

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**LES LIPOPEPTIDES : UNE FAMILLE EMERGENTE DE BIOPESTICIDES
PROJET INTERREG PHYTOBIO 2010-2013**

Ph. JACQUES^a, F. KRIER^a, F. COUTTE^a, S. LEMIERE^b, M. HOFTE^c, M. ONGENA^d, E. AIT BARKA^e,
S. DOREY^e, C. JACQUARD^e, Ph. REIGNAULT^f, B. RANDOUX^f, L. DELANOTE^g, N. CAP^h

a : ProBioGEM-EA1026, Polytech'Lille/IUT A, Univ Lille1, Villeneuve d'Ascq, France
Philippe.Jacques@polytech-lille.fr

b : Université de Lille1, Sciences et Technologies, LGCGE, Avenue Langevin 59655 Villeneuve d'Ascq

c : Université de Gand, Laboratoire de phytopathologie, Sint Pietersnieuwstraat 25, B-9000 Gent, Belgique

d : Université de Liège - Gembloux Agro-Bio Tech, Centre Wallon de Biologie Industrielle, Passage des
déportés 2, 5030 Gembloux, Belgique

e : Université de Reims Champagne-Ardenne, Laboratoire de Stress, Défenses et reproduction des
plantes, Villa Douce, 9 bd. de la Paix 51097 Reims France

f : Université du Littoral Côte d'Opale, Unité de chimie environnementale et interactions sur le
vivant, BP 699, 62228 Calais France

g : Inagro vzw, leperseweg 87B-8800 Rumbeke-Beitem Belgique

h : Centre Provincial de la Recherche Appliquée des Cultures Maraichères (PCG) Karreweg 6 9770
Kruishoutem – Belgique

RÉSUMÉ

Le projet européen INTERREG IV PHYTOBIO a permis de démontrer que les lipopeptides d'origine bactérienne constituent une famille émergente de molécules exploitables dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. Il a notamment porté sur trois familles de lipopeptides produits par des souches du genre *Bacillus* : les surfactines, les fengycines et les mycosubtilines. L'activité inhibitrice *in vitro* de la mycosubtiline à 10 mg/l vis-à-vis de l'agent de la septoriose du blé a été mise en évidence ainsi que la capacité de la surfactine et de la mycosubtiline à induire une alcalinisation de culture de cellules de vigne. Ces deux molécules présentent également une écotoxicité inférieure à la majorité des fongicides utilisés en agriculture. L'efficacité de protection de différents lipopeptides seuls ou en combinaison a été démontrée *in vivo* contre le mildiou de la laitue et contre *Botrytis cinerea* sur feuilles de vigne.

Mots-clés : Biocontrôle, *Bacillus*, Lipopeptides, Champignons phytopathogènes.

ABSTRACT

LIPOPEPTIDES : AN EMERGING FAMILY OF BIOPESTICIDES

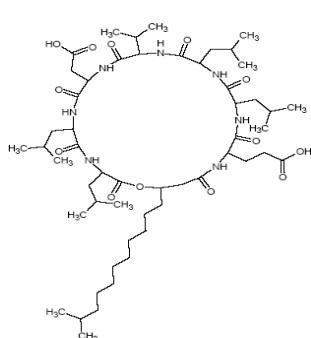
The european project INTERREG IV PHYTOBIO led to the demonstration that bacterial lipopeptides are emerging compounds for the biocontrol of fungal phytopathogens. It has focused on three families of lipopeptides from *Bacillus* strains: surfactins, fengycins and mycosubtilins. The *in vitro* antagonistic activity of mycosubtilin at 10 mg/l against the pathogen of wheat has been shown as well as the ability of surfactin and mycosubtilin to induce fast alcalinisation of grapevine cell culture. Both lipopeptides have an ecotoxicity lower than most of the fungicides used in agriculture. The efficiency of the lipopeptides alone or in combination have been demonstrated *in vivo* against lettuce mildew and *Botrytis cinera* on grapevine leaves.

Keywords: Biocontrol, *Bacillus*, Lipopeptides, Fungal phytopathogens.

