

Végéphyt – 12^e CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 10, 11 ET 12 DÉCEMBRE 2018

ACTINOBACTERIES ENDOPHYTES DU MAÏS (ZEA MAYS), PRESENCE, ISOLEMENT,
ACTIVITES ANTIFONGIQUES ET PERSPECTIVES DE BIOCONTROLE

D. CARON⁽¹⁾, P. JARA⁽²⁾ et F. MATHIEU⁽³⁾

⁽¹⁾ DIAGNOPHYT, 7 chemin de Saint Sernin 31290 Villenouvelle, France,
d.caron@diagnophyt.fr

⁽²⁾ SANOFI en partenariat avec Diagnophyt

⁽³⁾ LGC BioSyM, INP-ENSAT avenue de l'Agrobiopôle 31326 Castanet-Tolosan, France.

RÉSUMÉ

Les actinobactéries sont souvent source d'antagonisme contre les champignons phytopathogènes. La présence d'actinobactéries endophytes du maïs a été recherchées sur plantes prélevées au stade 3 feuilles en plein champ du Sud-Ouest de la France. Sur 30 plantes examinées 26 souches cultivables sur milieux gélosés ont été isolés et 12 espèces de *Streptomyces spp.* ont été identifiées par leur ADNr 16S. Un antagonisme contre *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* est observé sur six souches et 14 souches ont montré une activité contre au moins l'un d'eux. Des synthases *nrps* et *pks*, ont été trouvée sur ces souches, elles produisent des métabolites secondaires souvent impliquées dans les antagonismes entre microorganismes. Les propriétés endophytes ont été confortées avec réinoculation des souches par contact racinaire avec 8 ml de suspension de spores entre 10⁶ et 10⁷ CFU/ml sur plantules. Les souches ont été réisolées jusque dans les feuilles, démontrant pénétration et migration.

Mots-clés : *Streptomyces*, endophyte, *Fusarium*, *Aspergillus*, biocontrôle.

ABSTRACT

ENDOPHYTIC ACTINOBACTERIA OF ZEA MAYS, PRESENCE, ISOLATION, ANTIFUNGAL ACTIVITY AND BIOCONTROL PERSPECTIVES

Actinobacteria are often antagonism source against phytopathogenic fungi. Endophytic maize actinobacteria presence was investigated on plants withdrawn at the 3-leaf stage in an open field of South-West France. From 30 plants examined, 26 strains cultivable on agar media were isolated and 12 species of *Streptomyces spp.* have been identified by their 16S rDNA. Antagonism against *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* was observed on six strains and 14 strains showed activity against at least one of them. Synthases *nrps* and *pks*, were found on these strains, they produce secondary metabolites often involved in antagonisms between microorganisms. The endophytic properties were confirmed with reinoculation of the strains by root contact with 8 ml of spore suspension between 10⁶ and 10⁷ CFU / ml on seedlings. The strains were reisolated from up to the leaves, demonstrating penetration and migration.

Keywords: *Streptomyces*, endophyte, *Fusarium*, *Aspergillus*, biocontrol.

INTRODUCTION

Parmi la très nombreuse biodiversité invisible, de loin la plus importante sur la planète... nous avons abordé les microorganismes du microbiote endophyte du maïs. La notion de microbiote pour les plantes est assez récente, bien que des associations comme le mutualisme, les symbioses ou les mycorhizes soient étudiées depuis longtemps (Selosse 2018) et que la rhizosphère soit reconnue comme un lieu où les microorganismes échangent des substances avec les plantes (Cardon et Gage 2006). Le microbiote endophyte est en grande partie encore méconnu et n'est étudié que depuis peu (Kandel *et al.* 2017 ; Hardoim *et al.* 2015). Ces microorganismes vivent à l'intérieur de tout ou partie des plantes : racines, tiges, feuilles et organes reproducteurs. Les relations plantes-microorganismes des endophytes sont diversifiées et mal connues (Zhang *et al.* 2006). Jusqu'à maintenant, l'agriculture n'a considéré que la plante seule ou entourée par son environnement visible, mais il serait utile de la voir comme un tout avec les microbes qui l'accompagnent et notamment, avec ceux qui vivent à l'intérieur. Certains semblent n'avoir aucun effet sur les plantes et n'occuper qu'une position de commensal. D'autres conduisent à des fonctions de protection contre des agressions (agents pathogènes, ravageurs, herbivores...), ou favorisent la croissance des plantes (*PGPR*, *PGPB*...). D'autres encore sont des pathogènes latents comme *Fusarium verticillioides* dans le maïs ou la quenouille des graminées *Epichloe typhina*. La liste n'est pas limitative pour des effets neutres, positifs ou négatifs. On fonde beaucoup d'espoirs dans l'utilisation de ces microorganismes comme auxiliaires dans l'agriculture, dans la sécurité alimentaire et la qualité sanitaire des aliments.

Dans cette étude, nous avons évalué la présence et les propriétés antifongiques du microbiote endophyte actinobactérien du maïs. Les isollements ont été orientés vers les actinobactéries (anciennement actinomycètes) car c'est une classe produisant de nombreux métabolites secondaires souvent orientés dans les relations avec d'autres microorganismes (Dinesh *et al.* 2017). Des actinobactéries ont déjà été isolées de maïs ou d'autres plantes avec antagonisme contre des champignons phytopathogènes (Costa *et al.*, 2013, Evangelista-Martinez 2014, Shen *et al.* 2014). Et, d'autre part, nous avons déjà exploré avec succès les propriétés anti-mycotoxigéniques de *Streptomyces spp.* provenant du sol (Caron *et al.* 2014, 2015) contre *Aspergillus flavus* : AFB1 et *Fusarium graminearum* : DON, sur épis de maïs. Ces productions de mycotoxines pourraient s'accroître avec le réchauffement climatique sur les principales productions agricoles alimentaires de nos régions et dans le monde.

Des prélèvements en plein champ de maïs sains sur des variétés ordinairement cultivées dans le Sud de la France ont été effectués. Par une stérilisation de surface de feuilles, de pseudotiges et de racines nous avons isolé et purifié des colonies d'actinobactéries endophytes. Nous les avons identifiées puis caractérisées. Nous y avons recherché une activité antifongique pour lutter contre des agents pathogènes dans un objectif de biocontrôle.

