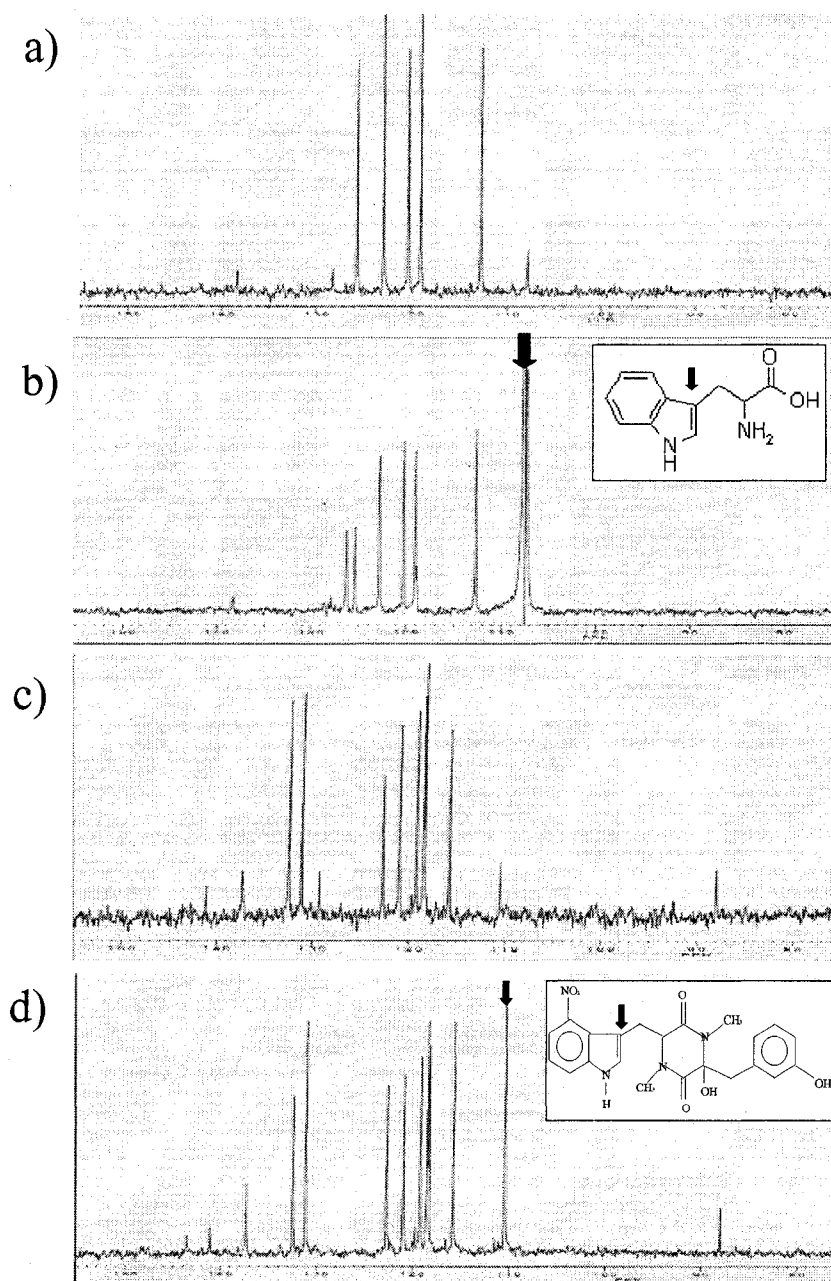
Radiolabeled substance <sup>a</sup>	Radioactivity incorporated	Incorporation rate (%) <sup>c</sup>
Glucose	9.0 ± 3.9	0.11
Methionine	341.5 ± 100.1	4.34
Phenylalanine	195.0 ± 37.4	3.63
Tryptophan	367.3 ± 47.5	5.84
Tyrosine	18.1 ± 5.1	0.24

<sup>a</sup> 2.2X10<sup>9</sup> dpm of radioactivity was added to 50 ml of oat bran broth prior to the inoculation

<sup>b</sup> Values are the mean of three replications

<sup>c</sup> Ratio between radioactivity added to the culture medium and radioactivity incorporated into purified thaxtomin A after 7 days incubation

Thaxtomin A produced by *S.scabies* CG1 when L-tryptophan-indole-3- $^{13}\text{C}$  was added into the production media was analyzed by NMR spectrometry to verify if tryptophan was integrated into thaxtomin A without being structurally modified. NMR spectra (Figure 2) for thaxtomin showed a significant  $^{13}\text{C}$  enrichment on the carbon found at a chemical shift of 110.5 ppm. After assignment of the peaks to their corresponding carbon atom in the thaxtomin molecule, we confirmed that the labeled tryptophan molecule was directly integrated into the biosynthesis of thaxtomin.



**Fig. 2.**  $^{13}\text{C}$  NMR analysis of tryptophan incorporation assay. Partial  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (75.47 MHz) of a) pure tryptophan and of b) L-tryptophan-indole-3- $^{13}\text{C}$ . Partial  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (75.47 MHz) of c) thaxtomin A isolated from an oat bran broth culture of *S. scabiei* and of d) thaxtomin A isolated from an oat bran broth culture of *S. scabiei* grown in the presence of L-tryptophan-indole-3- $^{13}\text{C}$ . Inserts in panels b and d show the chemical structures of tryptophan and thaxtomin A, respectively. The arrows indicate the  $^{13}\text{C}$ -labeled position.

## Discussion

The present study confirms the regulatory effect of tryptophan on thaxtomin A production in five additional *S. scabies* strains. These results add to those of Babcock *et al.*, (1993) who demonstrated that tryptophan had a regulatory effect on thaxtomin production in *S. scabies* strain RB2. Thaxtomin A production was inhibited in all *S. scabies* strains growing in the presence of 2.5 mM of this aromatic amino acid. This study confirms, as suggested by Babcock *et al.*, (1993), that inhibition is not due to the increased levels of nitrogen since serine had no inhibitory effect on thaxtomin A production in all strains except ATCC 49173 when it was added at a similar concentration. Secondary metabolism in actinomycetes is usually delayed or reduced by an excess of readily available nitrogen (Shapiro, 1989). We observed that all amino acids caused a complete inhibition of thaxtomin synthesis at a concentration of 10 mM in oat bran broth (data not shown). However, the concentration of an amino acid necessary to cause an inhibition of thaxtomin synthesis depends not only on the nature of the nitrogen source but seems to vary among *S. scabies* strains.

The strong level of inhibition caused by tryptophan appears to be specific to aromatic amino acids since phenylalanine and tyrosine had similar effects in strain EF-35 in contrast to aliphatic amino acids such as serine, glutamic acid and methionine. It also appears that methylation of tryptophan is enough to prevent the inhibitory effect since N-methyl-L-tryptophan was not an inhibitor of thaxtomin A synthesis. This could not be explained by the inability of the bacteria to catabolize the molecule since *S. scabies* can grow on N-methyl-L-tryptophan as the sole carbon source (results not shown). The strong inhibitory effect of tryptophan was observed not only in complex media such as oat bran broth but also in a suberin medium.

The results of the incorporation assay lend support to the hypothesis of King and Lawrence (1996) and King (1997), who suggested that thaxtomins result from the condensation of N-methyl-4-nitrotryptophan and phenylalanine by diketopiperazine ring formation. In our assay, labeled phenylalanine and tryptophan were efficiently

incorporated into thaxtomin A. These two amino acids could be the substrates used by the peptide synthetase homolog identified by Healy *et al.*, (2000) to form thaxtomin A. On the other hand, tyrosine and glucose were not. This suggests that tyrosine is not a precursor of the thaxtomin A since its level of incorporation was similar to that of glucose. Radiolabeled carbon of methionine, which was efficiently incorporated into thaxtomin A, could serve as donor of methyl groups since thaxtomin A is methylated at two positions. In this study, we identified three compounds (phenylalanine, tryptophan and methionine) that could be used to produce significant amounts of radiolabeled thaxtomin A.

Secondary metabolism in actinomycetes is essential to the survival of the bacteria in their natural environment. Regulation of secondary metabolism is modulated by a variety of factors so the organism can quickly adapt to its steadily changing environment (Shapiro, 1989). Thaxtomin biosynthesis is also regulated by several factors such as developmental stage of the bacteria (Babcock *et al.*, 1993), plant compounds (Beauséjour *et al.*, 1999), glucose (Babcock *et al.*, 1993; Loria *et al.*, 1995) and aromatic amino acids (Babcock *et al.*, 1993; this study).

Radiolabeling assays indicate that in spite of their inhibitory effect, tryptophan and phenylalanine are precursors of the thaxtomin A biosynthetic pathway. This was confirmed for tryptophan by incorporation assay with L-tryptophan-indole-3-<sup>13</sup>C. Inhibition of a metabolic pathway by biosynthetic precursors is rather unexpected. Biosynthetic gene regulation of aromatic amino acid biosynthesis could have a direct impact on thaxtomin production. Aromatic amino acids biosynthesis is regulated by feedback repression in several bacteria (Gat *et al.*, 1994; Kwak *et al.*, 1999; Maiti and Chatterjee, 1991). Surprisingly, aromatic amino acids biosynthesis could be regulated differently in *Streptomyces* since Hu and collaborators (1999) have demonstrated that tryptophan biosynthetic genes *trpCXBA* from *Streptomyces coelicolor* A3(2) are regulated by growth phase and growth rate rather than by feedback repression (Hu *et al.*, 1995). It is still possible that some aromatic amino acids might have more than one biosynthetic gene cluster as was reported for the biosynthesis of tryptophan in

*Streptomyces venezuelae* (Hu *et al.*, 1995). The end product repression of the biosynthetic pathways for specific aromatic amino acids could explain the effect of those amino acids on thaxtomin production. However, in this study the methylation of tryptophan appears to considerably reduce the level of inhibition.

<sup>14</sup>C tryptophan, phenylalanine and methionine can efficiently be used to produce labeled thaxtomin A. Radiolabeled thaxtomin A might be a useful tool to identify the cellular target of thaxtomin A. Furthermore, radiolabeled thaxtomin A might be of great interest in studying the biochemical steps involved in the degradation or the modification of the phytotoxin, since it was shown that microorganisms degrading thaxtomin A might act as biocontrol agents (Doubou *et al.*, 1998), and that chemical modification of the toxin *in planta* could be a means to reduce the toxicity of the molecule (King *et al.*, 2000; Acuna *et al.*, 2001).

### **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR) du gouvernement du Québec. A. L. and C. G. gratefully acknowledge the receipt of a scholarship from the FCAR.

## Reference

- Acuna, I.A., Strobel, G.A., Jacobsen, B.J., Corsini, D.L. 2001. Glucosylation as a mechanism of resistance to thaxtomin A in potatoes. *Plant Science* **161**: 77-88.
- Babcock, M. J., Eckwall, E. C., Schottel, J. L. 1993. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1579-1586.
- Beauséjour, J., Goyer, C., Vachon, J., Beaulieu, C. 1999. Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Can. J. Microbiol.* **45**:764-768.
- Doumbou, C. L., Akimov, V., Beaulieu, C. 1998. Selection and characterization of microorganisms utilizing thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(11): 4313-4316.
- Faucher, E., Savard, T., Beaulieu, C. 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant Pathol.* **14**:107-202.
- Gat, D.A., Jenal, U., Wasserfallen, A., Leisinger, T. 1994. Regulation of tryptophan biosynthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *J. Bacteriol.* **176**(15):4590-4596.
- Goyer, C., Beaulieu, C. 1997. Host range of streptomycetes strains causing common scab. *Plant Dis.* **81**:107-113.
- Goyer, C., Charest, P.-M., Toussaint, V., Beaulieu, C. 2000. Ultrastructural effect of thaxtomin A produced by *Streptomyces scabies* on mature potato tuber tissues. *Can. J. Bot.* **78**(3): 374-380.
- Goyer, C., Vachon, J., Beaulieu, C. 1998. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology* **88**:442-445.
- Healy, F.G., Wach, M., Krasnoff, S. B., Gibson, D.M., Loria, R. 2000. The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Micro.* **38**: 794-804.
- Hu, D.S.J, Hood, D.W., Heidstra, R., Hodgson, D.A. 1999. The expression of the *trpD*, *trpC* and *trpBA* genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is regulated by growth rate and growth phase but not by feedback repression. *Mol. Microbiol.* **32** (4): 869-880.
- Hu, D.S.J., Wood, D.W., Heidstra, R., Hodgson, D.A. 1995. A study of tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biotekhnologiya* **0** (7-8): 197-201.



- King, R. 1997. Synthesis of Thaxtomin C. *Can. J. Chem.* **75**: 1172-1173.
- King, R., Lawrence, H. C. 1996. Characterization of new thaxtomin A analogues generated in vitro by *Streptomyces scabies*. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 1108-1110.
- King, R. R., Lawrence, H. C. 2000. Microbial glucosylation of thaxtomin A, a partial detoxification. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 512-514.
- King, R.R., Lawrence, C.H., Clark, M.C., Calhoun, L.A. 1989. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *J.Chem. Soc., Chem. Commun.* : 849-850.
- Kinkel, L. L., Bowers, J. H., Shimizu, K., Neeno-Eckwall, E. C., Schottel, J. L. 1998. Quantitative relationships among thaxtomin A production, potato scab severity, and fatty acid composition in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* **44**: 768-776.
- Kolattukudy, P. E., Agrawal, V. P. 1974. Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (suberin). *Lipids* **9**: 682-691.
- Kwak, J.H, Hong, K.W., Lee, S.H., Hong, J.H., Lee, S.Y. 1999. Identification of amino acid residues involved in feedback inhibition of the anthranilate synthase in *Escherichia coli*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **32** (1): 20-24.
- Lambert, D.H. Loria, R. 1989. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. Rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**:387-392.
- Lawrence, C. H., Clark, M. C., King, R. R. 1990. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* **80**: 606-608.
- Locci, R. 1994. Actinomycetes as plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* **100**: 179-200
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Creath, R. A., Leiner, R. H., Olivier, M., Steffens, J. C. 1995. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species *in vitro*. *Phytopathology* **85**: 537-541.
- Loria, R., Bukhalid, R.A., Fry, B.A., King, R.R. 1997. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis.* **81**: 836-846.
- Maiti, T.K., Chatterjee, S.P. 1991. Microbial production of L-tryptophan: a review. *Hindustan Antibiot. Bull.* **33**(1-4):26-61.
- Shapiro, S. 1989. Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism. In: *Regulation of Secondary*

Metabolism in Actinomycetes, (Ed.: S. Shapiro). CRC Press, Boca Raton, Florida, 135-211.

## CHAPITRE 2

### 2.0 Effet de la subérine de pomme de terre sur le protéome de *S. scabies*

Cette étude est la première analyse du protéome de *S. scabies* jusqu'à maintenant. Dans cette étude, l'électrophorèse en 2 dimensions a été utilisée pour identifier les protéines induites par la subérine chez *S. scabies*. Vingt protéines induites ont été récupérées des gels 2D et identifiées par séquençage N-terminal ou spectre de masse en tandem (MS/MS). Quatre des protéines identifiées étaient liées à la réponse bactérienne aux stress (ALDH, GroES, TerD et LexA). Certaines voies métaboliques semblent être activées par la présence de subérine tel que démontré par l'augmentation de synthèse de protéines de transport ou d'enzymes reliées à la glycolyse, au métabolisme des acides nucléiques ainsi qu'à celui des acides aminés. La subérine semble aussi influencer le déclenchement ou la progression du métabolisme secondaire. BldK, une protéine impliquée dans la différenciation, ainsi que certains autres indicateurs du métabolisme secondaire chez les streptomycètes, tels l'IMP déshydrogénase et un transporteur d'acides aminés branchés, étaient induits par la subérine.

Ces travaux sont décrits à la section 2.1. Cette section est constituée de l'article A. Lauzier, A.-M. Simao-Beauvoir, S. Bourassa, G. Poirier, B. Talbot and C. Beaulieu (2007). Effect of potato suberin on *Streptomyces scabies* proteome. *Molecular Plant Pathology* (soumis pour publication). J'ai effectué la totalité des études protéomiques de cet article. Le séquençage et les spectres de masse ont été effectués au CHUL par S. Bourassa et G. Poirier. A.-M. Simao-Beauvoir a effectué les vérifications d'homologie dans le génome non annoté de *S. scabies*. J'ai rédigé cet article. Les travaux ont été faits sous la supervision de B. Talbot et C. Beaulieu.

dans le génome non annoté de *S. scabies*. J'ai rédigé cet article. Les travaux ont été faits sous la supervision de B. Talbot et C. Beaulieu.

## 2.1 Effect of potato suberin on *Streptomyces scabies* proteome

Annie Lauzier, Anne-Marie Simao-Beauvoir, Sylvie Bourassa, Guy Poirier, Brian Talbot and Carole Beaulieu<sup>1</sup>

A. Lauzier, A.-M. Simao-Beauvoir, B. Talbot and C. Beaulieu. Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne, Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada.

S. Bourassa and G. Poirier, Centre Hospitalier de l'Université Laval, 2705 boul. Laurier, Quebec City (Quebec), G1V 4G2, Canada.

<sup>1</sup> Corresponding author (e-mail : [carole.beaulieu@USherbrooke.ca](mailto:carole.beaulieu@USherbrooke.ca))

## Abstract

Two-dimensional (2-D) PAGE was used to detect proteins induced in *S. scabies* by potato suberin, a lipidic plant polymer. Twenty up-regulated proteins were excised from 2D gels and identified by N-terminal sequencing or tandem mass spectrometry (MS/MS). Four of the up-regulated proteins could be linked to the bacterial response to stress (AldH, GroES, TerD and LexA). Specific metabolic pathways seemed to be activated in the presence of suberin as shown by the increased expression of specific transporters and of enzymes related not only to glycolysis, but also to nucleotide and amino acid metabolism. Suberin also appeared to influence secondary metabolism since it also caused the overproduction of the BldK proteins that are known to be involved in differentiation and secondary metabolism.

## Introduction

Streptomycetes are Gram-positive, filamentous bacteria that are known for their ability to produce a wide variety of both extracellular hydrolytic enzymes and active secondary metabolites. Their genome is characterized by a high G + C content. Most members of this genus are soil-inhabiting saprophytes. However, some of them are plant pathogens and cause common potato scab, an economically important plant disease found in Canada and in most potato-growing areas in the world (Hill and Lazarovits, 2005). *Streptomyces scabies* is the main causal agent of common potato scab (Lambert and Loria, 1989a) although other species such as *Streptomyces acidiscabies* (Lambert and Loria, 1989b), *S. turgidiscabies* (Miyajima *et al.*, 1998), *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* (Bouchek-Mechiche *et al.*, 1998), *S. luridiscabiei*, *S. niveiscabiei* and *S. puniscabiei* (Park *et al.*, 2003) are widespread in North America, Asia and Europe.

The virulence mechanisms associated with these pathogens include the secretion of nitroaromatic compounds called thaxtomins that exhibit phytotoxic properties. Thaxtomins are 4-nitroindol-3-yl-containing 2,5 dioxopiperazines (King *et al.*, 1989). Thaxtomin A is the most abundant toxin produced by *S. scabies* and appears to be essential to symptom development. Purified thaxtomin A reproduces symptoms of common scab when applied on aseptic potato tubers (Lawrence *et al.*, 1990). Disruption mutants of the thaxtomin biosynthesis genes become avirulent on potato tubers (Healy *et al.*, 2000).

