

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

LE BIOCONTROLE : UN MOYEN DE LUTTE CONTRE LES PATHOGENES DE LA POMME DE TERRE

A. BEURY⁽¹⁾, P. DEWAEGENEIRE⁽¹⁾, J. CIGNA⁽¹⁻²⁾, Y. RAOUL DES ESSARTS⁽²⁻³⁾, V. HELIAS⁽³⁾,
X. LATOUR⁽⁴⁾, V. GOBERT-DEVEAUX⁽¹⁾, D. FAURE⁽²⁾

- (1) SIPRE (Semences Innovation Protection Recherche et Environnement), rue des champs
Potez, 62217 ACHICOURT, France amelie.beury@comitenord-sipre.fr
- (2) CNRS, Institut des sciences du vegetal, Upr2355 avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette,
France faure@isv.cnrs-gif.fr
- (3) RD3PT/FN3PT, UMR 1349 IGEPP INRA - Agrocampus Ouest Rennes - Université Rennes
BP 35327 F-35653 LE RHEU FRANCE valerie.helias@fnpppt.fr
- (4) LMSM (Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnements, 55 rue Saint-Germain
27000 Evreux, France, xavier.latour@univ-rouen.fr

RÉSUMÉ

SIPRE (Semences Innovation Protection Recherche et Environnement) est missionnée par le CNPPT (Comité Nord Plants de Pomme de Terre) pour développer de nouvelles stratégies de lutte contre les pathogènes bactériens et fongiques de la pomme de terre. Les cibles principales sont les bactéries des genres *Pectobacterium* et *Dickeya*, responsables des symptômes de jambe noire en végétation, l'oomycète *Phytophthora infestans*, agent responsable du mildiou et les *Fusarium*, responsables de fusarioses sur tubercules en conservation. Les stratégies développées sont basées principalement sur l'utilisation de bactéries naturellement présentes dans l'environnement et capables de bloquer soit la croissance soit les fonctions régulant la virulence des phytopathogènes. Nous proposons de présenter les essais réalisés en laboratoire, en serre (développement de pathosystèmes pour reproduire les symptômes induit pour chacun des phytopathogènes étudiés) et en champs (parcelles expérimentales).

Mots-clés : Biocontrôle, bactéries pectinolytiques, *Phytophthora infestans*, *Fusarium*, Pathosystèmes.

ABSTRACT

BIOCONTROL : A STRATEGY TO CONTROL PATHOGENS OF POTATO

SIPRE (Seeds Innovation Protection Research and Environment) was commissioned by CNPPT (Comité Nord Plants de Pomme de Terre) to develop new strategies against bacterial and fungal pathogens of potato. The main targets are the bacteria belong to the *Pectobacterium* and *Dickeya* genera, causative agent of black legs on potato stem, the oomycete *Phytophthora infestans* causative agent of mildew and *Fusarium*, responsible of dry rot during potato tubers storage. Develop strategies are based on the used of bacteria naturally present in environment and able to inhibit the growth or the virulence regulatory system of plant pathogens. We proposed to present the tests in laboratory, in greenhouses (development of pathosystems to reproduce symptoms induced by each of the studied plant pathogens) and in fields (experimentals trials).

Keywords: Biocontrol, pectinolytic bacteria, *Phytophthora infestans*, *Fusarium*, pathosystems.

INTRODUCTION

Trois programmes de recherche basés sur l'utilisation de bactéries antagonistes ou « guerriers naturels » sont actuellement menés par la SIPRE pour lutter contre trois types de phytopathogènes : (1) des bactéries macergènes communément appelées *Erwinia* et appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* induisant des symptômes de jambe noire sur tiges et de pourriture humide sur tubercules lors du stockage (2) les oomycètes de type *Phytophthora infestans* induisant la maladie du mildiou (3) les champignons pathogènes de type *Fusarium* induisant des symptômes de pourriture sèche sur tubercules lors du stockage (fusarioses).