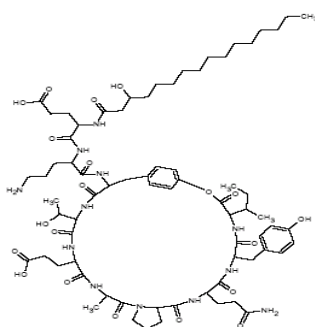
INTRODUCTION

Les productions agricoles et maraîchères sont importantes et diversifiées dans les régions transfrontalières du Nord de la France, de Flandres et de Wallonie. Les mêmes cultures sont retrouvées dans cette zone géographique couverte par le programme européen de coopération transfrontalière INTERREG IV France-Wallonie-Vlaanderen. Que ce soit pour l'agriculture biologique ou pour l'agriculture conventionnelle, la recherche de nouveaux moyens de lutte contre les maladies des plantes plus compatibles avec l'environnement est devenue une priorité. Le projet INTERREG IV PHYTOBIO s'inscrit dans cette démarche de mise en place d'une agriculture plus durable en visant à découvrir et produire de nouvelles molécules biopesticides et/ou stimulatrices des défenses des plantes et à promouvoir leur utilisation. Dans ce contexte, cinq laboratoires de recherche universitaires (Université Lille 1 Sciences et Technologies, Université de Gand, Gembloux AgroTech-Université de Liège, Université de Reims Champagne-Ardennes, Université du Littoral Côte d'Opale) de renommée internationale, deux centres de recherches appliquées (Inagro, PCG) et un syndicat de professionnels (Groupement des agriculteurs biologiques du Nord Pas de Calais) se sont réunis pour concevoir et produire à l'échelle pré industrielle de nouveaux biopesticides d'origine bactérienne, valider leur pertinence et leur performance sur des pathosystèmes de la région transfrontalière.

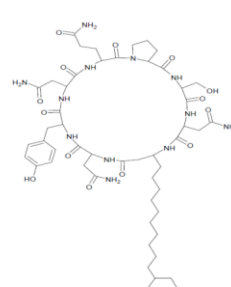
Le projet s'est focalisé sur les lipopeptides produits par des bactéries du genre *Bacillus*. Ces molécules sont regroupées en trois grandes familles, les surfactines, les fengycines (ou plipastatines) et les iturines (dont la mycosubtiline) (Figure 1). De nombreux travaux ont démontré au cours de ces vingt dernières années que ces molécules constituent le principal mécanisme d'action de *Bacillus subtilis* ou *Bacillus amyloliquefaciens* en tant que biopesticide. Ces molécules agissent essentiellement comme inhibiteur de la croissance des champignons phytopathogènes et inducteur de la résistance systémique des plantes (Ongena & Jacques, 2008).



Surfactine ic15



Fengycine n-C16



Mycosubtiline anteiso C17

Figure 1. Structure de la surfactine, de la fengycine et de la mycosubtiline

MATERIEL ET MÉTHODE

ACTIVITE ANTAGONISTE

Effet vis à vis de *Mycosphaerella graminicola*

L'effet fongicide du DMSO, de la surfactine et de la mycosubtiline a été testé en condition de cultures solides vis à vis de *Mycosphaerella graminicola*, agent responsable de la septoriose du blé. Les concentrations testées sont 1 mg/L, 10 mg/L, 50 mg/L et 100 mg/L dans du DMSO (0,1%). Cinq μL de suspension de spores (5×10^5 spores /mL) sont déposées sur des boîtes de Petri gélosé (1,2% d'agar) contenant les molécules aux différentes concentrations. Les boîtes de Petri sont incubées pendant 7 jours à 20°C dans l'obscurité. La croissance mycélienne est alors examinée et les diamètres des colonies sont mesurés.

ETUDES DU MECANISME D'ACTION

Suspensions cellulaires de vigne

Les cultures cellulaires de vigne 41B (*Vitis vinifera* L. cv. Chasselas × *V. berlandieri*) ont été cultivées dans un milieu liquide Murashige–Skoog (MS) à un pH de 5,8, contenant des vitamines (x1,5), du saccharose (30 g/L), de l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D, 0,2 mg/L) et de la 6-benzylaminopurine (BAP, 0,5 mg/L). Les cultures ont été entretenues dans le noir sous agitation (120 rpm) à 25°C. Elles ont été repiquées tous les sept jours afin de les maintenir en phase exponentielle. Pour les expériences d'alcalinisation, les cellules ont été filtrées après 7 jours de culture, pesées, puis suspendues à une concentration de 8 g/100 mL dans 10 mL de milieu MS 4 jours avant les mesures.

