

Université de Montréal

**Identification de composés naturels contre
Saprolegnia sp., un champignon pathogène en
aquaculture**

par

Arianne Faille

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Science
en Microbiologie et Immunologie

Avril 2010

© Arianne Faille, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Identification de composés naturels contre *Saprolegnia* sp., un champignon
pathogène en aquaculture

présenté par :
Arianne Faille

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Georges Szatmary, président-rapporteur
Dr. Pierre Belhumeur, directeur de recherche
Dr. Grant Vandenberg, co-directeur
Dr. France Daigle, membre du jury

Résumé

La saprolégniose est une maladie fongique causée par le champignon aquatique *Saprolegnia* sp. qui affecte les poissons sauvages et ceux provenant des piscicultures. L'apparition de touffes cotonneuses semblables à de la ouate de couleur blanche à grise est souvent la première indication de l'infection. Ce saprophyte ubiquitaire se nourrit habituellement des œufs de poissons morts, mais peut se propager rapidement aux œufs sains causant la mort de ces derniers. La saprolégniose est souvent une infection secondaire, mais des souches virulentes peuvent facilement se développer sur les salmonidés ayant subi un stress ou une mauvaise manipulation. De grandes pertes économiques associées à la saprolégniose sont rapportées chaque année à travers le monde surtout dans l'industrie de la pisciculture. Jusqu'en 2002, le contrôle de la saprolégniose pouvait se faire par l'utilisation du vert de malachite, un colorant organique ayant une grande activité antifongique. Malheureusement, cette molécule a été bannie à cause de ses propriétés cancérigènes. Aucun composé aussi efficace n'est actuellement disponible pour traiter les infections de la saprolégniose. Des molécules ou extraits naturels ayant un potentiel antifongique ont donc été testés à l'aide de deux techniques (par graines de chanvre et par cylindre d'agar). Les molécules d'un extrait de propolis (cire de ruches d'abeilles) démontrant de l'activité anti-*Saprolegnia* ont été identifiées. De plus, une bactérie, *Pseudomonas aeruginosa*, pouvant être retrouvée dans le même environnement que *Saprolegnia* sp. a démontré un effet antagoniste au champignon. Une molécule de signalisation intercellulaire produite par *P. aeruginosa*, 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ), a été identifiée comme responsable de l'effet antagoniste contre *Saprolegnia* sp.

Mots-clés : Saprolégniose, *Saprolegnia* sp., Propolis, *Pseudomonas aeruginosa*, 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ),

Abstract

Saprolegniosis, a fungal disease which affects wild and farm fish, is caused by the water mold *Saprolegnia* sp. Visible cotton-like white or grey patches on fish skin are often the first sign of infection. This ubiquitous saprophyte infects dead fish eggs and then spreads to healthy eggs resulting in major losses due to mortalities. Saprolegniosis is often a secondary infection; however some virulent strains are known to cause primary infection on injured or stressed salmonids. Important economic losses in aquaculture are reported every year worldwide due to saprolegniosis. Infection by *Saprolegnia* sp. was well controlled with the use of an organic dye with great antifungal efficacy; malachite green. Unfortunately, the use of malachite green was banned in 2002 worldwide due to its carcinogenic and toxicological effects. Up until now, no new treatment as effective as malachite green has been discovered. Natural extracts or molecules with potential antifungal properties have also been tested using two techniques (with hemp seeds and with agar cylinders). Molecules from propolis extracts (beeswax), active against *Saprolegnia* sp. have been identified. Furthermore, culture supernatant of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* was found to be able to inhibit the growth of *Saprolegnia*. The intercellular signal molecule produced by *P. aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) was identified as the active compound against *Saprolegnia*.

Keywords : Saprolegniosis, *Saprolegnia* sp., Propolis, *Pseudomonas aeruginosa*, 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ).

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures	vi
Liste des sigles et des abréviations.....	viii
Remerciements	x
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Saprologniose	1
1.1.2 Vert de malachite.....	3
1.1.3 <i>Saprolegnia sp.</i>	4
1.1.3.1 Taxonomie.....	4
1.1.3.2 Cycle de vie.....	5
1.1.4 La maladie	8
1.1.4.1 Facteurs de prédisposition	8
1.1.4.2 Évolution de l'infection.....	9
1.1.5 Traitements alternatifs	11
1.2 Les <i>Pseudomonas</i> fluorescents	14
1.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.2.2 Facteurs extracellulaires	16
1.2.3 Signalisation intercellulaire (SI).....	20
1.2.3.1 Nouvelle communication extracellulaire	22
1.2.3.1.1 Opérons <i>pqsABCDE</i> et <i>phnAB</i>	23
1.2.3.1.2 MvfR.....	24
1.2.4 Le système à deux composantes GacA/GacS	26
1.3 Autres composés naturels.....	28
1.3.1 La propolis	28

1.3.1.1 Composition chimique	29
1.3.1.2 Activités biologiques et applications	31
1.3.2 Trans-cinnamaldéhyde	31
1.3.3 Extraits de la forêt boréale	32
1.4 Buts et Hypothèses	33
Chapitre 2: Article	34
2.1 Présentation du manuscrit.....	34
2.2 Inhibition of <i>Saprolegnia</i> sp. by the intercellular signalling molecules 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Chapitre 3 : Discussion	53
Références.....	58
Annexe I. Information non publiée	I
I.I Méthodes non publiées	I
I.I.I Méthode par graines de chanvre en microplaque	I
I.I.II Détermination du composé actif de la propolis.....	II
I.I.II.I Extraction à l'éthanol et à l'hexane	II
I.I.II.II Chromatographie sur couche mince	III
I.I.II.III Bioautographie.....	IV
I.I.II.IV Chromatographie liquide à haute performance	IV
I.I.II.V Spectre de masse.....	V
I.II Résultats non publiés	VI
I.II.I Activités anti- <i>Saprolegnia</i> des différentes molécules naturelles testés <i>in vitro</i>	VI
I.II.II Composé actif de la propolis	VIII
Annexe II.....	XV

Liste des tableaux

Tableau I.	Principaux antibiotiques secrétées par les <i>Pseudomonas</i> fluorescent.	18
Tableau II.	Composés chimiques majoritaires retrouvés dans la propolis provenant de différentes sources.	30
Tableau III.	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et létales (CML) de différents composés testés contre <i>S. parasitica</i> par la méthode de graines de chanvre.	VII
Tableau IV.	Concentrations minimales inhibitrices d'extraits de la forêt boréale contre le champignon aquatique <i>S. parasitica</i> par la méthode de graines de chanvre.	VIII
Tableau V.	Identité probable des molécules retrouvées dans la fraction active obtenue par HPLC phase normale d'un extrait de propolis suite à son analyse par spectre de masse.	XIII

Liste des figures

Figure 1.	Structure du vert de malachite (VM) et de sa forme réduite le vert de leucomalachite (VLM) qui persiste dans les tissus	3
Figure 2.	Représentation des gènes de l'ARN ribosomal 18S, 5.8S et 28S ainsi que ses régions ITS (Internal Transcribed Spacer).....	5
Figure 3.	Cycle de développement de <i>Saprolegnia</i>	7
Figure 4.	Larve de truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) infectée par le champignon <i>Saprolegnia parasitica</i>	10
Figure 5.	Schéma des systèmes de SI <i>las</i> et <i>rhl</i> de <i>P. aeruginosa</i>	21
Figure 6.	Signalisation intercellulaire chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Figure 7.	Voie de régulation sous l'influence du système à deux composantes GacA/GacS chez <i>P. aeruginosa</i>	27
Figure 8.	Propolis provenant du Québec	28
Figure 9	Schematic overview of <i>P. aeruginosa</i> cell-to-cell molecules interactions.	39
Figure 10.	Effect of supernatant extracts of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14 wild type (wt) compared with nutrient broth extract on <i>Saprolegnia</i> mycelium.	44

- Figure 11.** Separation of supernatant extracts of 1) NB + 2% glucose; 2) *P. aeruginosa* PA14 WT; 3) *P. aeruginosa gacA⁻*; 4) *P. aeruginosa rhIR⁻* and 5) *P. aeruginosa pqsA⁻* 46
- Figure 12.** Separation of 1) supernatant extract of *P. aeruginosa pqsA⁻*; 2) supernatant extract of *P. aeruginosa pqsH⁻*; 3) supernatant extract of *P. aeruginosa* PA14 WT; 4) HHQ; 5) HMAQ..... 48
- Figure 13.** Méthode des graines de chanvre en microplaque II
- Figure 14.** Évaporateur rotatif pour la concentration et l'extraction des composés actifs contenus dans la propolis..... III
- Figure 15.** Exemple de (A) croissance de *Saprolegnia* sur une graine de chanvre et d'inhibition (B) par le vert de malachite. VI
- Figure 16.** Chromatographie sur couche mince après migration d'un extrait de propolis... IX
- Figure 17.** Graphique HPLC montrant les pics d'absorption à 290 nm des molécules extraites à l'hexane de la propolis..... X
- Figure 18.** Chromatographie sur couche mince révélée à l'acide sulfurique des fractions obtenues par HPLC d'un extrait de propolis XI
- Figure 19.** Spectre de masse de la fraction active d'un extrait de propolis à l'hexane suite à un fractionnement par HPLC. XII

Liste des sigles et des abréviations

AA	Acide anthranilique
AHL	<i>N</i> -acyl-L-homosérine lactones
ARNr	ARN ribosomal
CCM	Chromatographie sur couche mince
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CML	Concentration minimale létale
DAPG	2,4-diacétylphloroglucinol
DHQ	2,4-dihydroxyquinoline
HAQ	4-hydroxy-2-alkylquinolines
HCN	Acide cyanhydrique
HHQ	4-hydroxy-2-heptylquinoline
HMAQ	4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HQNO	2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
PLT	Pyolutéorine
PQS	<i>Pseudomonas quinolone signal</i>
PRN	Pyrrolnitrine
QS	<i>Quorum Sensing</i>
R_f	Distance de migration
RP-HPLC	<i>Reverse phase-High performance liquid chromatography</i>
SI	Signalisation intercellulaire
rpm	révolution par minute
VLM	Vert de leucomalachite
VM	Vert de malachite

À mes parents qui ont toujours été à mes côtés

Remerciements

Ce mémoire, qui est le résultat de deux années de recherche dans le département de microbiologie et immunologie, a été possible grâce au soutien et aux encouragements de plusieurs personnes.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr. Pierre Belhumeur, sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour. Il m'a donné l'opportunité non seulement de faire ma maîtrise au sein de son laboratoire mais aussi celle de voyager et de faire plusieurs rencontres intéressantes lors de réunions et de congrès. Je remercie aussi les membres du laboratoire pour leurs précieux conseils soit, Martin Clément, Julie Shareck et Sébastien Croisetière.

Il est aussi important de souligner l'aide et le support de mon co-directeur Dr. Grant Vandenberg de l'Université Laval. La collaboration avec toute son équipe de l'Université Laval a été des plus enrichissantes. Je voudrais donc remercier, Émilie Proulx, Daniel Proulx et Éric Boucher pour leurs nombreux échanges et conseils.

Je remercie particulièrement Dr. Éric Déziel pour son expertise sur tout ce qui a porté sur *Pseudomonas aeruginosa* et sa disponibilité qui me fut grandement profitable. Je tiens aussi à remercier Dr. Alexandra Furtos ainsi que ses étudiantes pour leurs conseils et les nombreuses analyses en spectre de masse et HPLC.

Je ne peux oublier mes amis, ma sœur Catherine et mon petit frère Thomas qui ont été présents dans les hauts comme les bas tout au long de ce parcours.

Je voudrais dire un merci ou plutôt milles mercis à mes supporters no. 1, mes parents, pour leurs encouragements, support moral et financier mais surtout pour leur dévouement infini tout au long de mes études!!!

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Saprologéniose

Les oomycètes que l'on nomme souvent les « champignons aquatiques » ont la caractéristique de produire des zoospores biflagellées et mobiles. Ces champignons aquatiques sont ubiquitaires dans les écosystèmes d'eau douce et se nourrissent de matières organiques dans l'eau (104). Parmi les membres des oomycètes, on retrouve les plus importants pathogènes fongiques des poissons d'eau douce et saumâtre, qui sont surtout concentrés dans la famille des Saprolegniaceae (50). Les Saprolegniaceae du genre *Saprolegnia*, *Aphanomyces* et *Achlya* peuvent infecter les amphibiens, les mollusques, les crustacés (45), les poissons et leurs œufs causant la maladie que l'on nomme la saprologéniose (50, 82, 106). Les poissons les plus fréquemment infectés sont les salmonidés qui sont une famille de poissons vulnérables à la saprologéniose (71, 95). La saprologéniose est souvent une infection secondaire qui est diagnostiquée par l'apparition de touffes cotonneuses blanches ou grisâtres qui, lorsque sorties de l'eau, ont une apparence plutôt mucoïde (104). L'infection débute au niveau de la tête et des nageoires des poissons, se propageant sur le restant du corps surtout sur les poissons blessés ou ayant subi un stress (12).

Le genre *Saprolegnia*, le plus souvent isolé lors d'une infection fongique chez le poisson (104), est considéré comme étant le plus dévastateur en aquaculture (11, 68, 82) et est capable de croître ainsi que de se reproduire tout au long de l'année (71). Habituellement saprophyte, *Saprolegnia* se nourrit d'œufs morts, mais peut rapidement se propager aux œufs sains causant la mort de ces derniers. Plusieurs études démontrent d'ailleurs que les souches les plus

virulentes de *Saprolegnia parasitica* sont capables de causer des infections primaires (71, 106). L'Oomycète causant le plus de pertes économiques en infectant les poissons est certainement l'espèce *Saprolegnia parasitica* (12, 101, 106).

1.1.1 Importance économique

Le premier épisode d'infection par un Oomycète a été rapporté dans la littérature européenne en 1877 et a été nommé « salmon disease » (73). Cette infection qui a été observée initialement dans les rivières entre l'Angleterre et l'Écosse s'est rapidement propagée dans les rivières de Grande-Bretagne. Le champignon *Saprolegnia* a alors été identifié comme l'agent étiologique (73). La saprolégiose est en partie responsable du déclin des populations naturelles des salmonidés. Durant les dernières années, plusieurs épisodes d'infection par des oomycètes ont été rapportés dans la littérature autant pour les poissons sauvages que ceux élevés en pisciculture (12, 41, 73, 101, 106).

En aquaculture, les infections fongiques sont la deuxième source de perte économique surtout dans la culture du saumon et des crustacés (67). Au Japon, des mortalités annuelles pouvant aller jusqu'à 50 %, causées par *S. parasitica*, sont rapportées pour le saumon coho et l'anguille (73). *S. parasitica* est économiquement le plus important champignon pathogène des poissons et ce, surtout chez la truite et le saumon, causant des pertes représentant des dizaines de millions de dollars à travers le monde (101). Dû à la susceptibilité accrue du poisson aux infections durant les périodes hivernales (winter kill), *S. parasitica* cause chaque année aux États-Unis des pertes financières se situant autour de quarante millions de dollars (9).

1.1.2 Vert de malachite

Le vert de malachite (VM) est un colorant organique qui est aussi reconnu pour son activité en tant que désinfectant. Ce composé synthétique a été grandement utilisé afin de traiter les poissons et leurs œufs contre les parasites internes et externes (97). La découverte des effets antifongiques du VM dans les années 1930 fut d'un grand secours pour limiter les infections dans les piscicultures (12, 97, 101). À une concentration aussi faible que 1 ppm (mg/L), trois bains d'une heure de VM (24 heures d'intervalle entre les bains) suffisent pour traiter les infections. Ce traitement simple et peu coûteux pouvait être utilisé aussi à titre préventif, ce qui a restreint durant plusieurs années les pertes dues à la saprolégniose. Des études subséquentes ont cependant démontré que le VM, mais surtout sa forme réduite, le vert de leucomalachite (VLM) (Figure 1), peuvent persister dans les tissus des poissons et ainsi entrer facilement dans la chaîne alimentaire des humains (1, 3, 97).

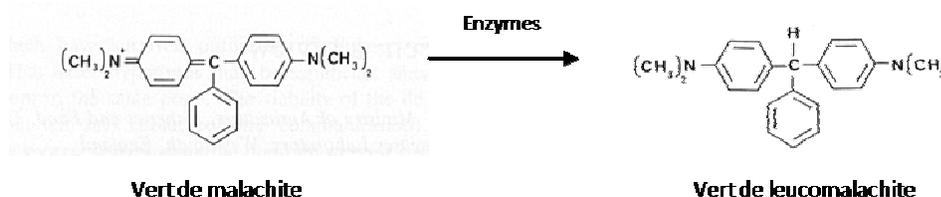


Figure 1. Structure du vert de malachite (VM) et de sa forme réduite le vert de leucomalachite (VLM) qui persiste dans les tissus (modifié d'Alderman, 1985 (3)).

En 2002, l'utilisation du VM dans les animaux destinés à la consommation humaine a été bannie au travers le monde dû aux propriétés cancérigènes et toxiques de ce dernier (1, 11, 79, 97, 101). Depuis, aucun nouveau produit

proposé n'est aussi efficace que le vert de malachite et une recrudescence des infections à la saprolégniose a été observée (12).

1.1.3 *Saprolegnia* sp.

1.1.3.1 Taxonomie

Les travaux de William Chambers Coker (17) en 1923 sur la taxonomie des Saprolegniaceae sont aujourd'hui la base pour la classification des champignons aquatiques. Coker a fait la première description de *S. parasitica*: « Tout parasite du genre *Saprolegnia*, isolé des poissons, qui est asexué ». Depuis Coker (1923), l'identification des espèces du genre *Saprolegnia* est devenue assez complexe dû à l'ajout de plusieurs études sur ces champignons aquatiques. Durant plusieurs années, l'identification des espèces de *Saprolegnia* s'est faite seulement à l'aide des caractéristiques des organes sexuels (anthéridie, oogone et oospores) (68).

En 2002, Johnson *et al.* publiaient une grande révision systématique des *Saprolegniaceae* et y énuméraient 17 genres et 122 espèces (47) en précisant que plusieurs espèces se chevauchaient. En effet, de nombreuses études ont démontré qu'il était difficile de baser l'identification uniquement sur les critères morphologiques des structures sexuelles, car il y a beaucoup de similarités entre les espèces. De plus, certaines espèces du genre *Saprolegnia* ne produisent pas d'organes sexuels dans les conditions de laboratoire (24, 49, 68, 95). Les organes asexuels consolident donc l'identification des espèces (45, 95). L'espèce *S. parasitica* peut être identifié par la présence de faisceaux de longs poils crochus et la germination indirecte dans un milieu faible en nutriment (95).

Récemment, des études sur les caractéristiques moléculaires sont venues renforcer l'identification des espèces. L'amplification et le séquençage de deux

régions codant pour l'ARN ribosomal (Figure 2) sont devenus des outils utiles pour l'identification des espèces de *Saprolegnia* (49, 94). La première séquence est une région du gène 18S de l'ARNr (A) et la deuxième comprend l'ITS (Internal Transcribed Spacer) et le gène 5.8S (B).