1/ Lutte contre les bactéries macergènes : *Pectobacterium* et *Dickeya*

Les bactéries macergènes des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sont chaque année la cause de 25 à 50% des pertes en culture de plants de Pomme de Terre. Actuellement aucune solution n'est apportée au producteur qui se trouve face à une infestation. Seules des mesures prophylactiques sont recommandées (désinfection du matériel agricole, arrachage des pieds présentant des symptômes, rotation des cultures et utilisation de semences certifiées). Le programme de recherche ciblant la lutte contre les *Erwinias* a été initié par le CNPPT il y a une dizaine d'année avec la collaboration du CNRS de Gif-sur-Yvette (équipe Ecologie de la Rhizosphère, D. Faure) et l'IUT d'Evreux (LMSM, Xavier Latour).

Les bactéries pathogènes communiquent entre elles *via* des signaux chimiques pour induire leur attaque de façon concertée. Ce mode de communication est appelé *quorum-sensing* (QS) (Cha et al, 1998) et nécessite l'accumulation de molécules signal dans l'environnement proche des bactéries pathogènes et ce jusqu'à un seuil qui, une fois atteint, va enclencher la production d'enzyme pectinolytiques (protéases, cellulases, pectinases) induisant la dégradation des tissus végétaux (Uroz et al., 2008).

La première stratégie de biocontrôle développée est basée sur la dégradation des signaux QS pour désactiver l'attaque des pathogènes. Pour cela des bactéries naturellement présentes dans le sol et capables de détruire le signal ont été criblées et identifiées. Ces bactéries de biocontrôle appartiennent à l'espèce *Rhodococcus erythropolis*. Ces bactéries produisent des enzymes capables de dégrader les signaux QS permettant de bloquer l'agressivité des pathogènes. Cette méthode est ciblée sur l'inhibition des fonctions de virulence des pathogènes et non sur leur destruction. Ceci permet de maintenir l'équilibre des communautés bactériennes des sols et donc de limiter les effets sur l'environnement. La stimulation dans le sol des bactéries bénéfiques (*R. erythropolis*) *via* des biostimulants a fait l'objet d'un dépôt de brevet international (Faure et al, 2007) et de publications (Cirou et al, 2007 et 2011).

Actuellement, des pathosystèmes permettant de recréer les conditions d'infestation par les bactéries pathogènes, *Pectobacterium* et *Dickeya* sont en cours de développement afin de valider la stratégie proposée et d'optimiser son efficacité. Ces travaux sont effectués à la station du Comité Nord d'Achicourt (CNPPT/SIPRE) et à l'INRA de Rennes (FN3PT/RD3PT). Des essais en parcelles expérimentales sont menés conjointement à la station d'Achicourt et chez des producteurs.

La deuxième stratégie est basée sur des mécanismes d'antibiose. Il est connu depuis de nombreuses années que certaines bactéries et notamment les bactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* produisent des composés toxiques vis-à-vis d'autres bactéries. Sur ce principe, il a été isolé plus de dix mille bactéries prélevées au niveau du sol rhizosphérique (sol adhérent aux racines) sur différentes variétés de pomme de terre et sur différents types de sols français en 2010 et 2011. Les isolats bactériens les plus performants pour inhiber la croissance des pathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya* ont été sélectionnés et sont actuellement testés en pathosystème, sous serre, pour valider leur effet d'antibiose et optimiser leur efficacité (CNPPT/SIPRE, FN3PT/RD3PT : V. Hélias et

doctorat de Y. Raoul des Essarts en cours sur ce sujet). Les expérimentations en champ d'essais à la station d'Achicourt sont également en cours.

Les deux stratégies de biocontrôle étudiées sont compatibles et pourront être associées dans une même formulation pour lutter contre l'ensemble des bactéries macergènes.

2/ Lutte contre *Phytophthora infestans*, agent responsable du mildiou.