MATERIEL ET MÉTHODE

PLANTES : MAÏS A 3 FEUILLES

Les plantes proviennent des essais "variétés" en plein champ de la station expérimentale d'Arvalis – Institut du végétal à Montesquieu Lauragais en Haute Garonne. Six variétés ont été utilisées : DKC 4814, DKC 4795, DKC 4522, PIXXTOL, P9838 et SY DARTONA semées en mai.

Cinq plantes saines ont été prélevées avec les racines un mois plus tard au stade 3 feuilles développées : BBCH 13.

Les échantillons ont été placés par variété dans des sacs de polyéthylène stériles et ramenés au laboratoire dans des glacières réfrigérées.

ISOLEMENT DES ACTINOBACTERIES ENDOPHYTES :

Nous avons utilisé le protocole de stérilisation de surface des tissus végétaux déjà décrit (Taechowisan *et al.* 2003).

Les plantes entières ont été rincées à l'eau courante sous le robinet. Les feuilles, les pseudo tiges et les racines ont ensuite été séparées et coupées en petits morceaux d'environ 1 cm de long et quelques mm sur la largeur selon l'organe.

La stérilisation de surface est effectuée par des bains successifs en tubes stériles fermés. Tween20 à 0,2 % : 2 mn. Puis hypochlorite de Na à 2 % : 15 mn. Puis eau stérile : 5 mn. Et enfin éthanol à 70 % : 15mn. Les morceaux sont séchés sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique) à flux laminaire stérile avant d'être réduits en morceaux plus petits avec des scalpels stériles pour déposer 10 à 30 morceaux selon la taille sur 4 milieux de culture en boîtes de Petri de 9 cm Ø.

Milieux de culture :

HVA : Acide Humique – Vitamines – Agar (Hayakawa and Nonomura 1987). Ce milieu permet de sélectionner un large ensemble de genres d'actinomycètes.

SCA : Amidon – caséine Agar. (Küster et Williams 1964). Ce milieu est plus spécialisé sur les streptomycètes.

ISP2 : yeast, malt extract, glucose, agar (milieu de référence de l'International Streptomyces Project) (Shirling et Gottlieb 1966). Ce milieu est plus adapté à la culture des Streptomyces.

ISP2 salin à 2 % de NaCl. Ce milieu élimine un grand nombre d'espèces de microorganismes ne pouvant pas vivre dans des milieux concentrés en sel. Beaucoup de Streptomyces vivent dans ce type de milieu et y sont plus spécialement sélectionnés.

Tous ces milieux sont complétés à 15 µg/ml d'acide nalidixique et à 50 µg/ml de cycloheximide pour restreindre la croissance des bactéries gram négatives et des champignons. Ils sont préparés à l'eau du robinet qui favorise parfois la sporulation. Les boîtes sont incubées 21 jours à 28°C et inspectées tous les 3 jours à la recherche de colonies de type morphologique actinobactérien (forme, couleur, hauteur, diamètre, marge, surface, opacité, texture).

Les colonies obtenues ont été purifiées par des répliquations en stries sur milieu ISP2 sans antibiotique. Les souches pures ont été conservées sous forme de suspension de spores ou de mycélium à -20°C.

Une actinobactérie précédemment isolée de racines de *Panicum turgidum* : PT1 à 99,14 d'homologie avec l'espèce *Streptomyces enissocaecilis* (Goudjal et al. 2013), a été incluse dans les tests de caractérisation des propriétés des souches en tant que référence extérieure dans cette étude.

IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES ISOLATS :

L'extraction d'ADN a été réalisée sur des colonies de 3 jours à 28°C sur milieu agar ISP-2 préparé à l'eau du robinet. L'ADN génomique a été extrait selon Liu et al. (2000). La quantification des acides nucléiques a été réalisée avec un Nanodrop 2000 selon les instructions de Thermo Scientific. L'amplification PCR de la région 16S a été réalisée avec un C1000 Touch MyCycler de Bio-Rad. L'amorce F était la 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et l'amorce R était la 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') pour obtenir des séquences longues complètes de l'ADNr 16S. La réaction de PCR a été effectuée avec le kit MP Biomedical : 50 ng d'ADN matrice dans 50 µL de tampon de réaction (1x) comprenant du MgCl₂, 0,5 µmol/L de chacune des amorces, 0,2 mmol/L de désoxyribonucléotides (dNTP) et 0,3 µL de Taq DNA polymérase à 5 u/µL. Les échantillons ont été soumis à une dénaturation initiale de 4 min suivi de 30 cycles composés de 94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 2 min et d'une extension finale de 72°C pendant 1 min. Des amplifiats d'environ 1500 pb ont été détectés par électrophorèse en gel d'agarose et visualisés par fluorescence UV après coloration au GelRed®.

Les amplifiats PCR ont été séquencés 2 fois par Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK). Les ADNr 16S ont été comparés avec la base de données EzTaxon basée sur NCBI Genbank, mais spécialisées pour les procaryotes (Chun et al 2007) et comportant en outre les séquences de souches non cultivables. Des séquences de gènes 16S ADNr similaires ont été trouvés et la similarité des appariements a été calculée par EzTaxon (Stackebrandt et Ebers 2006).