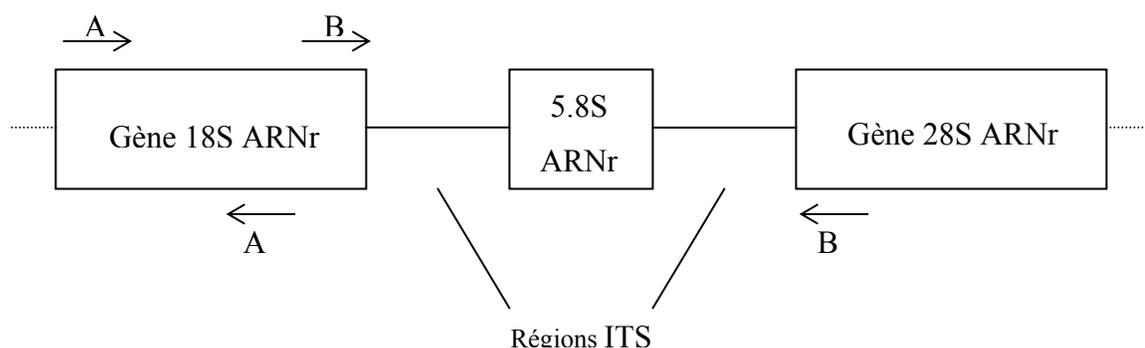


Figure 2. Représentation des gènes de l'ARN ribosomal 18S, 5.8S et 28S ainsi que ses régions ITS (Internal Transcribed Spacer). Les flèches représentent les deux paires d'amorces (A et B) utilisées pour différencier les espèces de *Saprolegnia* (19).

1.1.3.2 Cycle de vie

Le cycle de vie de *Saprolegnia* sp. est complexe et comprend la reproduction sexuée et asexuée (Figure 3). Les organes pour la reproduction sexuée sont l'oogone (femelle) et l'anthéridie (mâle) qui se retrouvent sur les mêmes hyphes (83). La production d'organes sexuels chez certaines espèces de *Saprolegnia* est très rare, voire absente dans les conditions *in vitro* (95). Le mode de reproduction asexuée est le plus important pour la dispersion dans les environnements aquatiques. L'organe principal pour ce mode de reproduction est le zoosporange qui se forme à l'extrémité d'un hyphe et qui peut libérer plusieurs zoospores mobiles et biflagellées. Ces zoospores primaires qui viennent d'être

relâchées nagent pour une courte période de temps avec l'aide de flagelles apicaux avant de s'enkyster. Les kystes peuvent soit germer en hyphes pour former du mycélium ou encore relâcher une zoospore secondaire ayant des flagelles latéraux (83). La dispersion ainsi que l'infection sont surtout attribuées aux zoospores secondaires qui sont beaucoup plus mobiles que les zoospores primaires (23, 106). Pour certaines souches, les zoospores secondaires peuvent avoir de longs poils à leur surface. Les souches de *Saprolegnia parasitica* possèdent typiquement de longs poils crochus à la surface de leurs spores, ce qui permettrait un meilleur attachement aux substrats désirés (96, 106). Ces poils crochus peuvent être un signe de la pathogénicité de la souche car l'attachement à l'hôte est facilité (8, 34). Au bout d'un moment, les zoospores secondaires s'enkystent à leur tour pour reformer une nouvelle zoospore ou germer si un endroit propice à la croissance est trouvé. Ce cycle d'enkystement et de formation de zoospores qui peut se répéter plusieurs fois selon les souches se nomme le « polyplanétisme » (101, 106). Cette adaptation permet donc à certaines souches de *Saprolegnia* de faire plusieurs tentatives afin de trouver l'hôte idéal (12).

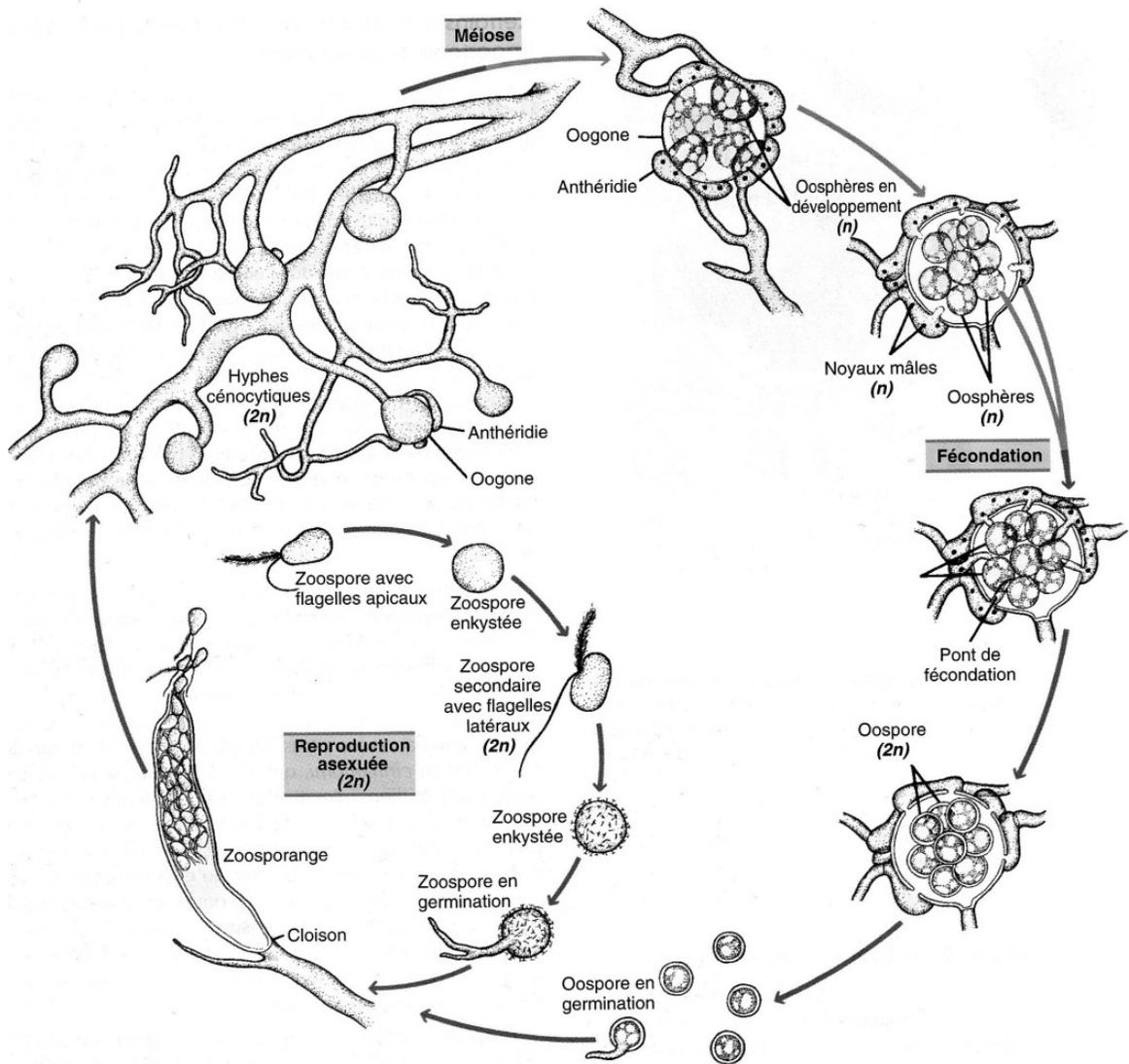


Figure 3. Cycle de développement de *Saprolegnia* (83).

1.1.4 La maladie

Saprolegnia est un pathogène opportuniste qui est ubiquitaire dans les environnements d'eau douce. Les poissons y sont conséquemment exposés autant en pisciculture que dans les lacs et rivières. Les infections causées par cette moisissure aquatique sont donc courantes. En effet, plusieurs épisodes de saprolégniose ont été rapportés à travers le monde surtout chez les salmonidés (67). Cette maladie est dévastatrice pour les populations de salmonidés autant dans leurs milieux naturels qu'en pisciculture. Il est important d'en connaître les causes et son mode d'action afin de mieux pouvoir prévenir et traiter les recrudescences de saprolégniose.

1.1.4.1 Facteurs de prédisposition

Le développement de la saprolégniose est causé par une combinaison de facteurs et non pas à la seule présence du parasite (87). Afin de mieux comprendre les éclosions de saprolégniose, trois composantes importantes doivent être prises en considération : le pathogène, l'hôte et l'environnement. Le pathogène, qui est la moisissure aquatique *Saprolegnia*, doit être une souche virulente afin de causer une infection (82, 95). Plusieurs souches de ce champignon ne causent pas d'infection sur des poissons sains. Il est d'ailleurs assez complexe, même avec une souche virulente de développer un bon modèle d'infection. En effet, le poisson, l'hôte, est plus vulnérable à une infection lorsqu'il a déjà une infection primaire (71, 73, 78, 87, 88) ou s'il est blessé au niveau de l'épiderme, qui constitue la première barrière externe contre les parasites. La sécrétion de mucus recouvrant l'épiderme est une importante barrière physique du poisson et prévient d'ailleurs l'attachement des spores (78). En cas d'un

affaiblissement des défenses immunitaires, la susceptibilité de l'hôte est accrue. De plus, de nombreux changements au niveau de l'épiderme se font lors de la maturation sexuelle du poisson et cette condition le prédispose aux infections (78, 87).

L'environnement est une autre composante à ne pas sous-estimer lors de l'analyse des facteurs de prédispositions aux infections. Plusieurs facteurs de stress comme la piètre qualité de l'eau, les variations de température, la baisse du niveau d'oxygène et la forte densité de poissons (67, 95) sont étroitement liés au développement de la saprolégniose. Par exemple, dans les années 90, chez les pisciculteurs aux États-Unis des pertes pouvant aller jusqu'à 50% dus à la saprolégniose sont enregistrés lors des hivers les plus froids (9) causés par la baisse sévère de température.

1.1.4.2 Évolution de l'infection

La saprolégniose est une infection qui peut se développer à tous les stades de vie du poisson (78). Au niveau des œufs, la moisissure se détecte par l'épaisse couche de mycélium qui se propage des œufs morts jusqu'aux œufs sains en causant la mort par suffocation si les œufs infectés ne sont pas enlevés ou traités rapidement (12).

Les alevins (ou jeunes poissons) à leur première alimentation vont se nourrir de tout ce qui est à leur portée, incluant la saleté qui peut contenir des spores (88). Il s'ensuit une infection du tube digestif et de la vésicule vitelline. L'infection se propage rapidement, causant la mort de ces jeunes poissons. L'alevin représenté à la Figure 4 a été infecté par des spores de *Saprolegnia parasitica*. L'infection s'est propagée sur toute la surface de l'épiderme et, comme on peut l'observer, le mycélium a complètement recouvert l'alevin mort.



Figure 4. Larve de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) infectée par le champignon *Saprolegnia parasitica*. (Photo: É. Proulx, 2008).

Pour ce qui est des poissons adultes, l'infection débute habituellement sur l'épiderme au niveau de la tête et des nageoires. Le mycélium apparaît sous forme de touffe cotonneuse et on peut observer la propagation de celui-ci sur le restant du corps pouvant atteindre jusqu'à 80 % de la surface du poisson (12). *Saprolegnia* cause la nécrose des cellules ce qui engendre la destruction du derme et de l'épiderme (101) des poissons qui deviennent encore plus susceptibles aux infections secondaires (73). Les souches les plus virulentes peuvent pénétrer les organes en causant des dommages aux muscles sous-jacents et aux vaisseaux sanguins. L'infection peut parfois se propager très rapidement dans le poisson sans aucune réponse immunitaire apparente. Une fois infecté, les salmonidés ne guérissent habituellement pas de la saprolégniose (78). On observe souvent une perte d'équilibre chez les poissons infectés ainsi que des difficultés respiratoires peu avant la mort (104). La mort est causée par des déséquilibres osmotiques qui apparaissent dus à la destruction de larges zones de tissus sur le poisson (78, 106). Le temps de survie du poisson est variable mais il a été décrit que chez la truite, trois jours seulement séparent l'apparition des premiers signes et la mort (78).

1.1.5 Traitements alternatifs

Depuis l'interdiction d'utilisation du vert de malachite comme traitement contre la saprolégniose, de nombreuses recherches ont été effectuées afin de trouver un nouveau remède (10, 11, 79, 100). Les critères essentiels pour trouver un bon candidat comme fongicide aquatique sont les suivants :

- ✓ Activité anti-*Saprolegnia* élevée
- ✓ Faible toxicité pour les œufs et les poissons
- ✓ Grand écart entre la concentration minimale inhibitrice (CMI) du champignon et celle néfaste pour les œufs et les poissons
- ✓ Non toxique pour la consommation humaine
- ✓ Peu coûteux à l'utilisation

Plusieurs traitements alternatifs ont été proposés et sont actuellement utilisés dans les piscicultures pour traiter la saprolégniose sur les œufs et les poissons. Les produits les plus connus sont le bronopol, le formol, le peroxyde d'hydrogène et le sel sans iode. Les particularités de chacun sont expliquées ci-dessous.

Le **bronopol** (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) est utilisé comme agent de conservation dans les produits médicaux, pharmaceutiques, de cosmétiques et aussi dans les shampoings (79). Cet antimicrobien à large spectre est un produit peu toxique et ne représente pas de danger pour l'environnement. Afin de traiter la saprolégniose chez les œufs, il est recommandé de l'utiliser en bain de 30 minutes à des concentrations entre 30 et 50 mg/ml, et de 15 à 20 mg/ml pour les poissons (69). Par contre, il est déconseillé pour les alevins car le bronopol est toxique pour les poissons à ce stade de vie (97). Développé en Grande-Bretagne, le Pyceze® (Novartis Animal Vaccines) est le produit à base de bronopol qui peut

être utilisé en pisciculture. Le Pyceze® est par contre un produit coûteux qui est réglementé par le programme de distribution de médicaments d'urgence et nécessite une prescription d'un vétérinaire. Il est donc souvent utilisé en dernier recours lorsque l'infection est déjà bien établie.

Le **formol** est une solution aqueuse qui est utilisée pour la conservation mais aussi comme désinfectant et antimycosique. Il est utilisé pour traiter plusieurs parasites externes du poisson de même que la saprolégiose. Les produits homologués au Canada sont le Parasite-S® et Formalin-R. Ils ne sont utilisés que pour traiter les œufs car ils peuvent être toxiques pour les poissons. Il est aussi nécessaire d'être prudent avec ce produit car il est potentiellement cancérigène (106).

Le **peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2) est un composé intéressant car il a un large spectre d'activité. Il est efficace contre de nombreux microorganismes comme les bactéries, les moisissures, les levures et les virus (12). C'est un produit non polluant qui peut être utilisé à titre préventif ainsi que curatif. Afin de traiter la saprolégiose, il est conseillé de l'utiliser à des doses allant de 500 à 1000 mg/L pendant 15 minutes (12, 69), ce qui est une CMI assez élevée pour un traitement. La marge entre la CMI et la toxicité étant faible, il n'est pas suggéré d'utiliser ce produit comme traitement avec les poissons (79). Au Canada, le produit à base de peroxyde d'oxygène homologué pour traiter les infections fongiques des œufs est le Perox-Aid^{MC} (Syndel International Inc.), disponible sans prescription (69).

Le **sel sans iode** (NaCl) est sans aucun doute le plus ancien des traitements pour les poissons et il est très sécuritaire. Ne causant pas de danger pour l'environnement, il est le seul produit pouvant être utilisé librement pour traiter les poissons atteints de saprolégiose (69). Le sel est un bon traitement à utiliser à titre préventif car il est efficace pour limiter les épisodes de saprolégiose. Par contre, afin de traiter une infection déjà présente,

d'importantes quantités de sel sont nécessaires ce qui peut être problématique en pisciculture.

Aucun de ces produits de remplacement ne détient tous les critères essentiels à un bon composé antifongique pour traiter la saprolégniose. En effet, ces traitements sont soit trop coûteux (bronopol), toxiques (formol, peroxyde d'hydrogène) ou peu efficaces (le sel).

Des travaux ont été effectués afin d'explorer de nouvelles voies comme option de traitement comme les vaccins et des antagonistes bactériens.

Le développement de vaccins est une avenue peu explorée pour prévenir la saprolégniose. Une telle avenue toutefois pourrait ne pas être efficace compte tenu du fait que la majorité des poissons ont déjà été exposés naturellement à *Saprolegnia* et aucune immunité ne semble les mettre à l'abri d'une éclosion. De surcroît, dans les périodes de recrudescence dont le « winter kill », les poissons sont immunosupprimés et il ne pourrait y avoir protection immunitaire (12).

Plusieurs antagonistes bactériens de *Saprolegnia* ont été découverts dans l'environnement aquatique (12). Celle qui a été le plus souvent retrouvée dans la littérature est *Pseudomonas fluorescens*, une bactérie Gram négative omniprésente dans les milieux d'eau douce qui présente une activité anti-*Saprolegnia* (10). L'utilisation comme traitement des bactéries du genre *Pseudomonas* n'est pas possible car elles sont responsables des *maladies bactériennes ulcératives* causant une mortalité soudaine et élevée chez les poissons (104). Une alternative serait d'isoler l'agent inhibiteur produit par la bactérie afin de l'utiliser comme traitement. Le groupe de Bly *et al.* (1997) a essayé d'isoler le composé actif dans le surnageant de cultures actives de *Pseudomonas fluorescens*. Ils ont cependant dû conclure que l'activité inhibitrice contre *Saprolegnia* ne semblait pas résider dans les surnageants de culture et ne serait donc pas un facteur sécrété (10). Bien que ces travaux aient été cités dans une publication ultérieure (9), aucune autre étude n'a confirmé expérimentalement ces conclusions ou poursuivi cette piste.

1.2 Les *Pseudomonas* fluorescents

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bâtonnets Gram négatifs ayant un métabolisme strictement respiratoire et des flagelles polaires d'où leur mobilité (59). Les différentes espèces de *Pseudomonas* sont divisées en cinq groupes selon leur ARNr (57). Le sous-groupe des *Pseudomonas* fluorescents appartenant au premier groupe génomique, est certainement le plus étudié parmi les *Pseudomonas* et se distingue par la production de pigments fluorescents solubles dans l'eau (59). Les espèces comprises dans le sous-groupe des *Pseudomonas* fluorescents sont *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichorii*, *P. viridiflava* et *P. aeruginosa* (57). Ce groupe de bactéries ubiquitaires peut s'adapter à divers environnements. On les retrouve en grande abondance dans la rhizosphère, mais ils sont aussi abondants dans l'eau.

Les *Pseudomonas* fluorescents ont une grande importance environnementale car certains d'entre eux sont des pathogènes des animaux et des végétaux tout en étant aussi reconnus pour leur potentiel comme agent de biocontrôle (105). En effet, plusieurs études démontrent leur capacité à contrer certaines infections des plantes dues à des pathogènes fongiques (5, 31, 39). Des activités antagonistes contre des pathogènes en aquaculture ont aussi été décrites chez les *Pseudomonas* fluorescents. Par exemple, *P. fluorescens* est capable d'inhiber la croissance du champignon aquatique *Saprolegnia* sp. (10), de la bactérie *Vibrio anguillarum* (38) et aussi de la bactérie *Aeromonas salmonicida* (80) qui cause la furunculose surtout chez les salmonidés.