Selon le même principe, des bactéries issues de la rhizosphère ou de la phyllosphère de pomme de terre ont été criblées pour leur capacité à lutter contre *Phytophthora infestans*, agent responsable du mildiou. Le mildiou, bien connu pour ces effets dévastateurs sur les cultures, reste le principal ennemi de la pomme de terre. C'est un oomycète de la famille des *Peronosporaceae* largement répandu dans le monde. Les symptômes en cours de végétation sur pomme de terre apparaissent rapidement et sont caractérisés par la présence de taches noires à l'extrémité des feuilles et sur les tiges. Ce pathogène se développe très rapidement si les conditions climatiques sont favorables (humidité et chaleur). A la différence des pathogènes bactériens cités précédemment (*Pectobacterium* et *Dickeya*), il existe des produits phytosanitaires performant disponibles sur le marché. Dans le cadre du programme Ecophyto et pour diminuer l'utilisation de ces produits et ainsi limiter leur impact sur l'environnement, le CNPPT/SIPRE en collaboration avec le laboratoire SPIRAL de Couternon (M. Prost) et la société Original Process (I. Delporte) a lancé un programme de recherche basé sur le biocontrôle pour lutter contre l'agent responsable du mildiou, le *Phytophthora infestans*. Comme précédemment, la stratégie en cours de développement est basée sur l'action d'antibiose des bactéries de la rhizosphère et de la phyllosphère. Il a été identifié plusieurs bactéries appartenant au genre *Bacillus* capables de bloquer la croissance de *Phytophthora infestans*. Pour évaluer l'effet d'antibiose de ces bactéries antagonistes en application foliaire (mildiou du feuillage) ou en application au sol (mildiou du tubercule), un pathosystème est en cours de développement dans les serres du bâtiment de confinement à Achicourt (Programme de recherche suivi par P. Dewaegeneire, SIPRE).

La recherche de méthodes alternatives pour lutter contre les champignons des genres *Fusarium* et notamment les espèces *F. sambucinum* et *F. roseum* est également un des axes prioritaires de la SIPRE. Comme pour *Phytophthora infestans*, des solutions sont proposées par les firmes phytosanitaires pour lutter contre ces pathogènes. Les produits commercialisés sont relativement efficaces et permettent de limiter la contamination fongique.

Dans le but de proposer de nouvelles stratégies de lutte plus respectueuses de l'environnement, la SIPRE en collaboration avec le laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources de l'Université d'Amiens (80) a axé ses recherches sur deux méthodes de biocontrôle complémentaires: l'éllicitation des défences naturelles de la plante et l'antibiose. Dans le cadre de ce projet des molécules ayant potentiellement un effet éliciteur ont été synthétisées. Ce sont des molécules biodégradables à rémanence limitée produites selon un procédé de « chimie verte » qui exclut l'utilisation de solvants et préconise l'utilisation de matières premières renouvelables. L'activité élicitrice de ces molécules reste encore à valider, cependant il a été montré « in vitro » que ces molécules avaient un effet direct sur la viabilité des deux *Fusarium* testés. Les premiers résultats obtenus sur tubercules en conservation sont très encourageants. Le procédé de synthèse de ces molécules ainsi que leur activité fongicide ont fait l'objet d'un dépôt de brevet national en 2013 (Epoune et al., 2013). Pour compléter l'action des molécules de synthèse, des bactéries rhizosphériques ont été isolées et criblées pour leur activité d'antibiose vis-à-vis des deux espèces de *Fusarium* ciblés. L'activité fongicide des bactéries biocontrôle a premièrement été validé « in vitro » et des tests « in vivo » sont programmés pour l'année à venir seul et en couplage avec les molécules de synthèse.