Thaxtomin A is synthesized by a peptide synthetase encoded by the *txtA* and *txtB* genes (Healy *et al.*, 2000). Hydroxylation of the cyclic dipeptide is catalyzed by a cytochrome P450 monooxygenase encoded by *txtC* (Healy *et al.*, 2002), while nitration of the dipeptide is carried out by an enzyme similar to mammalian nitric oxide synthase (Kers *et al.*, 2004). The genes responsible for thaxtomin biosynthesis are located on a pathogenicity island found in the genome of *S. scabies*, *S. acidiscabies* and *S. turgidiscabies* (Bukhalid *et al.*, 2002).

Bacteria commonly detect specific plant metabolites which they use as signals to regulate the expression of virulence genes that allow their adaptation to the plant environment. For example, in *Agrobacterium tumefaciens*, several virulence genes are activated by acetosyringone and other phenolic molecules produced by the plant (Melchers *et al.*, 1989). It has also been shown that cellobiose can induce thaxtomin A production in *S. acidiscabies* (Wach *et al.*, 2007). However, cellobiose by itself did not induce dipeptide synthesis in *S. scabies* strains such as EF-35. Nevertheless, the disaccharide did increase thaxtomin A production when added to a culture medium containing suberin (Lerat, Beaudoin and Beaulieu, unpublished data). Addition of suberin in a minimal medium is sufficient to allow thaxtomin A production in *S. scabies* strains (Beausejour *et al.*, 1999).

Suberin is a complex polymer consisting of both polyaromatic and polyaliphatic domains (Kolattukudy *et al.*, 1981). Potato suberin was described as consisting of a hydroxycinnamic acid-monolignol polyphenolic domain embedded in the primary cell wall, and covalently linked to a glycerol-based polyaliphatic domain located between the primary cell wall and the plasma membrane (Bernards, 2002).

The lipidic polymer provides effective resistance to dehydration and plays an important role in the protection of the plant by acting as a physical barrier against most pathogenic microorganisms (Kolattukudy, 1987; Lulai *et al.*, 1995; Lyon, 1989). However, *S. scabies* can overcome this defense mechanism by producing a heat-stable esterase that breaks down suberin (MacQueen and Schottel, 1987).

Differential protein display by two dimensional gel electrophoresis and proteome analysis is a powerful tool to monitor changes occurring in the protein expression of an organism (Wilkins *et al.*, 1996). Analysis of streptomycete proteomes has been carried out to study bacterial development (Hesketh *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005a; Kim *et al.*, 2005b; Orsaria *et al.*, 1998; Piette *et al.*, 2005; Vohradsky and Thompson, 2006), secondary metabolite



production (Hesketh and Chater, 2003; Lai *et al.*, 2002; Mohrle *et al.*, 1995; Wang and Yuan, 2005) and mechanisms involved during interaction with a plant (Langlois *et al.*, 2003). Proteomic studies have also been used to study plant-microbe interactions involving bacteria such as *Streptomyces coelicolor* (Langlois *et al.*, 2003), *Rhizobium leguminosarum* (Guerreiro *et al.*, 2000), *Pseudomonas putida* (Heim *et al.*, 2003) and *Sinorhizobium meliloti* (Natera *et al.*, 2000).

The aim of this study was to elucidate the physiological adaptations induced in *S. scabies* by the presence of the complex plant polymer, suberin. 2D gel electrophoresis was used to identify newly-expressed proteins from *S. scabies* in the presence of the polymer. Edman sequencing and mass spectroscopy was used to identify selected proteins.

## Results and discussion

### **Comparison of protein profiles in MM and SM**

Proteomes of *S. scabies* grown with or without suberin were compared. Growth curves were similar in both conditions (data not shown) suggesting that changes observed in the proteomes could be directly linked to the addition of the plant polymer. Soluble proteins were extracted from 40h-old cultures which represent the early stationary phase of the life cycle. Thaxtomin A, a pathogenicity factor produced by *S. scabies* in the suberin medium, became detectable after about 36 hours of growth under conditions used in this study.

Image analysis of the *S. scabies* proteome in MM medium revealed over 650 protein spots in the pH range of 4 to 7 and the size range of 10 to 180 kD (Figure 1). Narrow-range IPG strips (pH 4 to 5, 4.5 to 5.5, 5 to 6 and 5.5 to 6.7) were used to further resolve these proteins. Several protein spots were detected only in the presence of suberin in at

least three independent experiments. Thirty spots were excised from the gels and subjected to Edman degradation or MS analysis.

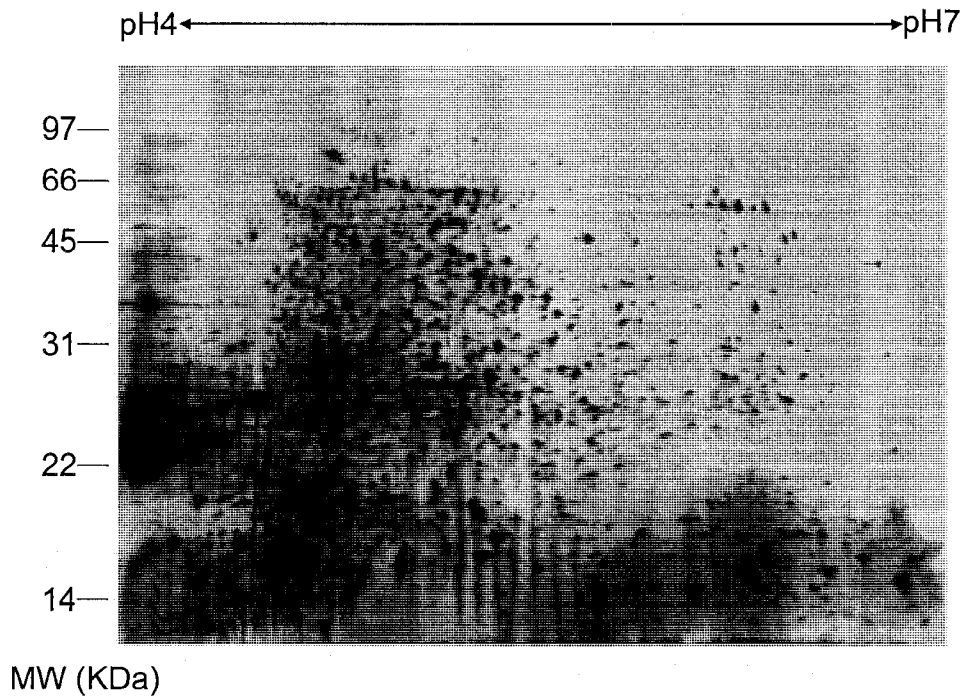


Figure 1: Proteome map of *S. scabiei* soluble internal proteins visualized with silver stain. Proteins were separated in the first dimension over a pH range of 4 to 7.

Seven spots could not be conclusively assigned to a protein identification. Four spots were found to contain more than one protein and were not further analyzed. Amino acid sequences were obtained for 19 spots (Table 1). Ten of the sequenced proteins were excised from the pH 5.5 to 6.7 gels, 7 from the pH 5 to 6 gels and one each from the pH 4 to 5 gels and the pH 4.5 to 5.5 gels.

Table 1: Identification of protein spots up-regulated in the presence of suberin.

Protein designation	pI <sup>(a)</sup>	MW (kDa) <sup>(a)</sup>	Method of analysis <sup>(b)</sup>	Amino acid sequence <sup>(c)</sup>	Matching protein	
					Probable function	Bacterium
1	5.6	67.6	MS/MS	AVALAEAR - IGTPALTTR - RPAFQDYAQR - NVDTVESLAAEHAR - QAEEALLDSGIVTNR - GLGTAEMDEVAGLIDR - NAIPADPNGAWYTS GIR - SYGTD PATGLIDYEALR - VLTGDFDPVPHAQIVTTTTHK	serine hydroxymethyltransferase	<i>S. coelicolor</i>
2	5.8	58.1	MS/MS	RYGVEIK - GAEVVVGR - DCAQVGIAS IQR - AQLLVNVVEAAER - GVTIGRPMPLLLTR - HRDCAQVGIAS IQR - ELNEDPACTGYIVQLPLPK - LVLN EPAPLPCTPNGVLTLLR - ILELMDPKDADGLHPMNLGR	p methylenetetrahydrofolate dehydrogenase and cyclohydrolase	<i>S. avermitilis</i>
4	5.88	64.9	MS/MS	MLAGLEDVNGGAIR	ABC transporter ATP-binding protein	<i>S. coelicolor</i>
5	5.98	63.7	MS/MS	QIAEPFMK - TLGIVGESGSGK - VDDYPHQFSGGMR	BldKD, p ABC transporter intrac. ATPase subunit	<i>S. coelicolor</i>
10	6.2	75.2	MS/MS	HLPDSVLETPDAK - GKHL PDSVLETPDAK	p ABC transporter protein	<i>S. avermitilis</i>
12	6.27	63.2	MS/MS	LRGVELLAR - GASVVHAPALR - RADELGALLQR - IVPLADDS ELLAATK - ALPGAGRDEHAVETAMAR	p transcriptional regulator	<i>S. avermitilis</i>
13	6.22	49.2	MS/MS	RVIEVIRDSVQR	LexA protein	<i>S. lipmanii</i>
16	6.46	48.7	MS/MS	GKHL PDSVLETPDAK	p ABC transporter protein	<i>S. avermitilis</i>
17	5.85	70.7	MS/MS	LLGIVTNR - DMAFETDR - GMGSLGAMQSR - GLITVKDFVK - VGVGPGS ICTTR - DGAQALIDAGVDGIK - LVPEGIEGQVPYR - SYRGMGSLGAMQS - ESHPHDIQMTVEAPNYSR	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	<i>S. coelicolor</i>
18	6.1	56.1	MS/MS	TLPIAGHRVEIR - RADELGALLQRR - ALPGAGRDEHAVETAMAR	p transcriptional regulator	<i>S. avermitilis</i>
21	5.82	13.5	N-term	LVIPDTACEPPQFGVL	GroES	<i>S. coelicolor</i>
24	5.29	38	N-term	SAPAXDEDITIVMGVNQDXDAAN	G-3-P dehydrogenase	<i>S. coelicolor</i>
25	5.58	45	MS/MS	SYFR - KVFVIDDK - KFYADYK	p periplasmic branched chain amino acid binding protein	<i>S. coelicolor</i>
29	5.75	44	MS/MS	AARAQTAWAALAPGDR - DLLDYAAGGVER - ELGPDALTAFTETK - ILVQR - PAETPLTALR - QVAAKGAALLK - VGDPAD ESTEMGPLISR - WEAGNVR - YWTFPGGFK	p aldehyde dehydrogenase	<i>S. coelicolor</i>
30	5.74	41	N-term	PIATPEVYNIQLD	Fructose-biphosphate aldolase	<i>S. galbus</i>
31	5.73	34	MS/MS	LAFALADK - SVQTLVDGDK - IQYGGSVK	triose-phosphate isomerase	<i>S. coelicolor</i>

43	4.77	41.2	MS/MS	GYVSAVQNK - LEMELTVR - RTLLSSIPGAAVTSIR - LIAQRPSLTEEVDVDFR - FVIEPLEPGFGYTLGNSLR - MLIAQRPSLTEEVDVDFR - QGPGLVTAADIAPPAGVEVHNPDLVLATLNGK	RNA polymerase alpha subunit	<i>S. coelicolor</i>
47	4.28	40	N-term	IVFPVSIHDAENR	TerD	<i>S. coelicolor</i>
50	4.55	35.2	MS/MS	LVDTVGQGGANFVQNAILGPLEDK	hypothetical protein	<i>S. avermitilis</i>

<sup>(a)</sup> Experimental value as determined by gel image analysis.

<sup>(b)</sup> MS/MS: analysis by Quadrupole ion trap mass spectrometry, N term: analysis by N-terminal sequencing.

<sup>(c)</sup> Oligopeptides are separated by an indent.

Figure 2 presents the proteome associated with gels covering pH 5.5 to 6.7. A search for sequence homology with the NCBI database, allowed the identification of most of the proteins with a high level of confidence (Table 1), although the annotation of the *S. scabies* genome sequence was not yet available in the public database. This indicates the relevance of proteome analysis even involving organisms for which the genome sequence is not available or is not yet annotated.

The presence of a region corresponding to the amino acid sequences obtained by Edman or MS was confirmed in the *S. scabies* genome (Table 2). Blast analysis using the complete amino acid sequence deduced from the corresponding *S. scabies* gene, allowed a more precise identification of some of the proteins. While data derived from MS analysis indicated that proteins 4, 5, 10 and 16 could be classified as ABC transporter proteins, sequence analysis of the entire corresponding genes in *S. scabies* genome suggested that protein 4 was involved in cellobiose and maltose transport, while proteins 5, 10 and 16 were part of the BldK oligopeptide transport system. Furthermore, MS analysis suggested that spot 29 shared an amino acid domain with acetaldehyde dehydrogenases. The blast analysis, using the corresponding gene of the *S. scabies* genome, suggested that the substrate of this enzyme was specifically phenylacetaldehyde. However, the results of the two analyses were not always in agreement. In the case of spots 12 and 18, the amino acid sequences obtained by MS analysis, suggested that these proteins were transcriptional regulators. However, the complete amino acid sequence

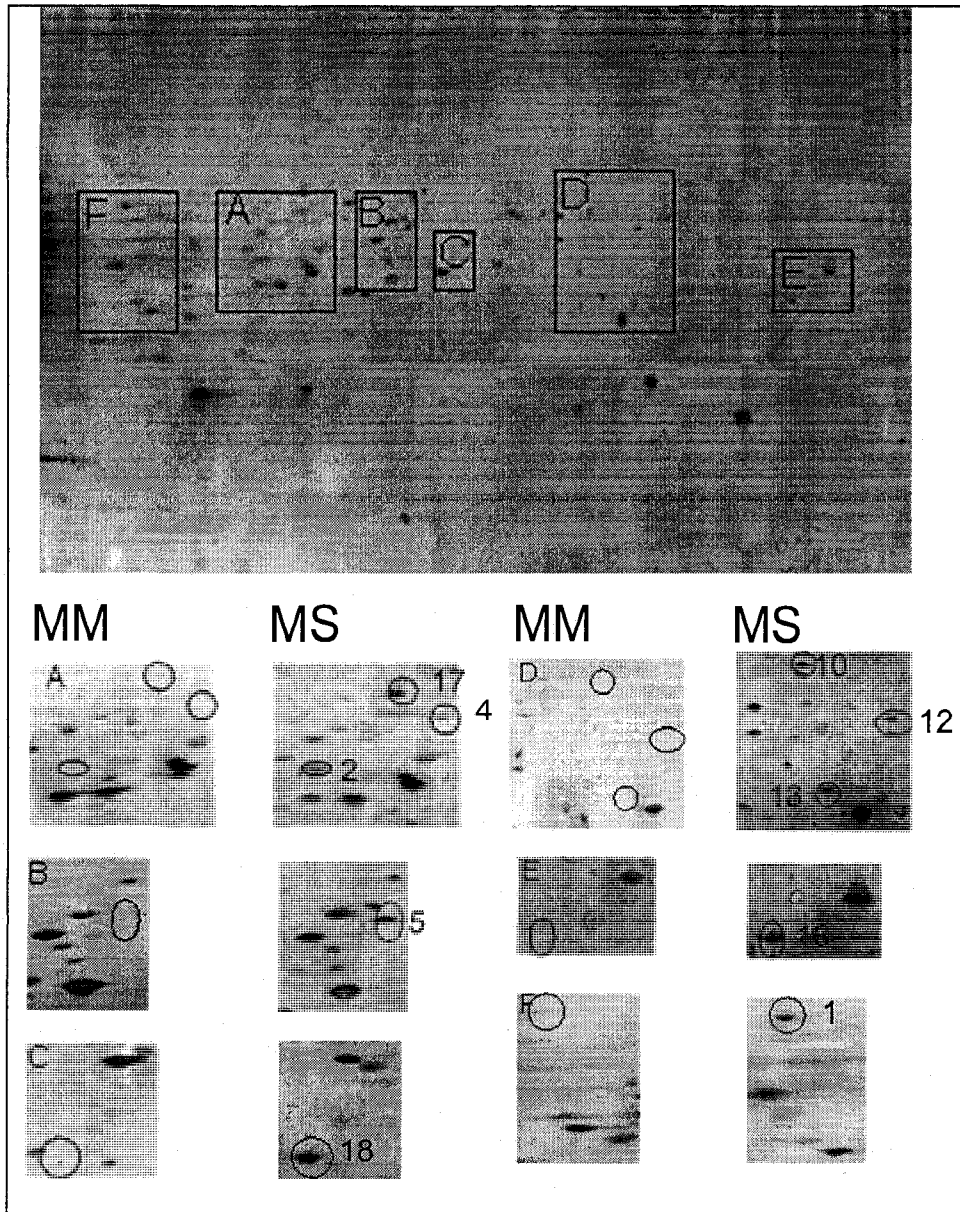


Figure 2: Comparative two-dimensional gel electrophoresis of soluble internal proteins of *S. scabiei* stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The large gel image represents the MS proteome using IPG strips pH 5.5-6.7. Regions of interest are boxed (A-F) and shown below with the equivalent gel region of the MM proteome. Identified proteins are circled and identified on the excerpts from the MS proteome.

Table 2: Identification of *S. scabiei* genes containing the translated amino acid sequences of proteins up-regulated in the presence of suberin

Protein designation	Gene position in the genome of <i>S. scabiei</i> <sup>(a)</sup>	Number of amino acid divergence <sup>(b)</sup>	Matching protein			
			Probable function	Bacterium	Accession n° <sup>(c)</sup>	Protein similarity (%) <sup>(d)</sup>
1	4 021 189 (482)	0/127	serine hydroxymethyltransferase	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	NP_628992.1	97
2	4 030 061 (284)	0/130	p methylenetetrahydrofolate dehydrogenase and methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_824619.1	99
4	5 589 110 (379)	0/14	ABC transporter ATP-binding protein assisting in cellobiose and maltose transport ( <i>MsiK</i> )	<i>S. reticuli</i>	CAA70125.1	97
5	3 570 317 (353)	0/33	BldKD, ABC transporter intracellular ATPase subunit	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	NP_629265.1	85
10/16	3 572 493 (600)	0/28	BldKB, ABC transport system lipoprotein	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	NP_629263.1	73
12/18	6 234 465 (385)	2/76	uroporphyrinogen-III syntase	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_826297.1	93
13	2 789 747 (259)	0/12	LexA repressor	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_823639.1	99
17	4 097 422 (500)	0/108	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	NP_628928.1	97
21	4 106 605 (102)	4/16	10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	<i>S. albus</i> G	Q00769	98
24	7 724 061 (336)	0/24	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	<i>S. clavuligeris</i>	ABA26666.1	96
25	7633671 (409)	2/19	branched chain amino acid binding protein	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	NP_626269.1	91
29	8 171 015 (458)	7/102	phenylacetaldehyde dehydrogenase	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_827902.1	90
30	4 748 812 (340)	2/13	fructose-bisphosphate aldolase	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_825700.1	96
31	7 726 447 (290)	0/26	triosephosphate isomerase	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_827474.1	83

43	4 144 299 (340)	0/120	DNA-directed RNA polymerase alpha subunit	<i>S. avermitilis</i> MA-4680 <i>S. coelicolor</i> A3(2)	NP_826130.1 NP_628887.1	100
47	7 128 592 (191)	0/13	tellurium resistance protein	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_826981.1	94
50	8 216 882 (429)	0/24	hypothetical protein SAV6777	<i>S. avermitilis</i> MA-4680	NP_827953.1	54

<sup>(a)</sup> Protein-coding gene were predicted using GeneMarkHMM program. The number of amino acid in the deduced protein is indicated in the parenthesis.