Ces qualités antagonistes reconnues des *Pseudomonas* fluorescents proviennent en grande partie de la production de métabolites secondaires diffusibles et/ou volatils qui ont des activités antibiotiques (105). En effet, certaines de ces espèces produisent de nombreux antimicrobiens à spectre large

permettant donc aux *Pseudomonas* de compétitionner avec les nombreux microorganismes vivant à leurs côtés (28).

1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste qui est responsable de sévères infections chez les personnes immunosupprimées et les gens souffrant de de fibrose kystique (51). Le génome de cette bactérie a été séquencé en 2000 et possède 6.3 millions de paires de bases (51). Son génome contient une quantité très élevée de gènes codant pour des facteurs de virulence et des mécanismes de régulation, ce qui lui confère une grande capacité à s'adapter à divers environnements (92) et la capacité d'infecter différents hôtes (51, 109).

De tous les *Pseudomonas sp.*, *P. aeruginosa* est l'espèce-type le plus étudié. La virulence de *P. aeruginosa* est multifactorielle, cette bactérie pouvant produire une multitude de métabolites secondaires dont des facteurs de virulence extracellulaires de faibles poids moléculaire, qui sont régulés en partie par la signalisation intercellulaire (54, 85). De plus, de nombreux facteurs de virulence se retrouvant à la surface des cellules font de cette espèce un pathogène redoutable (42, 51). Parmi ces facteurs, on retrouve le flagelle qui permet à la bactérie de nager, les pilis pour le déplacement et l'adhésion, et la couche de lipopolysaccharide (LPS) qui est se situe à la surface externe de la membrane et qui est aussi nécessaire à l'adhésion (51).

1.2.2 Facteurs extracellulaires

L'utilisation d'antimicrobiens provenant des *Pseudomonas* sp. a commencé en 1899 par l'observation d'Emmerich and Löw (33), qui ont remarqué que le concentré de culture exempt de cellules de *P. aeruginosa* pouvait inhiber la croissance de plusieurs bactéries. Ce concentré appelé « pyocyanase » a été produit commercialement et utilisé durant plusieurs années comme traitement contre la diphtérie, l'influenza et la méningite (39, 59). L'utilisation de la « pyocyanase » a plus tard été interrompue dû à la variation de l'efficacité et à la toxicité de certaines molécules présentes dans ce mélange. Depuis, les nombreux métabolites secondaires produits par les *Pseudomonas* fluorescents ont été étudiés pour leurs activités antibiotiques.

Ces métabolites secondaires permettent aux bactéries de compétitionner avec d'autres espèces, d'infecter différents hôtes et de coloniser divers environnements (107). Les principaux antibiotiques sécrétés qui font des *Pseudomonas* fluorescents de grands pathogènes sont les suivants : les phénazines, le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), la pyolutéorine (PLT), la pyrrolnitrine (PRN), ainsi que les rhamnolipides (32, 58) (Tableau I).

Les **phénazines** sont des hétérocycles contenant de l'azote et possèdent des propriétés antibiotiques. Les *Pseudomonas* fluorescents synthétisent différents phénazines avec un grand spectre d'activité contre les bactéries et champignons (32). Ces molécules sont des pigments qui peuvent avoir plusieurs effets toxiques (36). Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* produit un phénazine de couleur bleue appelé pyocyanine et ayant plusieurs effets pathogéniques (51). Le phénazine-1-carboxylate (PCA) est, quant-à lui, synthétisé par plusieurs *Pseudomonas* sp. et contribue au biocontrôle de phytopathogènes

fongiques (36). À ce jour, sept gènes ont été impliqués dans la biosynthèse des phénazines : *phzABCDEFG* (36).

Le **2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG)** possède des propriétés antibiotiques mais avec emphase contre les phytopathogènes tel *Pythium ultimum* (74). Le DAPG est un composé phénolique qui contrairement à plusieurs antibiotiques produits par les *Pseudomonas* fluorescents ne contient pas d'azote. La biosynthèse de cette molécule se fait par les gènes *phIA-F* (32).

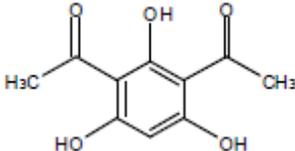
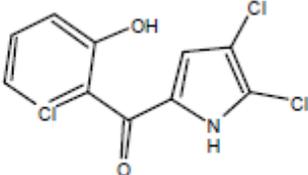
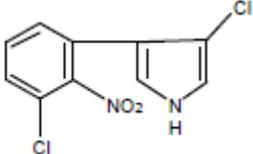
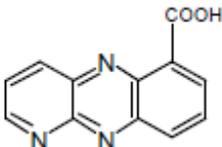
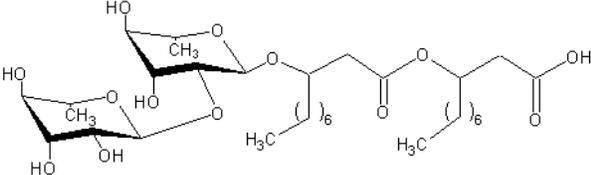
La **pyolutéorine (PLT)** est un autre antibiotique produit par plusieurs bactéries du genre *Pseudomonas*. Ce composé est surtout étudié pour sa forte activité antifongique contre les oomycètes comme *Pythium ultimum* qui infecte les racines de certaines plantes (30, 32). Les gènes impliqués dans sa biosynthèse sont *pltA-G* (31).

Antifongique à spectre large, la **pyrrolnitrine (PRN)** est produite par les bactéries du genre *Pseudomonas*. La synthèse de cette molécule se fait à partir du tryptophane (59) et implique les gènes de l'opéron *prnABCD*. Elle a été utilisée comme traitement contre les mycoses de la peau causées par les membres du genre *Tricophyton* (32).

Les **rhamnolipides** sont des molécules amphiphiles possédant une région hydrophobe et une région hydrophile. Ces biosurfactants ont la caractéristique d'être tensio-actifs ce qui en font des composés intéressants dans le milieu industriel et environnemental (92). Le rôle joué par les rhamnolipides n'est pas parfaitement élucidé mais il est généralement accepté qu'ils participent à la pathogénèse des microorganismes qui en produisent (93). Par exemple, *P. aeruginosa* sécrète des rhamnolipides qui ont la capacité de lyser les zoospores de plusieurs phytopathogènes tels *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* et *Plasmopara lactucae-radiciis* (93). Le mécanisme par lequel les rhamnolipides causent la lyse est par insertion dans la membrane plasmique, ce qui provoque l'instabilité de cette dernière. De plus, les rhamnolipides ont un

impact dans la formation des biofilms ainsi que la motilité de *P. aeruginosa* (22). La biosynthèse de rhamnolipides se fait en trois grandes étapes et est contrôlée par RhIA, RhIB et RhIC (92).

Tableau I. Principaux antibiotiques sécrétés par les *Pseudomonas* fluorescents (modifié de Dwivedi et al., 2003 (32)).

Nom	Structure moléculaire
2,4-Diacétylphloroglucinol	
Pyolutéorine	
Pyrrolnitrine	
Phénazines	
Rhamnolipides	

On retrouve aussi d'autres types de facteurs de virulence sécrétés qui sont nécessaires à la virulence complète des *Pseudomonas* fluorescents :

L'**acide cyanhydrique** (HCN) qui est produit par plusieurs *Pseudomonas* sp. est un métabolite secondaire responsable de l'activité biologique contre divers champignons (39). Ce composé volatil est un facteur de virulence qui peut s'avérer toxique.

Les **sidérophores** sont sécrétés par plusieurs microorganismes surtout dans des conditions où la quantité de fer soluble est limitée et agissent comme des chélateurs de fer (Fe^{3+}). La production de sidérophores est très exigeante mais peut profiter à plusieurs cellules qui sont dans l'entourage et qui ont les récepteurs appropriés (40). Les sidérophores sont des facteurs de virulence importants chez les microorganismes producteurs (53). Les *Pseudomonas* fluorescents se distinguent des autres *Pseudomonas* par la production de pigments fluorescents jaune-vert dont le principal est nommé pyoverdine (55). Chez *P. aeruginosa*, deux types de sidérophores sont retrouvés soit la pyoverdine et la pyochéline (53). Ce sont en fait des sidérophores qui contrôlent aussi l'expression de certains gènes (53). Par exemple, la pyoverdine régule la sécrétion de facteurs de virulence comme l'exotoxine A (51). Chez *P. aeruginosa*, 14 gènes (*pvd*) codant pour différentes protéines de biosynthèse de la pyoverdine ont été identifiés (55).

Les facteurs de virulence qui sont sécrétés par des systèmes de sécrétion chez *P. aeruginosa* sont la **protéase alcaline** qui agit en lysant les fibrines. On retrouve aussi l'élastase (**LasB**) qui est une métalloprotéinase causant d'importantes lésions au niveau de l'épithélium ainsi que l'exotoxine A (**ExoA**) qui inhibe la synthèse protéique (51).

1.2.3 Signalisation intercellulaire (SI)

Plutôt que de vivre en tant que cellules individuelles, les bactéries ont développé un système de communication qui leur permet d'unir leurs forces et d'agir de façon similaire à un organisme pluricellulaire. Ces cellules communiquent donc à l'aide de petites molécules extracellulaires et peuvent ainsi réguler l'expression de leurs gènes en fonction de la densité cellulaire. Ce mécanisme de communication retrouvé chez les bactéries Gram-négatives se nomme « signalisation intercellulaire » (51).

Plusieurs systèmes de signalisation intercellulaire (SI) ont été décrits dans la nature mais *Pseudomonas aeruginosa* est le modèle le plus étudié (21, 51). Chez cette espèce, on retrouve des systèmes de SI utilisant les *N*-acyl-L-homosérine lactones (AHLs) comme molécules de signalisation intercellulaire (aussi appelées auto-inducteurs). Les deux systèmes de SI principaux chez *P. aeruginosa* sont *las* et *rhl* qui interagissent selon une cascade hiérarchique (61). Chaque système a son propre régulateur transcriptionnel (LasR ou RhIR) ainsi que son auto-inducteur synthase (LasI ou RhII), une enzyme qui produit son AHL spécifique (61) (Figure 5). Les AHLs majoritairement produit par LasI et RhII sont respectivement *N*-(3-oxododécanyloyl)-L-homosérine lactone (oxo-C₁₂-HSL) et *N*-butanoyl-L-homosérine lactone (C₄-HSL) (76). La quantité d'auto-inducteurs augmente en fonction de la densité de la population bactérienne. Lorsque la quantité d'auto-inducteurs atteint un certain seuil (*quorum*) les AHLs se lient aux régulateurs de transcription provoquant leur changement de conformation. Ceci ayant pour conséquence, leur attachement à l'ADN et l'activation de plusieurs gènes de virulence ainsi que la production de signaux supplémentaires du QS (89) (Figure 5). Les principaux gènes régulés par les systèmes *rhl* et *las* sont ceux codant pour les sidérophores, la pyocyanine, l'acide cyanhydrique, la

lécithine (LecA), la protéase alcaline, l'élastase (LasB), les rhamnolipides ainsi que ceux impliqués dans la formation de biofilms (25, 27, 29, 111).

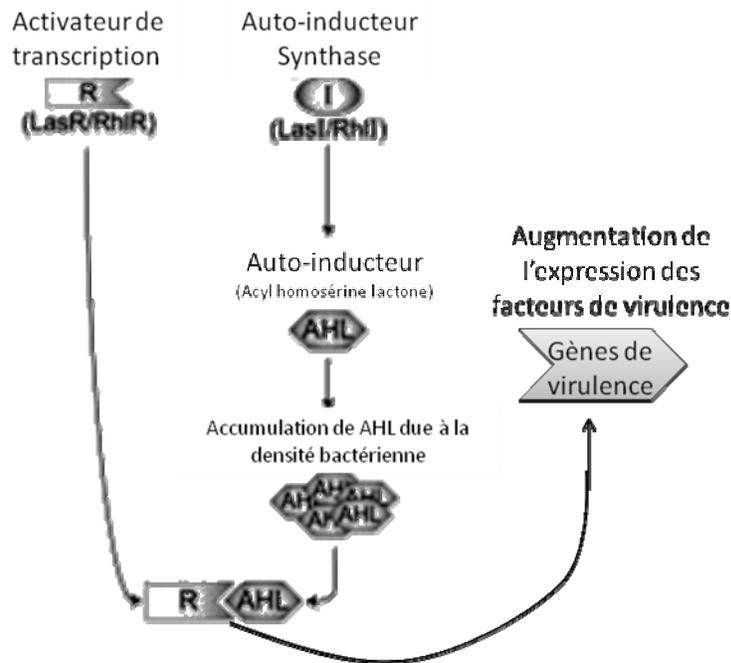


Figure 5. Schéma des systèmes de SI *las* et *rhl* de *P. aeruginosa* (modifié de Kipnis et al., 2006 (51))

Malgré la grande similitude entre ces deux systèmes du SI, ils sont deux voies distinctes dont les composantes de l'une ne peuvent remplacer celles de l'autre (89). Par contre, elles peuvent interagir via l'activateur LasR, qui a un effet positif sur l'expression des gènes *rhlR* ainsi que *rhlI* (20). LasR peut aussi contrôler l'expression de son auto-inducteur *lasI* (35).

1.2.3.1 Nouvelle communication extracellulaire

Une nouvelle molécule de signalisation intermoléculaire distincte des AHLs a récemment été découverte chez *Pseudomonas aeruginosa*. Cette molécule qui vient s'imbriquer dans la hiérarchie de la SI est le 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline dénommé le « *Pseudomonas* quinolone signal » (PQS) (65, 77). Elle fait partie d'une grande classe de métabolites secondaires ayant des propriétés antimicrobiennes soit les 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) (21, 62) dont le précurseur le 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) fait aussi partie. Ces molécules, HHQ et PQS, sont les deux HAQs agissant en tant que molécules de signalisation extracellulaire chez *P. aeruginosa* (29). Le rôle de ces molécules est entre autre de maintenir une bonne concentration de fer à l'intérieur de la cellule en agissant comme un chélateur de fer. PQS n'intervient pas à titre de sidérophore mais plutôt en retenant le fer à la surface de la cellule afin de faciliter l'action des sidérophores (25). Il est aussi impliqué dans la régulation de gènes comme l'élastase, les rhamnolipides, la lectine (LecA), la pyocyanine ainsi que la formation des biofilms (25). Ces gènes sont aussi régulés par le système de SI *rhl*. Une étude a donc suggéré que PQS agissait en activant le système de SI *rhl* (65). D'autres travaux ont par la suite menés à l'hypothèse que PQS puisse réguler directement ces gènes sans passer par la régulation de *rhlR* ou *rhlI* (35).

1.2.3.1.1 Opérons *pqsABCDE* et *phnAB*

L'opéron *pqsA-E* code pour des protéines qui permettent la biosynthèse des différents HAQs tandis que l'opéron *phnAB* code pour des enzymes de synthèse de l'acide anthranilique (AA). L'acide anthranilique est le précurseur des HAQs.

Les rôles précis de chacun des gènes de l'opéron *pqsA-E* ne sont pas complètement élucidés mais on connaît de plus en plus certaines de leurs fonctions. Le gène ***pqsA*** code pour un produit semblable à une coenzyme ligase A qui serait nécessaire dans l'activation du carbonyle de l'AA dans la voie de biosynthèse des HAQs. Une étude récente suggère aussi son implication dans la synthèse d'un nouveau métabolite produit par *Pseudomonas aeruginosa* le 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ) dont le rôle reste à élucider (60). Les gènes ***pqsBCD*** coderaient quant à eux pour des enzymes impliqués dans la production de longues chaînes d'hydrocarbures dans la synthèse de PQS à partir de l'AA (35). Le gène ***pqsE*** est le seul de l'opéron qui n'influence pas la production des HAQs. Il serait cependant nécessaire pour la production de phénazines comme la pyocyanine LecA et l'acide cyanhydrique (35). Le système de régulation *rhl* a un effet de répression sur l'opéron *pqsABCDE* (64).

En résumé, les protéines encodées par l'opéron *phnAB* sont nécessaires pour la production de l'AA qui est le précurseur des HAQs. Par la suite, les gènes *pqsA-D* codent pour des enzymes qui produisent HHQ et le transforment en PQS, qui sont les deux HAQs impliqués dans la communication intercellulaire(29). Le gène ***pqsH*** ne fait pas partie de l'opéron *pqs* mais est aussi important dans la conversion de HHQ à PQS (35) (Figure 6). C'est via ce gène que LasR peut aussi contrôler la biosynthèse de PQS (65).

1.2.3.1.2 MvfR

L'identification récente d'un nouveau régulateur transcriptionnel nécessaire pour la virulence complète de *P. aeruginosa* a permis d'élargir notre compréhension de la hiérarchie dans la voie du QS. Ce régulateur MvfR peut contrôler la production des HAQs car il agit à la fois sur l'opéron *pqsA-E* et *phnAB* (20). Il régule aussi plusieurs gènes contrôlés par le QS sans influencer l'expression de *larRI* et *rhIRI* ou d'AHLs. D'autres travaux suggèrent que PqsE serait essentiel à l'activité régulatrice de MvfR mais des études supplémentaires sont nécessaires afin d'élucider la manière dont PqsE influence les fonctions de MvfR (20). Il a été démontré que LasR, le régulateur transcriptionnel le plus en amont dans la hiérarchie du QS, contrôlerait positivement l'expression de MvfR (113) et que RhIR régulerait négativement MvfR (25). Il est aussi documenté que les deux HAQs agissant comme signaux intercellulaires soit HHQ et PQS, sont des ligands du régulateur MvfR. Ces derniers provoquent un changement de conformation permettant à MvfR de lier entre autre le promoteur de l'opéron *pqsA-E* (113).