Mesures de l'alcalinisation du milieu

Les mesures d'alcalinisation ont été menées selon le protocole de Félix et al. (1993) en utilisant un pH-mètre standard (Basic, Denver Instrument, Goettingen, Allemagne). Les mesures ont été réalisées suite à des traitements avec de la surfactine, de la fengycine ou de la mycosubtiline à 10, 20 ou 50 µg/mL, ou du diméthylsulfoxyde (DMSO) 0,1% (témoin). Les résultats présentés sont issus de la moyenne de trois expérimentations ± écart-type (Standard Deviation). Afin de vérifier si le flux de protons était un processus actif, l'alcalinisation a également été mesurée après traitement des suspensions cellulaires avec 1 µM d'inhibiteur de protéine kinase K-252a (Sigma-Aldrich; dilué dans du DMSO à 0,05%) suivant Félix et al. (1993). L'inhibiteur a été ajouté aux suspensions 5 min avant les lipopeptides (50 µg/ml).

ECOTOXICITE

Le test Microtox est généralement utilisé pour mesurer la toxicité directe de molécules. Le principe est la mesure de réduction de l'émission de lumière de la bactérie marine luminescente *V. fischeri*. Les tests ont été réalisés selon les procédures décrites dans le manuel d'utilisation du Microtox Analyser 500. *V. fischeri* est exposé à des séries de concentration des molécules testées. La chute de bioluminescence est mesurée après 5, 15 et 30 minutes à une température de 15°C. La toxicité est mesurée comme le pourcentage d'inhibition de l'émission de lumière. Les résultats sont exprimés comme la concentration effective (EC50).

TESTS SUR DES MODELES

Protection de la vigne vis-à-vis de *Botrytis cinerea*

Des feuilles de vitroplant de vigne sont pulvérisées par des solutions de lipopeptides aux concentrations suivantes : surfactine à 10 mg/ml, mycosubtiline à 10 mg/ml et fengycine à 50 mg/ml. Les molécules sont dissoutes dans du DMSO 0,1%. Après deux jours, les feuilles sont déposées sur boîtes de Petri et infestées avec des conidies de *B. cinerea*. Les symptômes sont mesurés 2 jours et 4 jours après inoculation et classés. Les classes de lésion sont : absence de lésion, lésion de moins de 50 % de la surface, lésion affectant plus de 50 % de la surface.

Protection de la laitue vis à vis de *Bremia lactucae*

Des plants de laitue sont traités par des solutions aux concentrations suivantes dans du DMSO à 0,1% : surfactine 50 mg/L, mycosubtiline 50 mg/L et par un mélange de surfactine/mycosubtiline à 50 mg/L-50 mg/L. Le jour suivant, les salades sont infestées par une suspension de spores de *B. lactucae*. Une fois qu'apparaissent les premiers signes de la maladie, les résultats sont relevés en termes de pourcentage de laitues infestées et du nombre de spores par plantes infestées.

RESULTATS

Activité antagoniste *in vitro*

L'activité antifongique des lipopeptides *in vitro* a déjà été démontrée dans la littérature contre un certain nombre de champignons dont *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum* (Bechet et al., 2013 ; Ongena & Jacques, 2008). Dans le cadre de ce projet, cette activité a été testée contre d'autres champignons phytopathogènes afin de vérifier l'étendue de cette activité. La mycosubtiline s'est révélée particulièrement active vis-à-vis de *Mycosphaerella graminicola*, responsable de la septoriose du blé (Figure 2). Aucune croissance de la souche n'a été détectée sur un milieu solide contenant 10 mg/L de mycosubtiline après sept jours d'incubation.

