

Evaluation d'un moyen de bio-contrôle innovant vis-à-vis des bactérioses : les peptides antimicrobiens, de la recherche fondamentale à la pratique

Brachet M.L.¹, Béven L.²

¹ CTIFL – 28 route des Nébouts, F-24130 Prignonrieux

² INRAE – Université Bordeaux, Biologie du Fruit et Pathologie, UMR 1332, F-33140 Villenave d'Ornon

Correspondance : marie-lisa.brachet@hotmail.fr

Résumé

Les bactéries phytopathogènes représentent de redoutables ennemis pour différentes cultures telles que les cultures de kiwi, de melon, de noyer, ou encore de laitue avec des retombées d'importance économique. La difficulté de gestion des maladies bactériennes provient du fait (i) de la complexité de l'agent pathogène (capacité d'évolution, épidémiologie, ...) et (ii) de l'absence de moyen de lutte curatif. Le principal produit utilisable en agriculture est le cuivre pour son activité uniquement préventive mais qui ne permet pas de venir à bout des fortes épidémies sévissant ces dernières années.

Un moyen de protection développé depuis de nombreuses années dans le domaine médical notamment pour lutter contre l'apparition des résistances aux antibiotiques dans les hôpitaux, commence à faire son apparition dans le domaine agricole : l'utilisation des peptides antimicrobiens (PAMs). D'origine naturelle ou de synthèse, les PAMs, petites molécules de moins de 50 acides aminés, ont une activité bactéricide.

L'objectif de ce projet était d'évaluer l'efficacité d'une gamme de PAMs vis-à-vis des bactéries phytopathogènes ainsi que leurs possibles applications en protection des plantes. La preuve de concept est aujourd'hui faite : les PAMs évalués dans ce projet sont efficaces en conditions contrôlées sur une large gamme de souches bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Xanthomonas*.

Cependant, il existe deux principaux freins au développement de ce type de produits dans le domaine agricole : (i) le coût de production de ces produits à la fois d'origine naturelle mais plus encore pour celle synthétique, et (ii) le faible développement de produits concentrés en PAMs des professionnels de l'agrochimie.

Mots-clés : *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, curatif, lutte, peptide

Abstract: Evaluation of antimicrobial peptides, an innovative biocontrol resource against bacterial diseases

Phytopathogenic bacteria are severe enemies on various crops of economic importance such as kiwi, melon, walnut, or lettuce. The difficulty of managing bacterial diseases is due to 1) the complexity of the pathogens (evolutionary capacity, epidemiology, ...) and 2) the lack of curative control. The main product that can be used in agriculture is copper, which has only a preventive activity and does not overcome the strong epidemics that have been occurring in recent years.

A means of protection has been developed for many years in the medical field and is beginning to appear in the agricultural field: the use of antimicrobial peptides (PAMs), small molecules of less than 50 amino acids with bactericidal activity. Of natural or synthetic origin, PAMs are developed to fight against the emergence of antibiotic resistance in hospitals.

The objective of this project was to evaluate the effectiveness of a range of PAMs against phytopathogenic bacteria and to evaluate their possible uses in plant protection. The proof of concept is now done: the

PAMs evaluated in this project are effective under controlled conditions against a wide range of bacterial strains belonging to the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas*.

However, there are two main obstacles to the development of this type of products in the agricultural field: 1) the production cost of these products, whether they are of natural origin or synthetic, and 2) the few products concentrated in PAMs being developed by agrochemical companies.

Keywords: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, curative, fight, peptide.

Introduction

Les bactérioses en culture de fruits et légumes sont depuis plusieurs années des problématiques majeures et concernent des cultures d'importance économique pour différentes filières. La récente épidémie observée sur kiwi (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) et la recrudescence de certaines bactérioses (notamment du melon) avec des symptômes atypiques, amène à repenser dans son ensemble les stratégies de protection actuellement utilisées.

Toutes cultures confondues, les stratégies vis-à-vis des bactérioses sont essentiellement basées sur de la prophylaxie et des applications préventives de cuivre avec des efficacités plus ou moins bonnes. En fonction du risque de l'année, les quantités de cuivre apportées peuvent être importantes (doses, nombre de traitements) et leur efficacité parfois remise en cause (traitements d'automne de la bactériose de l'abricotier). D'autres moyens de protection existent mais n'apportent pas entière satisfaction en termes d'efficacité et des résistances au cuivre ont déjà été décrites sur différents couples bactérie/hôte : comme *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* sur noyer (Gardan *et al.*, 1993) et *P. s.* pv. *actinidiae* sur kiwi (Masami *et al.*, 2004). L'identification de moyens de protection avec un mode d'action différent est donc nécessaire et primordiale pour les filières. Le projet de recherche présenté dans cet article étudie l'efficacité d'un moyen de protection qui, s'il montre un intérêt, pourrait être déployé dans les années à venir.

1. Les bactérioses en fruits et légumes : éléments de contexte

1.1 Biologie des bactéries et perspectives de protection

Les bactéries phytopathogènes sont très diverses, mais appartiennent pour la plupart aux genres *Pseudomonas* et *Xanthomonas*.

Elles suivent différents processus épidémiques. Certaines bactéries restent à la surface des feuilles puis envahissent seulement les premières couches cellulaires des feuilles, provoquant des nécroses foliaires ou fructières avec diminution de la photosynthèse. D'autres bactéries ont la capacité de se vasculariser, c'est-à-dire coloniser le système vasculaire des plantes, elles provoquent ainsi l'infection pérenne des arbres. À ce stade, les traitements préventifs ne sont d'aucune efficacité et il n'existe pas, à ce jour, de traitement curatif homologué. Concernant les pistes de recherche actuellement travaillées au niveau national avec des applications à moyen terme, elles sont relativement peu nombreuses et sont globalement communes aux différentes bactérioses. Les différentes pistes de recherche peuvent être classées en 4 grands piliers :

- Résistance variétale, que ce soit au niveau de la variété ou du porte-greffe.
- Produits de traitement : Stimulateur de défense des plantes, champignons et bactéries antagonistes, huiles essentielles, formes de cuivre, ...
- Positionnement des traitements / modélisation.
- Pratiques culturales : raisonnement de la fertilisation et de l'irrigation, hauteur de greffage (cultures pérennes).