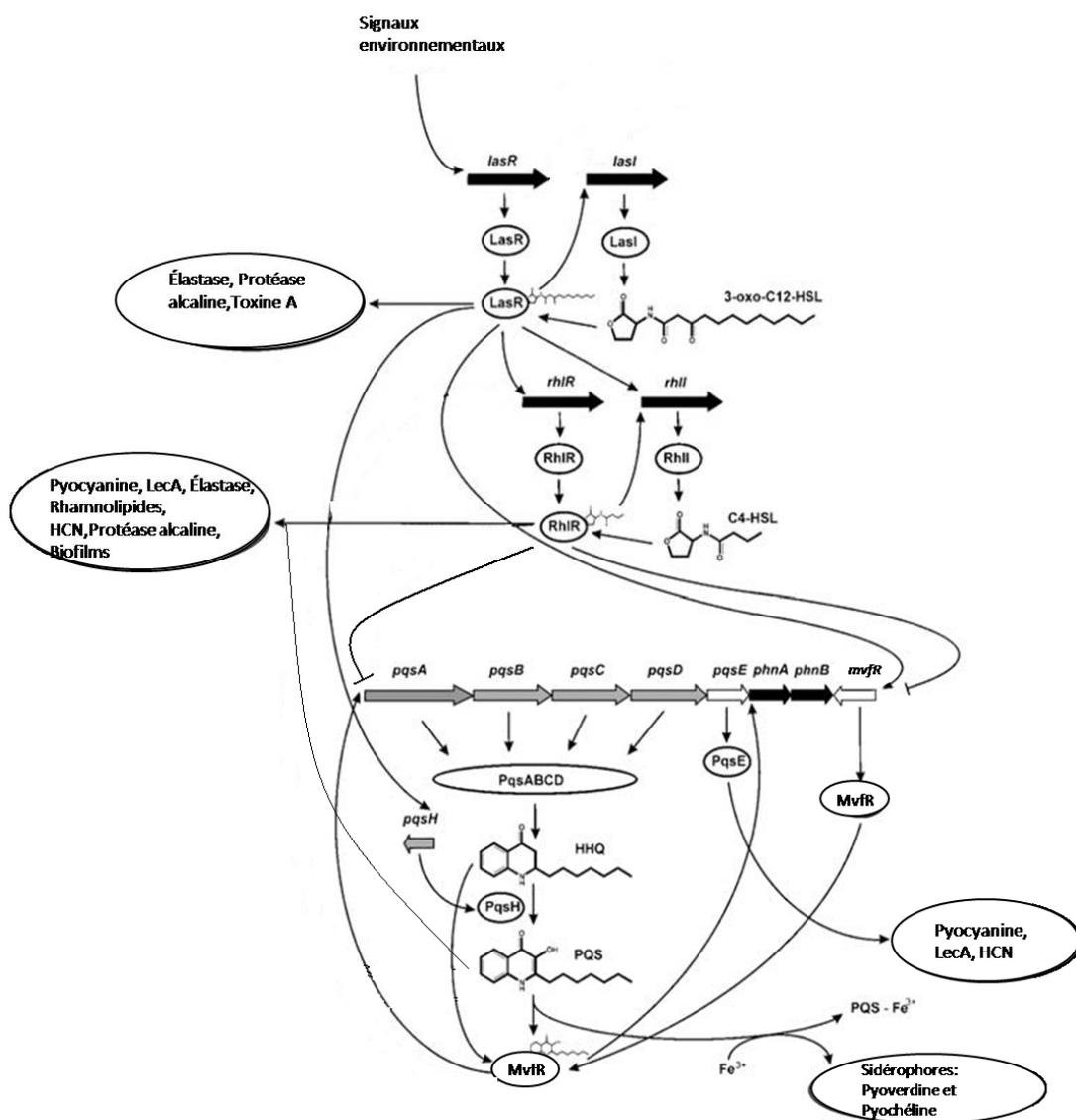


Figure 6. Signalisation intercellulaire chez *Pseudomonas aeruginosa* (modifié de Dubern *et al.*, 2008 (29))

1.2.4 Le système à deux composantes GacA/GacS

Le système à deux composantes GacA/GacS est d'une grande importance chez plusieurs *Pseudomonas* fluorescents car il gouverne la production de divers métabolites secondaires et exoenzymes (114). La première composante de ce système est la protéine GacA, un régulateur de réponse cytoplasmique très conservé chez les bactéries Gram-négatives. GacS (LemA), la deuxième composante, est une kinase associée à la membrane interne (85, 105, 114). Le système GacA/GacS fonctionne en activant la production des petits ARN non-codants RsmY et RsmZ. RsmY et RsmZ vont annuler l'effet répresseur de la protéine RsmA qui est liée près ou au site de liaison du ribosome des gènes cibles (86, 114). GacA est un régulateur global surtout chez *P. fluorescens*, *P. syringae* ainsi que *P. viridiflava* où une mutation de ce gène abolit la production de métabolites secondaires et d'exoenzymes. L'inactivation de GacA chez *P. aeruginosa*, entraîne une réduction dans la formation de C₄-HSL, RhlR et LasR (85). Une pathogénicité diminuée observée chez un mutant GacA de *P. aeruginosa* est donc le résultat de la réduction dans l'activation des facteurs de virulence contrôlés surtout par le système de QS *rhl* (Figure 7).

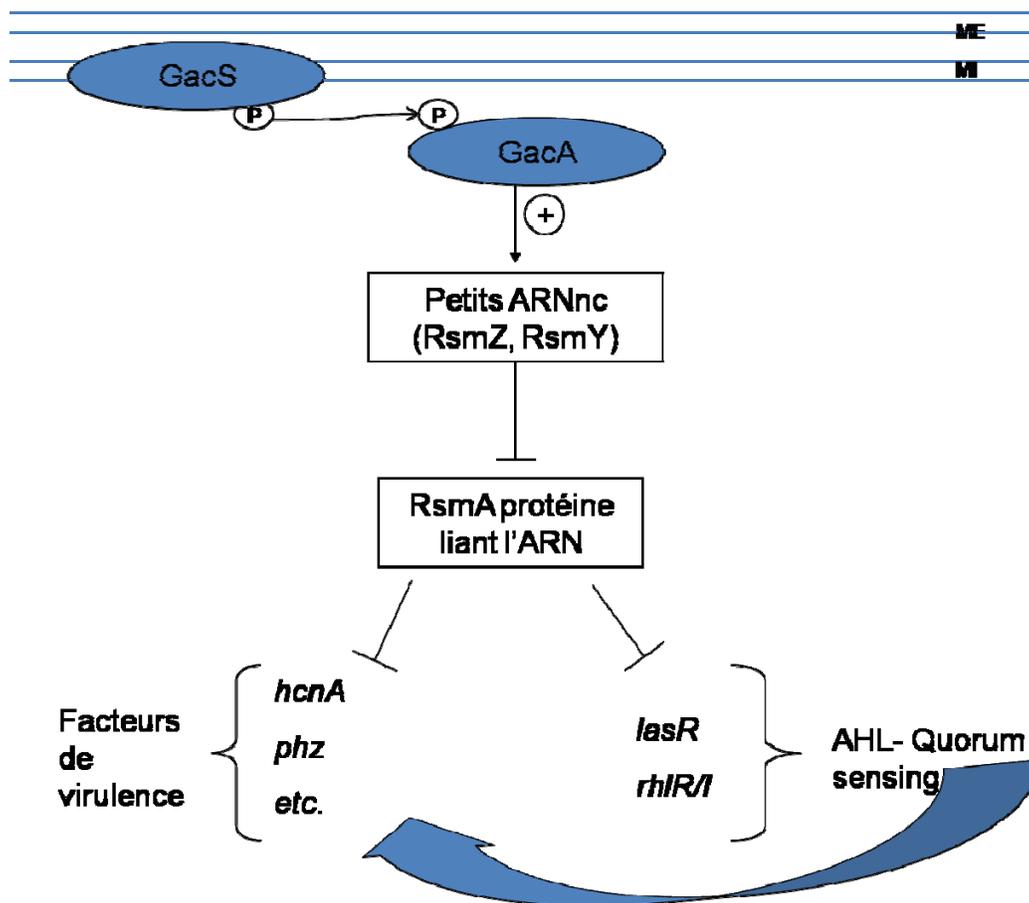


Figure 7. Voie de régulation sous l'influence du système à deux composantes GacA/GacS chez *P. aeruginosa* (modifié de Dubuis *et al.*, 2007(31)).

1.3 Autres composés naturels

1.3.1 La propolis

La propolis est une substance résineuse récoltée, transformée et utilisée par les abeilles et est de couleur jaune pâle à brun foncé (Figure 8). Ce mélange complexe est entre autres utilisé afin de protéger l'entrée de la ruche contre les organismes envahisseurs d'où le terme propolis qui est composé du préfixe grec « pro » signifiant *devant* et du suffixe « polis » pour *cité* ou ruche dans ce cas-ci (13). La propolis est aussi très importante dans la ruche afin de sceller les trous, lisser les murs et aussi afin de momifier les carcasses (13, 81). Dû à ses grandes activités biologiques, la propolis maintient l'intégrité de la ruche qui autrement serait un endroit idéal de croissance pour plusieurs microorganismes (15, 81).



Figure 8. Propolis provenant du Québec (Photo : A. Faille, 2007)

Afin de concocter ce mélange, les abeilles vont tout d'abord récolter différentes substances produites par les plantes majoritairement sur les bourgeons, les feuilles et les fissures d'écorce d'arbres pour ensuite les mélanger avec de la cire et leurs enzymes salivaires (81). Le mélange produit, fort complexe, est très variable selon l'endroit où la ruche est située. La composition dépend principalement de la source de plantes où les abeilles ont récolté. Plusieurs études démontrent que les abeilles butineuses vont utiliser une source spécifique d'arbre, selon la région, afin de produire la propolis (7, 16, 81). Dans plusieurs zones tempérées, c'est le peuplier qui est reconnu comme principale source pour la propolis (7). Ceci dit, il existe à travers le monde plusieurs autres sources comme le pin, les palmiers, le saule, etc. Au Canada, les sources d'arbres qui ont les plus grandes ressemblances au niveau de la composition phénolique avec la propolis sont les peupliers *Populus deltoides*, *Populus fremonii* et *Populus maximoviczi*. Au Québec, peu d'études ont été effectuées sur la composition de la propolis donc la source reste encore à être déterminée.

1.3.1.1 Composition chimique

On dénombre aujourd'hui une grande variété de composés chimiques retrouvés dans la propolis dont le nombre varie entre 150 et 300 par échantillon (48, 52). Certaines classes de molécules sont retrouvées dans tous les échantillons de propolis à différentes concentrations, comme illustré dans le Tableau II suivant :

Tableau II. Composés chimiques majoritaires retrouvés dans la propolis provenant de différentes sources (modifié de Cuesta *et al.* (18)).

Composés	Substances	Abondance (%)
Résines	Flavonoïdes	45–55
	Terpènes	
	Coumarines	
	Acides phénoliques et esters	
Cires et acides gras	Provenant des abeilles ou des plantes	25–35
	Acides gras polyinsaturés	
Huiles essentielles	Volatiles	10
Pollen	Protéines	5
	Acides aminés libres	
	Vitamines (A, B, C, E, PP, etc.)	
Autres substances	Traces de minéraux (Cu, Mn, Fe, Zn, Al, Ag, Ca, Mg, Co, etc.)	5
	Cétones	
	Lactones	
	Quinones	
	Stéroïdes	
	Sucres	

1.3.1.2 Activités biologiques et applications

Les nombreuses propriétés biologiques de la propolis sont reconnues depuis déjà plusieurs siècles (13). En effet, elle était utilisée déjà 300 ans avant Jésus-Christ pour concocter les remèdes.

De nos jours, plusieurs études ont permis d'identifier des propriétés antifongiques, anti-inflammatoires, anesthésiques, antibactériennes, antivirales et anti-oxydantes au propolis (18, 90, 102). Ces propriétés varient selon la composition de la propolis, qui change selon la région et la végétation.

Grâce à ses propriétés antimicrobiennes, la propolis est utilisée encore de nos jours en médecine douce sous plusieurs formes. On en retrouve autant dans la gomme à mâcher, dans les suppléments alimentaires, dans les produits de beauté, shampoing, savon et dentifrice. La toxicité de la propolis est très faible ce qui permet de l'utiliser aussi bien dans le shampoing que pour la consommation humaine (108).

Les flavonoïdes qui y sont présents en grande quantité ont souvent été reconnus comme les principaux responsables de l'activité antimicrobienne de la propolis et, en particulier, de son activité antifongique (75). La pinocembrine, galangine et pinobanksine sont trois flavonoïdes constituant la propolis présentant des activités antifongiques intéressantes et peu de toxicité (2, 81).

1.3.2 Trans-cinnamaldéhyde

La trans-cinnamaldéhyde (*trans*-3-Phenyl-2-propenal) est la molécule active extraite du tronc des canneliers qui donne l'odeur ainsi que la saveur à la

cannelle. Elle est utilisée dans plusieurs produits commerciaux à base de cannelle comme la gomme, les bonbons, les savons, chandelles, etc. Comme cette molécule naturelle est assez coûteuse, la trans-cinnamaldéhyde est souvent utilisée sous sa forme synthétique. Les propriétés antimicrobiennes, mais surtout antifongiques font de ce composé organique un bon candidat comme agent anti-*Saprolegnia* (6, 100).

1.3.3 Extraits de la forêt boréale

Les plantes ont su survivre et s'adapter aux nombreux envahisseurs au cours des siècles. Tous les jours, elles doivent se défendre contre les prédateurs bactériens, fongiques et viraux. Afin de combattre ces nombreux envahisseurs, elles produisent divers métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes (4). Elles sont donc d'excellentes sources de composés actifs contre plusieurs parasites (84).

Les plantes ont donc été utilisées dans la médecine douce et traditionnelle afin de combattre diverses infections depuis fort longtemps. Une équipe de chercheurs de l'Université du Québec à Chicoutimi s'est donc concentrée sur l'extraction des plantes retrouvées dans la forêt boréale dans la recherche de nouvelles molécules bioactives (99). Ces extraits naturels sont de bons candidats afin de trouver un mélange ou une molécule pour traiter la saprolégniose.

1.4 Buts et Hypothèses

On retrouve dans la littérature diverses études sur des antifongiques testés contre la saprolégniose. Par contre, aucun composé trouvé à ce jour n'est aussi efficace que le vert de malachite.

Le but principal de cette étude est donc d'identifier de nouveaux composés qui pourraient remplacer efficacement le vert de malachite afin de combattre cette maladie très fréquente en aquaculture.

Pour ce faire, différentes sources de composés susceptibles d'intérêt ont été investiguées soit la propolis, les extraits de forêt boréale et une souche bactérienne isolée d'une pisciculture et ce, d'une façon fortuite. La section suivante de ce mémoire rapporte les travaux effectués avec cette souche bactérienne, qui sont organisés sous forme de manuscrit. Les travaux réalisés avec la propolis et les extraits végétaux sont rapportés en Appendice.

L'activité antifongique des extraits bruts ou après fractionnement a été évaluée en utilisant deux techniques. L'une faisait appel aux graines de chanvre en microplaques et l'autre, aux cylindres d'agar colonisés en éprouvette. Nous avons aussi choisi d'utiliser une souche de *S. parasitica* isolée d'une pisciculture québécoise : un tel « isolat clinique » se rapprochait de la situation réelle tout en démontrant une croissance plus vigoureuse que les souches de collection.

Lors de l'isolement du champignon à partir d'une pisciculture, nous avons identifié une espèce bactérienne présentant une activité anti-*Saprolegnia* : les travaux de purification et d'identification des molécules responsables sont décrits au chapitre suivant.

Chapitre 2: Article

2.1 Présentation du manuscrit

L'article suivant, intitulé « Inhibition of *Saprolegnia* sp. by the intercellular signalling molecules 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) produced by *Pseudomonas aeruginosa* » a été rédigé suite aux expériences effectuées lors de ma maîtrise d'avril 2007 à juin 2009. Ce manuscrit écrit par moi-même, a été révisé par mon directeur Dr. Pierre Belhumeur et mon co-directeur Dr. Grant Vandenberg. Il sera soumis sous peu au journal pour publication. Les auteurs de cet article sont dans l'ordre : Arianne Faille, Martin Clément, Éric Déziel, Grant Vandenberg et Pierre Belhumeur.

Le surnageant de culture de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a démontré des effets antagonistes contre la moisissure aquatique *Saprolegnia* sp. Le but des expériences présentées dans cet article a donc été d'isoler la molécule anti-*Saprolegnia* du surnageant de culture de bactérie, à l'aide de différentes techniques d'extraction et de séparation. Les résultats ainsi que les conclusions de ces analyses sont présentés dans le manuscrit ci-dessous. Il est à noter que la numérotation des figures de l'article a été adaptée pour ce mémoire.

2.2 Inhibition of *Saprolegnia* sp. by the intercellular signalling molecules 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) produced by *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Fungal diseases of fishes are second only to bacterial diseases in term of losses to aquaculture industry. One of the major fungal pathogens of salmonids is an oomycete, *Saprolegnia* sp. This water mold is a ubiquitous saprophyte in fresh and brackish water. It is known to infect dead fish eggs and then spreads to healthy eggs causing mortalities. Saprolegniosis, the disease caused by *Saprolegnia* sp., is a secondary infection affecting only injured, stressed or infected fishes. The apparition of white to grey patches of mycelium is often the first sign of infection. Since malachite green has been banned, no new effective treatments have been discovered. *Pseudomonas* sp. are well known producers of extracellular factors with antimicrobial activities. Here, we report that the culture supernatant of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* can inhibit the growth of *Saprolegnia* sp. Both thin layer chromatography (TLC) and bioautography were used to analyze the active molecules in the supernatant of *P. aeruginosa*. The intercellular signal molecule produced by *P. aeruginosa*, 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ), a cell-to-cell signaling molecule, was identified as the active compound against *Saprolegnia*. This is the first study to identify an anti-*Saprolegnia* molecule produced by *P. aeruginosa* and to demonstrate the antifungal activity of HHQ.

Keywords : Saprolegniosis, *Saprolegnia* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ), Thin layer chromatography (TLC), bioautography.

INTRODUCTION

Saprolegniaceae is a microbial family commonly known as “water molds” that are largely responsible for mycotic infections in wild and cultured fish (50). Water molds are characterized by their biflagellate and mobile zoospores (23, 112). The water molds from the genus *Saprolegnia* are ubiquitous in freshwater ecosystems and can infect fish and fish eggs causing saprolegniosis. *Saprolegnia* sp. are saprophytes usually considered opportunistic secondary invaders infecting mostly salmonids that are injured, stressed or infected with other pathogens (12, 72). Although known as secondary invaders, some virulent strains of *Saprolegnia* have been shown to cause primary infections. The first sign of infection is the apparition of white to grey patches of cotton-like mycelium starting from the head and fins and spreading all over the body (12). Fish with saprolegniosis will rapidly die from osmoregulatory failure due to the destruction by the fungus of dermis and epidermis (101). Until 2002, saprolegniosis was kept under control with the use of malachite green; this organic dye is a very effective fungicide and was used to treat fungal and protozoan infections since the mid-1930s (97). The use of malachite green as a treatment on food fish is now banned because of its toxic and carcinogenic effects to consumers of treated fish (70). Although new treatments have been developed (11, 79, 97), none is as effective as malachite green. Water molds are now known to be second to bacterial diseases as the most important source of mortalities in salmonids causing global economical losses in aquaculture (67). It is therefore urgent to find a new treatment against saprolegniosis.

It is essential that any new treatment is not harmful to the environment and human health. Fungicides of microbial origin are known to be more specific on the

target organisms therefore less toxic to the environment. Antimicrobial compounds are often produced by organisms that live in the same environment as the target microbe. In healthy fishes, an important part of the microflora of skin and gills are *Pseudomonas* sp (14). Some species of *Pseudomonas* are also known to be biocontrol agents for fish diseases (46, 98). For example, *Pseudomonas fluorescens* has been reported to inhibit the growth of *Saprolegnia* sp. (10), *Vibrio anguillarum* (38) and *Aeromonas salmonicida* (37, 46) all three causing important fish diseases. The use of *Pseudomonas* sp. as probiotic is not possible because it is recognized as the causal agent of bacterial hemorrhagic septicemia in fish (104). Fluorescent pseudomonads are ubiquitous gram-negative bacteria comprising *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichorii*, *P. viridiflava* and *P. aeruginosa* (57) that are characterized by the production of fluorescent pigments. They have been used as biocontrol agents against plant diseases in many studies because of their capacity to produce therapeutic secondary metabolites (31, 32, 59, 93). These different species are able to produce a large variety of compounds and the inhibitory activity of these bacteria is often associated with the production of antibiotics (32, 59), hydrogen cyanide (31), siderophores (40, 55) or rhamnolipids (93).