<sup>(b)</sup> Comparison between the amino acid sequence experimentally determined and the sequence of *S. scabiei* protein predicted from genome analysis.

<sup>(c)</sup> Accession number in NCBI database

<sup>(d)</sup> Sequence comparison was determined using Clustalw program

deduced from the corresponding *S. scabiei* gene shared a 93% similarity with the amino acid sequence of *S. avermitilis* uroporphyrinogen-III synthase.

Following these analyses, it was possible to divide *S. scabiei* up-regulated proteins into 6 groups according to their function: proteins involved in amino acid metabolism (proteins 1, 2, 25), proteins involved in nucleotide and nucleic acid metabolism (proteins 17, 43), proteins involved in heme metabolism (proteins 12, 18), proteins involved in carbon acquisition (proteins 4, 29), proteins linked to the glycolytic pathway (proteins 24, 30, 31) and finally, stress-induced proteins and proteins involved in secondary metabolism (proteins 5, 10, 13, 16, 21, 47). The function of protein 50 could not be determined based on amino acid or nucleotide sequences, but it appeared to possess a signal peptide (Analysis with the SignalP 3.0. software using a hidden Markov model, signal peptide probability: 1).

Analysis of spots 10 and 16 as well as spots 12 and 18 yielded the same protein identification even though they exhibited a slightly different MW or PI. This suggest that uroporphyrinogen-III synthase and BldKB could be postranscriptionally modified. In *S. coelicolor*, Hesketh (2002) has estimated a mean of 1.2 protein isoforms per gene.

### **Enzymes involved in the glycolytic pathway or in carbon acquisition are up-regulated in the presence of suberin**

The presence of suberin in *S. scabies* culture media seemed to induce enzymes involved in the energy metabolism of the bacteria. Three enzymes associated with glycolysis, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, fructose-bis-phosphate aldolase and triose-phosphate isomerase, were up-regulated in the presence of suberin in this study. The up-regulation of these glycolytic enzymes might be attributed to the presence of glycerol in suberin since glycerol is an important constituent of suberin as demonstrated by Moire et al (1999). To be catabolized, glycerol is phosphorylated and then oxidized to dihydroxyacetone phosphate by a glycerol phosphate dehydrogenase. This last product, as well as glyceraldehyde-3-phosphate is the substrate for the three enzymes of the glycolytic pathway identified in this study. The fact that suberin has also been shown to induce the expression of a gene encoding a glycerol phosphate dehydrogenase in *S. scabies* (Lauzier and Beaulieu, unpublished data) also provided evidence that suberin constituted a source of glycerol for the pathogenic bacteria.

Serine hydroxymethyl-transferase and methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase (Table 2, protein 1 and 2) are two other enzymes that were up-regulated when *S. scabies* was grown in the presence of suberin. These enzymes are involved in the biosynthesis of glycine and serine respectively (Stryer, 1995). Phosphoglycerate, a metabolite of the glycolytic pathway, is the biosynthetic precursor of serine and glycine. The up-regulation of both methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase and serine hydroxymethyl-transferase could thus be a consequence of the up-regulation of several enzymes associated with glycolysis.

Bernards and Lewis (1998) established that alkaline hydrolysis of suberized potato wound periderm tissues released cell-wall bound aldehydes including vanillin. This correlates with the up-regulation of aldehyde dehydrogenase in the proteome of *S.*



*scabies* grown in the presence of suberin (Table 1, protein 29). These results suggest that the bacterium could produce extracellular enzymes that attack suberin to release aldehydes. In support of this hypothesis, a proteomic differential display technique used to study the cellular responses of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* exposed to vanillin, revealed that enzymes involved in glycolysis, in heme biosynthesis and cellobiose catabolism were activated in the presence of the aldehyde (Shimizu *et al.*, 2005). These same types of enzymes were activated in this study by the presence of suberin, suggesting that aldehydes, associated with suberin or lignin, might induce similar physiological responses. The amplified production of enzymes involved in heme synthesis, such as uroporphyrinogen III synthase (Table 2, proteins 12/18), might reflect an increased need for this cofactor in microorganisms exposed to suberin or lignin. This idea is supported by the observations that several heme-containing enzymes participate in the degradation of phenolics and aldehydes associated with plant polymers (Shimizu *et al.*, 2005).

Another example of the link between carbohydrate metabolism and phytochemicals is the unexplained activation of cellobiose catabolism in *P. chrysosporium* by exposure to vanillin (Shimizu *et al.*, 2005). The identification in the present study of a cellobiose and maltose ABC transporter in the proteome of *S. scabies* might simply reflect the enzymatic degradation of suberin by the bacteria that results in the release of aldehydes. However, in *S. acidiscabies*, cellobiose is thought to play an important role in pathogenicity by inducing the biosynthesis of thaxtomin A (Wach *et al.*, 2007). In other phytopathogenic organisms, several ABC transporters have been linked to virulence. Inactivation of ABC transporters in *Botrytis cinerea* (Schoonbeek *et al.*, 2001), *Fusarium culmorum* (Skov *et al.*, 2004), *Erwinia chrysanthemi* (Nachin *et al.*, 2001), *Mycosphaerella graminicola* (Stergiopoulos *et al.*, 2003), *Gibberella pulicaris* (Fleissner *et al.*, 2002) and *Magnaporthe grisea* (Urban *et al.*, 1999) have all been shown to have a direct effect on pathogenicity

### **Stress-related proteins are up-regulated in the presence of suberin**

Acetaldehyde dehydrogenases are general detoxifying enzymes that catalyze the oxidation of aldehydes to carboxylic acids (Liu and Schnable, 2002; Nakazono *et al.*, 2000; Sunkar *et al.*, 2003). Over expression of aldehyde dehydrogenase genes in eukaryotic cells resulted in an increased resistance to oxidative stress (Sunkar *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2004). Aldehyde dehydrogenases are also involved in resistance to osmotic stress (Boch *et al.*, 1997) and in the response to iron deprivation in *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*, respectively (Heim *et al.*, 2003). Suberin medium appears to represent a stressful environment, given the induction of stress-related proteins such as GroES, an oligomeric molecular chaperone (Fink 1999); TerD, a homolog of a tellurite resistance protein (Hill *et al.*, 1993) in *Serratia marcescens*; LexA, a protein of the DNA repair SOS-like regulatory system (Little and Mount, 1982) as well as an acetaldehyde dehydrogenase (Table 2, proteins 21, 47, 13 and 29 respectively). This confirms the work of Douliez (2004) who previously demonstrated that suberin monomers were stressing agents and act as membrane perturbants. Similar conclusions can be drawn from the proteomic study that identified homologs of both GroES and TerD that were induced in *S. coelicolor* in the presence of plants (Langlois *et al.*, 2003). Furthermore, a putative tellurite resistance protein was also up-regulated in the actinomycete *Frankia* during the interaction between the symbiont and its host plant (Hammad *et al.*, 2001). It appears that actinomycetes which interact with plants had to adapt to physiological stresses caused by the plants despite their adaptation to acquire carbon and energy through degradation of plant material.

### Suberin influences secondary metabolism

In streptomycetes, the onset of secondary metabolism and the transition phase from vegetative growth to the stationary phase depends on various molecular signals, including guanoside nucleotides (Chakraborty and Bibb, 1997), branched-chain amino acids (Sprusansky *et al.*, 2005) and extracellular oligopeptides recognized by BldK proteins (Nodwell *et al.*, 1996). This proteomic study revealed that the enzymes which are involved in the biosynthesis or the transport of these signal molecules were differentially produced in response to suberin. The polymer thus appeared to interfere with the onset or the progression of the secondary metabolism.

A positive correlation between secondary metabolism and the stringent response to nutritional and environmental stresses has already been established (Inaoka *et al.*, 2003). The stringent response depends on an increase in the concentration of the hyperphosphorylated guanosine nucleotide, ppGpp (Inaoka *et al.*, 2003). In streptomycetes, inosine-mono-phosphate dehydrogenase (IMP dehydrogenase), the first enzyme in the GMP synthesis pathway, is negatively regulated by ppGpp (Ochi *et al.*, 1982). The up-regulation of IMP dehydrogenase (Table 2, protein 17) synthesis caused by suberin suggests that the stringent response was stronger in the minimal medium. Similarly, in *Rhizobium tropici* IMP dehydrogenase was shown to be essential for effective nodulation (Ricciolo *et al.*, 2000). These results suggest that this enzyme being differentially produced by *S. scabies* in minimal and suberin media, could be an important factor for the interaction between the pathogenic bacteria and its host. Since ppGpp is an effector that modulates both IMP dehydrogenase and RNA polymerase activities (Toulokhonov *et al.*, 2001), the changing expression of the RNA polymerase suggests that amounts of ppGpp differed within cells grown in minimal or suberin media.

The streptomycetes have evolved in order to tie the degree of expression of stationary phase genes to the availability of branched-chain amino acids. Degradation of these

amino acids in Gram-positive bacteria supplies precursors for membrane synthesis during sporulation and polyketide antibiotic production (Molle *et al.*, 2003; Sprusansky *et al.*, 2005). The expression of the transporter for branched-chain amino acids was up-regulated in the presence of suberin which suggests a shift in the onset of the stationary phase or in the biosynthesis of secondary metabolites.

Among the other substances specifically produced in the presence of suberin, we found two BldK proteins. In streptomycetes, *bld* genes are involved in morphological differentiation (Nodwell *et al.*, 1999) as well as in secondary metabolite production (Champness, 1988; Elliot *et al.*, 2003; Merrick, 1976). The genetic locus *bldK* was characterized as a gene cluster coding for an oligopeptide permease complex that acts as the first receptor of an extracellular oligopeptidyl signal (Nodwell *et al.*, 1996). Nodwell and Losick (1998) have purified an oligopeptide that recognizes the BldK complex which regulates *S. coelicolor* differentiation. In *S. scabies*, little is known about the regulation of both the differentiation process and the biosynthesis of secondary metabolites. A possible link between *bldK* genes and thaxtomin production would merit further exploration.

It would have been expected that enzymes involved in thaxtomin biosynthesis would be overexpressed in the presence of suberin. However, no proteins involved in thaxtomin biosynthesis were identified in this study. This may have been due to their lack of abundance or it may simply have been due to the difficulty in resolving such high molecular weight proteins in 2D electrophoresis. (Warren, 2003)

This study suggests that suberin is not only a physical barrier to *S. scabies* penetration in plant tissues (Lulai and Corsini 1998) but that the polymer seems to profoundly affect the physiology of the pathogen. Suberin does not only act as a carbon source for the bacteria (Beausejour *et al.*, 1999), but also appears to generate physiological stress and to modulate the activity of elements linked to the bacterial secondary metabolism.

## Experimental procedures

### **Bacterial culture conditions**

Inoculum of *S. scabiei* strain EF-35 (Faucher *et al.*, 1992) was prepared by growing the strain, with shaking (300 rpm), in Tryptic Soy Broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI) for 48h at 30°C. The culture was then centrifuged and resuspended in 5 volumes of fresh TSB. This suspension was used to inoculate minimal media (Beausejour *et al.*, 1999) supplemented (or not) with 0.2% potato suberin at a ratio of 1/60 (v/v). Suberin was extracted from potato tuber skin as previously described by Kolattukudy and Agrawal (1974). Bacteria were then incubated in this medium with shaking for 40 hours at 30°C. Before proceeding to the protein extraction, these 40h-old bacterial cultures were centrifuged at 4000 rpm for 5 min and the pellets were washed twice with Tris 10 mM, pH 8.3.

### **Protein extraction**

Soluble proteins from *S. scabiei* cells grown with or without suberin were extracted using the phenol extraction method proposed by Hurkman *et al.*, (1986). Bacterial cells from a 30 ml culture were finely powdered in liquid nitrogen using a pestle and mortar. They were then resuspended in 8 ml of extraction buffer [0.7M Sucrose, 0.5M Tris, pH 7.5, 0.5M EDTA, Complete (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN, U.S.A.) 1 tablet/20 ml, 2% mercaptoethanol]. Cells were disrupted in a Fastprep 120 cell disrupter (Thermo Electron Corporation, Milford, MA) for 45 sec in the presence of 0.1mm glass beads at speed 6.5. An equal volume of equilibrated phenol (Anachemia Canada Inc, Lachine, Canada) was added and the disruption procedure was repeated twice. The homogenate was centrifuged at 2500 g for 5 min and the proteins were extracted from the phenol phase with an equal volume of extraction buffer. Proteins were then precipitated with five volumes of cold 0.1M ammonium acetate in methanol for a minimum of 30 minutes

at -20° C and recovered from the suspension by centrifugation at 2500 g for 30 min. The protein pellet was finally resuspended in IEF buffer [ 9M urea, 2% CHAPS, 1% Pharmalyte 3-10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), 15mM DTT] and the insoluble material was removed by centrifugation at 14000 g for 15 min. Protein concentration was measured using the BioRad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) modified as follows. Twenty µl of a protein sample were mixed with 80 µl of 0.12 N HCl. Bio-Rad dye reagent was diluted ¼ in water and filtered. 3.5 ml of Bio-Rad solution was added to each assay tube. The absorbance of the solution was measured at 595 nm after five min of incubation at room temperature. A standard curve, established with known concentrations of bovine serum albumin, was used to determine protein concentration of the experimental samples.

### **Two-dimensional gel electrophoresis**

For preliminary tests, 11 cm immobilized pH 4-7 gradient (IPG) strips (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) were used. For analytical purposes, 24cm IPG strips covering pH ranges 4.5 to 5.5 and 5.5 to 6.7 were used. Strips were first rehydrated with between 300 µg to 1.8 mg of protein at 100V for 12h. Isoelectric focusing (IEF) was carried out using the IPGphor IEF System (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) for a total of 170 KVh. Strips were then equilibrated for 15 min by incubating them with shaking in a solution comprising 0.05M Tris pH8.8, 2% SDS, 6M urea, 30% glycerol containing 1% DTT and then, for an additional 15 min in the same buffer in which DTT was replaced with 4% iodoacetamide. Strips were transferred onto ExcelGel SDS Homogeneous 15 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and SDS-PAGE was carried out according to manufacturer's instructions. Broad range protein markers (NEB, Ipswich, MA, USA) were prepared according to the manufacturer's instructions on Whatman paper (Whatman Ltd., Maidstone, UK), and run alongside IEF strips. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue R250 or were silver stained using a protocol

compatible with mass spectrum analysis (Mortz *et al.*, 2001). Image analysis was carried out using Phoretix 2D Software (Nonlinear dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Proteomes of cells grown with or without suberin were compared. Three experiments were used to identify protein spots that were only associated with the presence of suberin

### **N-terminal sequencing**

Proteins were transferred to PVDF membranes by capillarity (TRIS 25mM, glycine 192mM, methanol 20%) and were visualized with Ponceau Red. The protein spots were excised from the membrane and used directly for automated Edman degradation on an Applied Biosystems model 473A pulsed-liquid protein sequencer (Foster City, CA).

### **Mass Spectrometry**

In-gel protein digest was performed on a MassPrep liquid handling station (Micromass Ltd) according to the manufacturer's specifications and using sequencing grade modified trypsin (Promega). Extracted peptides were lyophilized using a speed vac and resuspended in 0.1% trifluoroacetic acid solution. Peptides obtained were analysed by Ion Trap MS/MS.

Peptide MS/MS spectra were obtained by microcapillary reverse-phase chromatography coupled to an LCQ DecaXP or LTQ (ThermoFinnigan) quadrupole ion trap mass spectrometer with a nanospray interface. A 10  $\mu$ l aliquot of the peptide sample was loaded onto a 75- $\mu$ m (internal diameter) C18 picofrit column (New Objective). Peptides were eluted with a water-acetonitrile 0.1% formic acid gradient at a flow rate of about 200 nl/min.

## Sequence analysis

Amino acid sequences, obtained from automated Edman degradation, were used to search the completed genomes in the NCBI database using BLAST. Peptide spectra resulting from MS/MS analysis were interpreted using the SEQUEST algorithm (Eng *et al.*, 1994) or the MASCOT algorithm (Perkins *et al.*, 1999).

Each peptide sequence was compared by Blast analysis against the Sanger Institute *S. scabies* genome sequence (protein versus translated DNA). The complete corresponding protein-coding gene was predicted using the GeneMarkHMM for Prokaryotes (Version 2.4) program. Entire deduced amino-acid sequences were compared by Blast analysis against NCBI protein database for protein identification.

## Acknowledgements

We thank Isabelle Madore, Julie Gendron and Mariève Lapointe for their technical assistance. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. A.L. gratefully acknowledges the receipt of a scholarship from NSERC.



## References

- Babcock, M.J., Eckwall, E.C., and Schottel, J.L. 1993. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. J. Gen. Microbiol. **139**: 1579-1586.
- Beausejour, J., Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. 1999. Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. Can. J. Microbiol. **45**(9): 764-768.
- Bernards, M.A., and Lewis, N.G. 1998. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm. Phytochemistry **47**(6): 915-933.
- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S., and Bremer, E. 1997. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. Arch. Microbiol. **168**(4): 282-289.
- Bouchek-Mechiche, K., Guerin, C., Jouan, B., and Gardan, L. 1998. *Streptomyces* species isolated from potato scabs in France: numerical analysis of "Biotype-100" carbon source assimilation data. Res. Microbiol. **149**(9): 653-663.
- Bukhalid, R.A., Takeuchi, T., Labeda, D., and Loria, R. 2002. Horizontal transfer of the plant virulence gene, *necl*, and flanking sequences among genetically distinct *Streptomyces* strains in the Diastatochromogenes cluster. Appl. Environ. Microbiol. **68**(2): 738-744.
- Chakraborty, R., and Bibb, M. 1997. The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. J. Bacteriol. **179**(18): 5854-5861.
- Champness, W.C. 1988. New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. J. Bacteriol. **170**(3): 1168-1174.
- Douliez, J.P. 2004. Cutin and suberin monomers are membrane perturbants. J. Colloid Interface Sci. **271**(2): 507-510.

Elliot, M.A., Locke, T.R., Galibois, C.M., and Leskiw, B.K. 2003. BldD from *Streptomyces coelicolor* is a non-essential global regulator that binds its own promoter as a dimer. FEMS Microbiol. Lett. **225**(1): 35-40.

Eng, J. K., McCormack, A.L. and Yates, J.R., III 1994. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with nimo-aci-sequences in a protein database. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **5**, 976-989.

Faucher, E., Savard, T., and Beaulieu, C. 1992. Characterization of Actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie **14**(3): 197-202.

Fink, A.L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. Physiol. Rev. **79**(2): 425-449.

Fleissner, A., Sopalla, C., and Weltring, K.M. 2002. An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. Mol. Plant Microbe Interact. **15**(2): 102-108.

Graca, J., and Pereira, H. 2000. Diglycerol alkenedioates in suberin: building units of a poly(acylglycerol) polyester. Biomacromolecules **1**(4): 519-522.

Guerreiro, N., Ksenzenko, V.N., Djordjevic, M.A., Ivashina, T.V., and Rolfe, B.G. 2000. Elevated levels of synthesis of over 20 proteins results after mutation of the *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide synthesis gene *pssA*. J. Bacteriol. **182**(16): 4521-4532.

Hammad, Y., Marechal, J., Cournoyer, B., Normand, P., and Domenach, A.M. 2001. Modification of the protein expression pattern induced in the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia sp.* strain ACN14a-ts<sub>r</sub> by root exudates of its symbiotic host *Alnus glutinosa* and cloning of the *sodF* gene. Can. J. Microbiol. **47**(6): 541-547.

Healy, F.G., Krasnoff, S.B., Wach, M., Gibson, D.M., and Loria, R. 2002. Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. J. Bacteriol. **184**(7): 2019-2029.