Cependant les recherches menées ne permettent pas d'envisager une amélioration notable dans les années à venir ; favoriser le développement de moyens de protection innovants, en rupture avec ce qui est déjà disponible est nécessaire. Interdits dans l'Union Européenne, des études concernant des alternatives à l'utilisation d'antibiotiques au niveau mondial sont menées. Ces récents travaux innovants font suite aux dernières épidémies et permettent d'envisager de nouveaux modes de protection : utilisation des bactériophages et des peptides antimicrobiens (PAMs). Ce sont ces derniers que nous proposons de travailler dans ce dossier.

1.2 Les peptides antimicrobiens : moyen de protection innovant

Les PAMs d'origine naturelle sont des petites molécules composées de 10 à 50 acides aminés (aa). De nature très diversifiée, ils sont synthétisés par des bactéries, des champignons, des plantes, des invertébrés et des vertébrés. Ces peptides exercent une activité antibactérienne, antifongique, antivirale ou antiparasitaire qui peut également être associée à une activité vis-à-vis d'autres organismes, comme une activité insecticide ou une activité d'induction des réactions de défense des plantes. Plusieurs centaines de PAMs naturels ont été isolées et le répertoire de ces molécules a été grandement enrichi par des peptides obtenus par voie de synthèse chimique.

1.2.1 Les PAMs, une alternative aux antibiotiques

L'utilisation massive des antibiotiques pour lutter contre les maladies bactériennes en santé humaine entraîne la sélection de nombreuses souches de bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. Des phénomènes de résistance aux antibiotiques ont également été mis en évidence en protection des plantes. Du fait du grand pouvoir d'adaptation des bactéries, le développement de nouvelles molécules agissant sur de nouvelles cibles apparaît nécessaire, que ce soit pour la santé humaine, celle des animaux ou la protection des végétaux. Dès les années 1990, les PAMs ont été perçus comme une alternative intéressante aux antibiotiques classiques car le risque d'apparition de résistance est très faible. En effet, ils visent la membrane bactérienne, élément constitutif de la bactérie dont l'intégrité est requise pour la vie de la bactérie. Les mécanismes de résistance aux PAMs recensés incluent la modification des propriétés de l'enveloppe bactérienne (altération des charges de surface par exemple), l'inactivation ou l'extrusion du peptide ou la sécrétion de protéases (Guilhelmelli *et al.*, 2013). Le développement d'une résistance aux PAMs nécessite donc la mise en place de mécanismes complexes par la bactérie, ce qui réduit le risque d'apparition de résistances.

1.2.2 Obtention des PAMs

Les PAMs naturels sont synthétisés par voie ribosomale ou par une machinerie enzymatique non ribosomale. Concernant les peptides produits par des micro-organismes, par exemple, les petites bactériocines et les défensines produites par des champignons sont synthétisés par voie ribosomale. Tandis que les peptaïbiotics, cyclopeptides et pseudopeptides, étant des métabolites secondaires, sont donc issus de la voie non ribosomale de certains champignons ou bactéries.

1.2.3 Intérêts des PAMs en protection des plantes

L'intérêt des PAMs pour des développements en médecine et protection des plantes a augmenté de manière significative ces quinze dernières années (Montesinos, 2007). Des publications récentes mettent en avant l'activité de certains peptides vis-à-vis d'agents phytopathogènes, testée généralement en laboratoire (Tableau 1).

Tableau 1 : Exemple de peptides antimicrobiens ayant montré une efficacité en laboratoire vis-à-vis de bioagresseurs des fruits et légumes.

Peptide	Pathogène cible	Référence
AFP	<i>Botrytic cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Pyricularia oryzae</i>	Montesinos, 2007
ESF1	<i>Cryphonectria parasitica</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , <i>Septoria musiva</i>	Powell <i>et al.</i> , 1995
ESF12	<i>C. parasitica</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , <i>S. musiva</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Pseudomonas syringae</i>	Powell, Catranis, et Maynard, 1995
D4E1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i>	De Lucca <i>et al.</i> , 1998
D2A21	<i>Gremmeniella abietina</i> , <i>Ophiostoma ulmi</i> , <i>Nectria galligena</i>	Rioux <i>et al.</i> , 2000
PAF26, PAF38, PAF40, BM0	<i>Penicillium digitatum</i>	Muñoz, López-García, et Marcos, 2007
PPD1, 66-10	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Ceratocystis fagacearum</i> , <i>Pythium ultimum</i>	Reed, Edwards, et Gonzalez, 1997
77-3	<i>Fusarium sambucinum</i>	Gonzalez <i>et al.</i> , 2002
BP 100	<i>E. amylovora</i> , <i>Xanthomonas axonopodispv. vesicatoria</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Badosa <i>et al.</i> , 2007
Pc87	<i>Phytophthora capsici</i>	Bishop-Hurley <i>et al.</i> , 2002
SP1 à 16	<i>P. syringae</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> , <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Zeitler <i>et al.</i> , 2013
3 TAC-I/BAC	Bactérie à <i>Pseudomonas</i>	Moya-Elizondo <i>et al.</i> , 2015
TK VI	<i>Fusarium oxysporum</i>	Shi <i>et al.</i> , 2012

Ces produits présentent un réel intérêt car ils ont montré une efficacité face à des bactéries qui produisaient des biofilms à la surface des plantes, entraînant ainsi une perte d'efficacité des produits classiques. (*P. s. pv. actinidiae* pour le kiwi) (Cameron et Sarojini, 2014). De plus, l'action rapide des PAMs, qui ne nécessite pas la multiplication de la bactérie (comme dans le cas des bêtalactamines) ou la synthèse de protéines cellulaires bactériennes (comme les macrolides) constitue un atout majeur dans la lutte contre les bactéries pathogènes. Le mode d'action des PAMs est à la fois préventif et curatif, par une inhibition ou perturbation de certains processus cellulaires. Cependant, les intérêts des PAMs restent un sujet récent, La principale limite identifiée actuellement au développement des PAMs en protection des plantes concerne leur coût de production, surtout pour les peptides issus de synthèse chimique (peptides purs). À terme les peptides naturels, issus de processus de fabrication beaucoup moins coûteux seront à privilégier, Les peptides produits notamment par *Trichoderma* en sont un exemple, certains présentent au moins à faible dose une activité bactéricide in vitro (Béven et Wroblewski, 1997 ; Béven *et al.*, 1998) tout en ayant une toxicité contre les cellules végétales limitée aux mêmes doses (Rippa *et al.*, 2010). Des travaux sont en cours afin de diminuer les coûts de production des PAMs issus de synthèse, mais beaucoup de travaux restent encore à mener.