Pseudomonas aeruginosa, an opportunistic human pathogen, is one of the most studied species of fluorescent pseudomonads. The uniquely large genome of this bacterium is responsible for its capacity to adapt to hostile environments and to infect different hosts (51). Like other *Pseudomonas*, this species can produce a large variety of secondary metabolites responsible for its antimicrobial properties (55, 58, 92). Furthermore, several reports have demonstrated that *Pseudomonas aeruginosa* was able to inhibit *Candida albicans* filamentation (36, 44).

Synthesis of important antibiotics is controlled in response to cell density by an intercellular communication system called quorum sensing (QS) (51). The best studied systems of QS are mediated by extracellular signaling molecules called *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) (89). In *P. aeruginosa*, two QS systems named *las* and *rhl*, are based on the production of AHLs (76). They are composed of a transcriptional regulator (LasR/RhIR) and an AHL synthase (LasI/RhII) which produces its specific AHL. The major AHL produced by LasI is *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (oxo-C₁₂-HSL) and *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C₄-HSL) for RhII. The cell-to-cell signaling molecule oxo-C₁₂-HSL was reported as an inhibitor of *C. albicans* filamentation (44). The transcriptional regulator and its cognate AHL form a complex when AHLs reached a threshold level. This complex binds to specific regions of DNA activating genes, a number of them coding for virulence factors (111). The two QS systems act in a hierarchical manner, LasR influencing *rhlR/I* expression (56) (Figure 9). In *P. aeruginosa*, a new QS system has been recently discovered and it is based on the production of a group of extracellular 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) (21). HAQs are known to be a large class of antimicrobials molecules also acting as iron chelators (25). HAQ-analogues that are required for quorum sensing regulation have been reported in other bacteria such as some species of *Burkholderia* (107). The *phnAB* operon encodes enzymes for the synthesis of anthranilic acid (AA), the precursor of all HAQs (35). The enzymes from the operon *pqsABCDE* are responsible for the primary biosynthesis of HAQs (21, 35). Two HAQs act as intercellular signaling molecules; 3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline called the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) and its precursor 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) (21, 77) (Figure 9). Conversion of HHQ into PQS is controlled by PqsH (21) whose expression is mediated by the transcription regulator LasR (65). PQS is also implicated in the regulation of the expression of genes controlled by the *rhl* system (26, 65). RhIR has been demonstrated to be a repressor of the expression of the operon *pqsA-E* (64). The global regulator GacA

is also implicated in the production of some secondary metabolites (30, 86, 114). Among all *Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa* virulence seems to be the least affected by a *gacA* null mutation. In *P. aeruginosa*, GacA influences the production of some virulence genes regulated by *rhl* system (85).

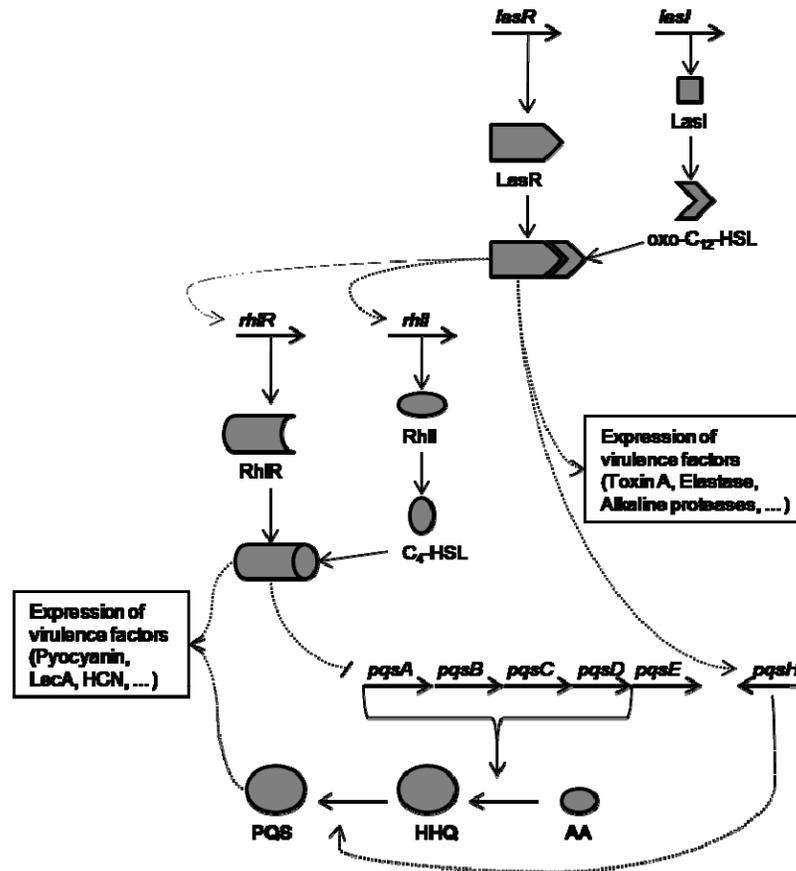


Figure 9 Schematic overview of *P. aeruginosa* cell-to-cell molecules interactions. *pqsA-D* encodes proteins involved in HHQ synthesis and *pqsH* regulates the conversion of HHQ into PQS. The complex LasR/oxo-C₁₂-HSL, upregulates the transcription of *pqsH* and *rhIR/rhII* while RhIR/C₄-HSL represses the transcription of *pqsABCDE* operon.

In the present study, we described the anti-*Saprolegnia* activity of *P. aeruginosa* strain PA14 culture supernatant. PA14 *pqsA*, *pqsH*, *gacA*, *rhIR* and *lasR* mutants are compared with the wild type for the identification of the genes involved in the biosynthesis of the active compound. The intercellular signal molecule produced by *P. aeruginosa*, 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ), is identified as the active compound against *Saprolegnia*. The identification of a new anti-*Saprolegnia* molecule produced by *P. aeruginosa* is reported for the first time in this study.

MATERIAL AND METHODS

Bacteria and culture conditions

P. aeruginosa strain PA14 was used in this study. PA14 *pqsA*, *pqsE*, *pqsH*, *gacA*, *rhIR*, *lasR* mutants and wild type were obtained from Dr. Éric Déziel of INRS-Institut Armand-Frappier Research Centre (Laval, Canada). All bacteria were cultivated in nutrient broth; supernatants were obtained by growth at 37°C with aeration for 48 h (initial OD₆₀₀ of 0.05).

Saprolegnia culture conditions and zoospore production

Saprolegnia sp. was isolated from fry suffering from saprolegniosis from the Pisciculture de la Jacques-Cartier, Cap-Santé, Quebec, Canada. The isolate was cultured on glucose-yeast extract (GY) agar (10g glucose; 5g yeast extract; 20g agar; in 1L water) at 18°C. The production of zoospores was triggered using a technique modified from Udomkusonsri et al. 2005 (103). Briefly, after two days of incubation, an agar-plug with mycelia of 10 mm in diameter was cut and placed into a 125 ml Erlenmeyer flask containing 20 ml of GY broth. After three days of incubation at 18°C, the agar-plug was removed and the mycelium was rinsed three times with sterile sporulation medium (SM: 0.25mM KCL; 0.25mM CaCl₂; 20mM HEPES; 0.01 g/L phenol red; pH 7.4). Then, 20 ml of MS was added to the flask for an incubation of 24 hours and this step was repeated twice. The suspension was then centrifuged for 10 min at 5 000 x g. The pellet was finally suspended in GY at a final concentration of 20 000 spores/ml.

Chemicals

All chemicals used were analytical grade. *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), 4-hydroxy-2-alkylquinoline (HHQ), 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide (HQNO) and 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinoline (HMAQ) were kindly provided to us by Dr. Éric Déziel of INRS-Institut Armand-Frappier Research Centre (Laval, Canada). All solvents were purchased from Sigma (Oakville, Ontario, Canada).

Supernatant extraction

After 48 hours of incubation, bacterial cells were removed from cultures (200ml) by centrifugation at 15 000 x *g* for 10 min and filtered through 0.45 µm filter membranes (Millipore, Billerica, MA). Filtered supernatants were extracted three times with ethyl acetate (70ml). Ethyl acetate extracts were evaporated using a rotary evaporator and the crude extracts were suspended in ethyl acetate at 25 mg/ml. The concentrated ethyl acetate extracts were stored at -20°C.

Antifungal assays

Ethyl acetate supernatant extracts (30 µl volumes added to obtain the following concentrations of 20, 50, 100 and 200 ppm) were added to tubes and left to air dry until the solvent had completely evaporated. Then, GY broth (3ml) was added to each tube containing 1×10^6 *Saprolegnia* zoospores (prepared as described above). After five days of incubation at 18°C, growth of *Saprolegnia* hyphae was scored.

Thin-layer chromatography and bioautography

Molecules from the supernatant extracts were separated using thin layer chromatography (TLC) plates (silica gel, HPTLC-HLF 150 μm , Analtech inc., Newark, DE). The mobile phase used was chloroform and methanol (90:10 (v/v)). Two separate TLC (duplicates) were prepared. One plate was used to visualize migrated compounds by first treating it with 40% sulfuric acid followed by a heating step at 110°C for 10 min. The second TLC plate was used for bioautography as described below.

After migration, the bioautography assay plates were left at room temperature for two days in the dark. They were then covered with soft GY agar (0.6%, 45°C). After hardening, the surface was inoculated with 2 ml of a suspension (2×10^6 zoospores/ml) using a sterile swab. After three days of incubation at 18°C, the white mycelium completely covered the plates except for the clear inhibition zones delimiting active compounds.

RESULTS

Broth assay

The results obtained from the broth assay are illustrated in Figure 10. Supernatant extracted by ethyl acetate from *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 exhibited significant antifungal activity. The minimal inhibitory concentration (MIC) of *P. aeruginosa* supernatant extract is 100 ppm. The negative control which is an extract of the nutrient broth used for the growth of the bacterium did not inhibit *Saprolegnia* at any of the concentrations tested.

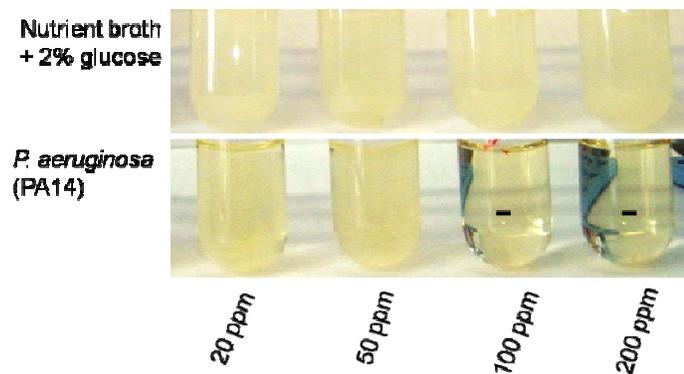


Figure 10. Effect of supernatant extracts of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 wild type (wt) compared with nutrient broth extract on *Saprolegnia* mycelium. *Saprolegnia* zoospores were at a concentration of 1×10^6 zoospores/ml. After 5 days at 18°C, inhibition of hyphal growth (-) was observed at a concentration of 100 ppm and 200 ppm.

Isolation of active compounds (TLC and bioautography)

Analysis of the contents of the supernatant extracts of *P. aeruginosa* mutants and wild type was performed by TLC (Figure 11.A). Extracts from culture medium contained almost no visible compound compared to those from *P. aeruginosa* strain PA14. Extracts from wild type and *gacA* mutant strains seemed very similar. The extract exhibiting the most visually different antifungal activity was obtained from the *rhIR*⁻ supernatant which seemed to have lost most of the major polar compounds present in the wild type (Figure 11, lane 4). *P. aeruginosa pqsA*⁻ extracts still contained the polar compounds while one, less polar, was missing.

Bioautography of the TLC plate showed two areas containing substances which inhibited *Saprolegnia* sp. growth (Figure 11.B, spots a and b). The two inhibition areas were present in both *P. aeruginosa* wild type and *gacA*⁻ extracts, one area containing polar (b) and less polar molecules (a). The most polar inhibiting compounds were missing from the *rhIR*⁻ mutant (Fig. 11B, lane 4). In contrast, the *pqsA*⁻ extract had only the inhibition zone from the polar compounds (Fig. 11B, lane 5, spot b). *P. aeruginosa lasR*⁻ extract, demonstrating the same activity of *rhIR*⁻ with only one area of inhibition (not shown).

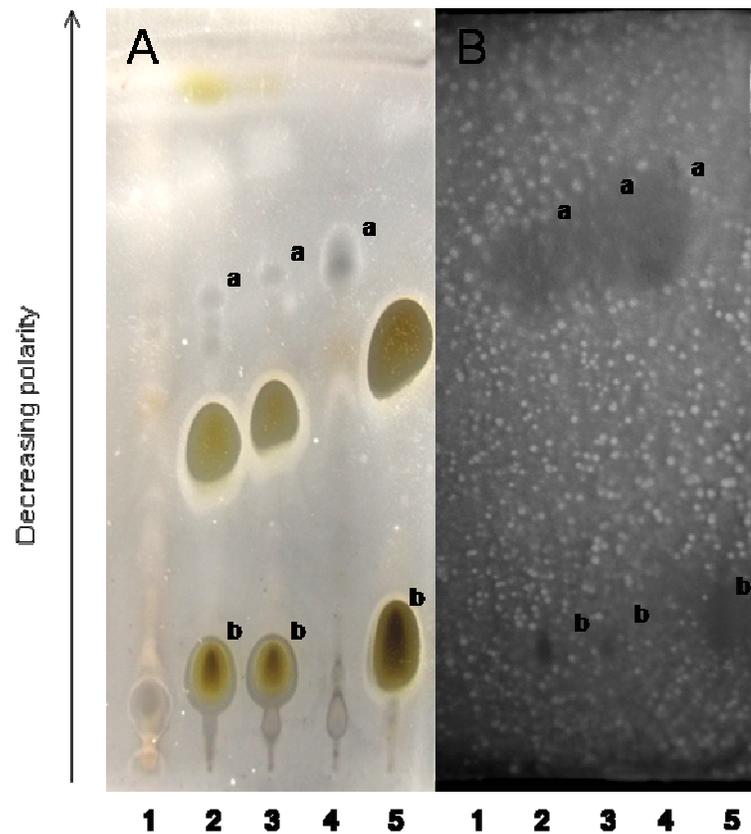


Figure 11. Separation of supernatant extracts of 1) NB + 2% glucose; 2) *P. aeruginosa* PA14 WT; 3) *P. aeruginosa gacA*⁻; 4) *P. aeruginosa rhIR*⁻ and 5) *P. aeruginosa pqsA*⁻. Thin layer chromatography (TLC) plates with chloroform and methanol (90:10 (v/v)) with the mobile phase visualized. A. TLC plate developed with 40% sulphuric acid. B. Bioautography of a TLC using GY agar inoculated with 2×10^6 zoospores/ml. Two inhibition zones are indicated (a and b).

Identification of the active compound (TLC and bioautography)

In order to identify molecules responsible for the inhibitory activities seen by bioautography (Figure 11), *P. aeruginosa* wild type and mutant extracts were compared with pure HAQs using TLC plate (Figure 12). *P. aeruginosa* extracts of wild type and *pqsH*⁻ mutant strains showed similar composition by TLC plate

analysis, although the area with less polar compounds (a) seemed smaller than in the wild type. This same area of active compounds was still absent from the *pqsA*⁻ supernatant extract. Only extracts of *P. aeruginosa* wild type and *pqsH* had the area of inhibition (a) as determined by bioautography.

Important HAQs such as *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), 4-hydroxy-2-alkylquinoline (HHQ), 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide (HQNO) and 4-hydroxy-3-methyl-2-alkylquinoline (HMAQ) were all tested by TLC and bioautography plates. HHQ, PQS and HQNO were all at a same migration distance (R_f) as that of the active area in extract from *P. aeruginosa* but only HHQ showed activity by bioautography (not shown). As shown in Figure 12, HMAQ did not migrate to the same distance as HHQ or other compounds in *P. aeruginosa* and it was not active against *Saprolegnia* sp. by bioautography.



Figure 12. Separation of 1) supernatant extract of *P. aeruginosa pqsA*; 2) supernatant extract of *P. aeruginosa pqsH*; 3) supernatant extract of *P. aeruginosa* PA14 WT; 4) HHQ; 5) HMAQ. Thin layer chromatography (TLC) plate with chloroform and methanol (90:10 (v/v)) as the mobile phase can be visualized. TLC plate was developed with 40% sulfuric acid. Areas exhibiting antifungal activity by bioautography are indicated (a).

DISCUSSION

A bacterial antagonist of *Saprolegnia* sp., *Pseudomonas fluorescens*, was isolated in the same environment as the fungus in several studies (10, 14). Bly *et al.* reported that the inhibitory activity of *P. fluorescens* was not associated to the culture supernatant. Here, we determined that *P. aeruginosa* supernatant was active against the devastating fish pathogen *Saprolegnia* sp. The reason why Bly *et al.* did not detect diffusible and spontaneous production of an anti-*Saprolegnia* activity could be due to a number of things such as experimental conditions and strain differences, to mention few of them. The further characterization of this antifungal activity as a potential lead for a new therapeutic agent against saprolegniosis was therefore pursued.

We have shown that this diffusible antifungal activity could be extracted by ethyl acetate. Indeed, determination of the MIC of this crude extract was performed using a broth assay. One should bear in mind that the extract is fairly complex and that the active compound is diluted out while there could also be synergistic effects of other molecules improving the effectiveness of the active agent.

P. aeruginosa has the capacity to produce a large amount of extracellular factors that have antibiotic properties. The production of these molecules is controlled in a cell density dependent manner by quorum sensing systems. To identify the nature of the activity from the extract, we first used Thin Layer Chromatography. Coupled with the development of a bioautography procedure allowing the detection of antifungal activity *in situ*, we could compare the profile pattern of compounds secreted in the growth medium from wild type and mutants of *P. aeruginosa*, after chromatography. The bioautography technique revealed

the presence of two areas with inhibiting activities in *P. aeruginosa* PA14 culture supernatant extracts. The area with the greatest inhibitory activity was present in several *P. aeruginosa* quorum sensing mutants such as *gacA*, *rhlR*, *lasR* and *pqsH*. This result suggests that the active compound is not under the influence of the two QS systems mediated by AHLs *las* and *rhl*. It also indicates that the two signaling molecules oxo-C₁₂-HSL and C₄-HSL are not responsible for anti-*Saprolegnia* activity. Since the active molecule was still present in a *pqsH* mutant, it is therefore not regulated by the *Pseudomonas* quinolone signal molecule and is not PQS (35). Many of the extracellular factors with antimicrobial activity are under the regulation of *las*, *rhl* or PQS QS systems, or the regulator GacA. Interestingly, the *pqsA* mutant extract was the only one that did not have the strongest area of inhibitory activity using the bioautography technique. This mutant cannot produce any HAQs because PqsA is implicated in the first step of production, possibly by activating the carbonyl of anthranilic acid, the precursor of all HAQs (60). Since we had determined that PQS was not implicated in this activity, the intercellular signaling molecule HHQ was then suspected to be associated with the anti-*Saprolegnia* activity.