Healy, F.G., Wach, M., Krasnoff, S.B., Gibson, D.M., and Loria, R. 2000. The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. Mol. Microbiol.

38(4): 794-804.

Heim, S., Ferrer, M., Heuer, H., Regenhardt, D., Nimtz, M., and Timmis, K.N. 2003. Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: distinct responses of KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 to iron deprivation and a new form of superoxide dismutase. *Environ. Microbiol.* **5**(12): 1257-1269.

Hesketh, A., and Chater, K.F. 2003. Evidence from proteomics that some of the enzymes of actinorhodin biosynthesis have more than one form and may occupy distinctive cellular locations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**(8): 523-529.

Hesketh, A.R., Chandra, G., Shaw, A.D., Rowland, J.J., Kell, D.B., Bibb, M.J., and Chater, K.F. 2002. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **46**(4): 917-932.

Hill, J., and Lazarovits, G. 2005. A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology- Revue Canadienne De Phytopathologie* **27**(1): 46-52.

Hill, S.M., Jobling, M.G., Lloyd, B.H., Strike, P., and Ritchie, D.A. 1993. Functional expression of the tellurite resistance determinant from the Inchi-2 Plasmid Pmer610. *Molecular & General Genetics* **241**(1-2): 203-212.

Hurkman, W.J., and Tanaka, C.K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel-electrophoresis. *Plant Physiol.* **81**(3): 802-806.

Inaoka, T., Takahashi, K., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., and Ochi, K. 2003. Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP co-operatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **278**(4): 2169-2176.

Kers, J.A., Wach, M.J., Krasnoff, S.B., Widom, J., Cameron, K.D., Bukhalid, R.A., Gibson, D.M., Crane, B.R., and Loria, R. 2004. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature* **429**(6987): 79-82.

- Kim, D.W., Chater, K.F., Lee, K.J., and Hesketh, A. 2005a. Effects of growth phase and the developmentally significant *bldA*-specified tRNA on the membrane-associated proteome of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **151**(Pt 8): 2707-2720.
- Kim, D.W., Chater, K., Lee, K.J., and Hesketh, A. 2005b. Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **187**(9): 2957-2966.
- King, R.R., Lawrence, C.H., Clark, M.C., and Calhoun, L.A. 1989. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* (13): 849-850.
- Kolattukudy, P.E., and Agrawal, V.P. 1974. Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (Suberin). *Lipids* **9**: 682-691.
- Kolattukudy, P.E., Rogers, L., and Larson, J.D. 1981. Enzymatic reduction of fatty acids and alpha-hydroxy fatty acids. *Methods Enzymol.* **71**: 263-275.
- Lai, C., Xu, J., Tozawa, Y., Okamoto-Hosoya, Y., Yao, X., and Ochi, K. 2002. Genetic and physiological characterization of *rpoB* mutations that activate antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Microbiology* **148**(Pt 11): 3365-3373.
- Lambert, D.H., and Loria, R. 1989a. *Streptomyces scabies* sp-nov, nom-rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**(4): 387-392.
- Lambert, D.H., and Loria, R. 1989b. *Streptomyces acidiscabies* sp-nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**(4): 393-396.
- Langlois, P., Bourassa, S., Poirier, G.G., and Beaulieu, C. 2003. Identification of *Streptomyces coelicolor* proteins that are differentially expressed in the presence of plant material. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(4): 1884-1889.
- Lauzier, A., Goyer, C., Ruest, L., Brzezinski, R., Crawford, D.L., and Beaulieu, C. 2002. Effect of amino acids on thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces scabies*. *Can. J.*

Microbiol. **48**(4): 359-364.

Lawrence, C.H., Clark, M.C., and King, R.R. 1990. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* **80**(7): 606-608.

Little, J.W., and Mount, D.W. 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**(1): 11-22.

Liu, F., and Schnable, P.S. 2002. Functional specialization of maize mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Plant Physiol.* **130**(4): 1657-1674.

Loria, R., Bukhalid, R.A., Creath, R.A., Leiner, R.H., Olivier, M., and Steffens, J.C. 1995. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species *in-vitro*. *Phytopathology* **85**(5): 537-541.

Lulai, E.C., and Corsini, D.L. 1998. Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **53**(4): 209-222.

McQueen, D.A., and Schottel, J.L. 1987. Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *J. Bacteriol.* **169**(5): 1967-1971.

Melchers, L.S., Regensburg-Tuink, A.J., Schilperoort, R.A., and Hooykaas, P.J. 1989. Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. *Mol. Microbiol.* **3**(7): 969-977.

Merrick, M.J. 1976. A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **96**(2): 299-315.

Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T., and Kuninaga, S. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48 Pt 2**: 495-502.

Mohrle, V., Roos, U., and Bormann, C. 1995. Identification of cellular proteins involved in nikkomycin production in *Streptomyces tendae* Tu901. *Mol. Microbiol.* **15**(3): 561-571.

Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R.E., and Ryser, U. 1999. Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiol.* **119**(3): 1137-1146.

Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., and Sonenshein, A.L. 2003. Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J. Bacteriol.* **185**(6): 1911-1922.

Nachin, L., El Hassouni, M., Loiseau, L., Expert, D., and Barras, F. 2001. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol. Microbiol.* **39**(4): 960-972.

Nakazono, M., Tsuji, H., Li, Y., Saisho, D., Arimura, S., Tsutsumi, N., and Hirai, A. 2000. Expression of a gene encoding mitochondrial aldehyde dehydrogenase in rice increases under submerged conditions. *Plant Physiol.* **124**(2): 587-598.

Natera, S.H., Guerreiro, N., and Djordjevic, M.A. 2000. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**(9): 995-1009.

Nodwell, J.R., and Losick, R. 1998. Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **180**(5): 1334-1337.

Nodwell, J.R., McGovern, K., and Losick, R. 1996. An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **22**(5): 881-893.

Nodwell, J.R., Yang, M., Kuo, D., and Losick, R. 1999. Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genetics* **151**(2): 569-584.

Ochi, K., Kandala, J., and Freese, E. 1982. Evidence that *Bacillus subtilis* sporulation induced by the stringent response is caused by the decrease in GTP or GDP. *J. Bacteriol.* **151**(2): 1062-1065.

Orsaria, L., Paoletti, L., and Gramajo, H.C. 1998. Characterization of stationary-phase proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol. Lett.* **162**(2): 275-281.

Park, D.H., Kim, J.S., Kwon, S.W., Wilson, C., Yu, Y.M., Hur, J.H., and Lim, C.K. 2003. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov. and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**(Pt 6): 2049-2054.

Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551-3567.

Piette, A., Derouaux, A., Gerkens, P., Noens, E.E., Mazzucchelli, G., Vion, S., Koerten, H.K., Titgemeyer, F., De Pauw, E., Leprince, P., van Wezel, G.P., Galleni, M., and Rigali, S. 2005. From dormant to germinating spores of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new perspectives from the *crp* null mutant. *J. Proteome Res.* **4**(5): 1699-1708.

Riccillo, P.M., Collavino, M.M., Grasso, D.H., England, R., de Bruijn, F.J., and Aguilar, O.M. 2000. A *guaB* mutant strain of *Rhizobium tropici* CIAT899 pleiotropically defective in thermal tolerance and symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**(11): 1228-1236.

Schoonbeek, H., Del Sorbo, G., and De Waard, M.A. 2001. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**(4): 562-571.

Shimizu, M., Yuda, N., Nakamura, T., Tanaka, H., and Wariishi, H. 2005. Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin. *Proteomics* **5**(15): 3919-3931.

Skov, J., Lemmens, M., and Giese, H. 2004. Role of a *Fusarium culmorum* ABC transporter (FcABC1) during infection of wheat and barley. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **64**(5): 245-254.

Sprusansky, O., Stirrett, K., Skinner, D., Denoya, C., and Westpheling, J. 2005. The *bkdR* gene of *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and encodes a transcriptional regulator of a branched-chain amino acid dehydrogenase complex. *J. Bacteriol.* **187**(2): 664-671.

Stergiopoulos, I., Zwieters, L.H., and De Waard, M.A. 2003. The ABC transporter MgAtr4 is a virulence factor of *Mycosphaerella graminicola* that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**(8): 689-698.

Stryer, L. 1995. *Biochemistry*. W. H. Freeman, New York.

Sunkar, R., Bartels, D., and Kirch, H.H. 2003. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J.* **35**(4): 452-464.

Toulokxonov, I.I., Shulgina, I., and Hernandez, V.J. 2001. Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta'-subunit. *J. Biol. Chem.* **276**(2): 1220-1225.

Urban, M., Bhargava, T., and Hamer, J.E. 1999. An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J.* **18**(3): 512-521.

Vohradsky, J., and Thompson, C.J. 2006. Systems level analysis of protein synthesis patterns associated with bacterial growth and metabolic transitions. *Proteomics* **6**(3): 785-793.

Wach, M.J., Kers, J.A., Krasnoff, S.B., Loria, R., and Gibson, D.M. 2005. Nitric oxide synthase inhibitors and nitric oxide donors modulate the biosynthesis of thaxtomin A, a nitrated phytotoxin produced by *Streptomyces spp.* *Nitric Oxide* **12**(1): 46-53.

Wach, M.J., Krasnoff, S.B., Loria, R., Gibson, M. 2007. Effect of carbohydrates on the production of thaxtomin A by *Streptomyces acidiscabies*. *Arch. Microbiol*, Online First, 6 march 2007.

Wang, Y.X., and Yuan, Y.J. 2005. Direct proteomic mapping of *Streptomyces Luteogriseus* strain 103 and *cnn1* and insights into antibiotic biosynthesis. *J. Proteome*



Res. 4(6): 1999-2006.

Warren, C.M., Krzesinski, P.R. and Greaser, M.L. 2003. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* **24**:1695-1702.

Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., HumpherySmith, I., Williams, K.L., and Hochstrasser, D.F. 1996. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio-Technology* **14**(1): 61-65.

Yoon, K.A., Nakamura, Y., and Arakawa, H. 2004. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J. Hum. Genet.* **49**(3): 134-140.

## CHAPITRE 3

### 3.0 Effet de la subérine de pomme de terre sur les gènes exprimés par *S. scabies*.

Dans cette étude, nous avons amorcé l'analyse de la réponse physiologique de *S. scabies* à la présence d'un composé complexe de la plante, la subérine. Cette recherche transcriptomique a permis d'identifier certains des gènes de *S. scabies* exprimés lorsque la bactérie est exposée au polymère lipidique.

Ces travaux sont décrits à la section 3.1. Cette section est constituée de l'article A. Lauzier et C. Beaulieu. Effet de la subérine de pomme de terre sur les gènes exprimés par *S. scabies* (à soumettre pour publication). J'ai effectué la totalité des expérimentations décrites dans cet article et j'ai rédigé cet article. Les travaux ont été faits sous la supervision de C. Beaulieu.

### 3.1 Effet de la subérine de pomme de terre sur les gènes exprimés par *S. scabies*

Annie Lauzier et Carole Beaulieu<sup>1</sup>

Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne, Département de biologie,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada.

<sup>1</sup> auteur de correspondance

## Résumé

Une banque d'ADN complémentaires des gènes exprimés par le *S. scabies* en présence de subérine a été construite et 51 gènes ont été identifiés par séquençage. Dix-sept de ces gènes codaient pour des protéines dont la fonction est inconnue et les protéines codées par les autres gènes ont été classées en quatre catégories fonctionnelles : les enzymes du métabolisme énergétique, les enzymes liées à la perception de l'environnement, les protéines liant l'ADN et protéines de régulation, les protéines sécrétées et enzymes hydrolytiques. L'induction de l'expression de dix de ces gènes par la subérine a été confirmée par PCR en temps réel. Ces gènes codaient pour des enzymes de modification ou de dégradation des composés chimiques cellulaires tels des méthyltransférases, une glucanotransférase, une acylase, une carboxypeptidase et une glycosyl hydrolase. De plus, la subérine induisait aussi la transcription du gène codant pour la glycérol-3-P déshydrogénase suggérant que le glycérol qui est un élément de base de la subérine était utilisé comme source d'énergie par le *S. scabies*. Il est possible que la présence de la subérine soit perçue par la bactérie comme un élément stressant puisque des gènes codant pour une protéine d'efflux similaire à une protéine de résistance au chloramphénicol et une ADN ligase sont surexprimés en présence du polymère.

## Introduction

La zone du sol entourant les racines des plantes est nommée la rhizosphère. C'est un environnement riche et complexe dans lequel interagissent les plantes, les microorganismes et le sol (Lines-Kelly, 2005). Les plantes contribuent à la richesse nutritive de la rhizosphère par la voie des exsudats racinaires. Ils sont composés en majeure partie d'acides aminés, d'acides organiques, d'hydrocarbures, de vitamines, de mucilage et de protéines (Bais *et al.*, 2006). Une grande variété d'organismes compétitionnent pour les nutriments présents dans la rhizosphère.

Les streptomycètes sont un groupe important de bactéries retrouvées dans la rhizosphère (Barakate *et al.*, 2002; Triger *et al.*, 1990). Ils sont des bactéries filamenteuses qui ont un cycle de vie complexe incluant le développement d'un mycélium basal et aérien et la dissémination sous forme de spores (Tan *et al.*, 1998). Les streptomycètes sont reconnus pour leur production de métabolites secondaires actifs tels les antibiotiques et les enzymes extracellulaires (Hodgson, 2000; Hopwood, 2006).

Seulement certaines espèces de streptomycètes sont phytopathogènes. Le *Streptomyces scabies* est le plus étudié et le plus important streptomycète phytopathogène. Il cause la gale commune de la pomme de terre, une maladie qui occasionne des pertes économiques importantes pour les producteurs de pomme de terre à travers le monde. Le *S. scabies* n'est pas hôte spécifique, il peut infecter plusieurs végétaux à organes de réserve tels la carotte, le radis et la betterave (Goyer and Beaulieu, 1997). Il inhibe également la croissance de plantules de monocotylédones et de dicotylédones (Leiner *et al.*, 1996). Cette bactérie produit des molécules chimiques pour coloniser et infecter les tissus végétaux. La plus étudiée de ces armes chimiques est une toxine appelée la thaxtomine A (King *et al.*, 1989). Les thaxtomines sont des composés nitroaromatiques (dioxypiperazines 4nitroindol-3-yl) produits par *S. scabies* au site d'infection (Lawrence *et al.*, 1990).

Plusieurs microorganismes de la rhizosphère produisent des enzymes extracellulaires permettant de dégrader les constituants des cellules végétales pour en retirer des nutriments (Agrios 2004). Une faible portion des organismes rhizosphériques sont capables de dégrader des polymères complexes comme la lignine (Haddadin *et al.*, 2002; Kirby, 2006), la cutine (Longhi and Cambillau, 1999) et la subérine (Alisch *et al.*, 2004; Kolattukudy, 2001). Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire sont souvent importantes dans le pouvoir pathogène des organismes phytopathogènes. Leur corrélation avec l'agressivité in planta de plusieurs agents phytopathogènes importants dont l'*Erwinia carotovora* subsp *carotovora* et l'*Erwinia chrysanthemi* (Collmer and Bauer, 1994; Nasser *et al.*, 2001 ; Beaulieu *et al.*, 1993; Eriksson *et al.*, 1998; Ried and Collmer, 1988), le *Ralstonia solanacearum* (Liu *et al.*, 2005) et le *Phaerosphaeria nodorum* (Lalaoui *et al.*, 2000).

La production d'enzymes hydrolytiques tels les pectinases, les amylases et les protéases (Paradis *et al.*, 1994) a été associée aux streptomycètes phytopathogènes. McQueen et Schottel (1987) ont isolé de *S. scabies* une estérase pouvant dégrader la subérine. La biosynthèse de cette enzyme chez *S. scabies* est induite par la subérine. La subérine est un polymère complexe faisant partie intégrante du périoderme et des tissus souterrains des plantes (Kolattukudy *et al.*, 1981). Elle est aussi produite par les tubercules lors de blessures pour protéger de la déshydratation et de l'infection par divers agents pathogènes (Lulai and Corsini, 1998). Elle est constituée d'un domaine polyaromatique et d'un domaine polyaliphatique reliés par des liens esters. Le glycérol est aussi présent en quantité importante dans la subérine extraite des tubercules de pomme de terre (Moire *et al.*, 1999). Le rôle de l'estérase de *S. scabies* dans le pouvoir pathogène demeure inconnue mais il a été proposé qu'elle pouvait être impliquée dans la dégradation de la subérine au site d'infection (McQueen and Schottel, 1987). De plus, il a été démontré que le *S. scabies* produisait la thaxtomine A lorsque la subérine était ajoutée au milieu de

culture *in vitro* (Beausejour *et al.*, 1999). Ceci suggère que les produits de dégradation de la subérine induisent la production de la phytotoxine.

Très peu d'études se sont jusqu'à maintenant penchées sur la dégradation de la subérine que ce soit par des organismes rhizosphériques pathogènes ou non pathogènes. De même, l'effet de la subérine sur le métabolisme microbien est à peu près inconnu. Le but de la présente étude est d'obtenir une meilleure compréhension de la réaction physiologique du *S. scabies* face au polymère complexe qu'est la subérine. Nous avons, dans un premier temps, cloné et séquencé certains des gènes exprimés par le *S. scabies* en présence de subérine et, par la suite, nous avons choisi certains de ces gènes pour étudier leurs profils d'expression à l'aide de la technique de PCR en temps réel.

## Matériel et méthodes

### **Purification de subérine de pomme de terre**

Des tubercules de pommes de terre Russet ont été bouillis afin de récupérer les pelures de pomme de terre. La subérine a été extraite des pelures selon le protocole de Kolattukudy et Agrawal (1974). La subérine purifiée a été séchée, broyée et autoclavée avant d'être ajoutée au milieu de culture.

### **Conditions de culture**

La souche EF-35 de *Streptomyces scabies* utilisée dans cette expérience a été isolée d'une lésion de gale commune sur une pomme de terre (Faucher *et al.*, 1992). La bactérie a été inoculée dans un milieu Tryptic Soy Broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) et incubée 48 heures à 30° C avec agitation (300 rpm). Cette préculture a été centrifugée et le culot bactérien resuspendu dans 5 volumes de saline (0,85% de NaCl). Cette

solution a été utilisée pour inoculer des erlenmeyers contenant 30 ml de milieu minimal (Beausejour *et al.*, 1999) à un ratio de 1/60 v/v. Ces cultures ont été incubées dans les mêmes conditions pour 24 heures. À ce moment, la subérine (0.06g) était ou non ajoutée et l'incubation était prolongée durant 12 heures.

