EVALUATION D'UNE ÉCO-TECHNOLOGIE DE PROTECTION DES CULTURES DE PLANTS DE POMME DE TERRE

ACRONYME : ECOPRO

EVALUATING ECO-TECHNOLOGY: CASE OF THE BIOSTIMULATION TARGETING THE QUORUM-SENSING VIRULENCE OF POTATO PLANT PETHOGENS

Programme Evaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des Pesticides
APR 2009
Rapport final-12_2013

Institut des Sciences du Végétal
Equipe Ecologie de la rhizosphère
CNRS Gif-sur-Yvette
Denis Faure faure@isv.cnrs-gif.fr

Date : 17/12/2013

N° de contrat : 055682
Date du contrat : 19/10/2010

RAPPORT SCIENTIFIQUE

EVALUATION D'UNE ÉCO-TECHNOLOGIE DE PROTECTION DES CULTURES DE PLANTS DE POMME DE TERRE

ACRONYME : ECOPRO

PESTICIDES

Faure Denis, CNRS

Introduction

Ce projet a permis l'évaluation en serre et en champs d'une éco-stratégie de phytoprotection des plantes de pommes de terre contre la maladie de la jambe noire causée par *Pectobacterium atrosepticum* qui mobilise la voie de régulation de type quorum-sensing pour exprimer ses facteurs de virulence. Cette stratégie utilise la biostimulation et/ou la bioaugmentation de bactéries natives ou introduites qui appartiennent à l'espèce *Rhodoccocus erythropolis* et sont capables de dégrader les signaux quorum-sensing, donc bloquer l'expression des facteurs de virulence. L'agent biostimulant est la gamma-heptanolactone (GHL) dont l'utilisation fait l'objet d'un brevet déposé et suivi depuis 2007 par les deux partenaires CNRS et CNPPT.

- Participants au projet :

Faure Denis	DR CNRS
Dessaux Yves	DR CNRS
Raffoux Aurélie	Technicienne CNRS
Tannières Mélanie	Doctorante CNRS
Sara Planamente	Ingénieur ECOPRO
Kwasiborski Anthony	Post-doc CNRS
Cirou-Beury Amélie	Post-doc CNRS/SIPRE (CNPPT)
Deveaux Virginie	Directrice SIPRE (CNPPT)
Riquiez Xavier	Ingénieur SIPRE (CNPPT)
Cigna Jérémy	Ingénieur SIPRE (CNPPT)
Mothe Nicolas	Ingénieur SIPRE (CNPPT)
Vast Sébastien	Technicien agronome SIPRE (CNPPT)
Copin Patricia	Technicienne SIPRE (CNPPT)

- Les actions proposées et réalisées seront présentées par action (voir **tableau 1**).

TABLEAU 1 : RECAPITULATIF DE L'AVANCEMENT DES TRAVAUX

Tâche	Etat d'avancement	En cours
Action 1 : Evaluation en serre	**terminée**	
1-1 à 1-6 en absence de pathogènes	terminée	
1-7 en absence de pathogènes	terminée	
1-2 à en présence de pathogènes	terminée	
Action 2 : Evaluation en parcelles	**terminée**	
Campagne 2011	terminée	
Campagne 2012	terminée	
Campagne 2013	terminée	
Action 3 : Synthèse et bilan	**terminée**	**valorisation**

1. Action-1 : essais en macrocosmes de sol (serres et enceintes de culture)

1.1. Les aspects méthodologiques (recueil et analyse des données)

Dans cette évaluation de l'impact et de l'efficacité de la stratégie de phytoprotection nous développons deux types d'essais en macrocosmes de sol (il s'agit du même sol que celui des parcelles expérimentales) :

- des essais en serres confinées au CNRS à Gif-sur-Yvette en absence de pathogènes pour évaluer le devenir des agents de biostimulation introduits, leur effet sur les populations bactériennes dégradant les signaux quorum-sensing de l'espèce *R. erythopolis* et les populations non-cibles cultivées (celles produisant les signaux quorum-sensing) et non-cultivées (approches globales 454-rrs et puces-rrs).