2. Projet CASDAR : programme de travail autour de 3 actions

Fruit d'un partenariat étroit avec l'INRAE, le projet présenté se focalise sur l'évaluation de produits purs (issus de synthèse) pour évaluer leur efficacité et comprendre leur fonctionnement. L'objectif général du projet est donc d'explorer les possibilités d'utilisation de ce moyen de protection.

2.1 Action 1 : Évaluation de l'efficacité in vitro des peptides antimicrobiens présélectionnés

Cette première action consistait à évaluer le potentiel d'utilisation des PAMs sur une large gamme de bactérioses s'attaquant aux fruits et légumes. Selon les souches bactériennes, les PAMs peuvent avoir des efficacités très différentes, bien que la cible primaire reste généralement la membrane plasmique cellulaire.

Pour évaluer l'efficacité des différents PAMs de manière comparative, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de chaque couple PAM/bactérie sera déterminée. La CMI correspond à la plus petite concentration de produit suffisante pour inhiber au laboratoire la croissance de chaque souche bactérienne.

2.2 Action 2 : modalités d'application des peptides antimicrobiens sur les cultures cibles

En priorité la bactériose du kiwi (*P. s. pv. Actinidiae*) et la bactériose du melon (*P. s. pv. Aptata*) seront travaillées. Cependant, les bactéries ciblées relèvent de choix libres des auteurs.

2.2.1 Tâche 1 : Évaluer la toxicité des peptides actifs vis-à-vis de différents végétaux

La mise en contact de différentes concentrations de PAMs avec des protoplastes, cellule végétale sans paroi pecto-cellulosique, et l'observation de leur évolution (dégradation ou non) permettront d'évaluer la toxicité des PAMs. Une évaluation de la phytotoxicité sur plantules sera aussi possible.

2.2.2 Tâche 2 : Evaluer la résistance à la protéolyse des peptides testés

Pour l'utilisation des PAMs en protection des plantes, une stabilité des peptides face à la digestion par les protéases est une propriété requise pour assurer un temps de demi-vie raisonnable de la molécule dans l'environnement de la plante. De ce fait, les PAMs seront testés pour leur résistance aux protéases bactériennes et aux protéases végétales. Leur résistance est généralement évaluée par rapport à une seule protéase, souvent la protéinase K. Des tests avec la protéinase K, mais également avec des lysats cellulaires contenant le mélange d'activités protéasiques auxquelles seront confrontées les PAMs dans le contexte de leur utilisation en protection des plantes ont été choisis pour être réalisés.

2.3 Action 3 : Efficacité des produits vis-à-vis des bactérioses cibles et échanges sur les perspectives de développement

2.3.1 Tâche 1 : Efficacité des peptides antimicrobiens sur plantule

Après avoir défini la CMI dans la première action et défini les PAMs présentant les meilleures caractéristiques d'application dans la seconde, l'objectif était d'évaluer l'efficacité des différents PAMs sur plantule (serre verre). Cette évaluation visait ainsi à déterminer si sur végétal entier les efficacités sont satisfaisantes ou non, et comparables aux résultats in vitro.

2.3.2 Tâche 2 : Présentation des résultats et échanges sur les perspectives de développement

Ce projet a permis d'acquérir des données, d'identifier les forces/faiblesses de ce moyen de protection et d'envisager des perspectives de développement. Ainsi, l'objectif de cette dernière tâche est de présenter les travaux et résultats du projet aux firmes dans le cadre du consortium Bio-contrôle et d'échanger avec les professionnels sur leur perception et leurs attentes vis-à-vis de ce type de produit.

3. Evaluation de l'efficacité *in vitro* des peptides antimicrobiens présélectionnés (Action 1).

L'objectif principal de cette action était de déterminer l'efficacité de plusieurs PAMs connus, issus de la recherche bibliographique, vis-à-vis d'une liste de bactéries phytopathogènes.

3.1 Méthodes de travail utilisées

3.1.1 Sélection des PAMs et des bactéries phytopathogènes

Les PAMs ont été sélectionnés en fonction de leurs résultats d'efficacité sur d'autres pathosystèmes et du fait de l'utilisation envisagée dans le domaine agricole.

Tableau 2 : Description des peptides antimicrobiens et témoins utilisés dans les essais.

Code	Séquence	Masse molaire	Pathogène cible
BP-100	H-KKLFKKILKYL-NH ₂	1 420.879 g/mol	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Xanthomonas axonopodis</i>
SP1-1	H-RKKRLKLLKRL-NH ₂	1 564.075 g/mol	<i>P. syringae</i> , <i>Xanthomonas versicatoria</i>
SP10-2	H-LRFLKKALKKLF-NH ₂	1 503.971 g/mol	<i>P. syringae</i> , <i>Xanthomonas versicatoria</i>
SP10-5	H-LRIKKILKKLI-NH ₂	1 478.018 g/mol	<i>P. syringae</i> , <i>Xanthomonas versicatoria</i>
Mellitine	GIGAVLKVLTTGLPALI SWIKRKRQQ-NH ₂	2 846,462 g/mol	<i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> <i>Chlamydia trachomatis</i>
Sulfate de streptomycine	C ₂₁ H ₄₁ N ₇ O ₁₂	1457,4 g/mol	Bacilles Gram négatifs, Cocci Gram positifs, mycobactéries

Les bactéries phytopathogènes ont été sélectionnées sur les dires d'experts : pour chaque filière produit c'est-à-dire fruits et légumes non transformés, le CTIFL possède un responsable en charge de la coordination et l'animation des travaux à l'échelle nationale sur le produit cible. Ainsi, l'ensemble des responsables filières ont été sollicités pour permettre de prioriser les bactéries phytopathogènes à travailler ; six problématiques bactériennes ont donc été priorisées :

- Bactériose du kiwi (*P. s. pv. actinidiae* et *P. s. pv. actinidifoliorum*)
- Bactériose du melon (*P. s. pv. aptata*)
- Bactériose du concombre (*P. s. pv. lachrymans*)
- *P. s. pv. syringae* qui cause plusieurs maladies bactériennes
- Bactériose du noyer (*X. a. pv. juglandis*)
- Bactériose de la laitue (*X. h. pv. vitians*)

3.1.2 Méthode d'évaluation de l'efficacité

La détermination de la CMI consiste à déterminer la concentration minimale pour laquelle le produit inhibe la croissance bactérienne. Cette technique de laboratoire est largement utilisée en médecine et permet notamment d'évaluer les produits bactéricides type antibiotique. Les résultats sont obtenus par une mesure de densité optique (DO) traduisant la croissance ou non de la souche bactérienne.