### **Extraction de l'ADN génomique**

Le culot bactérien d'une culture en milieu TSB (30 ml) de la souche *S. scabies* EF-35 âgée de 48h a été resuspendu dans 3ml d'une solution de lysozyme (Sigma-Aldrich, Oakville, On, Canada) à une concentration de 2mg/ml. La suspension a été incubée pendant 10 min. à 37° C puis 4ml de la solution Kirby 2x (Kieser *et al.*, 2000) ont été ajoutés. Le tout a été mélangé à vitesse maximale à l'aide d'un vortex avant d'ajouter 8 ml de phénol/chloroforme (1/1) et de mêler le mélange au vortex durant 20 sec. Une centrifugation de 10 min à 2500g a ensuite permis de séparer la phase aqueuse et le chloroforme. La phase aqueuse a été récupérée et mélangée de nouveau à 3ml de phénol/chloroforme. Les extractions au phénol/chloroforme ont été répétées jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse exempte d'impuretés. À la phase aqueuse, 1/10 de volume d'acétate de sodium à 3M a été ajoutée ainsi que 1 volume d'éthanol afin de permettre à l'ADN de précipiter durant une incubation de 20 min. à -20° C. L'ADN a été récupéré suite à une centrifugation de 15 min à 14000 g. Le culot a été lavé avec 7 ml d'éthanol à 70%, puis séché et resuspendu dans 5ml de tampon TE (10mM Tris, pH 7,5, 1mM EDTA). Les solutions d'ADN ont été incubées 30 minutes à 37° C en présence de 4mg/ml de RNase A (Quiagen, Mississauga, On., Canada)

### **Extraction des ARN totaux**

Les ARN totaux des cultures de *S. scabies* ayant cru en présence de subérine sur une période de 12 heures ont été extraits comme suit. Les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation (2500g, 10 min) et resuspendues dans 1ml d'une solution



Kirby 2x (Kieser *et al.*, 2000). Les cellules ont été lysées par trois sonications successives (60ohms) de 30 secondes en gardant les tubes de cellules sur de la glace. Des billes de verre (425-600 $\mu$ ) ont été ajoutées au lysat et le tout a été mêlé au vortex pendant 2 minutes. Deux ml de phénol/chloroforme (1/1) ont été ajoutés et le mélange mêlé au vortex pendant 1 minute. Le liquide a été séparé des billes par aspiration et centrifugé pendant 4 minutes à 2500 g. Le surnageant a été récupéré et utilisé pour en extraire les ARN totaux à l'aide du kit RNEasy (Quiagen, Hilden Germany). Le surnageant a été mélangé à l'aide d'un vortex à 500ul de la solution RLT puis 700 ul d'éthanol ont été ajoutés. La suite de l'extraction a été faite conformément au protocole fourni par le fabricant. L'ARN a été élué de la colonne dans 50 $\mu$ l d'eau DEPC (Sambrook and Russell, 2001). Les ARN ont été précipités pendant 30 min. à -70°C dans 3 volumes d'éthanol avec 1/10 vol d'acétate de sodium à 3M et 5 $\mu$ g de glycogène. Les acides nucléiques précipités ont été lavés avec de l'éthanol 70%, puis resuspendus dans du tampon TE. Les ARN ont été dosés en déterminant l'absorbance de la solution aux UV (Sambrook and Russell, 2001) et leur intégrité a été vérifiée par électrophorèse dans du tampon TAE sur sur gel d'agarose 1,5% (Sambrook and Russell, 2001) ou sur un gel d'agarose/formaldehyde réalisé selon les instructions du manufacturier.

### **Enrichissement des ARNm**

Un enrichissement des ARNm contenus dans le pool des ARN totaux extraits de cultures de *S. scabies* ayant cru en présence de subérine sur une période de 12 heures s'est faite en utilisant le kit MICROBExpress (Ambion, Texas, USA) selon les recommandations du manufacturier. Les étapes principales de ce système sont les suivantes : 1) mélange de l'ARN total et d'oligomères de capture d'ARN ribosomal (ARNr) 16S et 23S, 2) hybridation des oligomères de capture et des ARNr de l'extrait d'ARN totaux, 3) ajout de billes magnétiques fusionnées à un oligomère qui s'hybride aux oligomères de capture et 4) retrait des ARNr (billes/oligos). De façon à éliminer le maximum d'ARNr de l'ARN total, l'ensemble des étapes du protocole ont été effectué quatre fois en utilisant au

départ 20µg d'ARN total. Ce protocole permet d'obtenir un rendement final de 1µg d'ARN enrichi en ARNm.

### **Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)**

Les ARN enrichis en ARNm ont ensuite été transformés en ADNc. La synthèse du premier brin d'ADN a été faite avec le kit First-Strand cDNA Synthesis (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Les hexamères fournis dans le kit ont été utilisés à une dilution de 1/5 et la réaction conduite dans un volume total de 15µl. La synthèse du deuxième brin a été faite tel que décrit par Sambrook et al (2001). Les ADNc obtenus ont été purifiés en procédant à une extraction au phénol/chloroforme et à une précipitation à l'éthanol tel que décrit précédemment.

### **Clonage des ADNc**

Les ADNc ont été clonés dans le vecteur pMOSBlue à l'aide du kit pMOSBlue Blunt-Ended Cloning (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) selon les recommandations du manufacturier. Environ 900ng d'ADNc ont été utilisés par réaction et la ligation s'est faite à 22°C durant 16 heures. Le vecteur a été transformé dans les cellules ultracompetentes XL10\_Gold d'*Escherichia coli* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) selon le protocole fourni par le fabricant. Les transformants ont été incubés pendant 24h à 37°C sur pétris LB contenant de l'ampicilline (50ug/ml), du X-gal (80ug/ml) et de l'IPTG (20nM). Les clones positifs dont les colonies sont blanches ont été repiqués dans 400µl de LB avec ampicilline (50µg/ml) et incubés à 37°C avec agitation pendant 16 heures. Un aliquot représentant chaque culture de clones a été conservé à -20°C dans du glycérol (50/50 v/v). La présence d'insert dans les colonies positives a été confirmée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant les

amorces Pmos, complémentaires aux extrémités du site de clonage multiple du vecteur (Tableau1). Les conditions de PCR sont décrites ci-dessous.

## PCR

Pour la vérification de la présence d'un insert dans les clones positifs, un aliquot de 200µl d'une culture de chacun des clones a été centrifugé. 500µl d'eau autoclavée ont été ajoutés au culot et le tout a été bouilli 5 minutes. Les débris cellulaires ont été séparés par centrifugation et 2µl de surnageant ont été utilisés par réaction PCR. Les PCR ont été effectuées en plaques multi-puits en utilisant 1µl de chacune des amorces (5µM) ; 0,5µl DMSO; 1µl tampon Thermopol 10x (NEB, Ipswich, MA); 0,1µl dNTP à 10mM; 0,2µl taq polymérase (NEB, Ipswich, MA) et 5,2 µl d'eau stérile. La PCR a été effectuée dans les conditions suivantes : préchauffage à 95°C pendant 5 min; 35 cycles [dénaturation à 95°C pendant 30 sec; hybridation : 1<sup>er</sup> cycle à 58°C, 2<sup>e</sup> à cycle 56°C, 3<sup>e</sup> cycle à 54°C, 4<sup>e</sup> cycle et les suivants à 52°C pendant 1min et amplification à 72°C pendant 2 min] et post-amplification à 72°C pendant 7 min. La spécificité des amorces pour la QPCR a été testée dans les mêmes conditions en utilisant 50 ng d'ADN génomique de *S. scabiei*. Comme température d'hybridation, un gradient de température (Tm -5°C jusqu'au Tm +5°C) a été utilisé pour chacune des paires d'amorces. La présence et la taille des amplicons ont été vérifiées par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% (Sambrook and Russell 2001).

## Identification des ADNc clonés

Les plasmides des clones portant un insert ont été isolés à l'aide du kit Wizard SV (Promega, Fitchburg, WI, USA). Le séquençage des inserts a été fait par le centre d'Innovation Génome Québec (Montréal, Québec, Canada). Le séquençage a été fait en utilisant 0,5 µl de BigDye Terminator (version 3,1) sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2µl d'ADN, 1,75 µl de tampon de séquençage (0,4 M Tris, pH

9,0, 10mM MgCl<sub>2</sub>) et 10 pM d'amorce T7 dans un volume total de 10ul selon les conditions suggérées par le manufacturier. Les résultats ont été analysés sur l'analyseur de séquences ABI 3730XL (Applied BioSystems). Les séquences obtenues ont été soumises à une recherche de similitudes (BLAST) dans la banque de données publiques NCBI. La probabilité de présence d'un peptide signal dans les séquences a été calculée à l'aide du logiciel SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004).

### **PCR en temps réel (QPCR)**

Les niveaux d'expression de certains des gènes exprimés en présence de subérine ont été vérifiés par PCR en temps réel. Pour les expériences de QPCR, l'ARN de *S. scabies* a été extrait de cultures sans subérine et de cultures exposées à la subérine durant 12H, tel que décrit précédemment sauf que 0,2ng d'ARN du gène de la luciférase (Promega, WI, USA) a été ajouté à la solution Kirby 2X. L'ADN contaminant a été digéré par traitement à la DNase I (Promega, WI, USA). La transcription inverse à partir des ces ARN a été faite à l'aide du kit First-strand cDNA synthesis tel que décrit précédemment et a été suivie d'un traitement à la RNase H (USB corporation, Cleveland, Ohio, USA) de 20min, à 37°C.

L'expression relative de ces gènes a été déterminée à l'aide du chromophore SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) qui reconnaît de façon non spécifique les doubles brins d'ADN (Stratagène 2004). Comme standard de normalisation, nous avons testé l'ARNr 16S et l'ARN du gène de la luciférase. Les amorces pour les gènes d'intérêt ont été conçues à l'aide du logiciel PrimerQuest (IDT SciTools) (Tableau 1).

Tableau 1 : Séquence des amorces utilisées pour la PCR et la QPCR.

clone	gène	amorce 1	amorce 2
200	Ligase ADN	CCTCGTCATCCTCCAGCTCTGAT	TGGTCGCCGACTTCTCGACTGA
422	Trans-aconitate méthyltransférase	ACGCCTGGGAGACGACGTA	GAAGATGCGGCCGAACGGCAA
447	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase	ATCGACAAGTACCGCATCACCTTC	TTCTTCATCGTGCGGCCGATGT
648	Carboxypeptidase	CCCATTCCGGAGACCC	ATCTCCTGCCCGTGCCCT
683	Méthyltransférase SAM-dépendante	TCTCGTCCTGTTTCGACGTAGGGA	ATCCGATCCGATGGGCGTT
711	4-alpha-glucanotransférase	ACGTCCGTCCTGTGGTTTCGAG	TGGCGGTGGCGAGACAGTT
736	Pénicilline V acylase	AAGCGGGACGTACCCACTTCT	TGCTGACGTACTCGCAGTCCT
739	Protéine de résistance au chloramphénicol	AGAGCATGAACTCACTGGTGCCGA	TGTATATGTCTTCTCCCGCCGC
742	Glycosyl hydrolase	TGCCGATGTAGAGGTTCTTGTCCG	AGCCAGGTGACGGTCATCGACAT
1085	Protéine d'assemblage de la sous unité XV du cytochrome c oxydase	TGACTCCAGTGAGGTCCATCGCAT	TGAAGTACTGGACGTAGCCGACGA
	Luciférase	TACAACACCCCAACATCTTCGA	GGAAGTTCACCGGCGTCAT
	Pmos	TGA CCA TGA TTA CAC CAA GCT C	AAA CGA CGG CCA GTG AAT TCG AG

La quantification des ARN a été faite par amplification des ADNc obtenus de la transcription inverse dans le thermocycleur en temps réel Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA, USA). L'ADNc a été dilué dans une proportion de 1/30 avec de l'eau DEPC et 5 µl de la solution ont été utilisés pour une réaction de QPCR de 25 µl contenant 30nM du marqueur fluorochrome ROX, 5 µl des amorces à 1 µM, 2 µl eau DEPC et 12,5 µl de la solution MasterMix [12mM de Tris à pH 8,3, 50mM de KCl, 8mM de MgCl<sub>2</sub>, 150 mM de trehalose, 0,2% de Tween 20, 0,2mg/ml de BSA, SYBR green à une concentration totale de 1,39X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 250 µM de dNTP, 0,1 µl de JumpStart Taq (Sigma-Aldrich, Oakville, On, Canada)]. La QPCR a été effectuée en plaque multi-puits. Les cycles de réaction ont été suivis : 10 min. à 95°C suivi de 40 cycles comprenant les étapes suivantes : 30 sec. à 95°C, 1 min. à 56°C avec lecture en fin d'étape, 30 sec. à 72°C. Après chaque réaction de QPCR, une courbe de dissociation a été réalisée de façon à vérifier qu'un seul produit d'amplification était calculé dans nos résultats. De plus, les produits de QPCR ont été séparés sur gel d'agarose à 1,5% pour confirmer la spécificité et la taille des fragments d'amplification obtenus (Sambrook and Russell, 2001). Pour calculer le cycle du seuil (ct), le seuil de détection a été calculé avec la méthode ``amplification based threshold`` et le niveau de fluorescence du bruit de fond

calculé en fonction des cycles 4 à 16 (non-adaptative baseline) pour chaque amplification à l'aide du logiciel MxPro v3,1 (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Afin de s'assurer que les résultats obtenus avec différentes paires d'amorces étaient comparables, il était important de vérifier les efficacités d'amplification pour chacune des réactions. Pour ce faire, la courbe étalon de QPCR sur une dilution en série d'ADNc a été réalisée pour chacune des paires d'amorces. La pente de cette courbe permet de calculer l'efficacité d'amplification (E) selon la formule  $E=10^{(-1/pente)}$  (Stratagene 2004).

Afin de tenir compte des variations d'efficacité dans le calcul de l'expression relative des gènes, l'équation de Pfaffl (2001) a été appliquée.

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{gène cible}}^{\Delta \text{ct gène cible (contrôle-traitement)}}}{E_{\text{gène ref}}^{\Delta \text{ct gène ref (contrôle-traitement)}}$$

où E correspond à l'efficacité d'amplification calculée plus haut et  $\Delta \text{ct}$  correspond à la différence des cycles seuil pour chacune des conditions.

La QPCR a été effectuée sur quatre extractions d'ARN provenant de 4 cultures indépendantes. Les résultats obtenus proviennent d'au moins deux RT différents pour chacune des extractions de façon à prendre en compte les variations dues au niveau d'efficacité de la transcription inverse. Pour chaque réaction, un puit sans ADN a été inclus (No Template Control - NTC) pour s'assurer de l'absence de signal non-

spécifique. Seulement les réactions dont les ct étaient d'au moins 5 log inférieurs aux ct des puits NTC ont été considérées comme significatives.

Résultats et discussion

### **Construction de la banque de cDNA**

Au total, plus de 1200 clones ont été vérifiés et 186 clones positifs ont été séquencés. En principe, les clones ne produisant pas de pigment bleu lors de la croissance sur milieu contenant du X- GAL et de l'IPTG devraient contenir un insert. Cependant, lors de la première série de séquençage, plusieurs vecteurs semblaient vides. Nous avons donc procédé à une deuxième vérification pour la présence d'un insert par PCR. Malgré ces deux étapes de sélection, 43,7% des vecteurs séquencés ne contenaient pas d'insert. L'absence d'insert pourrait être expliquée par la présence de fragments trop petits pour être différenciés de la séquence du vecteur et par des réarrangements au niveau de l'ADN du vecteur qui auraient faussé les résultats.

Nous avons cependant pu constater que l'enrichissement en ARNm à l'aide du kit MICROBExpress a été efficace. Seulement 4% des clones séquencés contenaient un insert codant pour de l'ARN ribosomal. La longueur des fragments de cDNA séquencés variait de 43 à 363 nucléotides.

### **Identification des clones**

Les séquences d'ADN obtenues ont été utilisées pour faire une recherche d'homologie avec la séquence génomique non annotée de *S. scabies* (Sanger Institute). En utilisant le gène complet correspondant dans le génome de *S. scabies*, la fonction de 51 séquences d'ADN a pu être déduite (Tableau 2). Les protéines codées par les gènes identifiés sont

retrouvées dans différents emplacements cellulaires. La plupart des protéines (34/51) semblent avoir une localisation cytoplasmique alors que 11 des gènes identifiés possèdent une séquence associée à un peptide signal suggérant que les protéines qui sont codées par ces gènes sont secrétées. Par ailleurs, nous avons également identifié plusieurs protéines membranaires telles une perméase, des protéines de transport de type ABC et quelques protéines membranaires dont la fonction est inconnue.

Dix sept des séquences obtenues codent pour des protéines hypothétiques dont la fonction est pour le moment inconnue. Les autres protéines exprimées en présence de subérine ont été classées en 4 catégories fonctionnelles : le métabolisme énergétique, la perception de l'environnement, les protéines liant l'ADN et les protéines de régulation, les protéines secrétées et les enzymes hydrolytiques (Tableau 2).

Tableau 2 : Identification des gènes exprimés en présence de subérine

clone	Position sur génome	Taille de la protéine codée par le gène	Fonction probable (bactérie)	Similarité	Probabilité de la présence d'un peptide signal
<b>Protéine homologue</b>					
<b>Métabolisme énergétique</b>					
27	9593616	323 a.a.	Oxydoréductase	297/322 (92%)	0
66	5083985	379 aa	3-methyl-2-oxobutanoate déshydrogénase ( <i>Streptomyces avermitilis</i> )	351/356 (98%)	0
70	9593616	323 a.a.	Oxydoréductase	297/322 (92%)	0
422	6000426	272 aa	Trans-aconitate méthyltransférase ( <i>S. avermitilis</i> )	223/268 (83%)	0
447	8102317	539 aa	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase ( <i>S. avermitilis</i> )	522/538 (97%)	0
454	9740118	288 aa	Oxygénase utilisant le FMNH <sub>2</sub> ( <i>S. avermitilis</i> )	138/232 (59%)	0
693	4280603	853 aa	NADH déshydrogénase, sous unité gamma ( <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2))	777/843 (92%)	0



793	6000426	272 aa	Trans-aconitate méthyltransférase ( <i>S. avermitilis</i> )	223/268 (83%)	0
1023	4095122	403 a.a.	UDP-glucose/GDP-mannose déshydrogénase ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	371/402 (92%)	0
1085	7754479	341 aa	Cytochrome c oxydase, protéine d'assemblage de la sous unité XV ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	296/330 (89%)	0
<b>Perception de l'environnement</b>					
48	4224537	407 a.a.	Sensor kinase, système à deux composants ( <i>S. coelicolor</i> )	330/380 (86%)	0
140	4483466	329 aa	Transporteur de type ABC, sous unité liant l'ATP ( <i>S. coelicolor</i> A3(2))	281/323 (86%)	0
210	8057134	346 aa	Phosphotransférase ( <i>S. avermitilis</i> )	318/340 (93%)	0
464	8795442	419 aa	Transporteur de type ABC, sous unité périplasmique ( <i>Acidothermus</i> )	146/309 (47%)	0,995
495	4760832	487 aa	Histidine kinase, système à deux composants ( <i>S. coelicolor</i> A3(2))	373/397 (93%)	0,982
573	5670031	473 a.a. ou 144 a.a.	Perméase ( <i>S. avermitilis</i> ) ou protéine membranaire ( <i>S. avermitilis</i> )	449/464 (97%) ou 61/69 premier	0
663	4840438	140 aa	Protéine liant le molybdène ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	120/136 (88%)	0
739	5634957	419 aa	Protéine de résistance au chloramphénicol ( <i>S. coelicolor</i> A3(2))	343/392 (87%)	0
759	4838597	296 aa	Transporteur de type ABC, sous unité membranaire ( <i>S. coelicolor</i> A3(2))	226/228 (99%) a partir aa 68	0
<b>Protéines liant l'ADN et protéines de régulation</b>					
72	1984143	239 aa	Régulateur transcriptionnel de la famille TetR ( <i>S. avermitilis</i> )	226/239 (94%)	0
138	8191629	447 aa	Régulateur transcriptionnel ( <i>S. avermitilis</i> )	427/446 (95%)	0
200	9238753	689 aa	ADN ligase ( <i>S. coelicolor</i> )	590/671 (87%)	0
417	5856853	297 aa	Intégrase de phage ( <i>Nocardia farcinica</i> )	143/268 (53%)	0
545	283769	288 aa	Protéine hyp. SAV7019 ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680) présentant 44% de similarité avec la Ribonucléase BN ( <i>Frankia</i> sp EAN1pec)	213/280 (76%)	0,998
634	9683304	348 aa	Protéine de régulation, opéron Lacl ( <i>Frankia</i> sp. EAN1pec)	214/336 (63%)	0