REISOLEMENT D'ACTINOBACTERIES A PARTIR DE PLANTES INOCULEES EXPERIMENTALEMENT :

Des graines de maïs SY Dartona, Pixxtol et DKC 4814 lavées à l'eau du robinet stérile et stérilisées en surface par de l'hypochlorite de Na à 2 % pendant 5 min ont été mises en germination sur des papiers plissés stériles pendant 3 jours à l'obscurité à 30°C. Les plantes germées ont été transplantées dans des tubes Corning de 50 ml contenant un mélange stérile de sol et de perlite (2/1 v/v). Ils ont été inoculés le lendemain par contact racinaire avec chacun des actinomycètes isolés précédemment et la souche de référence PT1. Les inoculations ont été effectuées en 3 répétitions avec 8 ml de suspension de spores en tampon phosphate versés dans le sol des tubes entre 10⁶ et 10⁷ CFU/ml, sauf pour la souche ZM25 à sporulation faible qui a été réalisée à l'aide d'une suspension d'agrégats mycéliens de même concentration. Une série témoin sans inoculum fait partie du dispositif. Les plantes ont été mises en croissance en phytotron : éclairage 4400 lux à hauteur des plantes, 1 tube rouge fluorescent Osram L58W/77Fluora pour 3 tubes blancs Philips Master TL-D58W/865 G9J/N, rythme Jour-nuit : 16h/8h, 28°/22°C, HR 55/80 %. Arrosage : réajustement à 35 ml à l'eau du robinet stérile 2 fois par semaine. Après 30 jours de croissance en phytotron, les actinobactéries endophytes ont été isolées à partir des feuilles, pseudotiges et racines comme décrit précédemment. Les souches réisolées ont été comparées aux souches inoculées par des critères visuels et le séquençage de l'ADNr 16S comme décrit précédemment.

SOUCHES DE REFERENCES FONGIQUES :

Des souches fongiques de référence produisant l'aflatoxine AFB1 et le DON ont été utilisés.

Aspergillus flavus NRRL 62477 a été isolé de poivron marocain (El Mahgubi *et al.* 2013).

A. flavus NCPT180 a été isolé de manioc béninois (Adjovi *et al.* 2014).

A. parasiticus NCPT 217 a été isolé de noix. Ces 3 souches ont été fournies par Dr. Olivier Puel, Toxalim, INRA, Saint Martin du Touch, France.

Fusarium graminearum INRA 155 a été isolé de maïs dans le Sud-Ouest de la France et a été fourni par Dr. Christian Barreau MycSA, INRA Bordeaux, France.

Fusarium verticillioides BRFM 2251 a été obtenu au CIRM (Centre International de Ressources Microbienne), INRA, France.

ACTIVITE ANTIFONGIQUE IN VITRO :

L'activité antagoniste *in vitro* contre les agents pathogènes fongiques du maïs par les actinobactéries isolées précédemment a été réalisée par des tests de confrontations duales en boîtes de Petri à 3 répétitions (Evangelista-Martinez 2014). Trois souches d'actinobactéries et un cube d'agar de mycélium fongique ont été inoculés en même temps en boîtes de Petri sur milieu PDA et incubés à 28°C. Le diamètre des zones d'inhibition a été évalué après 5 jours d'incubation. La taille des zones d'inhibition entre le champignon et les souches d'actinobactéries a été évaluée selon l'échelle suivante :

+++ , >20 mm ; ++ , 11 – 19 mm ; + , 2 – 10 mm ; - , 0 mm.

Les peptides non ribosomiques (*nrp*) et les polycétones (*pk*) sont des métabolites secondaires qui ont très souvent des activités inhibitrices antifongiques ou antibactériennes. Nous avons recherché les synthases qui les produisent (*nrps* et *pks*). Pour amplifier les séquences des gènes *nrps* et *pks* de l'ADN des meilleures souches antifongiques, nous avons utilisé respectivement les oligonucléotides dégénérés A3F/A7R et KS α /KS β (Ayuso *et al.* 2005). Les mélanges réactionnels comprenaient 50ng d'ADN, 5 pmol de chaque oligonucléotide, 200 mM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂, tampon 1x et 1 U de Platinum Taq polymérase (Invitrogen Life Technologies) pour un volume final de 25 μ l. Les conditions de réaction étaient les suivantes : 4 min de dénaturation à 94°C suivi de 30 cycles de 35 s à 94°C, 40 s à 55°C, et 2 min à 72°C. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 % et révélés par fluorescence au GelRed[®].

DETECTION D'ACTIVITE LYTIQUE ENZYMATIQUE EXTRACELLULAIRE ET CROISSANCE SUR MILIEU ISP2 ET ISP2 SALIN :

Activités cellulase et xylanase :

Les souches d'actinobactéries ont été criblées pour leur capacité à produire des enzymes hydrolytiques cellulases et xylanases pouvant participer à la pénétration dans les plantes. Des tests sur boîtes de Petri ont été réalisés avec 1,5 % de carboxyméthylcellulose (CMC) ou 0,5 % de xylane, dissous dans un milieu à base de sel. Les boîtes ont été divisées en 6 secteurs. Une goutte des souches a été déposée au centre de chaque secteur sur les boîtes de CMC et les boîtes de xylane puis incubées à 28°C pendant 5 jours. Après incubation, une solution à 0,1 % de rouge Congo a été ajoutée à la surface des boîtes qui ont ensuite été contrastées par du NaCl 1M pendant 15 à 20 mn. Les zones où le xylane ou la cellulose ont été hydrolysés apparaissent plus claires autour de la colonie.

Activité chitinase :

Pour la détection de l'activité chitinase pouvant participer à l'inhibition fongique, nous avons utilisé des milieux sur boîtes de Petri en agarose 20g/L avec 1 % de chitine colloïdale : 20 g de chitine de carapace de crabe (Sigma) a été dissoute dans 200 ml d'HCl concentré agité pendant 60 mn. La chitine a été précipitée en suspension colloïdale en ajoutant lentement 2 L d'eau froide puis en laissant reposer toute une nuit à 4°C. Ce mélange a été filtré à travers 2 épaisseurs de filtre à café disposés sur un entonnoir de Buchner (130 mm) ajusté sur une fiole à vide. Approximativement 3 l d'eau du robinet ont été utilisés pour nettoyer le gâteau de chitine colloïdale afin de l'amener à un pH de 7,0 au papier pH. La chitine colloïdale obtenue a été pressée pour éliminer l'eau résiduelle puis a été stérilisée à l'autoclave pendant 20 mn à 121°C. Elle est conservée à 4°C jusqu'à utilisation sous cette forme de gâteau humide. A partir de 20g de chitine sèche, nous avons obtenu environ 200g de chitine colloïdale humide. Le halo clair autour de la colonie a ensuite été mesuré.

Tolérance au sel NaCl:

Le NaCl a été ajouté au milieu de référence de culture des *Streptomyces* ISP2 de façon à obtenir les proportions suivantes : 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 % et 7 %.