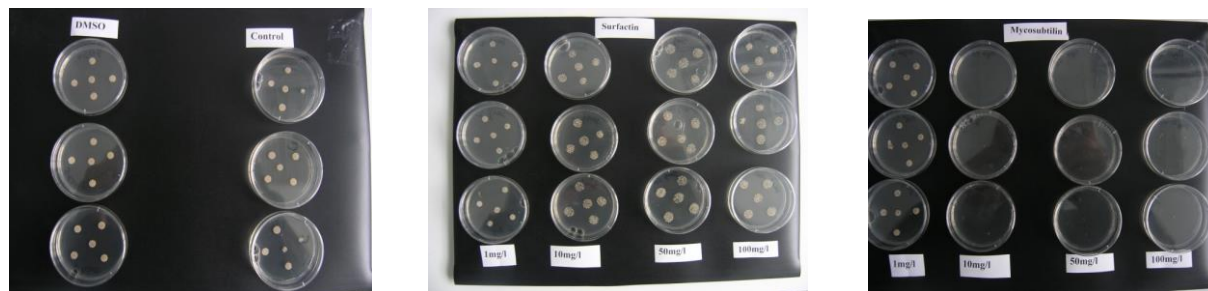


Figure 2. Activité antifongique du DMSO, de la surfactine et de la mycosubtiline après 7 jours vis-à-vis de *Mycosphaerella graminicola*, responsable de la septoriose du le blé. Les concentrations testées sont 1 mg/L, 10 mg/L, 50 mg/L et 100 mg/L.

Mécanismes d'action

La surfactine et la fengycine sont connues pour leur capacité à induire les mécanismes de résistance sur culture de cellules de tabac (Henry et al., 2011; Cawoy et al., 2014). Ces molécules ont été testées sur culture de cellules de vigne. La figure 3 montre l'effet de l'inhibiteur de la protéine kinase K-252a afin de vérifier que le flux de proton est un mécanisme actif. La figure 4 montre l'alcalinisation du milieu de culture durant les 60 min qui suivent l'ajout de lipopeptides à trois concentrations différentes. Sur ce modèle, la mycosubtiline et la surfactine s'avèrent plus efficaces que la fengycine qui n'a pratiquement pas d'effet.

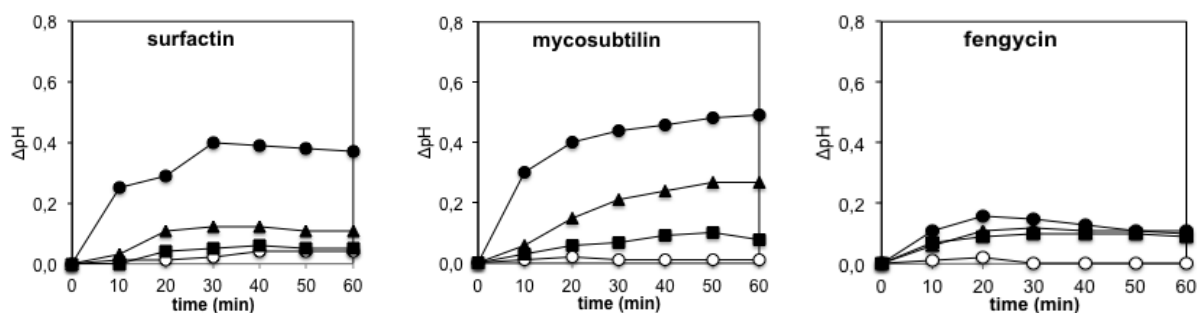


Figure 3. Alcalinisation du milieu de cellules de la vigne en suspension, provoquée par les lipopeptides. Les cellules sont traitées avec de la surfactine, de la mycosubtiline ou de la fengycine à 10 μg/ml (carrés noirs), 20 μg/ml (triangles noirs) or 50 μg/ml (cercles noirs) or DMSO (cercles blancs).

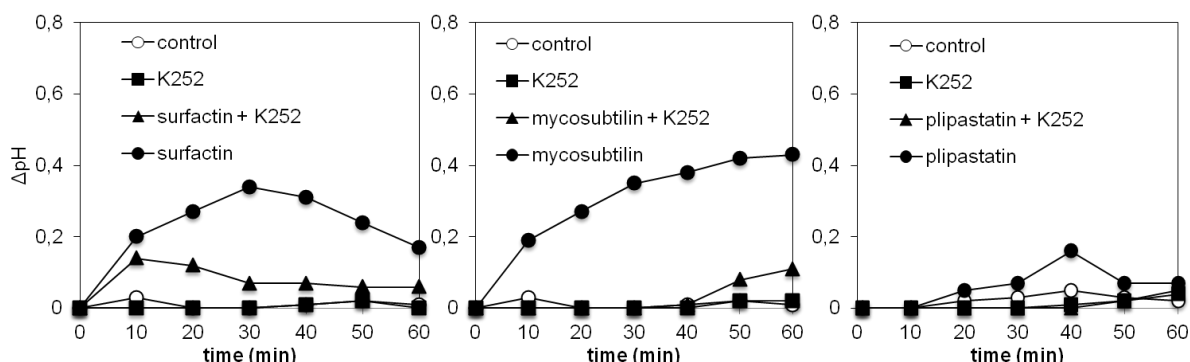


Figure 4 Effet de l'inhibiteur de la protéine kinase K-252a sur l'alcalinisation extracellulaire induite par les lipopeptides. L'inhibiteur de la protéine kinase ($1 \mu\text{M}$) est ajouté 5 minutes avant le traitement par les lipopeptides ($50 \mu\text{g/ml}$).