MATERIEL ET MÉTHODE

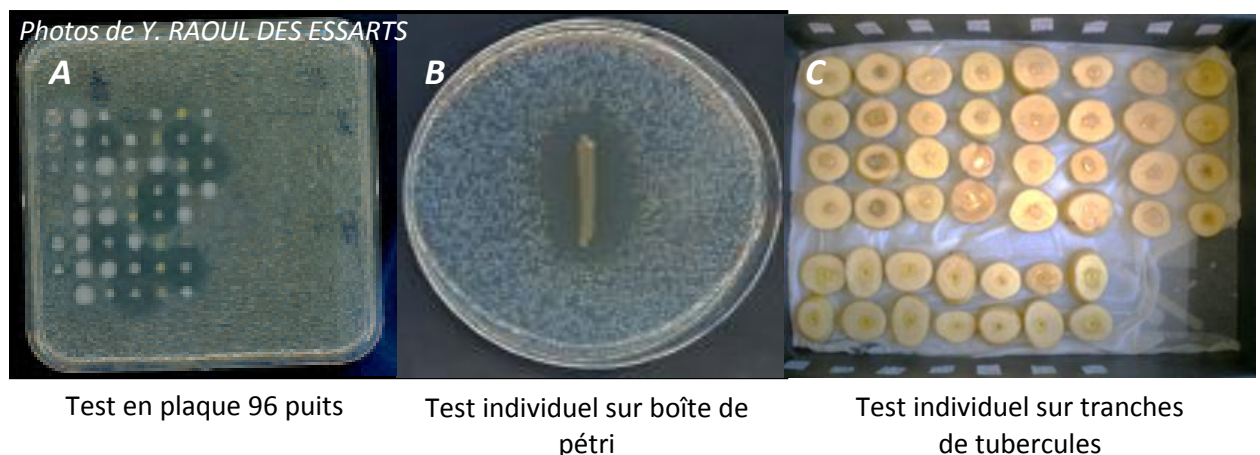
ISOLEMENT ET CRIBLAGE DES SOUCHES DE BIOCONTROLE

Au niveau de la rhizosphère

Des rhizosphères de pomme de terre, cultivées en France sous différentes conditions de climat et de sol, ont été prélevées et acheminées rapidement au laboratoire. A partir du sol rhizosphérique issu de chaque plante, plus de dix mille isolats bactériens ont été isolés. Les colonies ont ensuite été placées en plaques 96 puits et criblées pour leur effet d'antibiose contre les pathogènes ciblés appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* (Figure 1A). Un second criblage confrontant individuellement les isolats induisant une zone d'inhibition au premier criblage a été réalisé sur boîte de pétri (Figure 1B). Dans le but de combiner les stratégies d'antibiose et d'antivirulence, un test parallèle est effectué en cultivant les bactéries avec un fort potentiel d'antibiose et la souche *Rhodococcus erythropolis* R138 précédemment identifiée comme agent de lutte ciblant les mécanismes de virulence des bactéries pathogènes (Cirou et al, 2012). Le dernier criblage est effectué à l'aide de tranches de tubercules sur lesquelles sont déposées des cultures bactérienne de chacun des isolats positifs aux 2 premiers criblages. Ce test permet de s'assurer que les antagonistes retenus n'ont pas d'effet négatifs sur tubercule de pomme de terre (Figure 1C).

Figure 1 : Etapes de criblage des bactéries antagonistes contre *Pectobacterium* et *Dickeya*.

Screening of antagonists bacteria against *Pectobacterium* and *Dickeya*.