Les boîtes de Petri ont été divisés en 12 carrés et une goutte de spores a été déposée au centre de chaque secteur puis incubé à 28°C pendant 5 jours. La lecture a été faite par présence ou absence de la colonie inoculée.

RESULTATS

RECHERCHE D'ACTINOBACTERIES ENDOPHYTES DU MAÏS : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION.

La sélection a d'abord été opérée sur des critères phénotypiques visuels des colonies puis la détermination a été effectuée par analyse moléculaire de l'ADNr 16S.

A partir des organes stérilisés en surface des 6 variétés de maïs, nous avons obtenu 26 isolats internes d'aspect morphologiques correspondant aux actinobactéries. Elles ont été dénommées de ZM1 à ZM26 en référence à leur provenance de *Zea mays* (Tab. 1).

Trois souches ont été isolées à partir des feuilles. Cinq souches proviennent du niveau de la pseudotige et 18 proviennent des racines.

Après purification des isolats leur ADNr 16S d'environ 1500 pb a été amplifié et séquencé. Vingt souches ont été identifiées au genre *Streptomyces* avec un pourcentage d'identité supérieur à 98,65 %, 1 souche au genre *Nonomurea* et 1 au genre *Nocardia* selon les critères de similarité (Chun *et al.* 2007).

Tableau I : classification des souches isolées selon la base de données EZBioCloud.

Table I: classification of isolated strains according to the database EZBioCloud.

Royaume	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Streptomycetales	Streptomycetaceae	Streptomyces
			Streptosporangiales	Streptosporangiaceae	Nonomurea
			Corynebacteriales	Nocardiaceae	Nocardia

Vingt souches correspondent à une espèce de *Streptomyces* connue, tandis que 6 souches qui ont entre 98 % et 98,65 % de similarité sont provisoirement localisés parmi des *Streptomyces spp.*, *Nonomurea sp.* et *Nocardia sp.* Ils pourraient être des souches ou des espèces non encore répertoriées ou inconnues (Tab. II).

ACTIVITE ANTAGONISTE *IN VITRO* DES ISOLATS OBTENUS CONTRE LES PARASITES FONGIQUES DU MAÏS :

Parmi les 26 isolats d'actinobactéries endophytes 14 souches ont présenté une activité anti-fongique contre au moins l'un des agents pathogènes testés (Tab. III).

Six souches ont montré une activité sur tous les agents pathogènes testés avec plus ou moins d'importance : ZM1, ZM3, ZM15, ZM19, ZM20 et ZM21.

La souche ZM3 a montré l'activité anti-fongique la plus élevée.

La souche endophyte de référence PT1 a aussi montré un large spectre d'activités anti-fongique mais inférieures à celles de la souche ZM3.

La recherche de présence des gènes *nrps* et *pks* des souches antagonistes dans la mesure où ils sont impliqués dans la biosynthèse d'importants antibiotiques produits par les actinomycètes a été effectuée. Les produits d'amplification de 500 pb du gène *pks* et de 700 pb du gène *nrps* ont confirmé la présence de ces gènes dans les souches antagonistes isolées dans des maïs du Sud de la France.

CROISSANCE DES SOUCHES ISOLEES DU MAÏS :

Les 26 souches et la référence ont été cultivées sur milieu ISP2. De plus, du NaCl a été incorporé au milieu ISP2, de 1 % à 7 %, les actinobactéries étant connues pour avoir assez souvent la capacité à pousser sur des milieux salins. Les résultats sont présentés au tableau III. Les 26 souches et la référence PT1 poussent parfaitement sur le milieu de référence ISP2 et tolèrent 2 % de NaCl. Deux souches ZM1 et ZM4 tolèrent jusqu'à 6 % de NaCl. Les autres sont intermédiaires.

CARACTERISATION ET PROPRIETES *IN VITRO* DES ISOLATS OBTENUS :

Activités hydrolytiques cellulase, xylanase et chitinase :

Les souches d'actinobactéries ont été testées pour leur capacité à produire 3 types d'enzymes hydrolytiques : cellulases, xylanases et chitinases qui peuvent participer à la pénétration dans les plantes, ou à l'inhibition des champignons (Wang *et al.* 2013).

La production de ces enzymes a été assez variée. La souche ZM26 n'a produit aucune dégradation alors que 10 autres souches ont dégradé les 3 produits.

La dégradation des celluloses et hémicelluloses a été produite par 26 des 27 souches traitées avec en moyenne des effets forts pour la dégradation des xylanes et moyens pour la dégradation de la cellulose. Seule la souche ZM26 n'a pas eu d'effet sur ces composants.

Tableau II : Identification des actinobactéries endophytes isolés des six cultivars de *Zea mays* par séquençage de l'ADNr 16S.

Table II: Identification by 16S rDNA gene sequencing of the 26 endophytic actinomycetes isolated from six cultivars of *Zea mays*