Ecotoxicité

L'écotoxicité de la mycosubtiline, de la surfactine et d'un mélange mycosubtiline-surfactine a été évaluée contre *V. fischeri* dans le cadre du test standardisé Microtox. La dose inhibitrice à 50% (EC50) de ces molécules a été comparée à une série de fongicides chimiques (Figure 5). La surfactine est la molécule la moins toxique de l'ensemble des molécules analysées. La mycosubtiline et le mélange mycosubtiline-surfactine se situent dans la gamme des molécules peu toxiques (Deravel et al., 2014).

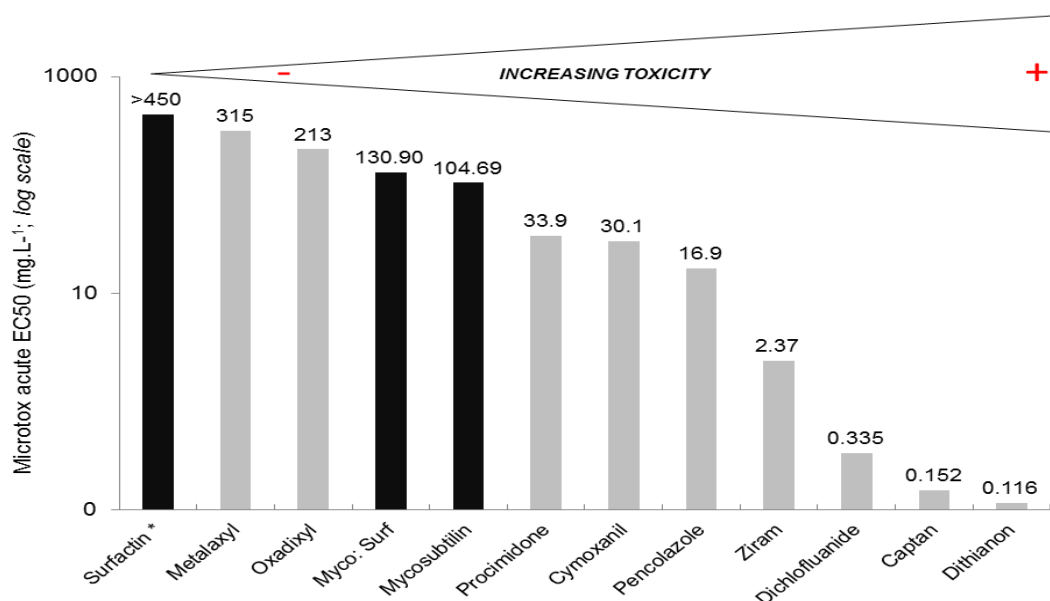


Figure 5. EC50 vis-à-vis de *V. fischeri* (test Microtox) des lipopeptides (en noir) comparées à d'autres substances actives ou fongicides (en gris).

Procédé de production

Afin de produire des quantités de molécules suffisantes pour réaliser des tests *in vivo*, un procédé de production a été optimisé (Coutte et al., 2013). Ce procédé est basé sur l'utilisation d'un bioréacteur aéré sans bulle dans lequel l'apport d'oxygène au micro-organisme producteur des lipopeptides est basé sur un transfert au travers d'une membrane. L'absence de bulle dans le réacteur permet d'éviter la mousse produite par les lipopeptides. Un procédé membranaire d'extraction et de purification des

lipopeptides a pu ensuite être développé en continu. Ce procédé se base sur la microfiltration en continu du milieu de culture suivie de la concentration des lipopeptides par ultrafiltration dans un réacteur intermédiaire. Ce procédé a permis de produire des centaines de gramme de lipopeptides à des degré de pureté variant entre 50 et 95%.