Les principales étapes du protocole sont indiquées ci-dessous :

- Préparation des suspensions bactériennes à une concentration de 10⁷ à 10⁸ cellules/ml.
- Réalisation de la CMI : les CMI sont réalisées dans des plaques 96 puits (8 lignes x 12 puits). Chaque puit comprend du milieu de culture, une certaine concentration de PAM et des bactéries.
- Incubation des plaques à 27°C pendant 24 et 48 h.

- Lecture du résultat : mesure des DO à 24h et 48h post inoculation bactérienne afin de laisser le temps aux peptides de terminer leur activité.
- Test de vérification de la croissance bactérienne est effectué sur gélose après la lecture des plaques à 48h pour s'assurer que la croissance bactérienne est bien terminée.

3.1.3 Résultats obtenus

Les CMI ont été réalisées à chaque fois sur les 2 milieux de cultures LPG (Levure Peptone Glucose) et Mueller–Hinton (MH) ; des inhibitions sont observées avec les 2 milieux, mais les résultats présentés discutés ci-dessous sont ceux obtenus sur LPG car plus proche de condition favorisant la croissance bactérienne comme c'est le cas en verger lorsque les conditions favorables sont réunies. Aussi, les meilleurs résultats sont toujours obtenus après 48h d'incubation, mais la mesure à 24h nous donne une idée de la rapidité d'action.

Les résultats sont présentés en fonction des hypothèses souhaitées à vérifier.

▪ Efficacité des PAMs vis-à-vis des bactéries du genre *P. syringae* et *Xanthomonas*

L'efficacité des PAMs face aux bactéries du genre *P. syringae* a été évaluée (i) sur plusieurs pathovars de *P. syringae*, et (ii) sur plusieurs souches du pathovar actinidiae. Les PAMs sont efficaces vis-à-vis des 4 pathovars évalués : *lachrymans*, *aptata*, *actinidiae* et *actinidifoliorum*. L'inhibition se situe la plupart du temps à une concentration de 6,25 μM et l'ensemble des PAMs présentent une efficacité. Les seules inefficacités concernent le Sulfate de Streptomycine qui est inefficace vis-à-vis de *P. s. pv. aptata*, et la Mellitine qui ne provoque pas d'inhibition sur *P. s. pv. actinidifoliorum* et *pv. lachrymans*.

Pour déterminer celle-ci vis-à-vis des bactéries du genre *Xanthomonas*, deux espèces de *Xanthomonas* ont été travaillées : *X. a. pv. juglandis* (Xaj) et *X. h. pv. vitians* (Xhv). Elles sont toutes les deux sensibles aux différents PAMs mais Xaj présente des inhibitions à des concentrations plus importantes que Xhv (respectivement 100 μM pour Xaj contre 3,125 μM pour Xhv sur milieu LPG).

▪ Variation d'efficacité des PAMs en fonction du pathovar travaillé

Pour tester l'hypothèse selon laquelle l'efficacité des PAMs varie selon le pathovar travaillé, seul le pathovar actinidiae a été considéré, et l'efficacité des PAMs évaluée vis-à-vis de 3 souches de référence (CFBP 7285, CFBP 7287 et CFBP 8047). Les résultats montrent que les efficacités sont relativement homogènes, les PAMs sont toujours efficaces à des concentrations faibles (de 1,562 μM à 12,5 μM), le sulfate de streptomycine est le produit qui inhibe la croissance bactérienne à la plus faible concentration, et la Mellitine est soit inefficace, soit efficace à la concentration maximale (100 μM).

4. Absences d'effets sur les bactéries bénéfiques

Les PAMs ne présentent aucun effet sur les bactéries bénéfiques. Certaines bactéries contenues dans le sol ont des propriétés bénéfiques notamment par l'apport d'une résistance vis-à-vis de certains pathogènes telluriques comme par exemple *Pseudomonas fluorescens*. L'efficacité des PAMs vis-à-vis d'une souche de *P. fluorescens* (CFBP 3353) a donc été évaluée. La croissance de cette souche n'est pas perturbée par l'application des différentes modalités, à savoir les PAMs. Cette souche possède certainement un mécanisme de résistance qui bloque l'efficacité des PAMs.

En conclusion, les résultats obtenus dans le cadre de l'action 1 permettent de valider le postulat de départ, à savoir que les PAMs présentent une efficacité vis-à-vis des bactéries phytopathogènes, efficacité obtenue dans des conditions de laboratoire sur des cultures bactériennes en pleine croissance.

5. Modalités d'application des peptides antimicrobiens sur les cultures cibles (Action 2).

5.1 Tâche 1 : Evaluer la toxicité des peptides actifs vis-à-vis de différents végétaux

L'objectif de cette action était d'évaluer le niveau de toxicité des peptides choisis vis-à-vis des cellules végétales, évaluation essentielle pour une validation ultérieure de l'utilisation des PAMs.

5.1.1 Méthodes de travail utilisées

La toxicité des PAMs vis-à-vis des végétaux peut être évaluée sur les végétaux entiers, des cellules en culture ou des protoplastes obtenus à partir des plants des espèces fruitières. L'approche privilégiée dans ce projet était une estimation de la toxicité des molécules sur des protoplastes. Ce choix était motivé notamment par l'absence de paroi et ainsi une plus grande accessibilité des PAMs à la membrane plasmique, et par le fait que contrairement aux cellules en culture, les protoplastes constituent des éléments cellulaires isolés, facilitant ainsi les mesures de viabilité cellulaire. Bien que la technique d'obtention de protoplastes des espèces fruitières ciblées (kiwi et melon) soit décrite dans la littérature par Derambure et Hirsch (1995) et Djerrab (2015), cette technique a été mise en place au laboratoire. Les protoplastes ont été préparés à partir de plants de melon semés au CTIFL, et de feuilles de kiwi préalablement collectées et congelées par le CTIFL. Différents protocoles ont été tentés, puis la viabilité des protoplastes estimée par observation en microscopie et marquage grâce à des marqueurs colorés et fluorescents vitaux.