Strain Isolate	<i>Zea mays</i> cultivar	Tissue	Isolation medium	Closest phylogenetic relative (EzTaxon database)	% identity*
ZM1	P9838	Roots	SCA	<i>Streptomyces pratensis</i> ch24	99.71
ZM2	P9838	Roots	ISP2	<i>Streptomyces albiflavescens</i> n20	98.29
ZM18	P9838	Roots	ISP2	<i>Streptomyces pratensis</i> ch24	98.03
ZM19	P9838	Roots	SCA	<i>Streptomyces pratensis</i> ch24	99.64
ZM3	SY Dartona	Leaves	SCA	<i>Streptomyces mordarskii</i> NRRL B-1346	99.43
ZM4	SY Dartona	Stem	SCA	<i>Streptomyces neopectinius</i> KNF 2047	99.14
ZM5	SY Dartona	Roots	SCA	<i>Streptomyces caeruleatus</i> GIMN4	99.07
ZM6	PIXXTOL	Leaves	Saline ISP2	<i>Streptomyces caeruleatus</i> GIMN4	99.57
ZM7	PIXXTOL	Stem	Saline ISP2	<i>Streptomyces aldersoniae</i> NRRL 18513	99.00
ZM8	PIXXTOL	Roots	SCA	<i>Streptomyces coeruleus</i> ISP 5146	99.07
ZM9	PIXXTOL	Roots	HVA	<i>Streptomyces neopectinius</i> KNF 2047	98.35
ZM25	PIXXTOL	Stem	HVA	<i>Nonomuraea guangzhouensis</i> NEAU-ZJ3	98.03
ZM26	PIXXTOL	Leaves	ISP2	<i>Nocardia pseudovaccinii</i> DSM 43406	98.02
ZM10	DKC 4814	Stem	ISP2	<i>Streptomyces rhizophilus</i> JR-41	98.74
ZM11	DKC 4814	Stem	ISP2	<i>Streptomyces rishiriensis</i> NBRC 13407	98.88
ZM12	DKC 4814	Roots	Saline ISP2	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178	98.17
ZM13	DKC 4814	Roots	HVA	<i>Streptomyces rhizophilus</i> JR-41	99.15
ZM20	DKC 4814	Roots	Saline ISP2	<i>Streptomyces rishiriensis</i> NRRL 13407	98.87
ZM21	DKC 4814	Roots	SCA	<i>Streptomyces acidiscabies</i> ATCC 49003	99.01
ZM23	DKC 4814	Roots	HVA	<i>Streptomyces bellus</i> ISP5185	99.00
ZM14	DKC 4795	Roots	SCA	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178	99.02
ZM15	DKC 4795	Roots	HVA	<i>Streptomyces acidiscabies</i> ATCC 49003	99.02
ZM16	DKC 4522	Roots	HVA	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178	99.23
ZM17	DKC 4522	Roots	ISP2	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178	99.01
ZM22	DKC 4522	Roots	ISP2	<i>Streptomyces zaomyceticus</i> NBRC 13348	99.22
ZM24	DKC 4522	Roots	ISP2	<i>Streptomyces venezuelae</i> NBRC 12595	98.68

* Pourcentage d'homologie avec l'ADNr 16S de l'espèce la plus proche calculée par la base de données de EzTaxon.

* The percentage identity with the 16S rDNA sequence of the closest phylogenetic relative calculated by EzTaxon database.

Tableau III : propriétés hydrolytiques et inhibitrices des souches d'actinobactéries isolées du maïs.

Table III: hydrolytic and inhibitory capacity of actinobacteria isolated from maize.

	Activity:			%NaCl*	Antagonistic activity against:			
	cellulase	xylanase	chitinase		<i>Aspergillus flavus</i> **	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
ZM1	++	++++	+	6	+/-	+/-	+	+
ZM2	+	+++	-	3	-	-	-	-
ZM3	++	++++	-	5	++	++	+++	++
ZM4	+	+++	-	6	+/-	-	+	-
ZM5	+	+++	-	3	-	-	-	-
ZM6	+	+++	+/-	4	-	-	+	+
ZM7	++	+++	-	5	-	-	+	-
ZM8	+	++++	+/-	≥ 5	-	-	-	-
ZM9	++	++	-	4	-	-	-	-
ZM10	-	++	-	2	+/-	-	-	-
ZM11	+	ND	-	2	+/-	-	++	+
ZM12	++	++++	-	3	-	-	-	-
ZM13	-	++	+	3	+/-	-	-	+/-
ZM14	++	+++	-	4	-	-	-	-
ZM15	+	+++	+	4	+	+	+	+
ZM16	++	++++	-	2	-	-	-	-
ZM17	++	++++	-	4	-	-	-	-
ZM18	+	+++	-	5	-	-	-	-
ZM19	++	++++	+	5	+	+/-	+	+
ZM20	++	++++	+	2	+	+/-	++	+/-
ZM21	++	+++	+	3	+	+	+/-	+/-
ZM22	++	++	-	5	-	+/-	-	+
ZM23	++	++++	+/-	5	-	-	-	-
ZM24	+++	-	+/-	5	-	+/-	-	+
ZM25	+	++	-	ND	-	-	-	-
ZM26	-	-	-	2	-	-	-	-
PT1	++	++++	+/-	5	+	+/-	+++	+

Activity of enzymes: -, Negative; ±, the hydrolysis ratio between 0 and 1; +, 1 and 2; ++, between 2 and 3; +++, between 3 and 4; +++++, >4

* Max growth permissive NaCl concentration (w/v) in ISP2 medium

**For *A. flavus*, two strains were tested and gave the same results of inhibition. The width of inhibition zones between the fungi and the actinomycete colonies was evaluated as follows: +++, >20 mm; ++, 11-19 mm; +, 2- 10 mm; ±, 1 mm; -, 0 mm.

ND: not determined.

Activité des enzymes : - négatif ; ± taux d'hydrolyse entre 0 et 1 ; + entre 1 et 2 ; ++ entre 2 et 3 ; ++++ entre 3 et 4 ; +++++ > 4.