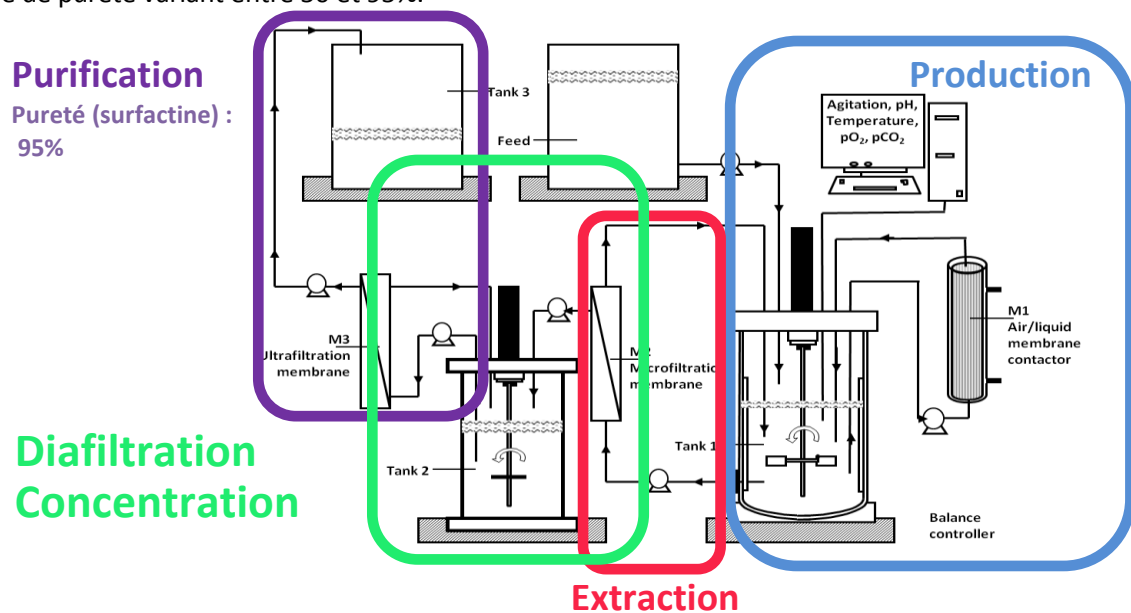
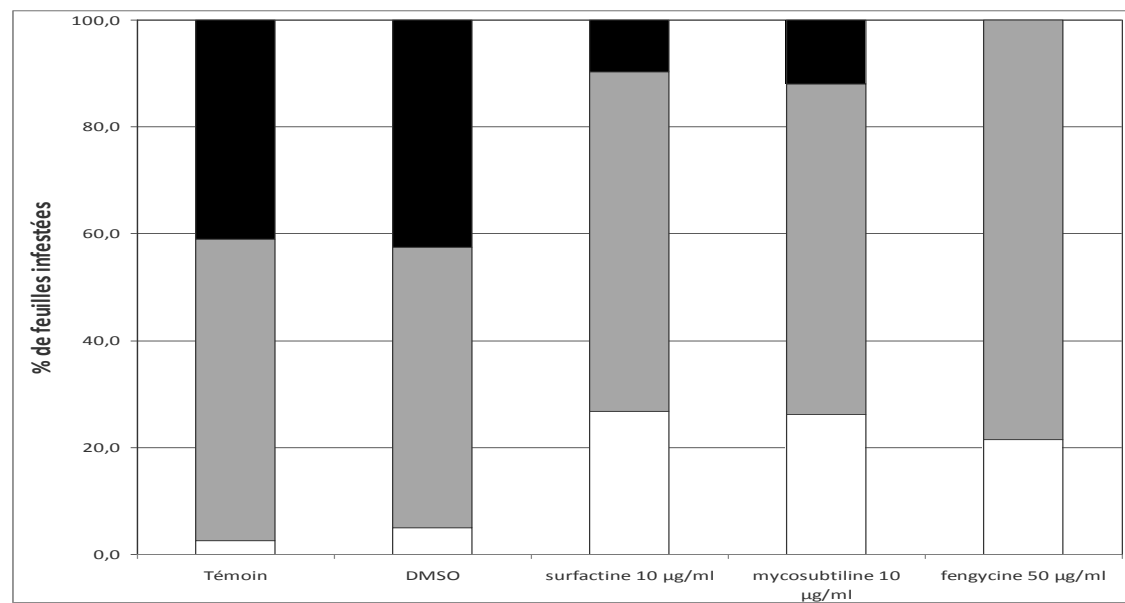


Figure 6. Procédé développé pour la production des lipopeptides. *Bacillus subtilis* est cultivé dans un bioréacteur (Tank 1) équipé d'un système d'aération par membrane (M1). Les lipopeptides sont extraits en continu du milieu par passage sur une membrane de microfiltration (M2) et récupérés dans un second réacteur (Tank 2). Le microfiltrat est ensuite soumis à une ultrafiltration sur membrane avec un seuil de coupure de 10000 daltons (M3). Les petites molécules passent au travers de cette membrane et les lipopeptides qui forment des micelles d'une taille supérieure à 40000 daltons sont retenus.