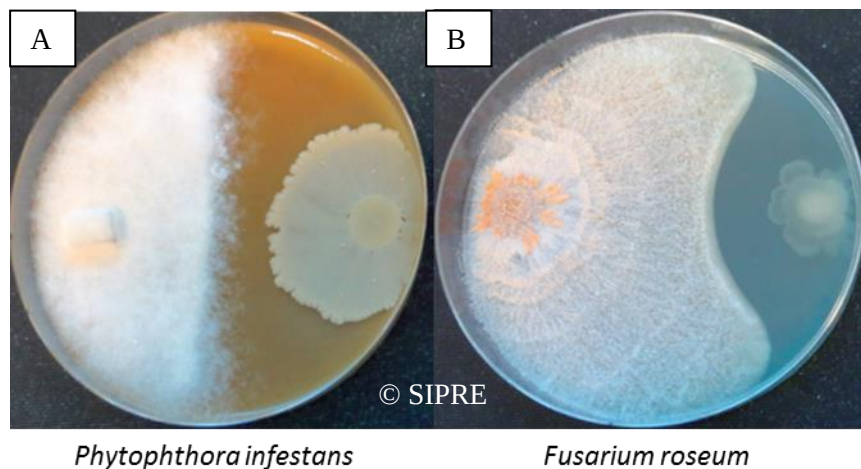


Au niveau de la phyllosphère

Phytophthora infestans est un pathogène qui se développe sur tubercules mais également sur le feuillage des plantes en végétation. Un premier criblage a été réalisé cette année à partir de feuilles de plantes saines de différentes variétés de pomme de terre afin d'identifier les bactéries qui pourraient avoir un effet antagoniste sur la croissance de *P. infestans* (Figure 2A)

Selon le même protocole des bactéries anti-Fusarium ont été identifiées (Figure 2B).

Figure 2 : Criblage des bactéries antagonistes contre *Phytophthora infestans* (A) et *Fusarium roseum*(B).
Screening of antagonists bacteria against *Phytophthora infestans* (A) and *Fusarium roseum*(B).



SEQUENÇAGE ET IDENTIFICATION DES AGENTS DE BIOCONTROLE

Séquençage du gene *rrs*

Les isolats cultivables sont identifiés par séquençage partiel (500 nt environ) de la région 5' du gène *rrs* (ARN16S) amplifiée avec les amorces pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) et 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG). Les séquençages sont effectués par la société Beckman Coulters.

Séquençage complet des agents de biocontrôle

Les antagonistes présentant des caractéristiques intéressantes comme l'induction de zones d'inhibition contre le ou les pathogènes cibles et un fort potentiel de colonisation de la rhizosphère ou de la phyllosphère, sont en cours de séquençage complet par Illumina HiSeq, Eurofins Genomics (France). L'assemblage sera réalisé à l'aide du logiciel CLC genomic 5.5 (CLCbio) au CNRS (ISV, Gif-sur-Yvette).

MISE EN PLACE DE PATHOSYSTEMES

Pour évaluer l'effet des différentes stratégies de lutte, des pathosystèmes à différentes échelles sont mis en place.

Pathosystème sur tubercule : ce pathosystème permet de confronter directement le pathogène à l'antagoniste au niveau de la surface du tubercule ou dans le tubercule.

Pathosystème sur plante entière en serre : ce pathosystème a pour but de mimer les conditions climatiques extérieures, rencontrées dans les champs tout en gardant des conditions contrôlées et donc reproductibles.

Pathosystème en champ d'expérimentation : ce pathosystème est le plus difficile à mettre en place et le plus hétérogène en termes de résultats. Les conditions climatiques sont rarement reproductibles d'une année sur l'autre et peuvent induire des variations dans les résultats obtenus.

RESULTATS

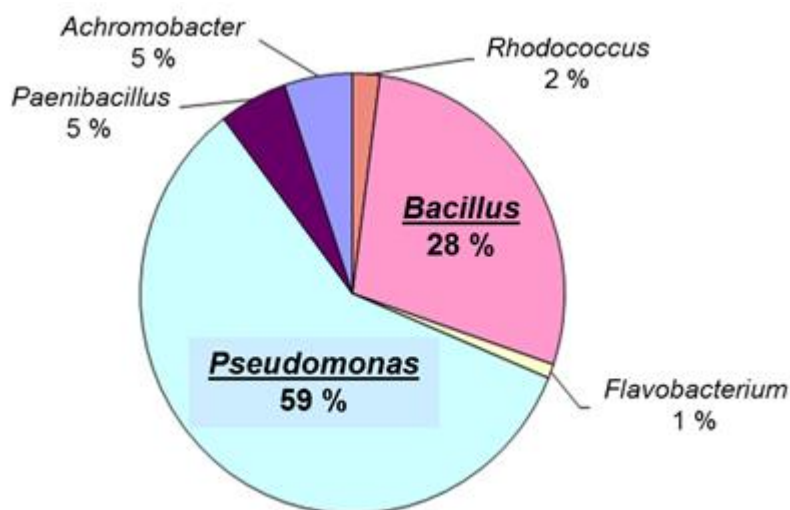
La partie résultats se focalisera uniquement sur la partie lutte contre les pathogènes bactériens des genres *Pectobacterium* et *Dickeya*.