5.1.2 Résultats obtenus

■ Mise en place du protocole d'obtention de protoplastes à partir de feuilles de kiwi et de melon

Le protocole décrit par Derambure et Hirsch a été modifié pour permettre l'obtention des protoplastes ; seuls les protoplastes de melon ont pu être obtenus. Principales étapes du protocole modifiés :

- 2g de matériel végétal initial lavé, séché, découpé en retirant les nervures
- Pré-plasmolyse dans une solution contenant du Mannitol 13% (CPW 13M)
- Digestion enzymatique de la paroi végétale en présence de cellulase 2% et de macérozyme (1%) durant 4h sans agitation
- Filtration des protoplastes sur membrane de porosité élevée (100 μ m)

Ce protocole modifié a permis l'obtention de protoplastes peu nombreux mais dont la majorité (60%) était imperméable au colorant Bleu d'Evans, indiquant que l'intégrité de la membrane de cette population était conservée.

■ Effet des peptides sur la viabilité des protoplastes de melon

Les protoplastes obtenus selon le protocole optimisé ont été mis en contact durant 10 minutes avec les peptides (BP-100, SP1-1, SP10-2, SP10-5, mellitine) à une concentration de 50 μ M, colorés au Bleu d'Evans ou à l'iodure de propidium (colorant se liant à l'ADN des cellules perméables, c'est-à-dire mortes ou mourantes) avant d'être observés en microscopie. Alors que dans ces conditions la mellitine entraîne la mort de 32% des protoplastes de melon, les autres peptides testés ont démontré une très faible activité toxique vis-à-vis des protoplastes, avec moins de 6% de protoplastes colorés en fin d'incubation. Ce résultat est donc particulièrement encourageant, mais reste préliminaire étant donné que ces essais n'ont pu être réalisés que sur une seule préparation de protoplastes de melon dans le temps imparti au projet. Ces résultats devront donc être confirmés pour le melon et les expériences adaptées pour le kiwi.

Les résultats préliminaires de l'évaluation de la toxicité des peptides suggèrent une très faible toxicité aux concentrations antimicrobiennes des peptides SP1-1, SP10-2, SP10-5.

5.2 Tâche 2 : Résistance à la protéolyse des peptides testés

A la suite de leur application sur les végétaux, les peptides vont être rapidement en contact avec les protéases végétales et par conséquent être potentiellement dégradés. Cette dégradation provoquerait une perte d'activité antibactérienne des PAMs est vraisemblable. En vue de leur utilisation pour lutter contre les bactérioses fructières les PAMs doivent avoir une durée de vie dans le végétal suffisante pour atteindre les cibles bactériennes. L'insertion d'acides aminés de configuration D ou d'acides aminés atypiques tels que l'acide alpha-isobutyrique est reconnue comme permettant d'augmenter la résistance des PAMs aux protéases. Néanmoins, les PAMs doivent également être dégradables de manière à ce qu'ils ne puissent pas persister dans la plante et provoquer la sélection et le développement de bactéries résistantes aux PAMs. Dans cette étude de faisabilité, la sensibilité/résistance relative des PAMs devait donc être évaluée. Les PAMs sélectionnés dans cette dernière ne contenaient ni d'acides en configuration D, ni d'acides aminés atypiques. Leur résistance/sensibilité à la protéolyse par les protéases végétales a donc été comparée à un PAM de taille similaire, ayant une activité antibactérienne connue et uniquement composé d'acides aminés naturels classiques en configuration L, la mellitine.

5.2.1 Méthodes de travail utilisées

Plusieurs méthodologies, faisant appel à diverses approches biochimiques et microbiologiques, ont été tentées afin d'évaluer *in vitro* la résistance des PAMs sélectionnés vis-à-vis des protéases. Dans cette étude, le lysat cellulaire contenant l'activité protéasique a été préparé à partir de feuilles de kiwi.

L'intégrité des peptides mis en contact avec le lysat cellulaire a été suivie par chromatographie liquide haute pression (HPLC), mesure de CMI, spectrophotométrie à 214 nm. L'approche par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a en revanche été menée sans succès.

■ Préparation du lysat cellulaire végétal contenant l'activité protéasique

Le lysat est préparé par broyage à froid (azote liquide) de feuilles de kiwi et extraction des protéines en tampon Tris 50 mM, pH 7.5 additionné de glucose 0.25M. L'extrait est ensuite clarifié par filtration sur Miracloth, centrifugation 3 min à 10000 g à 4°C. La composition du lysat aux différentes étapes est analysée par électrophorèse SDS-PAGE. Les protéines sont dosées à l'aide du kit de dosage commercial DC Protein Assay de Biorad basé sur la méthode Lowry.

■ Protocole d'incubation des peptides en présence du lysat cellulaire

Les peptides 175 µM sont incubés dans l'extrait cellulaire dilué au 1/2. L'action des protéases est alors arrêtée à différents temps (le temps d'incubation est indiqué ci-dessous pour chacune des stratégies méthodologiques tentées), soit par filtration sur filtre Millipore 0.2 µM (HPLC), soit par passage sur dispositif membranaire de filtration AMICON Ultracel (seuil de coupure 3K) (mesure de CMI, spectrophotométrie). Le profil obtenu après la filtration est visualisé sur le profil HPLC

■ Suivi de l'activité antibactérienne des peptides en présence des composants végétaux solubles

Les CMI des peptides lorsqu'ils sont ajoutés seuls dans la culture bactérienne et lorsqu'ils sont ajoutés en présence d'extraits végétaux sont ensuite comparés. Deux bactéries représentatives chacune des genres *Xanthomonas* et *Pseudomonas*, ont été sélectionnées pour ce test *X. hortorum* pv. *vitians* (Xhv) et *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. Les CMI ont été mesurées comme décrit précédemment pour l'action 1, chaque condition ayant été testée en triplica. Brièvement les peptides incubés deux heures en présence de lysat cellulaire végétal ont été ajoutés (0.07-100 µM) dans le milieu MH avant inoculation bactérienne (10⁶ cellules/mL). Ont été inclus dans cette expérience différents contrôles : H₂O, Tampon d'extraction du lysat (Tris – Glucose), lysat seul, mellitine, streptomycine, inhibiteurs peptidiques non bactéricides (A22, valinomycine). La lecture de la DO a été effectuée à différents temps, à 24 et 48 heures. L'inhibition de la croissance a été vérifiée par observation de l'absence de croissance sur milieu gélosé par le test de gouttes et observation en microscopie.