683	7649592	253 aa	Méthyltransférase SAM-dépendante ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	234/251 (93%),	0
705	6040928	678 aa	Méthylase spécifique à l'adénine, système de restriction-modification de l'ADN de type II ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	588/681 (86%)	0
<b>Protéines sécrétées et enzymes hydrolytiques</b>					
478	1855336	443 aa	Arabinofuranosidase ( <i>S. avermitilis</i> )	328/417 (78%)	0,731
648	3826795	458 aa	Carboxypeptidase ( <i>S. avermitilis</i> )	354/402 (88%),	1
711	6628180	691 aa	4-alpha-glucanotransférase ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	594/689 (86%)	0,928
718	994798	148 aa	Inhibiteur de subtilisine ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	119/144 (82%)	1
736	9480631	805 aa	Précurseur de l'acylase de la pénicilline V ( <i>Streptomyces lavendulae</i> ) similaire à l'acylase dégradant la N-acylhomoserine lactone ( <i>Streptomyces</i> sp. M664)	633/774 (81%) et 618/767 (80%)	1
742	8783534	1172 aa	Glycosyl hydrolase ( <i>S. coelicolor</i> A3(2))	553/924 (59%)	0
748	2967501	225 aa	Peptidase ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	124/143 (86%) a partir du 80 aa	0
1080	7471794	541 aa	Cholestérol oxydase ( <i>S. avermitilis</i> )	492/538 (91%)	0,998
<b>Protéines de fonction inconnue</b>					
57	3518798	302 a.a.	Protéine hyp. SAV3100 ( <i>S. avermitilis</i> )	283/298 (94%)	0
62	5502286	1653 aa	Protéine hyp. ( <i>S. coelicolor</i> ) ou protéine liant l'ADN ( <i>S. coelicolor</i> )	238/623 (38%) ou 183/485 (37%)	0
402	7588552	466 aa	Protéine hyp. SAV6183 ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	391/465 (84%)	0
473	4307727	433 aa	Protéine hyp. SAV3375 ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	294/443 (66%)	0
574	4678459	239 aa	Protéine hyp. SAV4567 ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	182/254 (71%)	0
583	3453271	241 aa	Protéine membranaire ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	224/243 (92%)	0
604	2181035	289 aa	Protéine hyp. SAV2074 ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	219/267 (82%)	0
636	5466446	371 aa	Protéine membranaire ( <i>S. coelicolor</i> A3(2))	268/355 (75%)	0,302
653	4678459	239 aa	Protéine hyp. SAV4567 ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	182/254 (71%)	0
669	7533985	246 aa	Protéine hyp. SAV6127 ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	204/213 (95%)	0

713	6032925	487 aa	Protéine hyp. SAV74 ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	239/401 (59%)	0
786	2491006	97 aa	Protéine hyp.SCO6914 ( <i>S. coelicolor</i> A3(2))	93/96 (96%)	0
915	3881447	547 aa	Protéine hyp. JNB_07574 ( <i>Janibacter</i> sp. HTCC2649)	158/361 (43%)	0,976
952	4307727	433 aa	Protéine hyp. SAV3375 ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	294/443 (66%)	0
966	2181035	289 aa	Protéine hyp. SAV2074 ( <i>S. avermitilis</i> MA-4680)	219/267 (82%)	0
1008	8245339	42 a.a.	Protéine phagique ( <i>Xylella fastidiosa</i> Temecula1)	24/32 (75%)	0

Les gènes identifiés sont exprimés par la souche *S. scabiei* EF-35, 12 h après l'ajout de subérine dans le milieu de culture. Ceci ne signifie pas pour autant que leur expression ait été induite par la présence de subérine. Il est cependant intéressant de constater que plusieurs des gènes ont été identifiés dans d'autres études d'expression de gènes ou de protéines chez des bactéries phytopathogènes.

Dans une étude de Zhao *et al* (2005), les gènes induits en condition d'infection chez l'*Erwinia amylovora*, un agent phytopathogène causant le feu bactérien chez différentes plantes rosacées, ont été étudiés. Plusieurs gènes produits en présence de subérine dans notre expérience ont été identifiés comme étant induits chez l'*Erwinia amylovora*. Ainsi, les gènes codant pour des systèmes de transport de type ABC et différentes perméases sont fortement représentés dans l'étude de Zhao *et al.* (2005). Plusieurs kinases sont aussi induites chez l'*E. amylovora* en présence de son hôte, indiquant une adaptation à différents stimuli dans l'environnement. Deux intégrases ont été identifiées ainsi que deux régulateurs transcriptionnels de type TetR. Chez l'*E. amylovora*, l'infection de l'hôte semble également induire l'agent pathogène à porter des changements à sa paroi cellulaire, comme démontré par l'induction de plusieurs protéines de la paroi ou qui ont un effet sur celle-ci, incluant une carboxypeptidase.

Dans une étude de protéomique, nous avons analysé les protéines induites en présence de subérine chez le *S. scabies* (Lauzier et al, chapitre 2). Nous avons constaté que la subérine induisait plusieurs protéines de la glycolyse ainsi que des protéines de transport de type ABC, deux types de protéines que nous retrouvons également dans la présente étude.

Puisque cette étude protéomique ne portait que sur le protéome intracellulaire, nous n'avons pu identifier de protéines extracellulaires. Par contre, 11 protéines sécrétées ont été identifiées dans la présente étude. En plus de trois protéines dont la fonction est inconnue, nous avons identifié deux protéines périplasmiques, une composante d'un système de transport de type ABC et une histidine kinase d'un système à deux composants, ainsi que six protéines extracellulaires, un inhibiteur de la subtilisine, une acylase, la cholestérol oxydase, une arabinofuranosidase, une glucanotransférase et une carboxypeptidase. Leur induction reste à vérifier mais on peut supposer qu'au moins certaines de ces protéines sont induites par la présence de subérine puisque très peu de protéines extracellulaires sont produites par le *S. scabies* dans un milieu minimal dépourvu de subérine (Lauzier et al, non publié).

### **Normalisation du PCR en temps réel (QPCR)**

Afin de vérifier si certains des gènes identifiés à l'étape précédente étaient effectivement induits par la subérine, nous avons choisi d'effectuer une PCR en temps réel avec quantification relative (Wong and Medrano, 2005). Une des étapes clés du QPCR à quantification relative est de trouver une méthode de normalisation qui permet d'évaluer correctement la quantité d'ARN dans les échantillons de départ de façon à pouvoir les comparer entre eux (Dheda *et al.*, 2004).

Dans notre cas, aucune méthode de calcul du matériel de départ suffisamment précise n'est disponible. De plus, la normalisation en fonction d'un gène de référence interne présuppose la disponibilité d'un gène dont l'expression n'est pas affectée par les différentes conditions de l'expérience. Nous ne connaissons pas à ce point-ci les patrons d'expression des différents gènes chez *S. scabies*. Nous savons cependant que le produit d'un gène fréquemment utilisé comme référence interne, la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase, varie en fonction de la présence ou de l'absence de subérine (Lauzier et al, non publié). Nous avons choisi la normalisation à l'aide d'un standard exogène externe (Gilsbach *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2005). Nous avons utilisé le gène codant pour la luciférase. Nous avons donc ajouté une quantité connue d'ARNm de luciférase dans nos échantillons à l'étape de la lyse cellulaire. La technique de normalisation à l'aide du standard exogène externe a l'avantage de prendre en compte tous les traitements subits par l'ARNm expérimental, des étapes de purification à l'efficacité de la transcription inverse (Johnson *et al.*, 2005). Nous avons pu constater que la quantité d'ARN de luciférase tel que déterminée par QPCR corrélait avec les rendements apparents d'ARN totaux sur gel d'agarose (résultats non présentés).

## Résultats de QPCR

Nous avons choisi 10 gènes au hasard dont au moins un pour chacune des 4 classes de fonction (Tableau 2) pour comparer leur taux d'expression avec ou sans subérine à l'aide de la méthode du PCR en temps réel (graphique 1). Un ratio supérieur à 1 indique une expression plus élevée du gène en présence de subérine alors qu'un ratio entre 0 et 1 indique une baisse d'expression en milieu subérine. Nous avons pu constater que l'expression des 10 gènes testés est plus importante en présence de subérine qu'en l'absence de celle-ci. Le calcul prend en compte les variations d'efficacité du PCR pour chacune des amorces, efficacité qui variaient entre 77,3% et 117%.

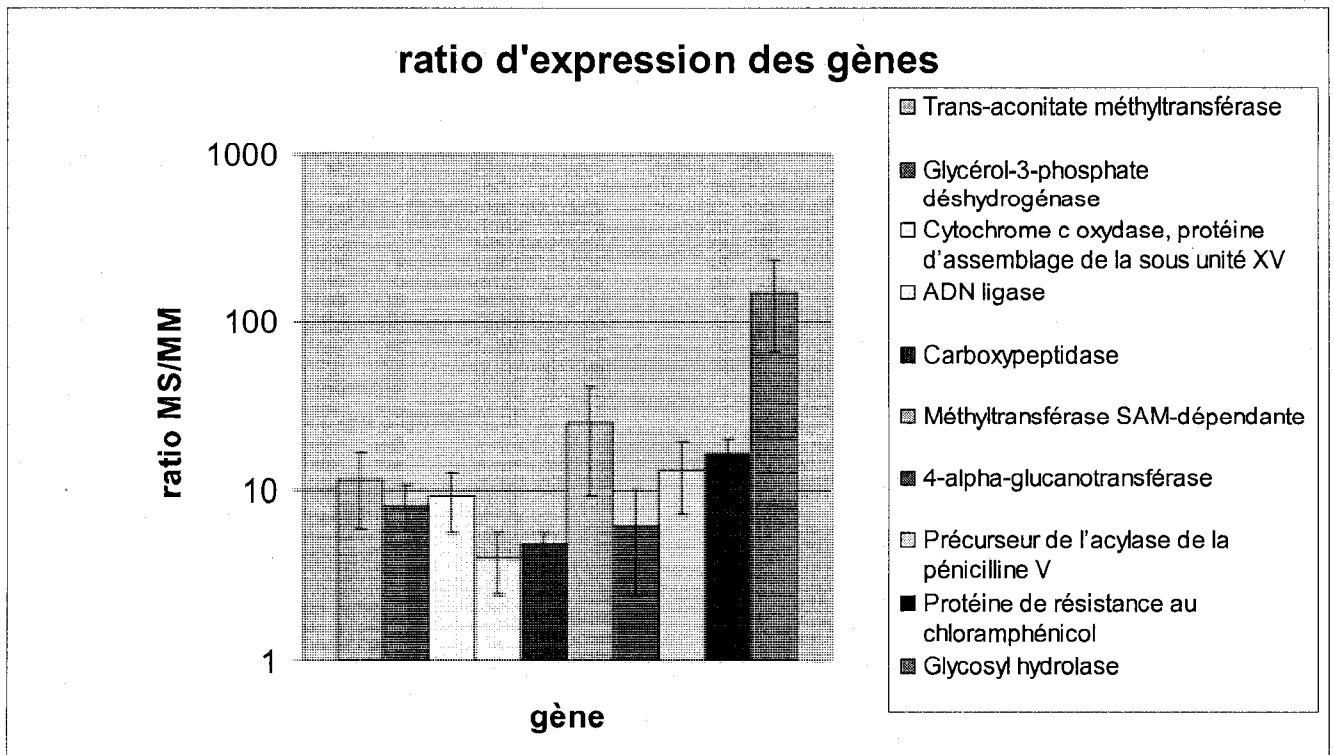


Figure 1 : Expression des gènes calculée par PCR en temps réel. Le ratio indique le niveau d'expression du gène en présence de subérine par rapport au niveau d'expression en absence de subérine. Les écarts-types indiquent la variation entre les résultats obtenus pour quatre extractions indépendantes.

La signification biologique de l'induction des gènes choisis en présence de subérine est encore inconnue même si nous pouvons poser quelques hypothèses. La présence de la plante accroît le métabolisme énergétique bactérien (Langlois *et al.*, 2003; Mehta and Rosato, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Ce même phénomène semble être observable avec la subérine. En effet, un gène codant pour un cytochrome c oxydase, enzyme du métabolisme énergétique qui intervient dans la chaîne respiratoire chez les bactéries (Rawn, 1990), est induit de 9 fois en présence de subérine. L'accroissement du métabolisme énergétique pourrait être dû au fait que la subérine constitue une source de nutriments.

La subérine est constituée d'un domaine polyaromatique et d'un domaine polyaliphatique reliés par des liens esters. La portion aliphatique est constituée de chaînes d'acides gras interconnectés par des molécules de homoacyl-glycérol (Kolattukudy, 1980). Dans cette étude, une protéine homologue à la pénicilline acylase/ N-acylhomoserine lactone acylase est induite 13 fois en présence de subérine. Cette enzyme pourrait servir à cliver les groupements acyls retrouvés dans la subérine afin de relâcher les acides gras et le glycérol. La glycérol-3-phosphate déshydrogénase, enzyme catalysant la première étape dans l'assimilation du glycérol (Rawn, 1990) est également surexprimé de 8 fois dans nos conditions ce qui suggère que la bactérie se trouve effectivement en situation d'assimilation de glycérol.

Les mécanismes de résistance au chloramphénicol chez les bactéries sont de plusieurs types. Les plus étudiés sont l'acétylation de la molécule par des acétyltransférases spécifiques (Murray and Shaw, 1997) et les systèmes d'efflux (George and Hall, 2002; Nilsen *et al.*, 1996). Dans cette étude, une enzyme de résistance au chloramphénicol est induite de 16 fois en présence de subérine. Puisque le gène présente une similarité de séquence de 68% avec un transporteur de *Nocardia*, nous pouvons présumer que la protéine de *S. scabies* qui présente de l'homologie pour une enzyme de résistance au chloramphénicol est un transporteur. Toutefois, nous n'avons pas d'indication qui nous permettrait de définir plus précisément le type de molécules transportées.

Bien qu'aucun hydrocarbure supplémentaire n'ait été ajouté au milieu subérine, au moins deux enzymes hydrolytiques impliquées dans la dégradation des sucres étaient induites. Les gènes codant pour la glycosyl hydrolase et la 4-alpha-glucanotransférase (Tableau 2) étaient exprimés plus fortement en présence de subérine, soit 147 et 6 fois respectivement. La subérine *in planta* est imbriquée dans la paroi primaire de la cellule végétale. Bien que la purification implique des digestions enzymatiques de la paroi, on

ne peut exclure la présence de contamination de la subérine par des sucres de la paroi cellulaire végétale. L'induction de ces gènes pourrait donc être expliquée par la présence possible de ces contaminants. Cependant, lors de la colonisation du tubercule, le premier élément avec lequel *S. scabies* entre en contact est la subérine et il est plausible que la bactérie anticipe sa progression dans les tissus végétaux en exprimant déjà d'autres enzymes de colonisation des tissus végétaux, comme ceux induits ici. Cette hypothèse est présentement testée dans notre laboratoire.

La carboxypeptidase est une enzyme impliquée dans la biosynthèse des peptidoglycanes. Elle hydrolyse les peptides de la paroi en retranchant un acide aminé du côté carboxyle de la molécule (Rawn, 1990). Dans notre expérience, la carboxypeptidase est induite d'environ 5 fois en présence de subérine. La raison expliquant que la présence de subérine induise chez *S. scabies* la biosynthèse de la carboxypeptidase est inconnue. Toutefois, des études en microscopie électronique ont démontré que la paroi de *S. scabiei* est plus dense et plus épaisse lorsque la bactérie croît en présence de subérine (Forest *et al.*, 2006).

Deux des enzymes très fortement exprimées en présence de subérine étaient de la famille des méthyltransférases. Il s'agit de la trans-aconitate méthyltransférase (induite 11 fois) et de la SAM-dépendante méthyltransférase (induite 25 fois). De nombreux composés secondaires synthétisés par les streptomycètes peuvent être méthylés par ce type d'enzymes (Anderle *et al.*, 2007; Grunewald and Marahiel, 2006; Nguyen *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 2007). La thaxtomine A, phytotoxine produite par *S. scabies* lors de l'infection de la plante (King *et al.*, 1989) et également produite en présence de subérine (Beausejour *et al.*, 1999), est une molécule qui est méthylé au niveau du cycle hydroxypipérazine (King *et al.*, 1989). Bien que plusieurs étapes de la biosynthèse de la thaxtomine A aient été élucidées (Healy *et al.*, 2000; Healy *et al.*, 2002; Kers *et al.*,



2004), l'enzyme responsable de la méthylation n'a pas encore été identifiée. Il serait donc intéressant de déterminer si les enzymes identifiées dans cette étude sont impliquées dans la méthylation de la thaxtomine.

Dans une étude protéomique portant sur les protéines induites chez le *S. scabies* par la subérine (Lauzier et al, chapitre 2), de nombreuses protéines de résistance au stress ont été identifiées. Les travaux de Douliez (2004) suggéraient également que les monomères de subérine pouvaient agir comme perturbants de la membrane. Dans cette étude, nous n'avons pas identifié de gènes de résistance au stress. Ceci pourrait être dû au temps d'exposition à la subérine (12 heures) qui aurait pu être trop court pour permettre une dégradation efficace du polymère. En plus des protéines de stress, les travaux de Lauzier *et al.*, (chapitre 2) révélaient une surproduction en présence de subérine d'une protéine de régulation de la réponse SOS, la protéine Lex A. Dans la présente étude, le gène codant pour une ADN ligase est induit de 4 fois. L'induction de cette enzyme en présence de subérine pourrait indiquer un besoin accru de réparation de l'ADN bactérien dû au stress. En effet, l'ADN ligase est l'enzyme responsable de la ligation des extrémités de l'ADN lors de la réplication, de la recombinaison et de la réparation de l'ADN (Zhao *et al.*, 2006).

Très peu d'études jusqu'à maintenant ont étudié les effets physiologiques de la subérine aussi bien sur des bactéries pathogènes que non pathogènes. Dans la présente étude, nous avons identifié plusieurs gènes exprimés par le *S. scabies* en présence de subérine et avons confirmé qu'au moins 10 d'entre eux étaient induits par la présence du polymère. La subérine semble modifier la physiologie du microorganisme non seulement en fournissant des éléments nutritifs supplémentaires mais en entraînant une adaptation au milieu. Cette étude transcriptionnelle a permis d'identifier des gènes qui pourraient jouer

un rôle important dans l'écologie de la bactérie phytopathogène et dans la colonisation du tubercule de pomme de terre.

#### Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier A.M. Simao-Beauvoir, J.A. Poitras et M.E. Bélanger pour leur assistance technique. Les travaux ont été financés par une subvention du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) du Canada.

## Bibliographie

Agrios, G.N. 2004. Plant pathology. Elsevier Academic Press, Amsterdam ; Boston.

Alisch, M., Feuerhack, A., Muller, H., Mensak, B., Andreaus, J., and Zimmermann, W. 2004. Biocatalytic modification of polyethylene terephthalate fibres by esterases from actinomycete isolates. *Biocatalysis Biotransformation* **22**(5-6): 347-351.

Anderle, C., Alt, S., Gulder, T., Bringmann, G., Kammerer, B., Gust, B., and Heide, L. 2007. Biosynthesis of clorobiocin: investigation of the transfer and methylation of the pyrrolyl-2-carboxyl moiety. *Arch. Microbiol.* **187**(3): 227-237.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., and Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **57**: 233-266.

Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K., and Beaulieu, C. 2002. Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**(1): 49-54.

Beaulieu, C., Boccara, M., and Vangijsegem, F. 1993. Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**(2): 197-202.