DIVERSITE DES SOUCHES DE BIOCONTROLE

Le criblage effectué sur 10 000 isolats bactériens issus de sol rhizosphérique de nature différente a fait ressortir 96 isolats ayant la capacité d'inhiber plus ou moins fortement la croissance des pathogènes ciblés (*Pectobacterium atrosepticum* CFBP6276 et *Dickeya dianthicola* RNS04.9). Ces 96 isolats ont été séquencés sur la base de leur gène *rrs* (Figure 3). La diversité des isolats bactériens ayant un effet antagoniste sur les bactéries pectinolytiques des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sont principalement des bactéries des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* (Figure 3).

Figure 3 : Identification par séquençage du gène *rrs* des bactéries antagonistes des pathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya*.

Identification by *rrs* gene sequencing of antagonists bacteria against *Pectobacterium* and *Dickeya*.



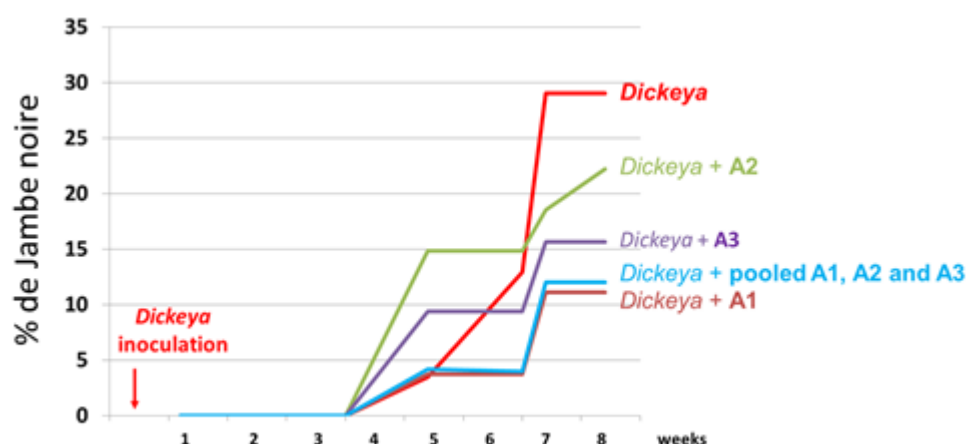
CINETIQUE D'APPARITION DES SYMPTOMES DE JAMBE NOIRE : PATHOSYSTEME SERRE

Le pathosystème pomme de terre/*Dickeya*, tel qu'il a été défini permet d'obtenir environ 30% de symptômes de jambe noire et ce de façon reproductible (Figure 4).

Le traitement par inoculation des antagonistes ici nommés A1, A2 et A3, seuls ou en mélange (Pool A1, A2, A3) permet de diminuer le pourcentage de symptômes. Cependant les effectifs (nombre de pots par modalité) restent trop faible pour obtenir des différences significatives (Figure 4). Ces expérimentations vont être renouvelées pour accumuler d'avantage de données et statuer sur l'efficacité des agents de bioprotection.

Figure 4 : Cinétique d'apparition de symptômes de Jambe noire après inoculation du pathogène *Dickeya* en pathosystème serre.

Emergence kinetic of black legs symptoms after *Dickeya* inoculation in greenhouse pathosystem.