▪ Suivi de l'intégrité peptidique par suivi spectrophotométrique

Afin de quantifier la dégradation peptidique, l'absorption du peptide à 214 nm avant et après l'incubation avec l'extrait cellulaire peut être mesurée. En effet, la présence de liaisons peptidiques entraîne une augmentation de l'absorption dans l'UV à cette longueur d'onde. Les peptides sont donc incubés en présence d'extrait cellulaire végétal à différents temps (0, 10 min, 1h, 2h), puis le peptide est récupéré et les protéines de l'extrait éliminées par passage sur AMICON Ultracell 3K.

▪ Suivi de la dégradation des peptides par HPLC

La colonne utilisée est une Kinetex XB-C18 100Å, 150 x 4.6 mm, porosité 2.6 µm (Phenomenex). Le gradient optimal de solvant consiste en un passage d'acétonitrile (ACN)+acide trifluoroacétique (TFA) 0.1% de 0 à 98% en 10 minutes, suivi d'un plateau de 5 minutes supplémentaires à 98%. Le peptide est incubé avec le lysat 1/2, les temps d'incubation testés sont 0, 40 minutes, 1, 3 et 24 heures.

5.2.2 Résultats obtenus

Comme attendu, le lysat cellulaire végétal contenant l'activité protéasique obtenu possède un profil protéique complexe après SDS-PAGE, avec une concentration de l'ordre de 1 mg/ml de protéines.

Suite à l'incubation des peptides en présence du lysat cellulaire, le profil HPLC obtenu permet de conclure que l'élimination importante des protéines permet de visualiser le pic correspondant au peptide sans interférence majeure. L'élimination des protéines sur système AMICON a été vérifiée par SDS-PAGE.

Dans le suivi de l'activité antibactérienne des peptides en présence des composants végétaux solubles, aucune inhibition de croissance n'a été observée pour l'ensemble des contrôles.

Les résultats des CMI (t=48h) des peptides sont récapitulés dans le Tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3 : Mesures de Densité Optique selon la bactérie, le peptide antimicrobien, et la présence ou non d'extrait végétal

Peptide	Xhv	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	Xhv + extrait végétal	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> + extrait végétal
BP100	6,25	3,12	3,12	6,25
SP1-1	6,25	3,12	3,12	3,12
SP10-2	12,5	12,5	6,25	ND
SP10-5	3,12	3,12	3,12	3,12
Mellitine	1,56	6,25	3,12	ND
Streptomycine	3,12	3,12	3,12	0,56-1,12
Lysat seul	ND	ND	ND	ND

ND : Inhibition non détectée : Signifie qu'aucune inhibition de croissance n'a été observée dans ces conditions.

Dans les conditions testées, en ce qui concerne Xhv, la CMI des différents peptides reste inchangée à un facteur 2 près, qu'ils soient ou non incubés préalablement avec l'extrait végétal. La légère baisse de CMI en présence du lysat pour BP-100, SP1-1, SP10-2 pourrait suggérer un effet synergique extrait cellulaire/peptides qu'il faudrait vérifier par des études complémentaires. Pour cette bactérie, seule la mellitine est légèrement moins active sur la croissance, ce qui pourrait être imputé à une dégradation protéolytique. Si une dégradation protéolytique des peptides a eu lieu, elle ne se traduit pas par une baisse d'activité ou cette baisse est compensée par un effet synergique extrait cellulaire/peptide (à noter que le lysat seul n'entraîne pas d'inhibition de croissance). En revanche, pour *P. syringae* pv. *aptata*, une baisse nette d'activité sur la croissance est notée pour SP10-2 et mellitine, suggérant que l'interaction extrait cellulaire/peptide provoque une perte d'activité antibactérienne, qui pourrait être liée à une

dégradation protéolytique ou une complexation peptide/composant de l'extrait. L'importance d'évaluer les propriétés des peptides sur les différentes souches d'intérêt est démontrée puisque les conclusions diffèrent d'une bactérie à l'autre.

Tableau 4 : Valeur de l'absorption à 214 nm en % par rapport au temps 0

Peptide	T=0	10 min	1h	2h
BP100	100	102	96	101
SP1-1	100	107	91	87
SP10-2	100	98	43	41
SP10-5	100	104	113	74
Mellitine	100	111	76	43

Ces résultats suggèrent une dégradation significative du peptide SP10-2 et de la mellitine, et une résistance pour SP1-1 et le BP100 au temps t=2h. Cette méthode est simple d'application et donne de réelles indications, mais présente néanmoins l'inconvénient de la présence éventuelle de peptides de faible masse moléculaire d'origine végétale après passage sur système de filtration AMICON. Ainsi, même si ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par détermination de CMI, un protocole permettant un suivi quantitatif de la sensibilité des PAMs aux protéases végétales a été défini.

Sans le suivi de la dégradation par HPCL, la détection des peptides réalisée à 214 nm pour les peptides seuls a permis de démontrer l'efficacité de la méthode (proportionnalité de l'aire des pics et de la concentration de peptides injectés) et sa reproductibilité. Après incubation du peptide avec le lysat $\frac{1}{2}$, la mellitine n'est plus détectée après 3h démontrant ainsi l'efficacité de la méthode d'analyse. Malheureusement, le temps imparti au projet n'a pas permis l'obtention de résultats concernant les peptides BP100, SP1-1, SP10-2 et SP10-5. Néanmoins le protocole de suivi quantitatif de la sensibilité à la dégradation protéolytique est maintenant mis en place au laboratoire, et pourra être appliqué à un plus grand nombre de peptides pour les études ultérieures.