Essais *in vivo*

Pour la première fois, des essais *in vivo* de protection de plantes par des lipopeptides ont été réalisés. Les figures 7 et 8 montrent deux exemples de résultats obtenus sur deux modèles : effet des surfactines, fengycines et mycosubtilines sur le modèle *Botrytis cinerea*-vigne et effet des surfactines et mycosubtilines seules ou en mélange sur le modèle *Bremia lactucae*-laitue. Après 4 jours d'incubation, les 2 modalités de traitement surfactine 10 mg/L et mycosubtiline 10 mg/L permettent de protéger, respectivement, 30 et 23% des feuilles de vigne contre *Botrytis*. Sur le modèle *Bremia lactucae*-laitue, un traitement avec un mélange contenant 50 mg/L de surfactine et 50 mg/L de mycosubtiline permet de réduire significativement le pourcentage de laitues infestées (Deravel et al., 2014).

A



B

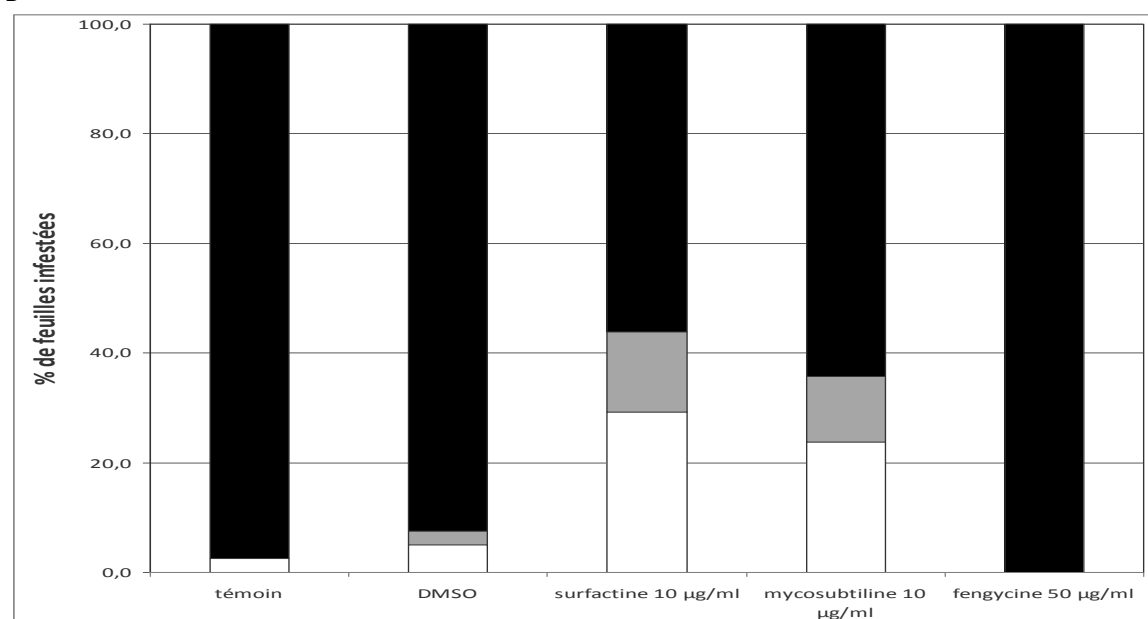


Figure 7 Pourcentage de feuilles de vigne infestées 2 jours (A) et 4 jours (B) après inoculation par *Botrytis cinerea*. Les classes de lésion sont : absence de lésion (en blanc), lésion de moins de 50 % de la surface (en gris), lésion affectant plus de 50 % de la surface (en noir).