- des essais en chambres de cultures confinées au SIPRE (CNPPT) à Beaurains en présence de pathogènes introduits pour évaluer l'efficacité de la stratégie et le devenir du pathogène.

1.2. Les résultats

- **Essais en macrocosmes de sol (CNRS, Gif-sur-Yvette)**

Ces essais ont permis de comparer 3 traitements à une condition témoin non-traitée. Le premier traitement est une biostimulation par l'apport d'un agent biochimique dégradable, la GHL, qui stimule la croissance des populations capables de dégrader les signaux NAHL ; le second traitement est l'apport d'un agent biologique, la bactérie phytoprotectrice *R. erythropolis* R138 qui est capable de dégrader les signaux NAHL ; le troisième est le couplage des agents biochimiques (GHL) et biologique (R138).

Les résultats montrent :

- Une biodégradation rapide de l'agent biochimique introduit (GHL) à un niveau 1000 fois inférieur à celui de l'introduction. La GHL atteint un niveau indétectable par les outils HPLC/MS-MS ;
- Une absence d'augmentation du niveau des populations cibles natives du sol dans la condition de biostimulation par la GHL ; ce traitement montre donc peu d'effet en macrocosmes de sol contrairement aux effets observés en cultures hydroponiques en hors sol (Cirou et al 2012 Appl. Env. Microbiol.) ;
- Une faible (ou non significative) augmentation des populations cibles lors que l'agent biologique R138 est introduit seul dans la rhizosphère de plants de pomme de terre dans la condition dite de bioaugmentation ;
- Une forte colonisation de la rhizosphère lors du couplage des agents biologique R138 et biochimique GHL puisque les populations cibles atteignent 40% de la communauté cultivable. Dans cette expériences la population introduite R138 représente plus de la majorité de la population cible. Il est important de noter qu'en absence de nouveaux traitements la population introduite R138 décroît en quelques semaines. L'installation de cette population est donc transitoire.
- Ces expériences ont été répétées et validées plusieurs fois en utilisant des plantes de pommes de terre et de tomate.

Les analyses de diversité bactérienne par 454-rrs montrent que :

- La structure des communautés des échantillons traités avec l'approche de couplage seraient différents des échantillons témoins ; en revanche les échantillons traités par

l'approche de biostimulation uniquement sont difficilement séparés des échantillons « couplage » et « témoin » ; L'approche de couplage serait celle qui a le plus d'effet sur la structure des communautés bactériennes ;

- Le niveau de populations cible comme celles appartenant au genre *Rhodococcus* est le plus augmenté dans le traitement de couplage ; ce niveau est variable dans le traitement GHL seul, et très faible dans la condition témoin ; ces données par approche 454-rrs consolident les acquis par les approches cultivables.
- Parmi les genres plus abondants, c'est-à-dire dont la représentation est supérieure à 1/1000 dans les communautés, les genres dominants comme *Pseudomonas* ou *Acidovorax* (en rouge dans l'accolade) ne sont pas affectés par les traitements, contrairement aux populations cibles comme *Rhodococcus*.

L'ensemble de ces données suggèrent que les traitements ont un impact mesurable mais n'affectent pas les populations dominantes de la rhizosphère de plants de pommes de terre. Actuellement la rémanence de cet impact sur la diversité bactérienne est en cours d'analyse.

2. Action-2 : essais en parcelles expérimentales

2.1. Les aspects méthodologiques (recueil et analyse des données)

- **Campagne 2011**

Cette campagne a été conduite avec trois parcelles randomisées par condition testée. Nous avons testé 2 modes d'apport des pathogènes : utilisant soit des tubercules déclassés lors de la précédente récolte pour des symptômes sur pied, soit des tubercules sains, mais inoculés artificiellement par l'apport du pathogène. A l'issu de notre expérience des campagnes 2009, 2010 et celle de 2011, nous avons décidé de ne plus utiliser les tubercules déclassés car la variabilité d'émergence des symptômes est trop forte.