Beausejour, J., Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. 1999. Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Can. J. Microbiol.* **45**(9): 764-768.

Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**(4): 783-795.

Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* **34**(3): 597-601.

Collmer, A., and Bauer, D.W. 1994. *Erwinia chrysanthemi* and *Pseudomonas syringae*: plant pathogens trafficking in extracellular virulence proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **192**: 43-78.

Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., and Zumla, A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* **37**(1): 112-4, 116, 118-9.

Douliez, J.P. 2004. Cutin and suberin monomers are membrane perturbants. *J. Colloid Interface Sci.* **271**(2): 507-510.

Eriksson, A.R., Andersson, R.A., Pirhonen, M., and Palva, E.T. 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**(8): 743-752.

Faucher, E., Savard, T., and Beaulieu, C. 1992. Characterization of Actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* **14**(3): 197-202.

Forest, M., Lauzier, A., Grondin, G., and Beaulieu, C. 2006. Effect of potato suberin on pathogenic *Streptomyces scabies* strain EF-35. *APS Abstract of Presentation, Quebec city, Quebec, Canada, Vol. 96, pp. s36.*

George, A.M., and Hall, R.M. 2002. Efflux of chloramphenicol by the CmlA1 protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**(2): 209-213.

Gilsbach, R., Kouta, M., Bonisch, H., and Bruss, M. 2006. Comparison of *in vitro* and *in vivo* reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *BioTechniques* **40**(2): 173-177.

Goyer, C., and Beaulieu, C. 1997. Host range of streptomycete strains causing common scab. *Plant Dis.* **81**(8): 901-904.

Grunewald, J., and Marahiel, M.A. 2006. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiology and Molecular Biology*

Reviews 70(1): 121-+.

Haddadin, M.S., Al-Natour, R., Al-Qsous, S., and Robinson, R.K. 2002. Bio-degradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of Basidiomycete. *Bioresour. Technol.* **82**(2): 131-137.

Healy, F.G., Krasnoff, S.B., Wach, M., Gibson, D.M., and Loria, R. 2002. Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. *J. Bacteriol.* **184**(7): 2019-2029.

Healy, F.G., Wach, M., Krasnoff, S.B., Gibson, D.M., and Loria, R. 2000. The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **38**(4): 794-804.

Hodgson, D.A. 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, Vol 42 **42**: 47-238.

Hopwood, D.A. 2006. Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu. Rev. Genet.* **40**: 1-23.

Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., and Zumla, A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* **6**(4): 279-284.

Johnson, D.R., Lee, P.K., Holmes, V.F., and Alvarez-Cohen, L. 2005. An internal reference technique for accurately quantifying specific mRNAs by real-time PCR with application to the tceA reductive dehalogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(7): 3866-3871.

Kers, J.A., Wach, M.J., Krasnoff, S.B., Widom, J., Cameron, K.D., Bukhalid, R.A., Gibson, D.M., Crane, B.R., and Loria, R. 2004. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature* **429**(6987): 79-82.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, England.

- King, R.R., Lawrence, C.H., Clark, M.C., and Calhoun, L.A. 1989. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications (13): 849-850.
- Kirby, R. 2006. Actinomycetes and lignin degradation. Advances in Applied Microbiology, Vol 58 **58**: 125-+.
- Kolattukudy, P.E. 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. Science **208**: 990-1000.
- Kolattukudy, P.E., and Agrawal, V.P. 1974. Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (Suberin). Lipids **9**: 682-691.
- Kolattukudy, P.E., Rogers, L., and Larson, J.D. 1981. Enzymatic reduction of fatty acids and alpha-hydroxy fatty acids. Methods Enzymol. **71**: 263-275.
- Kolattukudy, P.E. 2001. Polyesters in higher plants. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **71**: 1-49.
- Lalaoui, F., Halama, P., Dumortier, V., and Paul, B. 2000. Cell wall-degrading enzymes produced in vitro by isolates of *Phaeosphaeria nodorum* differing in aggressiveness. Plant Pathol. **49**(6): 727-733.
- Lambert, D.H., and Loria, R. 1989. *Streptomyces scabies* sp-nov, nom-rev. Int. J. Syst. Bacteriol. **39**(4): 387-392.
- Langlois, P., Bourassa, S., Poirier, G.G., and Beaulieu, C. 2003. Identification of *Streptomyces coelicolor* proteins that are differentially expressed in the presence of plant material. Appl. Environ. Microbiol. **69**(4): 1884-1889.
- Lawrence, C.H., Clark, M.C., and King, R.R. 1990. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. Phytopathology **80**(7): 606-608.

- Leiner, R.H., Fry, B.A., Carling, D.E., and Loria, R. 1996. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *Phytopathology* **86**(7): 709-713.
- Lines-Kelly, R. 2005. The Rhizosphere [online]. *Soil biology basics* : 20 april 2007.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M.A., and Denny, T.P. 2005. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**(12): 1296-1305.
- Longhi, S., and Cambillau, C. 1999. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**(2-3): 185-196.
- Lulai, E.C., and Corsini, D.L. 1998. Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **53**(4): 209-222.
- McQueen, D.A., and Schottel, J.L. 1987. Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *J. Bacteriol.* **169**(5): 1967-1971.
- Mehta, A., and Rosato, Y.B. 2005. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by representational difference analysis of cDNA. *Genetics and Molecular Biology* **28**(1): 140-149.
- Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T., and Kuninaga, S. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48 Pt 2**: 495-502.
- Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R.E., and Ryser, U. 1999. Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiol.* **119**(3): 1137-1146.
- Murray, I.A., and Shaw, W.V. 1997. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**(1): 1-6.

- Nasser, W., Faelen, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Reverchon, S. 2001. Role of the nucleoid-associated protein H-NS in the synthesis of virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**(1): 10-20.
- Nguyen, K.T., Kau, D., Gu, J.Q., Brian, P., Wrigley, S.K., Baltz, R.H., and Miao, V. 2006. A glutamic acid 3-methyltransferase encoded by an accessory gene locus important for daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*. *Mol. Microbiol.* **61**(5): 1294-1307.
- Nilsen, I.W., Bakke, I., Vader, A., Olsvik, O., and El-Gewely, M.R. 1996. Isolation of *cmr*, a novel *Escherichia coli* chloramphenicol resistance gene encoding a putative efflux pump. *J. Bacteriol.* **178**(11): 3188-3193.
- Paradis, E., Goyer, C., Hodge, N.C., Hogue, R., Stall, R.E., and Beaulieu, C. 1994. Fatty-acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in eastern Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**(3): 561-564.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**(9): e45.
- Rawn, J.D. 1990. *Traité de biochimie*. De Boeck Université; Editions du Renouveau pédagogique, Bruxelles; Montréal.
- Ried, J.L., and Collmer, A. 1988. Construction and characterization of an *Erwinia chrysanthemi* mutant with directed deletions in all of the pectate lyase structural genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 32-38.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Stevenson, C.E.M., Meyers, C.L.F., Walsh, C.T., and Lawson, D.M. 2007. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the O-methyltransferase NovP from the novobiocin-biosynthetic cluster of *Streptomyces spheroides*. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **63**: 236-238.



Stratagene (Editor). 2004. Introduction to Quantitative PCR. Stratagene, La Jolla, California, USA.

Tan, H., Yang, H., Tian, Y., Wu, W., Whatling, C.A., Chamberlin, L.C., Buttner, M.J., Nodwell, J., and Chater, K.F. 1998. The *Streptomyces coelicolor* sporulation-specific sigma WhiG form of RNA polymerase transcribes a gene encoding a ProX-like protein that is dispensable for sporulation. *Gene* **212**(1): 137-146.

Triger, E.G., Polyanskaya, L.M., and Kozhevnikov, P.A. 1990. Intermicrobial interactions in soil, as exemplified by a number of Streptomyces and bacterial populations. *Microbiology* **59**(4): 477-481.

Wong, M.L., and Medrano, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**(1): 75-85.

Zhao, A., Gray, F.C., and MacNeill, S.A. 2006. ATP- and NAD<sup>+</sup>-dependent DNA ligases share an essential function in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol. Microbiol.* **59**(3): 743-752.

Zhao, Y., Blumer, S.E., and Sundin, G.W. 2005. Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J. Bacteriol.* **187**(23): 8088-8103.

## CONCLUSION

Le but général de ce projet de doctorat était d'améliorer nos connaissances sur une interaction plante-microorganisme mettant en jeu la bactérie *S. scabies* et son hôte, la pomme de terre.

Dans la première partie de l'étude, la structure de base de la thaxtomine, cyclo-(L-4-nitrotryptophyl-L-phenylalanyl) (King *et al.*, 1989), laissait présumer que les acides aminés aromatiques étaient des précurseurs dans la synthèse de la toxine. Nous avons été les premiers à démontrer sans équivoque que le tryptophane et la phénylalanine étaient effectivement des précurseurs de la thaxtomine A. Nous avons également réussi à démontrer que la biosynthèse de la thaxtomine A était inhibée spécifiquement par les trois acides aminés aromatiques, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Puisque la thaxtomine est essentielle au pouvoir pathogène de *S. scabies*, une molécule qui inhibe sa synthèse est intéressante au niveau de la lutte contre la gale commune de la pomme de terre. Les informations sur les inhibiteurs de synthèse de la toxine pourraient être intégrées dans le développement d'une méthode de lutte efficace contre le *S. scabies*.

Nous avons cependant été étonnés de constater que des précurseurs inhibaient une voie de synthèse. Le tryptophane est un précurseur dans la synthèse d'un autre composé secondaire, l'auxine (Kriechbaumer *et al.*, 2006), et la tyrosine est un précurseur de la mélanine (Beausejour and Beaulieu, 2004). Nous avons observé que la production de thaxtomine A semblait être inversement corrélée avec la production des ces deux composés chez le *S. scabies*. Il est donc envisageable qu'une compétition entre les voies métaboliques de ces composés soit en jeu.

Grâce aux essais d'incorporation de radioactivité, nous avons également réussi à produire de la thaxtomine marquée radioactivement à partir de 3 précurseurs radioactifs, soit le [<sup>14</sup>C]tryptophane, [<sup>14</sup>C]phénylalanine et le [<sup>14</sup>C]méthionine. La thaxtomine marquée est un outil intéressant dans plusieurs types d'études sur la toxine. Le marquage radioactif pourrait être utilisé pour des études de localisation de la thaxtomine dans les tissus végétaux. De plus, cette technique pourrait permettre le suivi des étapes de dégradation ou de modification de la toxine *in planta*.

Nous avons également vérifié les effets de la subérine sur la physiologie de *S. scabies*. Les effets de certains composés produits par la plante sur les microorganismes du sol ont été étudiés. C'est le cas de la lignine (Dombrowskaia and Kostyshin, 1997; Gukasyan, 1999) et d'un dérivé, la vanilline (Shimizu *et al.*, 2005), des flavonoides (Guerreiro, 97) et autres molécules phénoliques (Melchers *et al.*, 1989; Mo and Gross, 1991; Quigley and Gross 1994) mais peu d'études se sont intéressées aux effets de la subérine dans les interactions entre les plantes et les microorganismes.

La subérine est surtout considérée comme un tissu qui protège la plante contre la dessiccation et une barrière physique contre les agressions (Bernards, 2002; Lulai and Corsini, 1998). Cependant, certains microorganismes associés aux plantes, tels le *S. scabies*, sont capables de dégrader la subérine (Alisch *et al.*, 2004; Haddadin *et al.*, 2002; McQueen and Schottel, 1987; McSweeney *et al.*, 1998; Schade and Lemmer, 2006) et nous avons réussi à démontrer que la subérine affectait profondément le métabolisme de cette bactérie.

Les deux approches testées, la protéomique et la transcriptomique, nous ont permis de tirer des conclusions intéressantes sur l'effet d'un composé complexe de plante sur le

fonctionnement bactérien. Les deux techniques nous ont permis d'identifier des protéines ou des gènes induits en présence de subérine. Bien que les gènes et les protéines identifiés dans les deux études soient différents, on peut remarquer que certaines voies métaboliques et certains mécanismes de réponse bactérienne ont été mis en évidence dans les deux expérimentations.

Dans les deux expériences, nous avons identifié plusieurs enzymes liées à la génération d'énergie. Dans l'étude protéomique, trois enzymes de la voie de la glycolyse étaient induites par la subérine. Dans l'étude sur les gènes, la glycérol-3-P déshydrogénase, aussi liée à la voie de la glycolyse était surexprimée en présence de subérine. De plus, des gènes liés au cycle de Krebs ont été identifiés par la transcriptomique. Nous pouvons donc conclure que le métabolisme énergétique est affecté par la subérine. Les mécanismes de transport bactérien semblent aussi être affectés par la subérine. Les deux études ont mis en évidence l'induction de certaines voies de transport, notamment de type ABC. Nous avons également pu constater dans les deux études, que des protéines liées à la synthèse ou la réparation des acides nucléiques étaient induites par la subérine. En protéomique, nous avons identifié deux gènes de synthèse d'acides nucléiques et un gène de la réponse SOS. En transcriptomique, une protéine qui peut être utile dans la réplication et la réparation de l'ADN, l'ADN ligase, était induite. Dans la même expérience, nous avons également identifié des gènes de régulation transcriptionnelle, mais leur induction reste à démontrer.

Grâce à l'étude de transcriptomique, nous avons pu identifier des gènes codants pour des enzymes de dégradation et des protéines secrétées. Vu les paramètres utilisés, ces enzymes n'ont pas été mises en évidence dans l'étude sur les protéines. Les deux études sont donc complémentaires et nous ont permis de cibler plusieurs classes de protéines.

Les projets exécutés au cours de mon doctorat sont de nature exploratoire. Ils nous ont permis de tirer des conclusions intéressantes mais sont surtout un point de départ pour des analyses plus poussées des mécanismes d'interaction entre la plante et le microorganisme. Des nombreux gènes identifiés au cours de l'étude transcriptomique, l'expression de seulement une partie des gènes a pu être vérifiée par QPCR. Une méthode plus rapide pour vérifier les niveaux d'expression de plusieurs gènes serait la construction d'une puce à ADN. De plus, puisque le génome de *S. scabies* a été entièrement séquencé, plusieurs autres gènes d'intérêt potentiel pourront être inclus sur la puce à ADN et permettront d'obtenir une vision plus globale de la réponse de *S. scabies* à des composés de la plante, tels que la subérine, ainsi qu'à d'autres conditions qui modulent l'expression de ces gènes de virulence. La protéomique est également une technique qui a été efficace dans la caractérisation de la réponse bactérienne à des conditions changeantes. Les études à ce niveau pourraient également être continuées pour permettre l'identification d'autres protéines d'intérêt. Nous pourrions par exemple poursuivre l'analyse des protéines dont l'expression est réduite en présence de subérine ou des protéines observables à des pH non-couverts dans notre étude. La même technique pourrait servir à l'étude de l'expression différentielle des protéines dans des conditions différentes. Par exemple, il serait intéressant de vérifier l'effet du tryptophane sur le protéome de *S. scabies*.

Certaines des protéines identifiées dans nos études sont présentement étudiées plus en détail. C'est le cas de TerD, une protéine connue pour conférer une résistance au tellurite (Whelan *et al.*, 1995) mais qui semble induite lors des relations entre les plantes et les microorganismes (Lauzier *et al.*, soumis ; Hammad *et al.*, 2001; Langlois *et al.*, 2003) bien que le tellurite ne soit pas un élément normalement retrouvé dans le sol et les tissus végétaux.

Ces travaux nous ont permis d'améliorer de façon significative nos connaissances sur une interaction plante-microorganisme peu étudiée au niveau moléculaire et nous ont ouvert de nouvelles avenues pour la poursuite des études sur les mécanismes d'adaptation de *S. scabies* à son environnement rhizosphérique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Agbessi, S., Beausejour, J., Dery, C., and Beaulieu, C. 2003. Antagonistic properties of two recombinant strains of *Streptomyces melanosporofaciens* obtained by intraspecific protoplast fusion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**(2-3): 233-238.
- Agrios, G.N. 2004. *Plant pathology*. Elsevier Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- Alisch, M., Feuerhack, A., Muller, H., Mensak, B., Andreaus, J., and Zimmermann, W. 2004. Biocatalytic modification of polyethylene terephthalate fibres by esterases from actinomycete isolates. *Biocatalysis Biotransformation* **22**(5-6): 347-351.
- Babcock, M.J., Eckwall, E.C., and Schottel, J.L. 1993. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1579-1586.
- Beausejour, J., and Beaulieu, C. 2004. Characterization of *Streptomyces scabies* mutants deficient in melanin biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* **50**(9): 705-709.
- Beausejour, J., Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. 1999. Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Can. J. Microbiol.* **45**(9): 764-768.
- Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M., and Hoondal, G.S. 2000. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces sp.* QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.* **27**(7): 459-466.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., and Hopwood, D.A. 2002. Complete genome

sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**(6885): 141-147.

Bernards, M.A. 2002. Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **80**(3): 227-240.

Bhargava, A., Osusky, M., Forward, B.S., Hancock, R.E., Kay, W.W., and Misra, S. 2007. Expression of a polyphenol variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and a virus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **88**(3): 301-312.

Bird, L.E., Ren, J., Zhang, J., Foxwell, N., Hawkins, A.R., Charles, I.G., and Stammers, D.K. 2002. Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus*. *Structure* **10**(12): 1687-1696.

Boisclair, J., and Estevez, B. 2006. Insect pest management in organic agriculture: acting in harmony with complexity. *Phytoprotection* **87**(2): 83-90.

Bondarenko, S., Gan, J.Y., Haver, D.L., and Kabashima, J.N. 2004. Persistence of selected organophosphate and carbamate insecticides in waters from a coastal watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(11): 2649-2654.

Bouchek-Mechiche, K., Gardan, L., Normand, P., and Jouan, B. 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50 Pt 1**: 91-99.

Bradbury, J.F. 1981. *Streptomyces ipomoeae*. In *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria*. Edited by CAB International.

Bruton, C.J., Plaskitt, K.A., and Chater, K.F. 1995. Tissue-specific glycogen branching isoenzymes in a multicellular prokaryote, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **18**(1): 89-99.



Bukhalid, R.A., and Loria, R. 1997. Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. *J. Bacteriol.* **179**(24): 7776-7783.

Bukhalid, R.A., Chung, S.Y., and Loria, R. 1998. *necl*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces spp.* and linked to a transposase pseudogene. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**(10): 960-967.

Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., and Zhou, S. 2005. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**(2): 147-152.

Cao, L.X, Xie, L.J., Xue, X.L., Tan, H.M., Liu, Y.H., Zhou, S.N. 2007. Purification and characterization of alginate lyase from *Streptomyces* species strain A5 from banana rhizosphere. *J. Agr. And Food Chem.* **55**(13): 5113-5117.

Challis, G.L., and Hopwood, D.A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100 Suppl 2**: 14555-14561.

Chung, W.C., Huang, J.W., and Huang, H.C. 2005. Formulation of a soil biofungicide for control of damping-off of Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) caused by *Rhizoctonia solani*. *Biological Control* **32**(2): 287-294.

Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H.J., Penninga, N.A., Bormann, C., Salas, J.A., Dijkhuizen, L., and Wosten, H.A. 2004. The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlets and chaplins. *Mol. Microbiol.* **53**(2): 433-443.

Clark, F.E. 1968. Ecological associations among soil microorganisms. *Rev. Soil Microbiol.* .

Crespi, M., Messens, E., Caplan, A.B., van Montagu, M., and Desomer, J. 1992. Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *EMBO J.* **11**(3): 795-804.

Demain, A.L., and Fang, A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **69**: 1-39.