6. Efficacité des produits vis-à-vis des bactérioses cibles et échanges sur les perspectives de développement (Action 3)

L'objectif de cette tâche était d'une part de commencer à acquérir des résultats d'efficacité effective des PAMs dans des essais sur plante entière et en présence de bactérie, et d'autre part de présenter le projet au cours de plusieurs événements pour susciter de futures collaborations et développements.

6.1 Test d'évaluation de l'efficacité des PAMs appliqués directement sur plantule

6.1.1 Méthodes utilisées

L'efficacité des PAMs a été évaluée sur des plantules de melon (Variété Védantais) âgées de 1 mois, sur lesquelles nous avons réalisé une inoculation de solution bactérienne (dépôt d'une goutte à 108 CFU/ml) et des traitements de PAMs selon 3 modes d'action : préventif, simultané et curatif (Tableau 5).

Deux témoins sont ajoutés :

- M17 : Non traité, inoculé avec *P. s. pv. aptata*
- M18 : Non traité, non inoculé

Tableau 5 : Modalités mises en œuvre pour évaluer l'efficacité des peptides antimicrobiens vis-à-vis de la bactériose du melon en conditions contrôlées sur plantules.

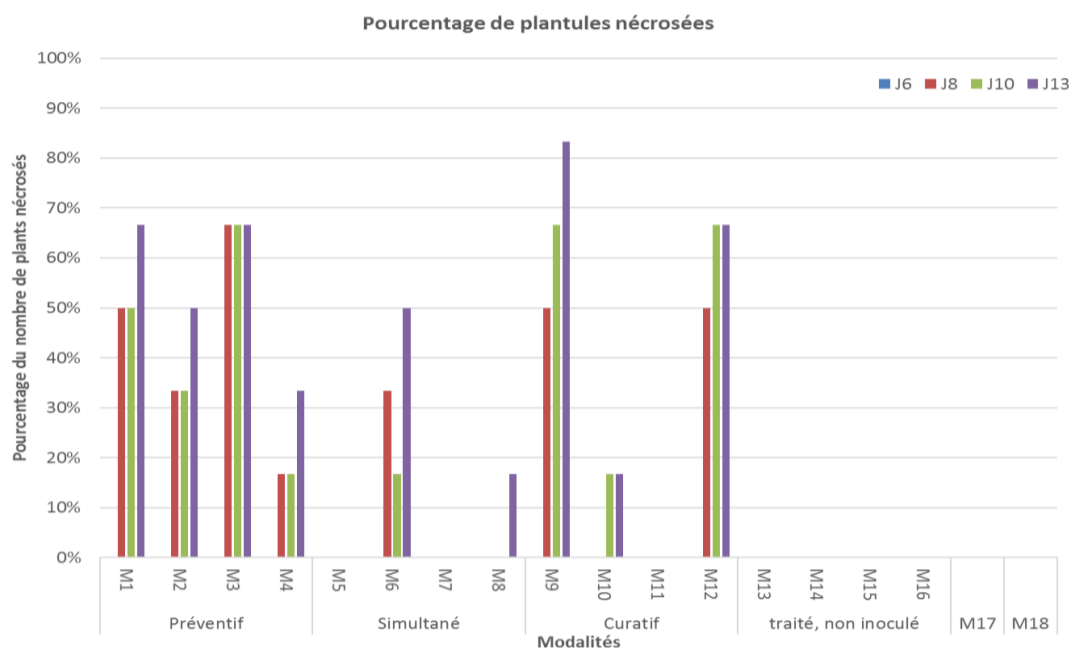
		BP100	SP10-5	Streptomycine	Mellitine
Traitement	Préventif	M1	M2	M3	M4
	Simultané	M5	M6	M7	M8
	Curatif	M9	M10	M11	M12
Non Traité		M13	M14	M15	M16

6.1.2 Résultats

Plusieurs paramètres ont été notés à 4 dates post inoculation, plus six jours (J+6), plus huit (J+8), dix (J+10) et treize (J+13) :

- Le pourcentage de plantules nécrosées (résultats présentés ci-dessous)
- La longueur des nécroses
- L'intensité des nécroses

Les résultats montrent plusieurs impacts des différents traitements (Figure 1). Les plantules du témoin inoculé non traité (M17) ne présente aucuns symptômes. Afin d'éviter les contaminations croisées dues à la proximité des plants dans la chambre climatique, nous avons positionné les témoins dans le fond de la chambre à proximité immédiate de la ventilation, ce qui a certainement asséché les gouttes de solution bactérienne déposées sur les feuilles trop rapidement, empêchant l'infection. C'est la présence de nécroses dans d'autres modalités, et l'absence de symptômes dans les modalités M13 à M16 (produits seuls) qui nous font dire que les nécroses sont bien dues au développement de la bactérie et non à des symptômes de phytotoxicité. De plus, nous avons pu ré-isoler *P.syringae* pv. *aptata* à partir de plusieurs nécroses, validant le postulat de Koch.

**Figure 1 :** Pourcentage de plantules présentant des symptômes en fonction des modalités évaluées.

Le mode d'application préventif apporte peu de satisfaction ; en effet, des nécroses sont observées avec tous les produits évalués, la streptomycine semble tout de même diminuer le nombre de plants atteints par rapport aux autres produits (un peu plus de 30% des plants touchés à J+13).

Le BP100 est efficace seulement lorsqu'il est appliqué en simultané avec la bactérie ; cela peut traduire une faible persistance d'action du produit, mais confirme l'action biocide du produit. Le SP10-5 est lui aussi bien biocide (efficacité observée en simultané et curatif), mais est quant à lui plus efficace en curatif qu'en simultané.

La streptomycine est le produit le plus efficace puisqu'aucune plantule ne présente de nécrose quel que soit le mode d'application. La Mellitine ne présente aucun intérêt en curatif comme le BP100, mais présente une bonne efficacité en simultané.