Les images ci-dessous montrent les parcelles en cours de traitements juste après le semis et après la levée des plants de pomme de terre.

- **Campagne 2012**

Dans cette campagne, 6 parcelles de 200 pieds randomisées sont analysées afin d'augmenter le nombre de répétitions par condition. Les conditions climatiques ont été si

particulières que le semis a été fait fin mai avec un mois de retard par rapport aux années précédentes à cause de fortes pluies. A l'issu de la compagne et malgré le travail conséquent de tout le consortium, nous avons décidé d'un commun accord avec le CNPPT ne pas tenir compte de l'année 2012 dans notre processus d'évaluation.

- **Campagne 2013**

Dans cet essai, 4 parcelles de 200 pieds randomisées sont réalisées par condition. Les tubercules sont inoculés avec le pathogène par trempage le jour de la plantation. Pour cette campagne, nous avons pu disposer des outils moléculaires souche spécifique nous permettant de suivre les populations introduites du pathogène *P. atrosepticum* CFBP6276 et de l'agent de biocontrôle *R. erythropolis* R138 dans le sol et sur les plants. Le protocole nous permettant d'obtenir ces marqueurs est décrit dans le paragraphe suivant.

- **Définition d'amorces spécifiques de détection du pathogène et de l'agent de biocontrôle introduits**

Le génome de *P. atrosepticum* CFBP6276 et *R. erythropolis* R138 a été séquencé sur fonds propres du laboratoire CNRS. Le génome de *P. atrosepticum* CFBP6276 comprend un chromosome circulaire de 4.9 Mpb et deux plasmides circulaires de 5.8 et 2.7 kpb. Le génome de *R. erythropolis* R138 montre un chromosome circulaire de 5.5 Mpb, un plasmide linéaire de 246 kpb et un plasmide circulaire de 84 kbp. Ces génomes ont ensuite été comparés *in silico* avec ceux d'autres organismes de la même espèce issus des bases de données ouvertes et celles de notre laboratoire afin d'identifier des régions génomiques distinctes et uniques chez *P. atrosepticum* CFBP6276 et *R. erythropolis* R138. Au sein de ces régions, des amorces ont été dessinées et testées pour vérifier leur spécificité sur différents isolats. Puis, ces amorces ont été testées pour leur sensibilité par qPCR. Ainsi, nous disposons d'un couple d'amorce pour détecter et quantifier *R. erythropolis* R138 et de 2 couples d'amorces pour *P. atrosepticum* CFBP6276.

2.2. Résultats des campagnes 2011 et 2013

Campagne 2011 :

Les relevés des symptômes de la campgane 2011 montrent une baisse significative des symptômes avec 4 traitements contenant l'agent R138 par rapport au témoin contaminé par le pathogène.
Lors de cette campagne, nous avons essayé de suivre par un approche cultivable la dynamique de *R. erythropolis* dans la rhizosphère. Mais cette méthode lourde à mettre en œuvre et peu sensible s'est avéré peu efficace.
Dans cette campagne, nous avons fait des prélèvements de sol afin de suivre les modifications des communautés bactériennes par 454-rrs . Les données de 454-rrs montrent que les genres dominants ne sont pas affectés par les traitements. De plus, l'analyse de la dynamique de la diversité des populations révèle que le seul facteur explicatif de variations est le stade de culture de plants de pommes de terre. Autrement dit, l'effet de la plante sur la structure des populations de la rhizosphère est plus marqué qu'un potentiel –non mesurable dans cette expérience- effet des traitements.