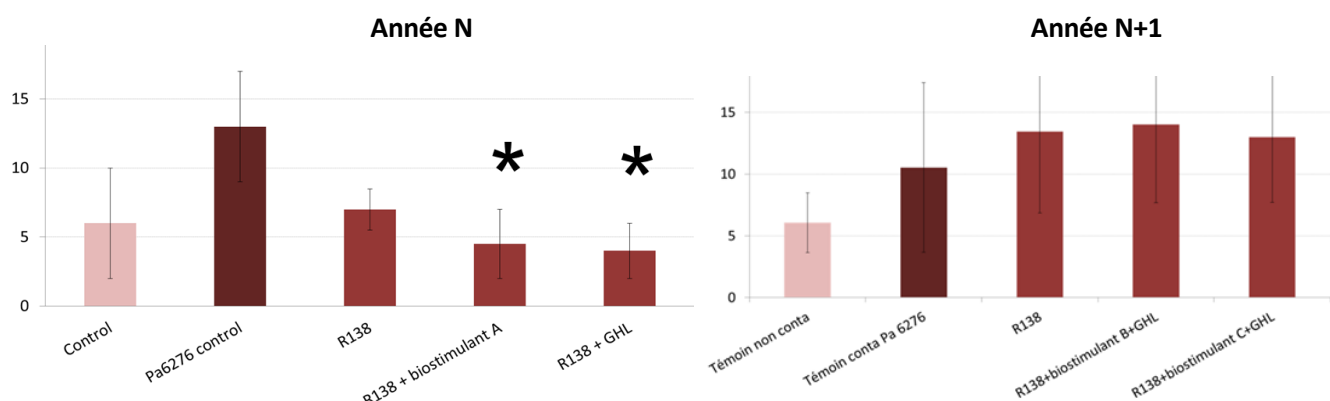


Effet de l'agent de Biocontrôle *Rhodococcus erythropolis* R138 sur le pourcentage de symptômes de Jambe noire : Pathosystème en champ pomme de terre/ *Pectobacterium*.

L'agent de bioprotection *R. erythropolis* R138 est connu pour dégrader les signaux de communication régulant l'agressivité des phytopathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya* (Crépin *et al.* 2012). Son effet de bioprotection a été évalué en parcelle expérimentale selon les conditions décrites précédemment. L'inoculation permet quelles que soient les années d'induire l'apparition de symptômes entre 10 et 15%. Lorsque *R. erythropolis* R138 est apporté, une diminution du pourcentage de symptômes est observée et ce notamment lorsque la bactérie est biostimulée dans le sol. La biostimulation est l'apport d'une source carbonnée quasi-uniquement assimilable par les *Rhodococcus erythropolis*. Ceci lui confère un avantage métabolique par rapport aux autres bactéries de la rhizosphère (Figure 5).

A l'inverse, à l'année n+1, cet effet n'est plus visible. Ceci montre une forte variabilité d'efficacité des méthodes de biocontrôle basées sur le management des populations bactériennes. Ceci soulève le problème permanent de l'évaluation des méthodes de biocontrôle.

Figure 5 : Tests de bioprotection en parcelle à l'année n et n+1. Pourcentage de jambe noire par modalité. Phytoprotection trials in field in year n and n+1. Percentage of black legs per condition.



Les étoiles indiquent des différences significatives selon le test du Khi2.

DISCUSSION

Ces résultats montrent que les agents de biocontrôle permettent de retarder ou de diminuer l'apparition de symptômes de jambe noire que ce soit en conditions contrôlées sous serre ou en parcelles expérimentales. Ils mettent aussi en évidence la fragilité de ces méthodes qui ne sont pas reproductibles d'une année sur l'autre. Les facteurs climatiques, la nature du sol, la diversité des pathogènes naturellement présents dans le sol peuvent être à l'origine de cette forte variabilité. La significativité des résultats est également un point à discuter car il nécessite des effectifs très conséquents. Les effets positifs induits par les agents de biocontrôle étudiés ne sont pas des effets tout ou rien, ils vont inhiber la croissance du pathogène et donc retarder l'apparition des symptômes. A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode pour évaluer les stratégies de biocontrôle. Les expérimentations sont basées sur ce qui est fait pour évaluer des produits phytosanitaires classiques avec une molécule chimique qui a un effet fongicide ou bactéricide. Les stratégies que nous développons, plus respectueuses de l'environnement sont également plus sensibles aux variations de celui-ci.