Djejeva, G., Grigorova, Y., and Stoychev, M. 1990. Resistance of spores and vegetative cells of *Streptomyces thermovulgaris* strain 127 and the glucose isomerase produced by them to temperature and glutaraldehyde. *Acta Microbiol. Bulg.* **25**: 8-15.

Dombrowskaia, E.N., and Kostyshin, S.S. 1997. Effect of lignin preparations and cultivation conditions on the ligninolytic complex of the fungus *Pleurotus floridae*, the wood white-rot pathogen. *Ukr. Biokhim. Zh.* **69**(1): 26-31.

Duval, I., Brochu, V., Simard, M., Beaulieu, C., and Beaudoin, N. 2005. Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta* **222**(5): 820-831.

El-Tarabily, K.A., and McKenna, F. 2006. Biological control of damping-off [*Pythium aphanidermatum*] of cucumber in the United Arab Emirates, using streptomycete and nonstreptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* **28**(2): 348-348.

Erler, F., Yegen, O., and Zeller, W. 2007. Field evaluation of a botanical natural product against the pear psylla (*Homoptera : Psyllidae*). *J. Econ. Entomol.* **100**(1): 66-71.

Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. John Wiley and Sons., New York, USA.

Faucher, E., Savard, T., and Beaulieu, C. 1992. Characterization of Actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* **14**(3): 197-202.

Faucher, E., Otrysko, B., Paradis, E., Hodge, N.C., Stall, R.E., and Beaulieu, C. 1993. Characterization of Streptomycetes causing russet scab in Quebec. *Plant Dis.* **77**(12): 1217-1220.

- Fry, B.A., and Loria, R. 2002. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **60**(1): 1-8.
- Getha, K., Vikineswary, S., Wong, W.H., Seki, T., Ward, A., and Goodfellow, M. 2005. Evaluation of *Streptomyces sp.* strain g10 for suppression of Fusarium wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**(1): 24-32.
- Goyer, C., and Beaulieu, C. 1997. Host range of streptomycete strains causing common scab. *Plant Dis.* **81**(8): 901-904.
- Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. 1998. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology* **88**(5): 442-445.
- Goyer, C., Faucher, E., and Beaulieu, C. 1996. *Streptomyces caviscabies sp nov.*, from deep-pitted lesions in potatoes in Quebec, Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**(3): 635-639.
- Goyer, C., Charest, P.M., Toussaint, V., and Beaulieu, C. 2000. Ultrastructural effects of thaxtomin A produced by *Streptomyces scabies* on mature potato tuber tissues. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **78**(3): 374-380.
- Graca, J., and Pereira, H. 2000. Diglycerol alkenedioates in suberin: building units of a poly(acylglycerol) polyester. *Biomacromolecules* **1**(4): 519-522.
- Gracia-Garza, J.A., Little, M., Brown, W., Blom, T.J., Schneider, K., Allen, W., and Potter, J. 2003. Efficacy of various biological control agents and biorationals against Pythium root rot in poinsettia. *Horttechnology* **13**(1): 149-153.
- Gukasyan, G.S. 1999. Effect of lignin on growth and tyrosinase activity of fungi from the genus *Aspergillus*. *Biochemistry (Mosc)* **64**(2): 223-227.
- Haddadin, M.S., Al-Natour, R., Al-Qsous, S., and Robinson, R.K. 2002. Bio-degradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of Basidiomycete. *Bioresour. Technol.* **82**(2): 131-137.

Hammad, Y., Marechal, J., Cournoyer, B., Normand, P., and Domenach, A.M. 2001. Modification of the protein expression pattern induced in the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia sp.* strain ACN14a-tsr by root exudates of its symbiotic host *Alnus glutinosa* and cloning of the *sodF* gene. *Can. J. Microbiol.* **47**(6): 541-547.

Healy, F.G., Krasnoff, S.B., Wach, M., Gibson, D.M., and Loria, R. 2002. Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. *J. Bacteriol.* **184**(7): 2019-2029.

Healy, F.G., Wach, M., Krasnoff, S.B., Gibson, D.M., and Loria, R. 2000. The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **38**(4): 794-804.

Henderson, A.R., and Walter, C. 2006. Genetic engineering in conifer plantation forestry. *Silvae Genet.* **55**(6): 253-262.

Hill, J., and Lazarovits, G. 2005. A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology- Revue Canadienne De Phytopathologie* **27**(1): 46-52.

Horowitz, A.R., Weintraub, P.G., and Ishaaya, I. 1998. Status of pesticide resistance in arthropod pests in Israel. *Phytoparasitica* **26**(3): 231-240.

Huang, X., Han, Y., Wiig, A., McMillan, J., Jones, T., Talton, W., Dong, J., Offenheiser, M., Ren, P., Ascenzi, R., Hill, S., Zhen, R., and Chaudhuri, S. 2006. Engineering resistance against plant-parasitic nematodes. *J. Nematol.* **38**(2): 275-275.

Irdani, T., Perito, B., and Mastromei, G. 1996. Characterization of a *Streptomyces rochei* endoglucanase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **782**: 173-181.

Joo, G.J. 2005. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnol. Lett.* **27**(19): 1483-1486.

- Kaltenpoth, M., Gottler, W., Herzner, G., and Strohm, E. 2005. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Curr. Biol.* **15**(5): 475-479.
- Kaup, O., Grafen, I., Zellermann, E.M., Eichenlaub, R., and Gartemann, K.H. 2005. Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* NCPPB382. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**(10): 1090-1098.
- Kawase, T., Yokokawa, S., Saito, A., Fujii, T., Nikaidou, N., Miyashita, K., and Watanabe, T. 2006. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S-coelicolor* A3(2). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **70**(4): 988-998.
- Kers, J.A., Cameron, K.D., Joshi, M.V., Bukhalid, R.A., Morello, J.E., Wach, M.J., Gibson, D.M., and Loria, R. 2005. A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol.* **55**(4): 1025-1033.
- Kers, J.A., Wach, M.J., Krasnoff, S.B., Widom, J., Cameron, K.D., Bukhalid, R.A., Gibson, D.M., Crane, B.R., and Loria, R. 2004. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature* **429**(6987): 79-82.
- King, R.R., Lawrence, C.H., and Calhoun, L.A. 1992. Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, the causal organism of potato common scab. *J. Agric. Food Chem.* **40**(5): 834-837.
- King, R.R., Lawrence, C.H., Calhoun, L.A., and Ristaino, J.B. 1994. Isolation and characterization of thaxtomin-type phytotoxins associated with *Streptomyces ipomoeae*. *J. Agric. Food Chem.* **42**(8): 1791-1794.
- King, R.R., Lawrence, C.H., Clark, M.C., and Calhoun, L.A. 1989. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* (13): 849-850.
- Kinkel, L.L., Bowers, J.H., Shimizu, K., Neeno-Eckwall, E.C., and Schottel, J.L. 1998. Quantitative relationships among thaxtomin A production, potato scab severity, and fatty acid composition in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* **44**(8): 768-776.

- Kirby, R. 2006. Actinomycetes and lignin degradation. *Advances in Applied Microbiology*, Vol 58 **58**: 125-+.
- Kodani, S., Lodato, M.A., Durrant, M.C., Picart, F., and Willey, J.M. 2005. SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes. *Mol. Microbiol.* **58**(5): 1368-1380.
- Kodani, S., Hudson, M.E., Durrant, M.C., Buttner, M.J., Nodwell, J.R., and Willey, J.M. 2004. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(31): 11448-11453.
- Kolattukudy, P.E. 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.* **62**: 2918-2933.
- Kolattukudy, P.E. 1980. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* **208**: 990-1000.
- Konwick, B.J., Garrison, A.W., Black, M.C., Avants, J.K., and Fisk, A.T. 2006. Bioaccumulation, biotransformation, and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout. *Environ. Sci. Technol.* **40**(9): 2930-2936.
- Kreuze, J.F., Suomalainen, S., Paulin, L., and Valkonen, J.P.T. 1999. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the *necl* gene from *Streptomyces spp.* causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. *Phytopathology* **89**(6): 462-469.
- Kriechbaumer, V., Park, W.J., Gierl, A., and Glawischnig, E. 2006. Auxin biosynthesis in maize. *Plant. Biol. (Stuttg)* **8**(3): 334-339.
- Lambert, D.H., and Loria, R. 1989a. *Streptomyces scabies sp-nov, nom-rev.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**(4): 387-392.
- Lambert, D.H., and Loria, R. 1989b. *Streptomyces acidiscabies sp-nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**(4): 393-396.

Langlois, P., Bourassa, S., Poirier, G.G., and Beaulieu, C. 2003. Identification of *Streptomyces coelicolor* proteins that are differentially expressed in the presence of plant material. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(4): 1884-1889.

Lawrence, C.H., Clark, M.C., and King, R.R. 1990. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* **80**(7): 606-608.

Lehtonen, M.J., Rantala, H., Kreuze, J.F., Bang, H., Kuisma, L., Koski, P., Virtanen, E., Vihlman, K., and Valkonen, J.P.T. 2004. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces species*) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant Pathol.* **53**(3): 280-287.

Leiner, R.H., Fry, B.A., Carling, D.E., and Loria, R. 1996. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *Phytopathology* **86**(7): 709-713.

Locci, R. 1994. Actinomycetes as plant-pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* **100**(3-4): 179-200.

Loria, R., Kers, J., and Joshi, M. 2006. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**: 469-487.

Loria, R., Bukhalid, R.A., Fry, B.A., and King, R.R. 1997. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis.* **81**(8): 836-846.

Luger, P., Weber, M., Dung, N.X., Ky, P.T., and LeThe, C. 1996. The new pentacyclic saponine ecdysantherin [3 beta-hydroxy-20-methylpregn-5,14-dien-16-one-(18-20)-lactone] from *Ecdysanthera rosea* Hook et Arn (*Apocynaceae*) of Vietnam. *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications* **52**: 1574-1576.

Lulai, E.C., and Corsini, D.L. 1998. Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **53**(4): 209-222.

- Manulis, S., Shafrir, H., Epstein, E., Lichter, A., and Barash, I. 1994. Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiology* **140** ( Pt 5)(Pt 5): 1045-1050.
- Martin, M.C., Schneider, D., Bruton, C.J., Chater, K.F., and Hardisson, C. 1997. A *glgC* gene essential only for the first of two spatially distinct phases of glycogen synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **179**(24): 7784-7789.
- McQueen, D.A., and Schottel, J.L. 1987. Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *J. Bacteriol.* **169**(5): 1967-1971.
- McSweeney, C.S., Dulieu, A., and Bunch, R. 1998. *Butyrivibrio* spp and other xylanolytic microorganisms from the rumen have cinnamoyl esterase activity. *Anaerobe* **4**(1): 57-65.
- Melchers, L.S., Regensburg-Tuink, A.J., Schilperoort, R.A., and Hooykaas, P.J. 1989. Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. *Mol. Microbiol.* **3**(7): 969-977.
- Minyard, J.P., Jr, Roberts, W.E., and Cobb, W.Y. 1989. State programs for pesticide residues in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**(3): 525-533.
- Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T., and Kuninaga, S. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48 Pt 2**: 495-502.
- Mo, Y.Y., and Gross, D.C. 1991. Plant signal molecules activate the *syrB* gene, which is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **173**(18): 5784-5792.
- Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R.E., and Ryser, U. 1999. Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiol.* **119**(3): 1137-1146.
- Mousavi, S.A., Kjekken, R., Berg, T.O., Seglen, P.O., Berg, T., and Brech, A. 2001. Effects of inhibitors of the vacuolar proton pump on hepatic heterophagy and autophagy.



Biochim. Biophys. Acta **1510**(1-2): 243-257.

Murphy, R.R., and Haith, D.A. 2007. Inhalation health risk to golfers from turfgrass pesticides at three northeastern U.S. sites. Environ. Sci. Technol. **41**(3): 1038-1043.

Naso, B., Perrone, D., Ferrante, M.C., Zaccaroni, A., and Lucisano, A. 2003. Persistent organochlorine pollutants in liver of birds of different trophic levels from coastal areas of Campania, Italy. Arch. Environ. Contam. Toxicol. **45**(3): 407-414.

Natsume, M., Ryu, R., and Abe, H. 1996. Production of phytotoxins, concanamycins A and B by *Streptomyces sp.* causing potato scab. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **62**: 411-413.

Natsume, M., Yamada, A., Tashiro, N., and Abe, H. 1998. Differential production of the phytotoxins Thaxtomin A and Concanamycins A and B by potato common scab-causing *Streptomyces sp.* Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **64**: 202-204.

Norovsuren, Z., Zenova, G.M., Mosina, L.V. 2007. Actinomycetes in the rhizosphere of semidesert soils of Mongolia. Eurasian Soil Science **40**(4): 415-418.

Oparaeke, A.M., Dike, M.C., and Amatobi, C.I. 2006. Botanical pesticide mixtures for insect pest management on cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) walp plants - The legume flower bud thrips, Megalurothrips sjostedti Trybom. J. Sustainable Agric. **29**(1): 5-13.

Pant, K., Bilwes, A.M., Adak, S., Stuehr, D.J., and Crane, B.R. 2002. Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. Biochemistry **41**(37): 11071-11079.

Park, D.H., Kim, J.S., Kwon, S.W., Wilson, C., Yu, Y.M., Hur, J.H., and Lim, C.K. 2003. *Streptomyces luridiscabiei sp. nov.*, *Streptomyces puniscabiei sp. nov.* and *Streptomyces niveiscabiei sp. nov.*, which cause potato common scab disease in Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**(Pt 6): 2049-2054.

Pasco, C., Jouan, B., and Andrivon, D. 2005. Resistance of potato genotypes to common and netted scab-causing species of *Streptomyces*. Plant Pathol. **54**(3): 383-392.

Perez-Ruzafa, A., Navarro, S., Barba, A., Marcos, C., Camara, M.A., Salas, F., and Gutierrez, J.M. 2000. Presence of pesticides throughout trophic compartments of the food

web in the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Mar. Pollut. Bull.* **40**(2): 140-151.

Prowse, G.M., Galloway, T.S., and Foggo, A. 2006. Insecticidal activity of garlic juice in two dipteran pests. *Agricult. For. Entomol.* **8**(1): 1-6.

Punja, Z.K. 2006. Recent developments toward achieving fungal disease resistance in transgenic plants. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* **28**: S298-S308.

Quigley, N.B., and Gross, D.C. 1994. Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae pv syringae* - Conservation of the *syrb* and *syrd* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**(1): 78-90.

Romaniuk, K., Witkiewicz, W., and Spodniewska, A. 2004. Residues of HCH and DDT in linden flowers, bees, drones as well as maggots and *Varroa destructor* females. *Med. Weter.* **60**(12): 1352-1353.

Roush, R.T. 1993. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitology Today* **9**(5): 174-179.

Schade, M., and Lemmer, H. 2006. *In situ* enzyme activities of filamentous scum bacteria in municipal activated sludge wastewater treatment plants. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **34**(5): 480-490.

Scheible, W.R., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli, L., Somerville, S., Loria, R., and Somerville, C.R. 2003. An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *Plant Cell* **15**(8): 1781-1794.

Schmidt, H., and Hensel, M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**(1): 14-56.

Schmutz, A., Jenny, T., and Ryser, U. 1994. A caffeoyl fatty-acid glycerol ester from wax associated with green cotton fiber suberin. *Phytochemistry* **36**(6): 1343-1346.

- Semedo, L.T., Gomes, R.C., Bon, E.P., Soares, R.M., Linhares, L.F., and Coelho, R.R. 2000. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strains isolated from a forest soil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86**: 267-276.
- Shimizu, M., Yuda, N., Nakamura, T., Tanaka, H., and Wariishi, H. 2005. Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin. *Proteomics* **5**(15): 3919-3931.
- Shirokikh, I.G., Merzaeva, O.V., Zenova, G.M. 2006. Changes in the structure of the rhizosphere complex of actinomycetes in the ontogenesis of winter rye. *Eurasian Soil Science* **39**(6): 648-652.
- Sinclair, C.J., Boxall, A.B.A., Parsons, S.A., and Thomas, M.R. 2006. Prioritization of pesticide environmental transformation products in drinking water supplies. *Environ. Sci. Technol.* **40**(23): 7283-7289.
- Song, J., Lee, S.C., Kang, J.W., Baek, H.J., and Suh, J.W. 2004. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 203-209.
- Suleman, P., Al-Musallam, A., and Menezes, C.A. 2002. The effect of biofungicide Mycostop on *Ceratocystis radicola*, the causal agent of black scorch on date palm. *Biocontrol* **47**(2): 207-216.
- Takeuchi, T., Sawada, H., Tanaka, F., and Matsuda, I. 1996. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**(2): 476-479.
- Talbot, N.J. 2003. Aerial morphogenesis: enter the chaplins. *Curr. Biol.* **13**(18): R696-8.
- Tamburini, E., Perito, B., and Mastromei, G. 2004. Growth phase-dependent expression of an endoglucanase encoding gene (eglS) in *Streptomyces rochei* A2. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**(2): 267-272.

Tian, X.L., Cao, L.X., Tan, H.M., Han, W.Q., Chen, M., Liu, Y.H., Zhou, S.N. 2007. Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microb. Ecol.* 53(4): 700-707.

Tokala, R.K., Strap, J.L., Jung, C.M., Crawford, D.L., Salove, M.H., Deobald, L.A., Bailey, J.F., and Morra, M.J. 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5): 2161-2171.

Toth, L., Maeda, M., Tanaka, F., and Kobayashi, K. 2001. Isolation and identification of pathogenic strains of *Streptomyces acidiscabies* from netted scab lesions of potato tubers in Hokkaido (Japan). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 48(3-4): 575-585.

Tuncer, C., Saruhan, I., and Akca, I. 2007. Comparative toxicity of neem and seven insecticides on hazelnut weevil (*Curculio nucum* Col.: Curculionidae) with laboratory bioassays. *Asian Journal of Chemistry* 19(3): 2285-2294.

Vanderschuren, H., Stupak, M., Futterer, J., Gruissem, W., and Zhang, P. 2007. Engineering resistance to geminiviruses - review and perspectives. *Plant Biotechnology Journal* 5(2): 207-220.

Wach, M.J., Krasnoff, S.B., Loria, R., and Gibson, D.M. 2007. Effect of carbohydrates on the production of thaxtomin A by *Streptomyces acidiscabies*. *Arch. Microbiol.* .

Wang, Y.X., and Yuan, Y.J. 2005. Direct proteomic mapping of *Streptomyces luteoigriseus* Strain 103 and *cnn1* and insights into antibiotic biosynthesis. *J. Proteome Res.* 4(6): 1999-2006.

Wanner, L.A. 2006. A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States. *Phytopathology* 96(12): 1363-1371.

Wanner, L.A. 2004. Field isolates of *Streptomyces* differ in pathogenicity and virulence on radish. *Plant Dis.* 88(8): 785-796.

Westley, J.W., Liu, C.M., Sello, L.H., Evans, R.H., Troupe, N., Blount, J.F., Chiu, A.M., Todaro, L.J., and Miller, P.A. 1984. The structure and absolute configuration of the 18-membered macrolide lactone antibiotic X-4357B (concanamycin A). *J. Antibiot. (Tokyo)*

37(12): 1738-1740.

Whelan, K.F., Colleran, E., and Taylor, D.E. 1995. Phage inhibition, colicin resistance, and tellurite resistance are encoded by a single cluster of genes on the inchi2 plasmid R478. *J. Bacteriol.* **177**(17): 5016-5027.

Zhang, X., Clark, C.A., and Pettis, G.S. 2003. Interstrain inhibition in the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoeae*: purification and characterization of a highly specific bacteriocin and cloning of its structural gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(4): 2201-2208.