Campagne 2013 :

La campagne 2013 s'est déroulée à Achicourt dans la nouvelle station expérimentale du CNPPT. Les différentes modalités sont similaires à celles de la campagne 2011. L'année 2013 a été une année favorable au développement des pathogènes du genre *Pectobacterium*. Les résultats de la campagne 2013 avec des taux de jambe noire supérieur à 10% ne montrent pas de baisse significative des symptômes après traitements par R138 par rapport au témoin contaminé par le pathogène.

- Suivi de l'agent de biocontrôle R138 dans la rhizosphère

Les données montrent une augmentation significative des populations de l'agent de biocontrôle dès le 2ème traitement. Elles atteingnent un pic vers mi-juin et restent détectables jusqu'à la fin de l'expérience sous biostimulation. En revanche dans la condition témoin, l'agent biologique R138 n'est pas ou faiblement détecté. Ces résultats nous permettent à la fois de valider la technique « amorce spécifique » pour la détection de R138 au champ et confirme que l'agent de biocontrole peut se maintenir dans le sol.

- suivi du pathogène introduit *P. atrosepticum* CFBP6276 en sol et sur symptômes
    - dans la rhizosphère

Le pathogène a été recherché dans les mêmes échantillons utilisés pour la détection de l'agent R138. Sur les 48 échantillons de sol analysés par qPCR avec les amorces spécifiques (3 modalités, 4 temps, 4 répétitions), le pathogène a été détecté uniquement 2 fois. Ces résultats suggèrent que le pathogène introduit par trempage des tubercules ne s'installe pas massivement dans la rhizosphère (dans nos conditions expérimentales).

    - dans les tissus végétaux avec symptômes

Un de total de 36 plants malades issus de parcelles plantés avec des tubercules inoculés avec le pathogène ont été analysés. La photo ci-dessous montre les symptômes sur tige causés par l'attaque de *P. atrosepticum* CFBP6276 au champ. Les résultats de détection du pathogène avec les amorces spécifiques montrent que les 36 plants malades possèdent bien la souche CFBP6276 inoculée lors de la plantation. Ces résultats permettent d'affirmer que les symptômes observés au champ sont bien imputables à la souche pathogène inoculée.

Symptômes sur tige causé par l'attaque de *P. atrosepticum* CFBP6276

3. Action-3 : Synthèse et bilan

3.1. Les méthodologies et outils mis en œuvre

- D'importants outils (marqueurs génétiques souches-spécifiques, 454-rrs) ont été développés pour l'évaluation des différentes approches de phytoprotection mobilisant l'agent biologique *R. erythropolis* R138 contre le pathogène *P. atrosepticum* CFBP6276. **Ces outils dont le développement est couteux constituent un acquis important pour la poursuite des travaux d'évaluation.**

- Ces années ont été importantes pour la mise en place de protocoles d'évaluation en parcelles expérimentales. Mais ce protocole doit être encore amélioré car la charge de pathogène introduite est très forte et éloignée de la réalité au champ. En champs de culture de plants de pommes de terre le seuil critique est de 1 à 2% de plants avec symptômes et non pas 10% comme nous l'obtenons dans nos essais. **Cette surcharge de pathogène et son mode d'introduction par trempage des tubercules peut conduire à une sous-estimation de l'effet de phytoprotection.**

- Une difficulté majeure dans la lutte contre *Pectobacterium* est que, contrairement aux pathogènes *Dickeya*, nous ne sommes toujours pas encore capables (au niveau international) de produire des symptômes en conditions contrôlées en serre dans un **pathosystème sol-plante-pathogène**.

3.2. L'évaluation de la phytoprotection

- La **campagne 2011 a montré un effet de phytprotection, mais pas la campagne 2013.** La campagne 2012 a été déclassée pour cause de conditions climatiques trop atypiques. Ce travail montre la difficulté de ce type d'évaluation car une seule campagne est conduite chaque année.

- **Le mode d'introduction du pathogène** par enrobage du tubercule avant le semis donne un avantage fort au pathogène qui reste à proximité de la plante et n'est pas détecté dans la rhizosphère. Le mode d'introduction du pathogène doit être pris en compte dans les analyses futures.