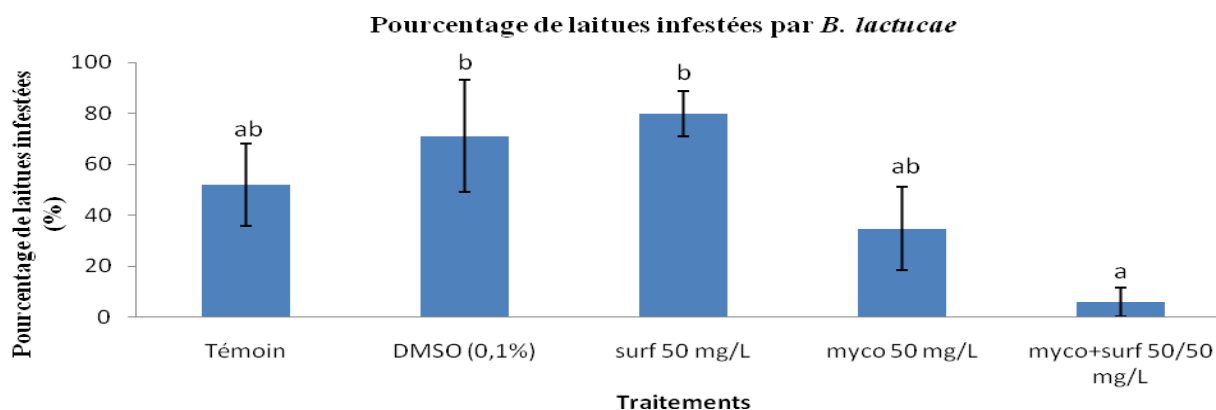


Figure 8 Pourcentage de laitues infestées par *B. lactucae* après traitement à la surfactine 50 mg/L, mycosubtiline 50 mg/L et par un mélange de surfactine/mycosubtiline à 50 mg/L/50 mg/L. surf : surfactine, myco : mycosubtiline

DISCUSSION

Différentes souches de *Bacillus* sont utilisées depuis un certain nombre d'années comme agent de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes avec un succès parfois mitigé. Ces résultats sont dus à différents facteurs tels que la capacité des souches à coloniser l'environnement ciblé et à produire les molécules responsables de leur activité de biocontrôle. Afin d'obtenir des résultats plus reproductibles, nous avons pour la première fois décidé de produire et tester ces molécules en tant que produit actif et donc futurs biopesticides. Ces molécules s'avèrent performantes à des concentrations qui sont en relation avec une exploitation industrielle.

CONCLUSION

L'efficacité des nouveaux lipopeptides contre différents agents phytopathogènes et la diversité de leurs mécanismes d'action (antagonisme direct et induction des mécanismes de résistance de la plante) soulignent le potentiel de ces molécules en tant qu'agent de lutte biologique, d'autant plus qu'elles présentent également une éco-toxicité plus faible que les pesticides chimiques utilisés couramment sur ces pathosystèmes et sont biodégradables. Le développement d'un procédé de production en continu et industrialisable de ces molécules permettent à la fois d'en produire des quantités importantes tout en réduisant le coût de production.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet INTERREG IVa PHYTOBIO (<http://phytobio.univ-lille1.fr>).

BIBLIOGRAPHIE

- M. BÉCHET, J. CASTÉRA-GUY, J.-S. GUEZ, N.-E. CHIHIB, F. COUCHENEY, F. COUTTE, P. FICKERS, V. LECLÈRE, B. WATHELET and P. JACQUES. Production of a novel mixture of mycosubtilins by mutants of *Bacillus subtilis*. Bioresour. Technol. **145**, 264-270, 2013.
- H. CAWOY, M. MARIUTTO, G. HENRY, C. FISHER, N. VASILYEVA, P. THONART, J. DOMMES, AND M. ONGENA Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. Molecular Plant Microbe Interactions In press. 2014
- F. COUTTE, D. LECOUTURIER, V. LECLÈRE V, M. BÉCHET, P JACQUES and P DHULSTER. New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in membrane bioreactor. Process Biochem. 48: 25-32, 2013.

J. DERAVAL, S. LEMIÈRE, F. COUTTE, F. KRIER, N. VAN HESE, M. BÉCHET, N. SOURDEAU, M. HÖFTE, A. LEPRÊTRE and P. JACQUES Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14, 6255-6264, 2014.

G. HENRY, M. DELEU, E. JOURDAN, P. THONART and M. ONGENA. The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. *Cellular Microbiology* 13, 1824-1837, 2011.

M. ONGENA and P. JACQUES. Bacillus lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol *Trends Microbiol.*, 16, 115-125, 2008.