6.2 Tâche 2 : Présentation des résultats et échanges sur les perspectives de développement

6.2.1 Méthodes de travail utilisées

Afin d'essayer d'impulser une dynamique sur l'utilisation des PAMs en protection des plants, plusieurs présentations et rencontres ont été faites :

- Deux présentations au cours de journées :
 - 1st session of the annual event of information and exchange of the Consortium Biocontrôle (Thursday 23rd Novembre 2017, Angers, Maison du Végétal) : cette manifestation a permis de présenter le projet et d'avoir 4 temps d'échanges privilégiés en Be to Be avec des représentants de sociétés phytosanitaires, la plupart du temps des responsables de recherche.
 - Session d'échange du pôle de compétitivité AgriSudOuest Innovation, le 12 juillet 2017 à Bordeaux ; cette manifestation était à destination de potentiels partenaires locaux désireux de s'investir sur ce sujet.
- Trois rencontres :
 - Rencontre de Pascal Dhulster (Université de Lille) et un représentant de Lipofabrik, start-up qui produit les lipopeptides issus de *Bacillus subtilis* le 18 janvier 2018 dans les locaux de Polytech à Lille.
 - Rencontre de Wilfried Remus-Borel de Belchim Crop Protection le 26 janvier 2018 dans les locaux de l'INRA de Bordeaux.
 - Rencontre d'Emilio Montesinos, de l'Université de Gérone (Espagne) le 23 janvier 2018. Il est notamment l'obteneur du BP100 que nous avons testé dans notre projet.

6.2.2 Résultats obtenus

Les présentations et contacts entrepris dans le cadre de ce projet ont toujours été source d'intérêt. Tous s'accordent à dire que les bactérioses sont aujourd'hui des maladies incurables qui peuvent amener à des impasses techniques dans certaines filières.

Cependant, le marché commercial des bactérioses fruits et légumes n'est pas un marché prioritaire pour les sociétés phytosanitaires, alors que seul ces dernières, pourraient rendre des produits contenant des PAMs disponibles pour les producteurs dans les années à venir.

Conclusion

Les résultats obtenus ont permis de démontrer l'efficacité des PAMs vis-à-vis d'une gamme de bactéries phytopathogènes en conditions de laboratoire. Ceci ne prévaut pas quant à l'efficacité au champ, mais cela permet de mettre en évidence une nouvelle gamme de produits prometteurs vis-à-vis des bactérioses. A l'heure actuelle, aucun produit biocide vis-à-vis des bactéries n'existe, en dehors des antibiotiques non autorisés en Europe pour un usage sur les plantes. Ainsi, les PAMs pourraient être mobilisés pour leurs modes d'action variés.

Références bibliographiques

- Badosa E., Ferre R., Planas M., *et al.*, 2007. A library of linear undecapeptides with bactericidal activity against phytopathogenic bacteria. *Peptides* 28, 2276–2285.
- Béven L., Duval D., Rebuffat S., Riddell F.G., Bodo B., Wróblewski H., 1998. Membrane permeabilisation and antimycoplasmic activity of the 18-residue peptaibols trichorzins PA. *Biochimica Biophysica Acta* 1372, 78-90.
- Béven L., Wróblewski H., 1997. Effect of natural amphipathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes. *Research Microbiology* 148, 163-175
- Bishop-Hurley S.L., Mounter S.A., Laskey J., *et al.*, 2002. Phage-Displayed Peptides as Developmental Agonists for *Phytophthora capsici* Zoospores. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3315–3320.
- Cameron A., Sarojini V., 2014. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives. *Plant Pathology* 63, 1–11.
- De Lucca A.J., Bland J.M., Grimm C., *et al.*, 1998. Fungicidal properties, sterol binding, and proteolytic resistance of the synthetic peptide D4E1. *Canadian journal of microbiology* 44, 514–520.
- Derambure A., Hirsch A.M., 1995. Obtention de protoplastes à partir de différents clones d'*Actinidia deliciosa* (Kiwifruit) et d'espèces botaniques du genre *Actinidia* résistantes au froid. *Acta Botanica Gallica* 142, 5–21.
- Djerrab D., 2015. Existe-t-il une activation de la transmission pour le Virus de la mosaïque du concombre (CMV) ?
- Gardan L., Brault T., Germain E., 1993. Copper resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* in French walnut orchards and its association with conjugative plasmids. *Acta Horticulturae*. N°311, p. 259-265.
- Gonzalez C.F., Provin E.M., Zhu L., Ebbole D.J., 2002. Independent and synergistic activity of synthetic peptides against thiabendazole-resistant *Fusarium sambucinum*. *Phytopathology* 92, 917–924.
- Guilhelmelli F., Vilela N., Albuquerque P., Derengowski L. da S., Silva-Pereira I., Kyaw C.M., 2013. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology* 4.
- Masami N., Masao G., Katsumi A., Tadaaki H., 2004. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *European journal of plant pathology* 110, 223–226.
- Montesinos E., 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters* 270, 1–11.
- Moya-Elizondo E., Quezada T.P., Reyes Salinas M., Reyes Navarro M.A., 2015. 2015 Meeting | Assessment of an antimicrobial peptide source to control *Pseudomonas* plant pathogens.
- Muñoz A., López-García B., Marcos J.F., 2007. Comparative Study of Antimicrobial Peptides To Control Citrus Postharvest Decay Caused by *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8170–8176.
- Powell W., Catranis C., Maynard C., 1995. Synthetic Antimicrobial Peptide Design. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 792–794.

Reed J.D., Edwards D.L., Gonzalez C.F., 1997. Synthetic peptide combinatorial libraries: a method for the identification of bioactive peptides against phytopathogenic fungi. *Molecular plant-microbe interactions* 10, 537–549.

Rioux D., Jacobi V., Simard M., Hamelin R.C., 2000. Structural changes of spores of tree fungal pathogens after treatment with the designed antimicrobial peptide D2A21. *Canadian Journal of Botany* 78, 462–471.

Rippa S., Eid M., Formaggio F., Toniolo C., Béven L., 2010. Hypersensitive-like response to the pore-former peptaibol alamethicin in *Arabidopsis thaliana*. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 11, 2042–2049.

Shi M., Chen L., Wang X.-W., *et al.*, 2012. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. *Microbiology* 158, 166–175.

Zeitler B., Herrera Diaz A., Dangel A., *et al.*, 2013. De-Novo Design of Antimicrobial Peptides for Plant Protection. *PLoS ONE* 8, e71687.

R Core Team 2013 R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2013. url : <http://www.R-project.org/>.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)