Les génomes des bactéries pathogènes et antagonistes ont été entièrement séquencés et des amorces souches spécifiques ont été définies afin de suivre dans le temps la présence des bactéries dans le sol et dans les symptômes (Kwasiborski et al, 2013 et 2014).

Jusque là, dans les essais menés par la SIPRE, les agents de biocontrôle ont été apportés directement à partir de culture bactérienne non formulées. La formulation est également une étape très importante dans le développement et la commercialisation de ces stratégies de biocontrôle. Elle doit permettre aux bactéries de se maintenir viables ou sous forme de spores le plus longtemps possible. L'utilisation de matériel vivant induit la mise au point de formulations spécifiques permettant la survie de ces micro-organismes. Cette mise au point est certainement une des étapes les plus importantes à prendre en considération.

CONCLUSION

Les micro-organismes présents naturellement dans les différents compartiments de la plante : surface racinaire, feuille, rhizosphère, sont à la base de l'ensemble des stratégies développées par la SIPRE. L'utilisation de produits biocontrôle permettra dans un futur proche de diminuer l'utilisation de produits phytosanitaires mais ne les remplacera pas complètement. Cependant, l'évaluation de la performance des antagonistes reste difficile et les outils à notre disposition ne sont pas toujours adaptés à cela.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le programme Labex-SPS (CNRS) pour son soutien financier. Également le service Expérimentation SIPRE/CNPPT, Sébastien Vast et David Dupré pour le suivi des expérimentations en champ.

BIBLIOGRAPHIE

Cha C., Gao P., Chen Y.C., Shaw P.D., Farrand S.K.. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 11:1119–1129.

Cirou A., Diallo S., Kurt C., Latour X., Faure D., 2007. Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ. Microbiol.* 9:1511-1522.

Cirou A., Raffoux A., Diallo S., Latour X., Dessaux Y., Faure D., 2011. Gamma-caprolactone stimulates growth of quorum-quenching *Rhodococcus* populations in a large-scale hydroponic system for culturing *Solanum tuberosum*. *Res. in Microbiology.* 162:945-950.

Cirou A., Mondy S., An S., Charrier A., Sarrazin A., Thoison O., DuBow M., Faure D., 2012. Efficient Biostimulation of native and introduced Quorum-Quenching *Rhodococcus erythropolis* populations is revealed by a combination of analytical Chemistry, Microbiology and Pyrosequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(2) :481. DOI :10.1128/AEM.06159-11.

Crépin A., Beury-Cirou A., Barbey C., Farmer C., Hélias V., Burini J.F., Faure D., Latour X. 2012. N-acyl homoserine lactones in diverse *Pectobacterium* and *Dickeya* plant pathogens: diversity, abundance, and involvement in virulence. *Sensors* (Basel) 12(3):3484-3497.

Faure D., Cirou A., Dessaux Y., inventeurs. «Chemicals promoting the growth of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria». USA n° 60/885,727 January 19th 2007. Demande Internationale n° PCT/IB2008/001156 du 18 janvier 2008, publiée sous le n° WO 2008/090479 le 31 juillet 2008.

Epoune-Lingome C., brevet SIPRE France n°13 55024 du 31 mai 2013.

Kwasiborski A., Mondy S., Beury-Cirou A., Faure D., 2013. Genome sequence of the *Pectobacterium atrosepticum* strain CFBP6276, causing blackleg and soft rot diseases on potato plants and tubers. *Genome Announc.* 1(3):e00374-13.doi:10.1128/genomeA.00374-13

Kwasiborski A., Mondy S., Beury-Cirou A., Faure D., 2014. Genome sequence of the Quorum-quenching *Rhodococcus erythropolis* strain R138. *Genome Announc.* 2(2):e00224-14. doi:10.1128/genomeA.00224-14.

Uroz S., Oger P.M., Chapelle E., Adeline M.T., Faure D., Dessaux Y.,2008. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1357–1366.