To test this hypothesis, chemically synthesized *P. aeruginosa* HAQs were tested for potential anti-*Saprolegnia* activity using TLC plates and bioautography. Purified compounds tested included HHQ, PQS, HQNO and HMAQ. Only three of these HAQs are produced by *P. aeruginosa* namely HHQ, PQS and HQNO while HMAQ is a HAQs analogue produced by some of *Burkholderia* species (107). HAQs have been known as a class of antimicrobial compounds produced by *P. aeruginosa* for many years (110) but PQS and HHQ have no known antibiotic activities. However, HQNO has been reported to inhibit the growth of some gram-positive bacteria (21, 63). Our results indicated that only HAQs produced by *P. aeruginosa*, HHQ, PQS and HQNO, had the same migration profile than the active area on the TLC plate. Using the technique of bioautography technique, purified

HHQ was the sole compound inhibiting the growth of *Saprolegnia*. Even if the structure of HMAQ is very similar to HHQ differing only by a methyl group, no inhibitory activity was observed for that analogue purified compound. The distance of migration and inhibitory activity of the HHQ on TLC plates confirmed our hypothesis that the area of inhibition present in the supernatant extracts of *P. aeruginosa* *gacA*, *rhIR*, *lasR*, *pqsH* and wild type was due to the activity of the HHQ molecule.

Other reports describe that bacterial quorum sensing signaling molecules can also act as antagonist to eukaryotic cell growth. For instance, Hogan *et al.*(44) have shown that the *P. aeruginosa* inhibitory activity against *Candida albicans* is the intercellular molecule oxo-C₁₂-HSL. However, to our knowledge, no other reports demonstrate the antifungal activity of HHQ.

Our observation that a bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, is an antagonist to *Saprolegnia* sp., matches the findings of other studies which reported the anti-*Saprolegnia* activity of other *Pseudomonas* sp. (10). However, this is the first time that a diffusible molecule associated with the QS molecule HHQ was identified as an inhibitor of *Saprolegnia* growth. Further evaluation of HHQ toxicity and its effectiveness should be undertaken *in vivo*, on fish and fish eggs. The identification of this anti-*Saprolegnia* molecule is an important step in developing a new treatment against saprolegniosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pierre East from the Pisciculture de la Jacques-Cartier (Québec, Canada) for providing us with *Saprolegnia* infected fry. This work was supported by Fisheries and Oceans Canada through the Aquaculture Collaborative Research

and Development (ACRDP) program, the Réseau Aquaculture Québec (RAQ) and the Société de recherche et de développement en aquaculture continentale (SORDAC). Finally, we would also like to thank Sébastien Croisetière and Julie Shareck for helpful discussions.

Chapitre 3 : Discussion

La moisissure aquatique *Saprolegnia*, présente en eau douce et saumâtre est un grave problème en aquaculture. Depuis que le vert de malachite ne peut plus être utilisé comme traitement à cause de ses effets toxiques et cancérigènes (97), un besoin urgent de trouver un nouveau remède efficace pour le contrôle de cette infection chez les poissons et leurs œufs est apparu. Nous avons choisi d'identifier de nouveaux composés naturels comme agents possibles présentant une activité antifongique contre *Saprolegnia sp.* Des agents soupçonnés tel la cinnamaldéhyde ont été investigués tout comme la propolis, des extraits de forêt boréale de même que des composés d'origine bactérienne. Cette dernière source fait l'objet d'un manuscrit et constitue le chapitre principal de ce mémoire.

Un antagoniste bactérien de *Saprolegnia sp.* a été isolé du même environnement où l'on retrouve les poissons ayant la saprolégniose (10, 14). Nous avons identifié la bactérie présentant une telle activité comme étant *Pseudomonas fluorescens*. Cette activité a été observée précédemment par Bly *et al.*, qui ont fait croître *P. fluorescens* et *Saprolegnia sp.* en co-culture sur pétri. Ils n'ont cependant pas été en mesure de reproduire l'effet antifongique de la bactérie en utilisant uniquement son surnageant (10). Ceci peut être attribuable au fait qu'ils n'aient pas concentré le surnageant et qu'ils aient testé celui-ci par la méthode des disques sur pétri, ce qui entraîne l'utilisation d'une faible quantité d'échantillon. Ils concluent ainsi que le facteur inhibiteur de *Saprolegnia sp.* n'est pas un élément sécrété dans le milieu. Pour des raisons pratiques, nous avons décidé d'utiliser *P. aeruginosa* car cette bactérie semblait présenter une activité inhibitrice similaire et même supérieure à celle de *P. fluorescens*. De plus, nous

avons accès à une collection de mutants, ce qui peut augmenter les possibilités d'identifier le facteur responsable de l'activité antifongique. Nos techniques, différentes de celles de Bly *et al.*, ont permis de mettre en évidence un facteur diffusible anti-*Saprolegnia* produit par *Pseudomonas*. En effet, l'utilisation de la technique par cylindre d'agar (Voir **Chapitre 2: Article**) a confirmé que l'extrait de surnageant de *P. aeruginosa* possédait aussi l'activité antifongique. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait du surnageant est de 100 ppm. Sachant que le surnageant est actif, on peut conclure que la ou les molécules actives sont des facteurs sécrétés par *P. aeruginosa*. Il est important de noter que cet extrait de surnageant est un mélange contenant plusieurs molécules extracellulaires dans lequel l'activité peut provenir d'une ou plusieurs molécules qui sont susceptibles d'avoir des effets antagonistes ou synergiques.

P. aeruginosa est reconnue comme étant une importante productrice d'une grande variété de facteurs extracellulaires ayant des propriétés antibiotiques (40, 51). Bien que l'activité anti-*Saprolegnia* de *Pseudomonas* sp. ait été observée dans la littérature (10, 12, 46), il n'y a eu aucune tentative pour en identifier l'élément causal. Notre étude est la première à identifier par chromatographie sur couche mince (CCM) une molécule active provenant du surnageant de *Pseudomonas aeruginosa*. Afin d'identifier la nature de l'activité anti-*Saprolegnia* de *P. aeruginosa*, plusieurs mutants dans les voies de signalisation du «quorum sensing» ont été comparés. En séparant les composantes de l'extrait par CCM et en utilisant la technique de bioautographie, deux zones d'activité ont été découvertes. La région démontrant la plus grande zone d'inhibition est commune à la plupart des surnageants de mutants. En effet, les mutants *lasR* et *rhIR* présentent cette zone d'activité sur CCM. Ce résultat démontre que l'effet inhibiteur recherché n'est pas dû à des molécules constituantes ou influencé par les systèmes de QS ayant des AHLs comme molécules de signalisation. Un AHL, le oxo-C₁₂-HSL, est d'ailleurs connu pour son activité antifongique chez *Candida*

albicans (44). De plus, le mutant *pqsH* qui est déficient dans la production de PQS (35), a aussi cette zone d'inhibition caractéristique sur CCM. Le mutant *gacA* détient cette importante zone d'inhibition démontrant que l'activité n'est pas reliée aux facteurs de virulence influencés par GacA (85). Cependant, cette zone d'inhibition était absente de l'extrait de surnageant du mutant *pqsA*⁻, déficient dans la production des HAQs. En comparant ces résultats, il est possible d'émettre l'hypothèse que la molécule de signalisation intercellulaire HHQ pourrait être responsable de la zone d'activité la plus importante de l'extrait de surnageant de *P. aeruginosa*.

Afin de tester cette hypothèse, des HAQs synthétiques et purifiées ont été comparées sur CCM et par bioautographie. Les molécules synthétiques de *P. aeruginosa* HHQ, PQS et HQNO migraient toutes au même endroit que la zone d'inhibition d'intérêt sur CCM. Ce résultat suggère que les molécules retrouvées dans la zone d'inhibition sont semblables ou identiques aux HAQs testés. HHQ et PQS sont des HAQs auxquelles aucune activité antimicrobienne n'avait jusqu'à ce jour été démontrée (22, 60, 62). Nos expérimentations n'ont pas révélé une activité anti-*Saprolegnia* au HQNO, bien que cette molécule ait une activité antimicrobienne bien documentée (21, 63). Le seul HAQ démontrant une activité antifongique sur CCM contre *saprolegnia* est le HHQ. Un analogue des HAQs soit le 4-hydroxy-3-méthyl-2-alkylquinolines (HMAQ), produit par certaines espèces de *Burkholderia*, a aussi été analysé sur TLC mais n'a pas présenté d'activité contre *Saprolegnia*. La distance de migration (R_f) et l'activité anti-*Saprolegnia* obtenue par bioautographie de HHQ concordent avec les résultats précédemment obtenus avec les extraits de surnageants des mutants. Ces résultats confirment que la molécule de signalisation intercellulaire HHQ de *P. aeruginosa* est bel et bien responsable de l'une des activités anti-*Saprolegnia*.

Bien que des molécules de signalisation intercellulaires ont déjà été identifiées en tant qu'antagonistes de cellules eucaryotes, il est inédit que ces propriétés soient attribuées à HHQ (44, 62). Il est d'ailleurs peu probable que l'activité anti-*Saprolegnia* induite par la molécule HHQ soit aussi retrouvée chez *P. fluorescens* car cette bactérie n'a pas été identifiée comme productrice de cette molécule de signalisation (21, 107).

Nos travaux portaient sur l'identification de nouveaux composés naturels pour contrer la saprolégniose. En plus de HHQ, nous avons identifié de nouveaux composés naturels prometteurs tels que la trans-cinnamaldéhyde, la propolis et les extraits de la forêt boréale (voir résultats Annexe I, p. VI).

Afin d'identifier l'agent ou les agents actif(s) contre *Saprolegnia* contenu dans la propolis, des analyses supplémentaires ont été effectuées. La méthode de séparation des molécules par CCM a permis de déceler par bioautographie les zones où les molécules actives se trouvaient. Par contre, la technique de HPLC qui a une force de résolution plus élevée a permis de séparer davantage les molécules de notre mélange. Plusieurs molécules intéressantes ont jusqu'à maintenant été identifiées comme la pinocembrine, un flavonoïde uniquement retrouvé dans la propolis (43). La pinocembrine qui est connu pour ces activités antifongiques, pourrait bien être la molécule active dans notre fraction extraite à l'hexane. Elle a d'ailleurs été identifiée comme inhibitrice de croissance de *Candida albicans in vitro* (66).

Quant aux extraits de forêt boréale, quelques uns d'entre eux sont fort prometteurs avec des CMI de 500 ppm malgré leur grande complexité. En effet, ces extraits contiennent une grande quantité de molécules, il est donc normal de retrouver une CMI un peu plus élevée. En isolant certaines de ces molécules, les CMI pourraient être beaucoup plus basses. Il est important de noter que les

extraits contenant le plus d'activité (*Picea mariana*, *Picea resinosa*, *Picea glauca* et *Larix laricina*) sont des extraits de conifères de la famille des *Pinaceae*. La caractérisation des molécules de ces mélanges pourrait mener à l'identification de nouvelles composantes plus efficaces contre le champignon *Saprolegnia*.

Dans ce mémoire, l'effet anti-*Saprolegnia* de plusieurs nouveaux composés naturels a été démontré *in vitro*. Il sera nécessaire d'en vérifier l'efficacité et la toxicité *in vivo* sur les poissons et leurs œufs afin d'en évaluer le potentiel comme agent thérapeutique contre la saprolégniose. L'identification de ces nouvelles molécules anti-*Saprolegnia* est un grand pas dans la voie pour découvrir un nouveau traitement efficace pour contrer les infections par la moisissure aquatique *Saprolegnia* sp.

Références

1. 2008, posting date. Vert Malachite. Agence canadienne d'inspection des aliments. [Online.]
2. **Adelmann, J., M. Passos, D. H. Breyer, M. H. dos Santos, C. Lenz, N. F. Leite, F. M. Lancas, and J. D. Fontana.** 2007. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: the pinocembrin biomarker by capillary techniques. *J Pharm Biomed Anal* **43**:174-8.
3. **Alderman, D. J.** 1985. Malachite green: a review. *Journal of fish diseases* **8**:289-298.
4. **Alviano, D. S., and C. S. Alviano.** 2009. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Curr Pharm Biotechnol* **10**:106-21.
5. **Baehler, E., M. Bottiglieri, M. Pechy-Tarr, M. Maurhofer, and C. Keel.** 2005. Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Appl Microbiol* **99**:24-38.
6. **Bang, K. H., D. W. Lee, H. M. Park, and Y. H. Rhee.** 2000. Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:1061-3.
7. **Bankova, V.** 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid Based Complement Alternat Med* **2**:29-32.
8. **Beakes, G., and H. Ford.** 1983. Esterase isoenzyme variation in the genus *Saprolegnia*, with particular reference to the fish-pathogenic *S. diclina-parasitica* complex. *J Gen Microbiol* **129**:2605-19.
9. **Bly, J. E., and L. W. Clem.** 1992. Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol* **2**:159-171.
10. **Bly, J. E., Quiniou, S. M-A, Lawson, L. A. and Clem, L.W.** 1997. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases* **20**:35-40.
11. **Branson, E.** 2002. Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with the fungus *Saprolegnia* species. *Vet Rec* **151**:539-41.

12. **Bruno, D. W., and B. P. Wood.** 1999. Fish Diseases and Disorders, p. 599-643. *In* C. INTERNATIONAL (ed.), *Viral, Bacterial and Fungal Infections*, vol. 3, Aberdeen, UK.
13. **Burdock, G. A.** 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* **36**:347-63.
14. **Cahill, M. M.** 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microb. Ecol.* **19**:21-41.
15. **Christov, R.** 2003. Application of Gas Chromatography and Mass Spectrometry for Analysis of Propolis from Different Geographic Regions. Université de Montréal, Montreal.
16. **Christov, R., B. Trusheva, M. Popova, V. Bankova, and M. Bertrand.** 2005. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat Prod Res* **19**:673-8.
17. **Cocker, W. C.** 1923. *The Saprolegniaceae with Notes on Other Water Molds*. University of North Carolina Press, Chapel Hill, North Carolina.
18. **Cuesta, A., A. Rodriguez, M. A. Esteban, and J. Meseguer.** 2005. In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol* **18**:71-80.
19. **Cui, C., and H. Tseng.** 2004. Estimation of ribosomal RNA transcription rate in situ. *Biotechniques* **36**:134-8.
20. **Deziel, E., S. Gopalan, A. P. Tampakaki, F. Lepine, K. E. Padfield, M. Saucier, G. Xiao, and L. G. Rahme.** 2005. The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* **55**:998-1014.
21. **Deziel, E., F. Lepine, S. Milot, J. He, M. N. Mindrinos, R. G. Tompkins, and L. G. Rahme.** 2004. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1339-44.
22. **Deziel, E., F. Lepine, S. Milot, and R. Villemur.** 2003. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**:2005-13.

23. **Dieguez-Uribeondo, J., L. Cerenius, and K. Söderhäll.** 1994. Repeated zoospore emergence in *Saprolegnia parasitica*. *Mycological Research* **98**:810-815.
24. **Dieguez-Uribeondo, J., J. M. Fregeneda-Grandes, L. Cerenius, E. Perez-Iniesta, J. M. Aller-Gancedo, M. T. Telleria, K. Soderhall, and M. P. Martin.** 2007. Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina*-*Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genet Biol* **44**:585-601.
25. **Diggle, S. P., S. Matthijs, V. J. Wright, M. P. Fletcher, S. R. Chhabra, I. L. Lamont, X. Kong, R. C. Hider, P. Cornelis, M. Camara, and P. Williams.** 2007. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol* **14**:87-96.
26. **Diggle, S. P., K. Winzer, S. R. Chhabra, K. E. Worrall, M. Camara, and P. Williams.** 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* **50**:29-43.
27. **Diggle, S. P., K. Winzer, A. Lazdunski, P. Williams, and M. Camara.** 2002. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**:2576-86.
28. **Dowling, D. V., and O. G. Fergal.** 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology* **12**:133-141.
29. **Dubern, J. F., and S. P. Diggle.** 2008. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* **4**:882-8.
30. **Dubuis, C., and D. Haas.** 2007. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* **73**:650-4.
31. **Dubuis, C., C. Keel, and D. Haas.** 2007. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads, *European Journal of Plant Pathology*. KPNV.
32. **Dwivedi, D., and B. N. Johri.** 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. *Current Science* **85**:1693-1703.

33. **Emmerich, R., and D. Löw.** 1899. Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben *Medical Microbiology and Immunology* **31**:1-35.
34. **Fregeneda-Grandes, J. M., F. Rodriguez-Cadenas, M. T. Carbajal-Gonzalez, and J. M. Aller-Gancedo.** 2007. Detection of 'long-haired' *Saprolegnia* (*S. parasitica*) isolates using monoclonal antibodies. *Mycol Res* **111**:726-33.
35. **Gallagher, L. A., S. L. McKnight, M. S. Kuznetsova, E. C. Pesci, and C. Manoil.** 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**:6472-80.
36. **Gibson, J., A. Sood, and D. B. Hogan.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa-Candida albicans* Interactions: Localization and Fungal Toxicity of a Phenazine Derivative. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:504-513.
37. **Gram, L., T. Lovold, J. Nielson, J. Melchiorson, and B. Spanggaard.** 2001. In vitro antagonism of probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* **199**:1-11.
38. **Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, and T. F. Nielsen.** 1999. Inhibition of vibrio anguillarum by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl Environ Microbiol* **65**:969-73.
39. **Haas, D., and C. Keel.** 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathology* **41**:117-153.
40. **Harrison, F., J. Paul, R. C. Massey, and A. Buckling.** 2008. Interspecific competition and siderophore-mediated cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J* **2**:49-55.
41. **Hatai, K., and G. Hoshiai.** 1992. Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* coker. *J Wildl Dis* **28**:532-6.
42. **He, J., R. L. Baldini, E. Deziel, M. Saucier, Q. Zhang, N. T. Liberati, D. Lee, J. Urbach, H. M. Goodman, and L. G. Rahme.** 2004. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2530-5.
43. **Hernandez, J., F. M. Goycoolea, J. Quintero, A. Acosta, M. Castaneda, Z. Dominguez, R. Robles, L. Vazquez-Moreno, E. F. Velazquez, H.**

- Astiazaran, E. Lugo, and C. Velazquez.** 2007. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med* **73**:1469-74.
44. **Hogan, D. A., A. Vik, and R. Kolter.** 2004. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol* **54**:1212-23.
45. **Hulvey, J. P., D. E. Padgett, and J. C. Bailey.** 2007. Species boundaries within *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota) based on morphological and DNA sequence data. *Mycologia* **99**:421-9.
46. **Irianto, A., and B. Austin.** 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* **25**:633-642.
47. **Johnson, T. W., R. L. Seymour, and D. E. Padgett** 2002, posting date. Biology and systematics of the Saprolegniaceae <http://www.iluminadlib.org>. [Online.]
48. **Kartal, M., S. Kaya, and S. Kurucu.** 2002. GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z Naturforsch [C]* **57**:905-9.
49. **Ke, X., J. Wang, Z. Gu, M. Li, and X. Gong.** 2009. *Saprolegnia brachydanis*, A New Oomycete Isolated from Zebra Fish. *Mycopathologia* **167**:107-13.
50. **Khoo, L.** 2000. Fungal diseases in fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **9**:102-111.
51. **Kipnis, E., T. Sawa, and J. Wiener-Kronish.** 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et maladies infectieuses* **36**:78-91.
52. **Krell, R.** 1996. Value-added products from beekeeping: Chapter 5 propolis, vol. 124. *Agric Serv Bull*, Rome.
53. **Lamont, I. L., P. A. Baere, U. Ochsner, A. I. Vasil, and M. L. Vasil.** 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* **99**:7072-7077.
54. **Lamont, I. L., and L. W. Martin.** 2003. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**:833-842.