- **Le mode d'introduction de l'agent biologique de phytoprotection** est aussi à ré-évaluer car il se fait actuellement sur des supports non-commercialisables. Les premiers essais de support pré-industriels n'ont pas été satisfaisants (baisse rapide de la densité UFC/ml lors de stockage). Ce point doit être pris en considération dans une perspective de valorisation.

3.3. Travaux en cours et perspectives

- Utilisation de l'agent *R. erythropolis* contre *Pectobacterium* en ciblant le quorum-sensing.

Ces travaux se poursuivre actuellement dans le cadre d'un projet collaboratif entre le CNRS et le CNPPT avec le soutien du Labex SPS, en mettant l'accès sur la prise en compte des modes d'introduction des agents pathogènes et de protection, et en mobilisant l'ensemble des outils développés lors de projet.

- Utilisation d'autres agents biologiques contre *Pectobacterium* et *Dickeya*

Les symptômes en champ sont causés par un complexe d'espèces des genres *Dickeya* et *Pectobacterium*, y compris l'espèce émergente *D. solani*. Des travaux entrepris avec le CNPPT et la FN3PT visent à développer des agents biologiques ayant une activité antibiose contre *Pectobacterium* et *Dickeya* dans le cadre d'un doctorat CIFRE. Ces travaux ont permis d'identifier et caractériser des agents potentiels, qui ont pu être testés en serre dans un pathosystème sol-plant-*Dickeya*. Les génomes de ces agents de protection ont été séquencés et des marqueurs génétiques souche-spécifiques sont en cours de développement.

- Combinatoire avec d'autres approches de phytoprotection.

En perspective, nous souhaitons tester des approches combinatoires associant agents biologiques et éliciteurs des défenses de la plante afin de proposer une palette d'outils de phytoprotection compatibles avec le plan Ecophyto2018.

ANNEXE : TEXTES DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PARUES

Le soutien du programme PESTICIDES a été remercié dans les publications suivantes :

M. Tannières, A. Beury-Cirou, Armelle Vigouroux, S. Mondy, F. Pellissier, Y. Dessaux, and D. Faure. 2013. A metagenomic study highlights phylogenetic proximity of quorum-quenching and xenobiotic-degrading amidases of the AS-family. **PLoS ONE** 8: e65473.

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

A. Crépin, C. Barbey, A. Cirou, M. Tannières, N. Orange, M. Feuilloley, Y. Dessaux, J-F Burini, D. Faure and X. Latour. 2012. Biological control of pathogen communication in the rhizosphere: A novel approach applied to potato soft rot due to Pectobacterium atrosepticum. **Plant and Soil** 358:27-37.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES À PARAÎTRE

néant

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PREVUES

- Une publication est en cours de rédaction sur les essais en serres de l'effet de la biostimualtion sur la colonisation de la rhizosphère par *R. erythrolis*, en combinaison avec les données de chimie analytique du devenir de la GHL et des données de puces-rrs et 454-rrs sur la diversité bactérienne.

- Une publication en cours de discussion entre le CNRS et le CNPPT sur les données de la campagne aux champs.

ACTIONS DE VULGARISATION/COMMUNICATION SUR LE PROJET :

- A. Cirou, M. Tannières, N. Mothe, V. Deveaux, et **D. Faure. 2012.** L'ingénierie écologique des agrosystèmes au service de la réduction des intrants chimiques dans le cadre du plan Ecophyto 2018. **Eclairage n°13** Janvier-Mars 2012 http://www.r2ds-ile-de-france.com/

- N. Mothe, V. Deveaux, et D. Faure. **2012**. Les journées de l'Ingénierie Ecologique : Ingénierie écologique sous le projecteur du plan Ecophyto 2018 (Visite du site 8). **CNRS**, Région Nord-Pas-de-Calais.