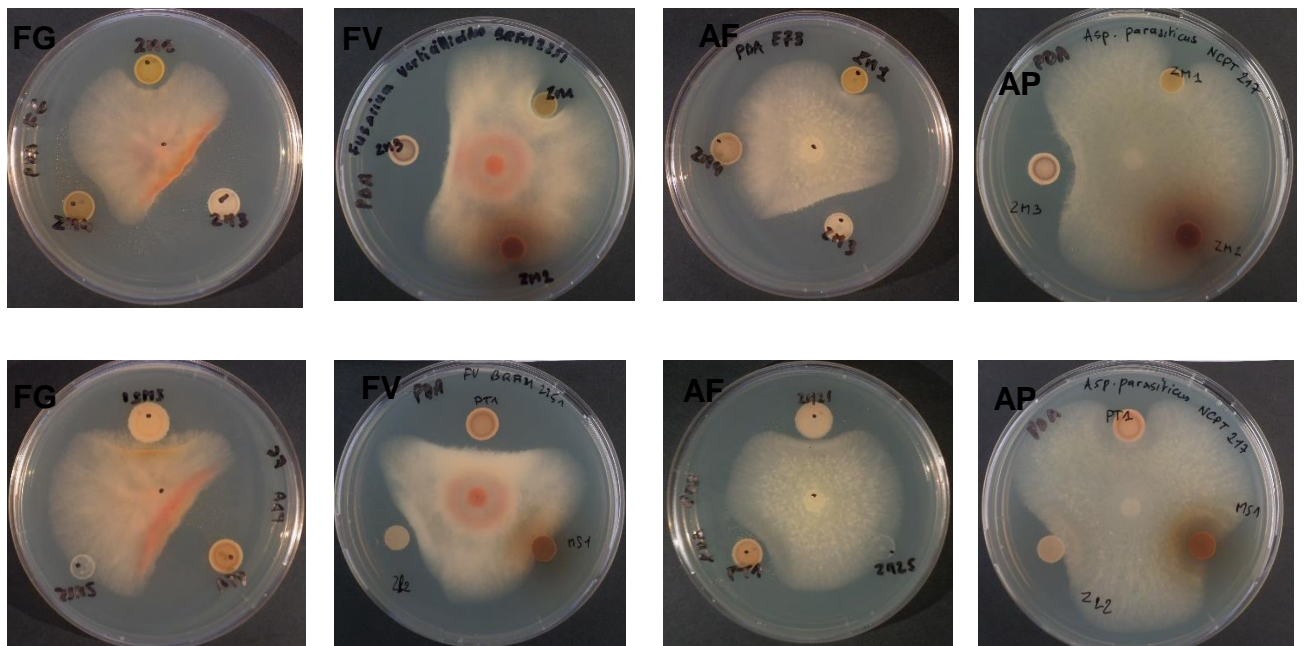
* Concentration maximale admissible de NaCl (p / v) dans le milieu ISP2.

** Pour *A. flavus*, deux souches ont été testées et ont donné les mêmes résultats d'inhibition. La largeur des zones d'inhibition entre les champignons et les colonies d'actinomycètes a été évaluée comme suit : ++++ > 20 mm ; ++ 11-19 mm ; + 2-10 mm ; ± 1 mm ; - 0 mm.

Figure. 1 : Activité antagoniste *in vitro* des souches de *Streptomyces* ZM3 (1^{ère} rangée) et PT1, référence externe (2^{ème} rangée), contre 4 agents pathogènes du maïs. Les spores de 3 souches de *Streptomyces* sont déposées sur le pourtour et celles du champignon au centre, en même temps sur PDA. La croissance radiale des champignons a été évaluée après 5 jours d'incubation à 28° C. Les champignons pathogènes du maïs sont de gauche à droite : FG, *Fusarium graminearum* I155 ; FV, *Fusarium verticillioides* BRFM2251 ; *Aspergillus flavus* NRRL 62477 ; AP, *Aspergillus parasiticus* NCPT 127.

Figure. 1: In vitro antagonistic activity of *Streptomyces* strain ZM3 (first row) and PT1 (2nd row) against 4 fungal maize pathogens. Three *Streptomyces* strains on the sides and fungal spores at the center were inoculated at the same time on PDA plates. Radial mycelia growth of fungi was determined after 5 days of incubation at 28°C.

Fungal maize pathogen from left to right: FG, *Fusarium graminearum*.I155; FV, *Fusarium verticillioides* BRFM2251; AF, *Aspergillus flavus* NRRL 62477.; AP, *Aspergillus parasiticus* NCPT 217



EVALUATION DE LA CAPACITE ENDOPHYTIQUE DES ISOLATS :

La capacité à coloniser les plantes et à persister à l'intérieur a été testée par mise en contact des racines avec les différentes souches. L'isolement des endophytes présents dans les plantes après 30 jours d'incubation a été effectué comme précédemment.

Les contrôles ont montré que les bactéries inoculées étaient encore présentes dans le milieu perlite/sol des tubes après 30 jours.

Le témoin sans inoculum avec uniquement le tampon phosphate n'a pas révélé d'endophyte présent naturellement dans les graines.

Le contact racinaire avec les isolats ZM ont permis de réisoler des endophytes dans les racines, les pseudotiges et les feuilles.

La morphologie des endophytes réisolés était identique à celle des souches inoculées.

DISCUSSION

Des actinobactéries endophytes ont été trouvées naturellement présentes dans le maïs du plein champ.

Les tests montrent que ces microorganismes endophytes du maïs sont assez fréquents : nous avons isolé 26 souches à partir d'un lot restreint de 30 plantes sur une parcelle agricole. La fréquence naturelle du microbiote endophyte total du maïs est vraisemblablement plus élevée, car nous n'avons sélectionné que les actinobactéries cultivables sur milieux gélosés et avons ignorés les autres procaryotes et les champignons développés sur ces milieux. La densité de ces actinobactéries semble cependant assez faible car le nombre de morceaux d'organes (racines, pseudotiges ou feuilles) présentant une actinobactérie cultivable est d'environ 1 sur 20. Ce sont les racines qui sont les plus colonisées : 73 %. Ensuite immédiatement au-dessus du sol viennent les pseudotiges:15 % puis loin du sol, les feuilles : 12 %. On distingue donc très nettement la colonisation du niveau racinaire, plus importante par rapport aux organes situés au-dessus du sol (73/27 %). Les isolats obtenus aux niveaux aériens de la plante pourraient provenir de la phyllosphère ou plus probablement de la mobilité des endophytes racinaires vers les parties supérieures de la plante. En effet, aux tests de réinoculation et de réisolement, nous avons obtenu de nombreuses colonies au niveau des feuilles correspondant aux souches inoculées par contact racinaire. Ces souches montrent ainsi leur capacité à s'introduire par les racines et coloniser les parties aériennes des plantes. Les tests d'isolement à partir de graines désinfectées superficiellement (témoins non inoculés des tests de réintroduction) suggèrent soit, que ces endophytes n'atteignent pas ou difficilement la spermosphère soit, que les traitements phytosanitaires reçus en production de semences les aient inhibés ou détruits. La reproduction en boucle entièrement interne accompagnant la reproduction des plantes n'est peut-être pas le moyen naturel de colonisation durable par ces endophytes. Pourtant elle n'est pas à exclure (Compant *et al.* 2011), des observations à une échelle plus large devraient être effectuées pour s'en assurer car ce mode de reproduction pourrait être utilisable en agriculture.

Leur recherche dans les sols devrait aussi nous indiquer leur niveau de présence près des racines de maïs ou loin d'elles.