55. **Lamont, I. L., and L. W. Martin.** 2003. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**:833-42.
56. **Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams, and A. Lazdunski.** 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**:1137-46.
57. **Leclerc, H., J.-L. Gaillard, and M. Simonet.** 1995. Les grands groupes de bactéries, p. 403-408, *Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien.*, France.
58. **Lee, J. Y., S. S. Moon, and B. K. Hwang.** 2003. Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. *Appl Environ Microbiol* **69**:2023-31.
59. **Leisinger, T., and R. Margraff.** 1979. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol Rev* **43**:422-42.
60. **Lepine, F., V. Dekimpe, B. Lesic, S. Milot, A. Lesimple, O. A. Mamer, L. G. Rahme, and E. Deziel.** 2007. PqsA is required for the biosynthesis of 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ), a newly identified metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia thailandensis*. *Biol Chem* **388**:839-45.
61. **Lépine, F., E. Déziel, S. Milot, and L. G. Rahme.** 2003. A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Biochimica et Biophysica Acta* **1622**:36-41.
62. **Lepine, F., S. Milot, E. Deziel, J. He, and L. G. Rahme.** 2004. Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**:862-9.
63. **Machan, Z. A., G. W. Taylor, T. L. Pitt, P. J. Cole, and R. Wilson.** 1992. 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **30**:615-23.
64. **McGrath, S., D. S. Wade, and E. C. Pesci.** 2004. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett* **230**:27-34.

65. **McKnight, S. L., B. H. Iglewski, and E. C. Pesci.** 2000. The Pseudomonas quinolone signal regulates rhl quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol **182**:2702-8.
66. **Metzner, J., H. Bekemeier, M. Paintz, and E. Schneidewind.** 1979. On the antimicrobial activity of propolis and propolis constituents. Pharmazie **34**:97-102.
67. **Meyer, F. P.** 1991. Aquaculture disease and health management. J Anim Sci **69**:4201-8.
68. **Molina, F. I., S. C. Jong, and G. Ma.** 1995. Molecular characterization and identification of Saprolegnia by restriction analysis of genes coding for ribosomal RNA. Antonie Van Leeuwenhoek **68**:65-74.
69. **Morin, R.** 2006. Les traitements des oeufs et des poissons contre les champignons du type Saprolegnia, p. 6 p. Direction de l'innovation et des technologies, Agriculture, pêcheries et alimentation Québec, Québec.
70. **Morin, R., and C. Boucher.** 2005. Le vert de malachite est interdit d'utilisation en pisciculture. Pourquoi et comment s'en passer., p. 1-7, L'AQUACOLE, vol. 10. Association des aquaculteurs du Québec, Québec.
71. **Neish, G. A.** 1977. Observations on saprolegniasis of adult sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). Journal of Fish Diseases **10**:513-522.
72. **Neish, G. A., and B. R. Green.** 1977. Fractionation of Saprolegnia diclina (Oomycetes) satellite DNAs by AgNO₃/Cs₂SO₄ density gradient centrifugation. Biochim Biophys Acta **479**:411-5.
73. **Neish, G. A., and G. C. Hughes.** 1980. Diseases of Fishes: Fungal Diseases of Fishes, vol. 6. T.F.H Publications, Neptune, NJ.
74. **Nowak-Thompson, B., S. J. Gould, J. Kraus, and J. E. Loper.** 1994. Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Can J Microbiol **40**:1064-1066.
75. **Oliveira, A. C., C. S. Shinobu, R. Longhini, S. L. Franco, and T. I. Svidzinski.** 2006. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. Mem Inst Oswaldo Cruz **101**:493-7.
76. **Pearson, J. P., L. Passador, B. H. Iglewski, and E. P. Greenberg.** 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by Pseudomonas aeruginosa. Proc Natl Acad Sci U S A **92**:1490-4.

77. **Pesci, E. C., J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg, and B. H. Iglewski.** 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11229-34.
78. **Pickering, A. D., and L. G. Willoughby.** 1982. *Saprolegnia* Infections of Salmonid Fish, p. 271-297. *In* R. J. Roberts (ed.), *Microbial Diseases of Fish*. Society for General Microbiology by Academic Press, Cumbria, U.K.
79. **Pottinger, T. G., and J. G. Day.** 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Dis Aquat Organ* **36**:129-41.
80. **Preetha, R., Jayaprakash, N.S., Philip, R., and Bright Singh, I.S.** 2006. Optimization of carbon and nitrogen sources and growth factors for the production of an aquaculture probiotic (*Pseudomonas* MCCB 103) using response surface methodology. *J of Appl Microbiol* **102**:1043-1051.
81. **Quiroga, E. N., D. A. Sampietro, J. R. Soberon, M. A. Sgariglia, and M. A. Vattuone.** 2006. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* **101**:103-10.
82. **Ramaiah, N.** 2006. A review on fungal diseases of algae, marine fishes, shrimps and corals. *Indian Journal of Marine Sciences* **35**:380-387.
83. **Raven, P. H., R. F. Evert, and S. E. Eichhorn.** 2000. Les protistes II: hétérokontées et algues vertes, p. 370-399, *Biologie Végétale*, 6e ed, Paris.
84. **Reichling, J., P. Schnitzler, U. Suschke, and R. Saller.** 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties--an overview. *Forsch Komplementmed* **16**:79-90.
85. **Reimmann, C., M. Beyeler, A. Latifi, H. Winteler, M. Foglino, A. Lazdunski, and D. Haas.** 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* **24**:309-319.
86. **Reimmann, C., C. Valverde, E. Kay, and D. Haas.** 2005. Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *J Bacteriol* **187**:276-285.
87. **Roberts, R. J.** 2001. *Fish Pathology*, 3rd ed. W. B. Saunders, Toronto

88. **Roberts, R. J., and C. J. Sheperd.** 1997. Handbook of trout and salmon diseases, 3rd ed. Fishing News Books, Oxford.
89. **Ruimy, R., and A. Andremont.** 2004. Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition Réanimation **13**:176-184.
90. **Salomao, K., P. R. Pereira, L. C. Campos, C. M. Borba, P. H. Cabello, M. C. Marcucci, and S. L. de Castro.** 2008. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. Evid Based Complement Alternat Med **5**:317-324.
91. **Sawaya, A. C., A. M. Palma, F. M. Caetano, M. C. Marcucci, I. B. da Silva Cunha, C. E. Araujo, and M. T. Shimizu.** 2002. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of Candida. Lett Appl Microbiol **35**:203-7.
92. **Soberon-Chavez, G., F. Lepine, and E. Deziel.** 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol **68**:718-25.
93. **Stanghellini, M. E., and R. M. Miller.** 1997. Biosurfactants: Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. The American Phytopathological Society **81**:4-12.
94. **Steciow, M. M., A. Paul, and K. Bala.** 2007. *Saprolegnia bulbosa* sp. nov. isolated from an Argentine stream: taxonomy and comparison with related species. FEMS Microbiol Lett **268**:225-30.
95. **Stueland, S., K. Hatai, and I. Skaar.** 2005. Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis **28**:445-53.
96. **Stueland, S., B. T. Heier, and I. Skaar.** 2005. A simple *in vitro* screening method to determine the effects of drugs against growth of *Saprolegnia parasitica*. Mycological Progress **4**:273-279.
97. **Sudova, E., J. Machova, z. Svobodova, and T. Vesely.** 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. Veterinarni Medicina **52**:527-539.
98. **Suomalainen, L. R., M. A. Tirola, and E. T. Valtonen.** 2005. Effect of *Pseudomonas* sp. MT5 baths on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout and on microbial diversity on fish skin and gills. Dis Aquat Organ **63**:61-8.

99. **Sylvestre, M., A. Pichette, A. Longtin, F. Nagau, and J. Legault.** 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J Ethnopharmacol* **103**:99-102.
100. **Tampieri, M. P., Galuppi, R., Carelle, M.S., Macchioni, F., Cioni, P.L. and Morelli, I.** 2003. Effect of Selected Essential Oils and Pure Compounds on *Saprolegnia parasitica* *Pharmaceutical Biology* **41**:584-591.
101. **Torto-Alalibo, T., M. Tian, K. Gajendran, M. E. Waugh, P. van West, and S. Kamoun.** 2005. Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. *BMC Microbiol* **5**:46.
102. **Trusheva, B., M. Popova, V. Bankova, S. Simova, M. C. Marcucci, P. L. Miorin, F. da Rocha Pasin, and I. Tsvetkova.** 2006. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* **3**:249-54.
103. **Udomkusonsri, P., and E. J. Noga.** 2005. The acute ulceration response (AUR): A potentially widespread and serious cause of skin infection in fish. *Aquaculture* **246**:63-77.
104. **Uhland, C., I. Mikaelian, and D. Martineau.** 2000. Les lésions et les maladies fongiques, p. 391-392, *Maladies des poissons d'eau douce du Québec*, Montréal (Québec).
105. **Upadhyay, A., and S. Srivastava.** 2008. Characterization of a new isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd as a potential biocontrol agent. *Lett Appl Microbiol* **47**:98-105.
106. **Van West, P.** 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist* **20**:99-104.
107. **Vial, L., F. Lepine, S. Milot, M. C. Groleau, V. Dekimpe, D. E. Woods, and E. Deziel.** 2008. *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *J Bacteriol* **190**:5339-52.
108. **Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, J. Fernandez-Lopez, and J. A. Perez-Alvarez.** 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* **73**:R117-24.
109. **Walker, T. S., H. P. Bais, E. Deziel, H. P. Schweizer, L. G. Rahme, R. Fall, and J. M. Vivanco.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol* **134**:320-31.

110. **Wells, I. C.** 1952. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*; syntheses of Pyo Ib, Pyo Ic, and Pyo III. *J Biol Chem* **196**:331-40.
111. **Whiteley, M., K. M. Lee, and E. P. Greenberg.** 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13904-9.
112. **Willoughby, L. G.** 1985. Rapid preliminary screening of *Saprolegnia* on fish. *Journal of Fish Diseases* **8**:473-476.
113. **Xiao, G., E. Deziel, J. He, F. Lepine, B. Lesic, M. H. Castonguay, S. Milot, A. P. Tampakaki, S. E. Stachel, and L. G. Rahme.** 2006. MvfR, a key *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity LTTR-class regulatory protein, has dual ligands. *Mol Microbiol* **62**:1689-99.
114. **Zuber, S., F. Carruthers, C. Keel, A. Mattart, C. Blumer, G. Pessi, C. Gigot-Bonnefoy, U. Schnider-Keel, S. Heeb, C. Reimann, and D. Haas.** 2003. GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interact* **16**:634-44.

Annexe I. Information non publiée

I.I Méthodes non publiées

I.I.I Méthode par graines de chanvre en microplaque

Deux techniques ont été élaborées pour tester l'activité antifongique de différentes molécules. L'une nécessitant l'utilisation de cylindres d'agar (**Chapitre 2: Article** p. 34) et l'autre des graines de chanvre. Brièvement, les graines de chanvre sont autoclavées à 121°C durant 20 minutes. Par la suite, un inoculum de *Saprolegnia* est déposé au centre d'une gélose glucose-yeast extract (GY, Annexe II.). Le pétri est incubé à 18°C durant 48 heures pour permettre la croissance du mycélium. Après incubation, les graines peuvent être placées au pourtour des hyphes. Une deuxième incubation de 24 heures est nécessaire pour permettre aux hyphes de coloniser les graines. Les graines peuvent ensuite être déposées dans des puits d'une microplaque contenant du sabouraud (1%, Annexe II.) ainsi que les différentes concentrations d'antifongiques à tester. Une dernière incubation de 48 heures est effectuée, toujours à 18°C afin de pouvoir déterminer s'il y a inhibition ou croissance des hyphes de *Saprolegnia*.

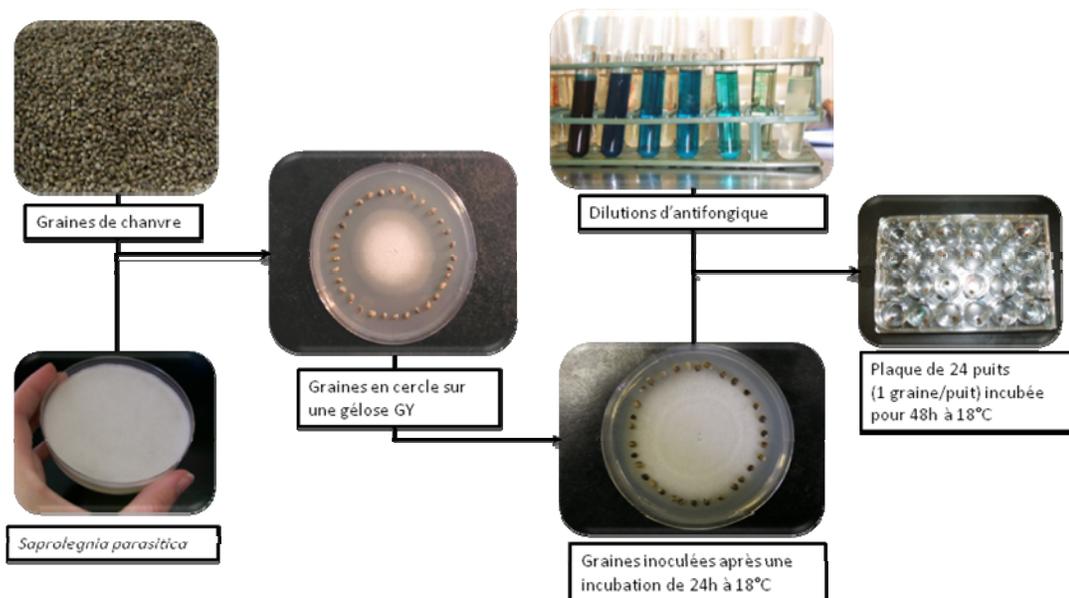


Figure 13. Méthode des graines de chanvre en microplaque (modifié de Stueland *et al.*, 2005 (96))

I.I.II Détermination du composé actif de la propolis

I.I.II.I Extraction à l'éthanol et à l'hexane

La propolis a été pesée (3 g) et elle a été solubilisée dans de l'éthanol 50, 70 et 100 %, pour un volume final de 10 ml. Ces mélanges ont ensuite été agités durant cinq jours, à l'abri de la lumière, et à la température de la pièce (22°C). Les échantillons ont par la suite été centrifugés à la vitesse de 18 000 révolutions par minute (rpm) durant 10 minutes, afin d'enlever les débris et la cire. Les échantillons ont été placés à -20°C pour une durée de 12 heures. Les extraits ont ensuite subi une deuxième centrifugation à 18 000 rpm durant 10 minutes afin d'éliminer le reste de la cire présente. Les phases alcooliques de composés de

propolis ont ensuite été extraites à l'hexane. Par la suite, les extraits à l'hexane ont été concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif afin d'analyser les ingrédients actifs (Figure 14). L'activité antifongique des divers produits dérivés de la propolis a été évaluée à l'aide des deux techniques (graines de chanvre en microplaques et milieu gélosé).



Figure 14. Évaporateur rotatif pour la concentration et l'extraction des composés actifs contenus dans la propolis.

I.I.II.II Chromatographie sur couche mince

L'étape suivante a consisté à caractériser les principes actifs contenus dans les extraits à l'hexane obtenus de la propolis. La chromatographie en couche mince (plaque de silice; CCM) a été employée afin de séparer les composés par leur polarité, en utilisant un mélange de solvants (hexane et éther). Pour ce faire, 100 µg d'extrait de propolis ont été utilisés. Les solvants utilisés pour la migration ont été l'hexane, l'éther ainsi que l'acide acétique dans un rapport 70:30:1. La révélation a été réalisée avec de l'acide sulfurique 40 % suivi d'un chauffage

(100°C) pour 10 min. Il a été par la suite possible de calculer la distance de migration des différents composés (Rf).

I.I.II.III Bioautographie

Une méthode de détection *in situ* (bioautographie) a été développée afin d'identifier les composés antifongiques efficaces qui se retrouvent séparés sur le chromatogramme en couche mince. Ainsi, une couche d'agar nutritif (GY, 0.6 %; Annexe II.) a été coulée sur la plaque de silice obtenu de la séparation de l'extrait de propolis par migration à l'aide des solvants. Après solidification de l'agar, une suspension de spores de *Saprolegnia* (souche piscicole) a été écouvillonnée. Le chromatogramme a par la suite été incubé à 18°C durant 48 heures afin de permettre la croissance du champignon et ainsi d'observer des zones d'inhibition associées aux composés actifs contre *Saprolegnia*. Il a alors été possible d'associer les Rf des zones d'inhibition de croissance du champignon aux Rf des composés retrouvés sur la CCM, révélés à l'acide sulfurique.

I.I.II.IV Chromatographie liquide à haute performance

L'étape suivante a consisté à utiliser la technique du HPLC (« *High Performance Liquid Chromatography* ») afin d'augmenter la résolution du fractionnement des composantes de la propolis obtenue par CCM. Le HPLC a servi également à récupérer les composés actifs pour les analyses subséquentes. Tout comme dans le cas de la technique par CCM, le HPLC permet de séparer les molécules selon leur polarité (colonne: Sherisorb S10W, 10 x 250 mm, Waters; éluants: hexane, hexane/éther (99:1), 7 mL/min). Les fractions récoltées ont

ensuite été analysées par CCM (100 µg/fraction) afin d'évaluer leur complexité et leur composition. En utilisant la méthode de détection par bioautographie, il a été possible d'identifier les fractions actives contre *Saprolegnia*.

Finalement, la méthode d'analyse par RP-HPLC (« *Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography* ») qui utilise une phase stationnaire différente (colonne: Sunfire C8 OBD, 19 x 100 mm, Waters; éluants: eau, méthanol/ isopropanol (50:50), 8 mL/min), a servi à purifier d'avantage les fractions. Cette technique a en effet une plus grande résolution que celle qui peut être obtenue avec le HPLC utilisant en phase normale.

I.I.II.V Spectre de masse

Les fractions qui démontraient de l'activité suite au HPLC et RP-HPLC ont été envoyées pour analyse au spectre de masse. Les fractions étaient solubilisées dans de l'hexane (1mg/L). L'appareil utilisé pour les analyses est le GC-MSD Quad (Agilent Technologies) et la méthode d'ionisation est par source d'ionisation électronique (ESI).

I.II Résultats non publiés

I.II.I Activités anti-*Saprolegnia* des différentes molécules naturelles testés *in vitro*

Le Tableau III présente les concentrations inhibitrices (CMI) et létales (CML) du vert de malachite (Figure 15), du bronopol, du trans- cinnamaldéhyde et de la propolis mesurées à l'aide de la technique avec les graines de chanvre. La CMI à 48 h du vert de malachite a été la plus faible (1-10 ppm), suivi par celle obtenue avec le bronopol, la propolis et le trans- cinnamaldéhyde, celui-ci ayant requis la plus forte CMI (250 ppm). Dans le cas de la concentration minimale létale (CML), le vert de malachite et le trans-cinnamaldéhyde ont donné respectivement la plus faible et la plus élevée CML, avec des concentrations intermédiaires pour les deux autres produits. Pour la CML, la propolis a été plus faible que celle obtenue avec le bronopol.

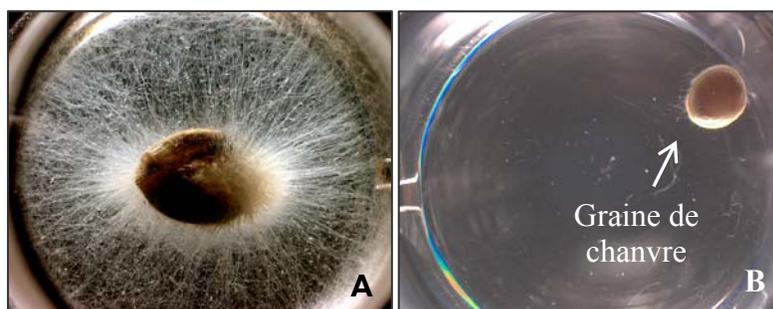


Figure 15 Exemple de (A) croissance de *Saprolegnia* sur une graine de chanvre et d'inhibition (B) par le vert de malachite.

Tableau III. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et létales (CML) de différents composés testés contre *S. parasitica* par la méthode de graines de chanvre.

Substances	CMI (ppm)	CML (ppm)
	48 heures	60 min
Vert de malachite	1 - 10	50
Bronopol	50	250
Trans-cinnamaldéhyde	250	1 000
Propolis	100	175

Le Tableau IV présente l'activité anti-*Saprolegnia* de plusieurs extraits de la forêt boréale. Tous ont démontré à différents degrés, de l'activité contre *Saprolegnia* mais certains ont une CMI très élevée (≥ 1000 ppm). Par contre, plusieurs extraits comme ceux de *Picea mariana*, *Picea resinosa*, *Picea glauca* et *Larix laricina* ont des concentrations inhibitrices de 500 ppm, ce qui est très encourageant compte tenu de la complexité des mélanges.

Tableau IV. Concentrations minimales inhibitrices d'extraits de la forêt boréale contre le champignon aquatique *S. parasitica* par la méthode de graines de chanvre. Les astérisques (*) représentent les extraits les plus actifs.

Extraits	Concentration minimale inhibitrice(MIC) ppm
<i>Betula papyrifera</i>	>1 000
<i>Betula alleghaniensis</i>	≥10 000
<i>Picea mariana</i>*	500
<i>Pinus resinosa</i>*	500
<i>Pinus banksiana</i>	1 000
<i>Abies balsamea</i>	≥10 000
<i>Larix laricina</i>*	500
<i>Picea glauca</i>*	500
<i>Pinus strobus</i>	>1 000

I.II.II Composé actif de la propolis

La Figure 16 présente le profil de migration obtenu par la séparation sur TLC des composés provenant des extraits de propolis à l'hexane. Les composés dont la présence est révélée par l'acide sulfurique indiquent que plusieurs d'entre eux sont de polarité moyenne puisqu'ils ne se rendent pas jusqu'au front de migration. On retrouve sur cette figure les composés séparés de la propolis qui ont présenté une activité antifongique sur *Saprolegnia* tel qu'indiqué par les deux zones d'inhibition de croissance du champignon les plus importantes (Figure 16.B). Leurs R_f associés sont inscrits dans les encadrés. Selon la figure, des

zones d'inhibition de croissance de *Saprolegnia* (Rf 0.836 et 0.491) sont associées à certaines zones du chromatogramme obtenu de la séparation de l'extrait de propolis (Rf 0.84 et 0.484).

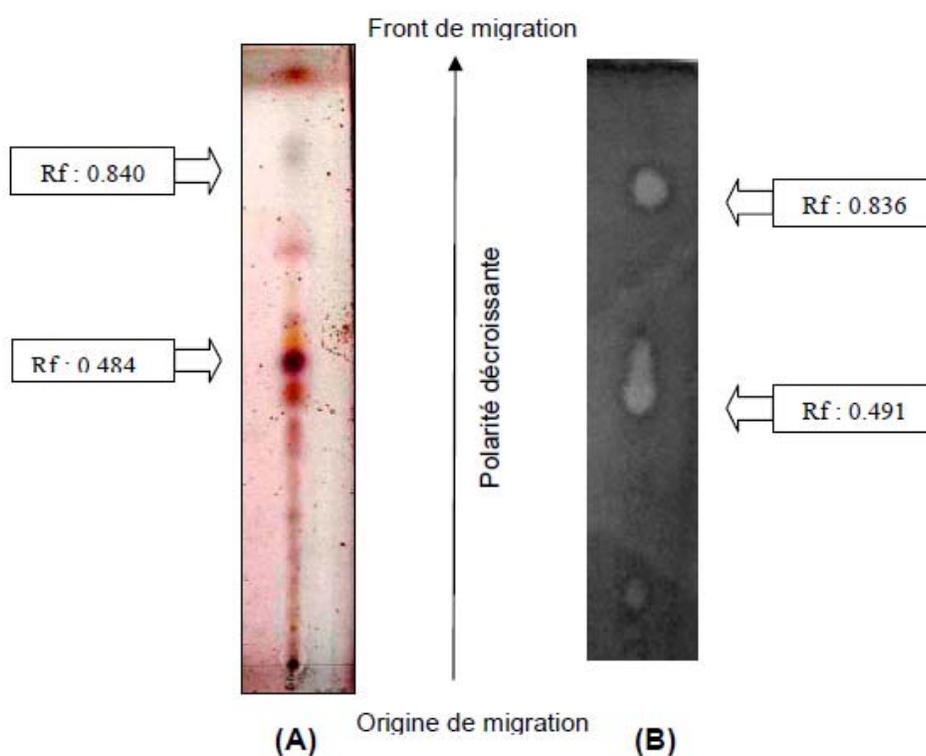


Figure 16. Chromatographie sur couche mince après migration d'un extrait de propolis (100 μ g) par un mélange de solvants (hexane : éther de 50 :50) (A) révélé à l'acide sulfurique 40% et (B) révélé par la méthode de bioautographie. Les zones d'inhibition de croissance où l'on retrouve les molécules actives sont visibles par des zones claires (grises).

La Figure 17 présente un graphique HPLC montrant les pics d'absorption à 290 nm en fonction du temps de sortie (temps de rétention) des molécules présentes dans la propolis. À l'aide du HPLC, l'extrait à l'hexane de la propolis a

été séparé en 33 fractions afin d'en isoler l'agent actif. Afin d'en connaître la complexité, chaque fraction recueillie a été analysée par CCM. La Figure 18 présente deux CCM des différentes fractions de propolis extraites par HPLC. On y retrouve également les fractions démontrant de l'activité anti-*Saprolegnia* (astérisque) qui ont été observées par la méthode d'évaluation par bioautographie. Parmi les 33 fractions analysées, les fractions 11 et 25 ont montré la plus forte activité inhibitrice contre *Saprolegnia*. Les analyses subséquentes ont été effectuées sur la fraction 11 qui semblait avoir une plus faible complexité.

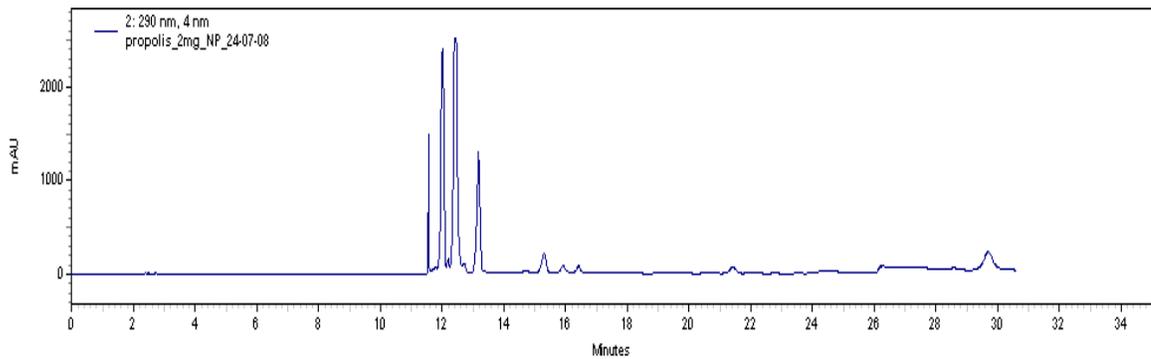


Figure 17. Graphique HPLC montrant les pics d'absorption à 290 nm des molécules extraites à l'hexane de la propolis.

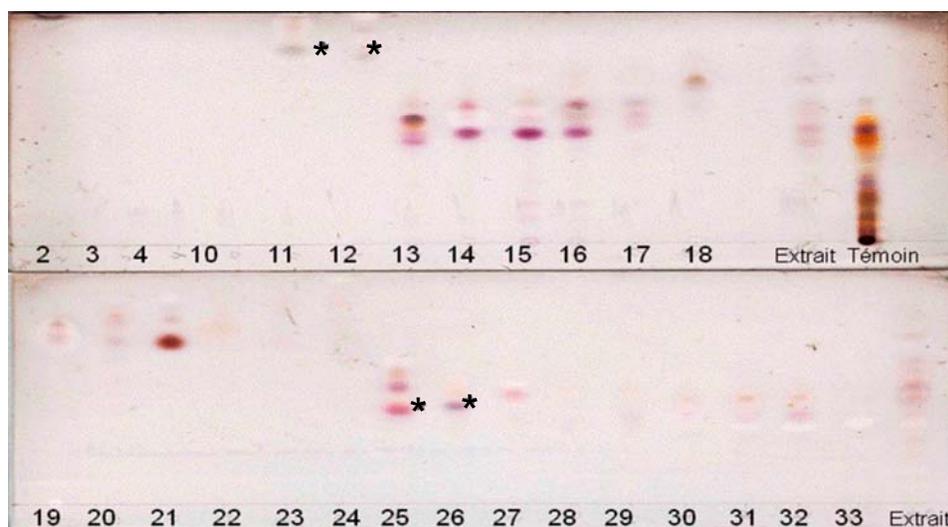


Figure 18. Chromatographie sur couche mince révélée à l'acide sulfurique des fractions obtenues par HPLC d'un extrait de propolis (solvants: hexane:éther 50:50). Les astérisques indiquent les endroits où des zones d'inhibition de croissance ont été observées avec la méthode *in situ*. Les chiffres indiquent le temps de rétention (minutes) des fractions au HPLC.

L'analyse par spectrométrie de masse effectuée sur la fraction active (Figure 18, colonne 11) est présentée à la Figure 19. Plusieurs pics sont présents sur le spectre ce qui démontre la complexité de la fraction isolée du HPLC en phase normale. Le Tableau V présente la masse moléculaire ainsi que la formule et l'identité probable des huit principales molécules présentes dans la fraction active. Toutes les masses ont pu être associées avec des molécules déjà connues comme faisant partie de la propolis.

Une autre analyse par spectrométrie de masse a été effectuée. À la place d'analyser la fraction active isolée du HPLC, on a utilisé un extrait de propolis directement gratté à la hauteur (Rf) où l'on retrouvait l'activité sur une CCM. Les masses retrouvées par spectre de masse correspondaient à celles obtenues lors de la première analyse. En effet, on retrouvait les masses qui pourraient

correspondre à la pinocembrin, la chrysin, l'émodyne d'aloès ainsi que l'isoflavone. Par contre, on retrouverait également plusieurs autres masses, certaines correspondant possiblement à des contaminants provenant de la silice présente sur la CCM. L'analyse de l'extrait de propolis par HPLC est donc plus fiable pour l'identification de la molécule active.

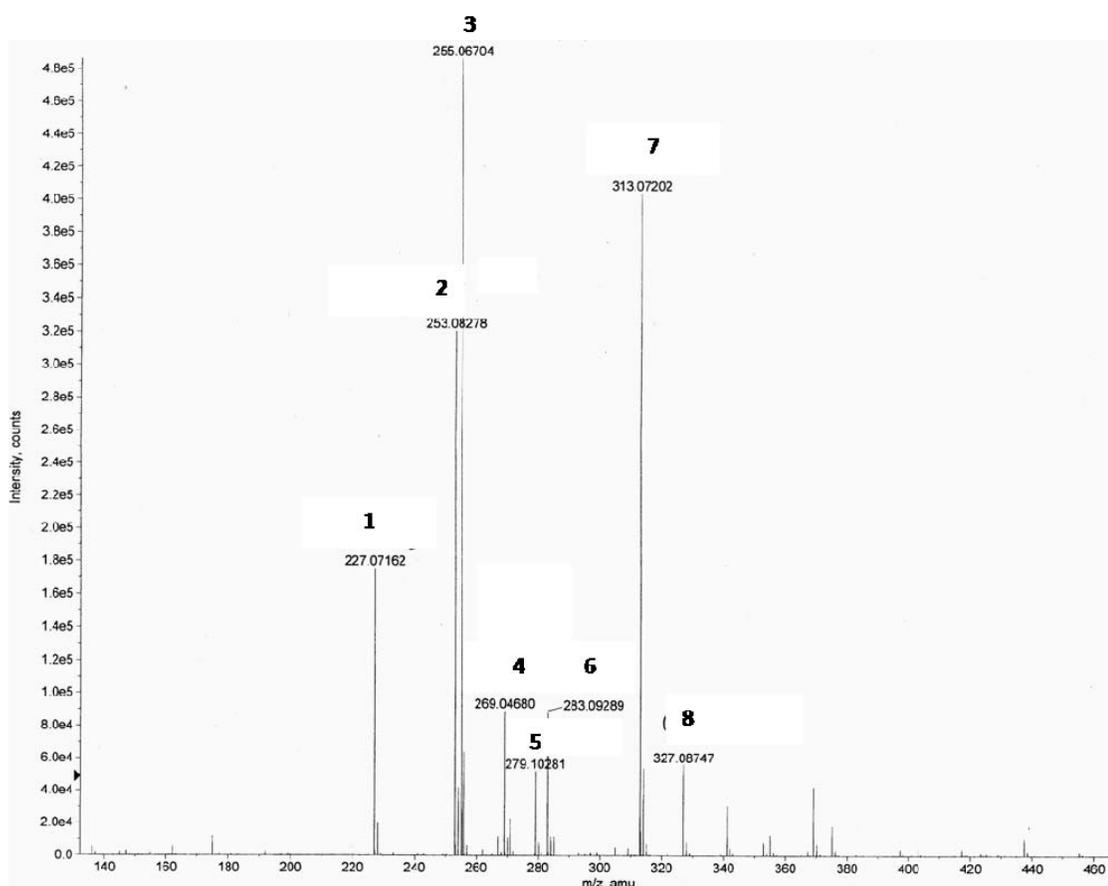


Figure 19. Spectre de masse de la fraction active d'un extrait de propolis à l'hexane suite à un fractionnement par HPLC. Les masses sont indiquées au-dessus des pics principaux.

Tableau V. Identité probable des molécules retrouvées dans la fraction active obtenue par HPLC phase normale d'un extrait de propolis suite à son analyse par spectre de masse.

No.	Masse moléculaire	Formule probable	Identité probable
1	227.07162	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	Resveratrol
2*	253.08278	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	Chrysin
3*	255.06704	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	Pinocembrin
4	269.04680	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	Émodine d'aloès
5	279.10281	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	Ipriflavone
6*	283.09289	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	CAPE (Caffeic acid phenethyl ester)
7*	313.07202	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Pinobanksin-3-acetate
8	327.08747	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	Isoflavone

(*) Ces molécules ont aussi été retrouvées dans la fraction active de la propolis isolée par HPLC en phase inverse.

Plusieurs molécules étaient encore présentes dans la fraction active, comme on peut l'observer à la Figure 19. Il était donc nécessaire d'utiliser une méthode ayant une plus grande résolution afin de séparer d'avantage ces composés. La méthode utilisée est le RP-HPLC (HPLC en phase inverse) qui a la capacité de séparer des molécules très semblables permettant d'obtenir des fractions ayant une moins grande complexité de molécules. Suite à l'analyse au spectre de masse de la fraction active obtenue par RP-HPLC, seulement cinq molécules ont été retrouvées dont quatre se trouvaient déjà dans l'analyse précédente (HPLC en phase normale). Ces molécules sont : pinocembrin, pinobanksin-3-acetate, « caffeic acid phenethyl ester » (CAPE), chrysin et

tectochrysin (non présente ou présente en très faible quantité lors de l'analyse au HPLC en phase normale). Trois des cinq molécules possiblement actives dans l'extrait de la propolis ont été achetées commercialement et testées sur CCM et par bioautographie. Les molécules chrysin et tectochrysin ne sont pas actives contre *Saprolegnia* sp. Pour sa part, la molécule CAPE, connue pour ses activités antifongiques (91), montre une zone d'inhibition lors de la bioautographie, mais n'a pas le même Rf que le(s) molécule(s) active (nt) de la propolis, ce qui suggère que ce n'est pas le composé recherché. La pinocembrine sera testée prochainement tandis que la pinobanksin-3-acétate ne sera pas testée étant donné qu'elle n'est pas disponible commercialement. Il est aussi possible que l'activité provienne de la synergie entre certaines de ces molécules. Dans ce cas, il faudra tester les molécules simultanément.

Annexe II.

Préparation des milieux de culture pour *Saprolegnia*

Bouillon GY (modifié de Udomkusonsri et Noga, 2004)

Pour 1 L :

1. Dissoudre 10 g de glucose et 5 g d'extrait de levures dans 1000 mL d'eau distillée.
2. Autoclaver à 121°C durant 20 minutes.
3. Laisser refroidir à la température de la pièce avant utilisation.

Agar GY (modifié de Udomkusonsri et Noga, 2004)

Pour 1 L :

1. Dissoudre 10 g de glucose, 5 g d'extrait de levures et 20 g d'agar dans 1 L d'eau distillée.
2. Autoclaver à 121°C durant 20 minutes.
3. Laisser refroidir à la température de la pièce jusqu'à une température d'environ 50°C et couler les pétris : environ 20 mL d'agar GY dans des boîtes de Pétri.

Agar GY pour bioautographie :

Pour 1L:

1. Dissoudre 10 g de glucose, 5 g d'extrait de levures et 6 g d'agar dans 1000 mL d'eau distillée.
2. Autoclaver à 121°C durant 20 minutes.
4. Laisser refroidir à la température de la pièce jusqu'à une température d'environ 50°C et couler sur la plaque de silice : environ 25 mL d'agar GY sur la plaque.

MSM - « Modified sporulation medium » (modifié de Udomkusonsri et Noga, 2004)

Pour 1 L :

1. Mélanger les ingrédients suivants :
 - . 1 ml CaCl_2 (0.25 mM)
 - . 1 ml KCl (0.25 mM)
 - . 5 g d'Hepes
 - . 10 ml phenol red (10g/L)
 - . 1000 mL d'eau MilliQ
2. Ajuster le pH de la solution à 7.4 avec une solution de NaOH. La solution doit prendre une couleur rouge foncé.
3. Le milieu a été stérilisé par filtration sur papier filtre de 0.22 μm .

Milieu Sabouraud (Stueland *et al.* 2005b)

Pour 1L :

1. Dissoudre 10 g de néopeptone, 20 g de glucose et 5 g d'extrait de levures dans 1000 mL d'eau MilliQ.
2. Autoclaver à 121°C durant 20 minutes.
3. Laisser refroidir et ajouter de façon stérile 6 mL de solution de Pénicilline-Streptomycine (Sigma no. P4458) et 1 ml d'une solution de chloramphénicol (Sigma no. C1919; 34 mg/mL d'éthanol).
4. Entreposer la solution à 4°C.