Les *Streptomyces* sont largement représentés dans les isolats obtenus. Les espèces ont été déterminées après séquençage des ADNr 16S (~1500 pb) par confrontation avec la base de données EzTaxon.

Les 20 souches de *Streptomyces spp.* déterminées avec le plus de certitude car, présentant des homologies supérieures à 98,65% (Stackebrandt et Ebers 2006), correspondent à 12 espèces de *Streptomyces spp.* Cette proportion montre la diversité des espèces rencontrées en endophytes dans le maïs. Il est probable que de nouveaux isolements révéleraient encore d'autres espèces.

Les homologies d'appariement plus faibles comprises entre 98 et 98,65 % pourraient correspondre à des souches non encore répertoriées, ou même à de nouvelles espèces à déterminer. Ce qui ne serait pas très étonnant, car la diversité des espèces procaryotes dans le sol ou dans les plantes est encore largement inexploree. Une souche est proche d'un *Nonomurea sp.*, une autre d'un *Nocardia sp.* et les 4 dernières de *Streptomyces spp.*, mais il ne faut pas accorder trop d'importance à ces déterminations provisoires dans la mesure où les proportions d'appariements bien que proche du consensus de 98,65 % sont en dessous de ce consensus butoir. Des investigations plus poussées devraient être réalisées sur ces isolats pour en assurer une détermination plus pertinente.

Des activités inhibitrices contre *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. graminearum* et *F. verticillioides* ont été détectées. Cet antagonisme pourrait être utilisé favorablement en agriculture contre la fusariose du maïs à *F. verticillioides* qui présente une phase endophyte (Pamphile et Azevedo 2002) avant que des conditions favorables initient la phase pathogène. La fusariose des tiges et des épis par *F. graminearum*, les moisissures des épis par *A. flavus* et *A. parasiticus* pourraient aussi être combattues par ces actinomycètes endophytes. Ces agents pathogènes et moisissures sont toxigènes (trichothécènes, fumonisines, aflatoxines). La production des toxines pourrait être diminuée ou évitée par l'action de ces endophytes, comme nous l'avons déjà constaté dans une autre étude avec des actinobactéries du sol (Caron *et al.* 2015).

Ces activités antagonistes pourraient provenir des métabolites secondaires synthétisés par les *nrrps* ou/et les *pks*. La présence de ces gènes ayant été détectée par PCR sur les souches testées.

Les métabolites produits par ces synthèses ont souvent été qualifiés dans la littérature comme des antagonistes de bactéries ou de champignons (Caboche *et al.* 2010, Hasani *et al.* 2014).

D'autres produits à activité antagoniste comme la dégradation de la chitine des champignons par les chitinases ont été détectées à de faibles niveaux sur 11 des 27 souches testées. Ce n'est donc pas l'élément principal de l'antagonisme contre les champignons phytopathogènes. D'autant plus que la souche ZM3 développant le plus d'activité antagoniste ne montre pas d'activité chitinase. L'hypothèse des *nrps* et des *pks* reste donc une source probable à envisager.

La régulation des propriétés de dégradation de la cellulose et des hémicelluloses pourrait être impliquée dans la pénétration des actinobactéries dans les plantes. L'ensemble des souches testées (26/27) possèdent ces activités à un niveau important, ce qui en fait de bons candidats, mais il faut aussi envisager d'autres propriétés puisqu'une souche (ZM 26) n'a pas cette fonction. Ou bien cette fonction est désactivée dans nos conditions de culture.

CONCLUSION

Les actinobactéries endophytes du maïs avec des propriétés d'antagonisme fongiques sont une réalité.

Les plantes de maïs à 3 feuilles que nous avons prélevé du champ nous ont permis de récolter 20 souches de *Streptomyces spp.* cultivables sur milieux de culture correspondant à 12 espèces différentes. Six autres souches posent questionnement, car elles n'ont pas de correspondance répertoriée suffisamment proches des espèces et souches enregistrées dans les bases de données génétiques. La connaissance de la diversité des actinobactéries du sol et des plantes reste encore très fragmentaire. Il y a donc là un vivier potentiel important pour la mise en pratique et la recherche d'auxiliaires de Protection des Cultures. En ce qui concerne nos souches, l'étude a démontré leurs propriétés antagonistes de champignons phytopathogènes avec des caractères d'activité de métabolisme secondaires *nrp*, *pk* et chitinase connus pour être souvent engagés dans ces antagonismes. Leurs propriétés de pénétration et de migration dans les plantes à partir de contact racinaire ont aussi été démontrées. Il reste à explorer l'importance de leur propagation à l'intérieur des plantes. Jusqu'à quel niveau de la plante elles peuvent migrer ? Est-ce qu'elles peuvent se multiplier dans la plante ? Est-ce qu'elles peuvent parvenir jusqu'aux épis du maïs et être embarquées dans les graines ? Combien de temps peuvent-elles vivre dans les plantes ? Quelle est leur innocuité sur les humains et sur l'environnement, bien qu'elles soient naturellement présentes dans notre environnement ? Autant de questions qui sont utiles à la mise au point de l'utilisation de ces microorganismes. La phase suivante est de cribler leur efficacité en serre, puis de les expérimenter en plein champ.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du projet AFLAFREE.

Nous remercions Philippe Anson, Cédric Cassan et Younès Bouchiba pour l'aide qu'ils nous ont apporté dans la réalisation des manipulations. Nous remercions Arvalis – Institut du végétal et en particulier Jean Pierre Lachurié et Pierre Esparbier pour la fourniture des plantes et des semences. Nous remercions Olivier Puel, et Christian Barreau, INRA pour la fourniture des agents phytopathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

- Adjovi, Y. C. S., Bailly S., Gnonlonfin B. J. G., Tadrict S., Querin A., Sanni A., Oswald I. P., Puel O., et Bailly J. D., 2014. « Analysis of the contrast between natural occurrence of toxigenic *Aspergilli* of the *Flavi* section and aflatoxin B1 in cassava ». *Food Microbiology* 38 (avril): 151-59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.005>.
- Ayuso A., Clark D., González I., Salazar O., Anderson A., et Genilloud O., 2005. « A Novel Actinomycete Strain De-Replication Approach Based on the Diversity of Polyketide Synthase and Nonribosomal Peptide Synthetase Biosynthetic Pathways ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 67 (6): 795-806. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1828-7>.
- Caboche S., Leclère V., Pupin M., Kucherov G. et Jacques P., 2010. « Diversity of Monomers in Nonribosomal Peptides: Towards the Prediction of Origin and Biological Activity ». *Journal of Bacteriology* 192 (19): 5143-50. <https://doi.org/10.1128/JB.00315-10>.

- Caron D, Anson P., Jara P., Verheecke C, Mathieu F., 2015. Utilisation d'actinomycètes en biocontrôle de l'aflatoxine B1 produite par *Aspergillus flavus* sur épis de maïs en serre. *AFPP – Annales 12^e conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours*.
- Caron D, Verheecke C, Mathieu F., 2014. "Aflatoxins on maize cobs inoculated with *Aspergillus flavus* in greenhouse". *ISM International Mycotoxin Conference in Beijing 2014*.
- Cardon, Z. G., and Gage D. J., 2006. "Resource Exchange in the Rhizosphere: Molecular Tools and the Microbial Perspective." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37 (1):459–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110207>.
- Chun, J., Lee J.-H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K., et Lim Y.-W., 2007. « EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2259–2261. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64915-0>.
- Compant, Stéphane, Birgit Mitter, Juan Gualberto Colli-Mull, Helmut Gangl, and Angela Sessitsch. 2011. "Endophytes of Grapevine Flowers, Berries, and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria, Comparison with Other Plant Parts, and Visualization of Niches of Colonization." *Microbial Ecology* 62 (1):188–97. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9883-y>.
- Costa, F G., Zucchi T D. et de Melo I S., 2013. « Biological control of phytopathogenic fungi by endophytic actinomycetes isolated from maize (*Zea mays* L.) ». *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56 (6): 948-55. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000600009>.
- Dinesh, Raghavan, Veeraraghavan Srinivasan, Sheeja T. E, Muthuswamy Anandaraj, et Hamza Srambikkal. 2017. « Endophytic actinobacteria: Diversity, secondary metabolism and mechanisms to unsilence biosynthetic gene clusters ». *Critical Reviews in Microbiology* 43 (5): 546-66. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1270895>.
- El Mahgubi, A., O. Puel, S. Bailly, S. Tadriss, A. Querin, A. Ouadia, I. P. Oswald, et J. D. Bailly. 2013. « Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section Flavi in spices marketed in Morocco ». *Food Control* 32 (1): 143-48. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.013>.
- Evangelista-Martínez, Z., 2014. « Isolation and Characterization of Soil Streptomyces Species as Potential Biological Control Agents against Fungal Plant Pathogens ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30 (5): 1639-47. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>.
- Goudjal, Y, Toumatia O, Sabaou N, Barakate M, Mathieu F, et Zitouni A. 2013. « Endophytic Actinomycetes from Spontaneous Plants of Algerian Sahara: Indole-3-Acetic Acid Production and Tomato Plants Growth Promoting Activity ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (10): 1821-29. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1344-y>.
- Hardoim, P R., van Overbeek L S., Berg G, Pirttilä A M, Compant S, Campisano A, Döring M, et Sessitsch A. 2015. « The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes ». *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79 (3): 293-320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>.
- Hasani A., Kariminik A. et Issazadeh K., 2014. « Streptomyces: Characteristics and Their Antimicrobial Activities ». *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 2 (1): 63-75.
- Hayakawa M. et Nonomura.H., 1987. « Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes ». *Journal of Fermentation Technology* 65 (5): 501-9. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(87\)90108-7](https://doi.org/10.1016/0385-6380(87)90108-7).
- Kandel, S L., Joubert P M. et Doty.S L., 2017. « Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants ». *Microorganisms* 5 (4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>.
- Küster, E., et Williams. S. T., 1964. « Selection of Media for Isolation of Streptomyces ». *Nature* 202 (mai): 928-29.
- Liu, D, Coloe S, Baird R, et Pedersen J. 2000. « Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR ». *Journal of Clinical Microbiology* 38 (1): 471.
- Pamphile J. A., et Azevedo J. L., 2002. « Molecular Characterization of Endophytic Strains of *Fusarium Verticillioides* (= *Fusarium Moniliforme*) from Maize (*Zea Mays* L.) ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18 (5): 391-96. <https://doi.org/10.1023/A:1015507008786>.
- Selosse, M.A. 2018. Jamais seul. Ces microbes qui construisent les plantes, les animaux et les civilisations. *Actes Sud*, 370 pp. <https://www.actes-sud.fr/catalogue/sciences/jamais-seul>.
- Shen Y., Zhang Y., Liu C, Wang X., Zhao J., Jia F., Yang L., Yang D., et Xiang W., 2014. « *Micromonospora Zeae* Sp. Nov., a Novel Endophytic Actinomycete Isolated from Corn Root (*Zea Mays* L.) ». *The Journal of Antibiotics* 67 (11): 739-43. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.54>.

- Shirling, E. B., et Gottlieb D.,1966. « Methods for Characterization of Streptomyces Species ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 16 (3): 313-40. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>.
- Stackebrandt, E, et Ebers J. 2006. « Taxonomic parameters revisited tarnished gold standards ». *MICROBIOLOGY TODAY* 33 (4): 152-55.
- Taechowisan, T., Peberdy J. F., et Lumyong S. 2003. « Isolation of Endophytic Actinomycetes from Selected Plants and Their Antifungal Activity ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (4): 381-85. <https://doi.org/10.1023/A:1023901107182>.
- Wang K., Yan P-S., Ding Q-L., Wu Q-X., Wang Z-B., et Peng J., 2013. « Diversity of Culturable Root-Associated/Endophytic Bacteria and Their Chitinolytic and Aflatoxin Inhibition Activity of Peanut Plant in China ». *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 29 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1135-x>.
- Zhang H W., Song Y C., et Tan R X., 2006. « Biology and Chemistry of Endophytes ». *Natural Product Reports* 23 (5): 753-71. <https://doi.org/10.1039/B609472B>.