

La litière de feuilles d'érable à sucre pour lutter contre les maladies bactériennes de la laitue?

M. Delisle-Houde¹, P. Dubé² et R.J. Tweddell¹

¹Département de phytologie, Université Laval

²Centre de recherche industrielle du Québec

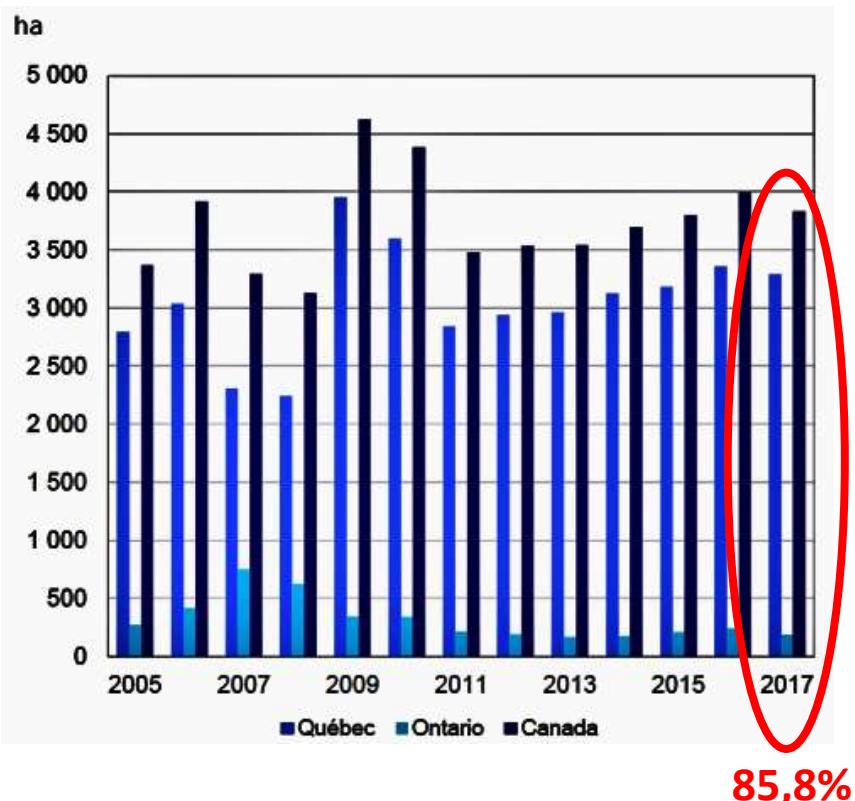


Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation
Département de phytologie

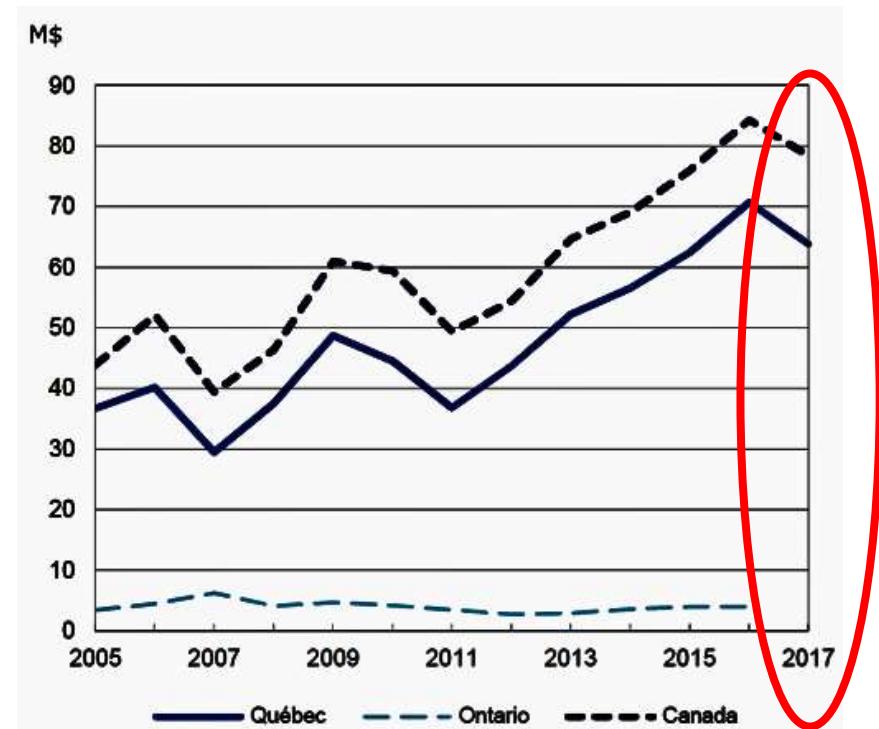


Quelques statistiques!

Superficies récoltées en laitues au Québec, en Ontario et au Canada de 2005 à 2017



Recettes monétaires en provenance du marché de la laitue au Québec, en Ontario et au Canada de 2005 à 2017



Profil sectoriel de l'industrie horticole au Québec, Édition 2018



Désordres physiologiques

- Brunissement nervaire
- Nécrose marginale



Maladies virales

- Virus de la mosaïque de la laitue (LMV)
- Virus des taches nécrotiques de la laitue (LNSV)



Maladies fongiques

- Botrytis cinerea*
- Rhizoctonia solani*
- Sclerotinia sclerotiorum et Sclerotinia minor*



Maladies bactériennes

Blancard, 2003



Maladies bactériennes de la laitue



Tache bactérienne
(*Xanthomonas campestris* pv. *vitiens*)



Maladie des taches et des nervures noires
(*Pseudomonas cichorii*)



Pourriture molle
(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)



Taches et nécroses foliaires marginales
(*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*)

Blancard, 2003



Les bactéries à l'étude

Xanthomonas campestris pv. *vitiens*

Bâtonnet

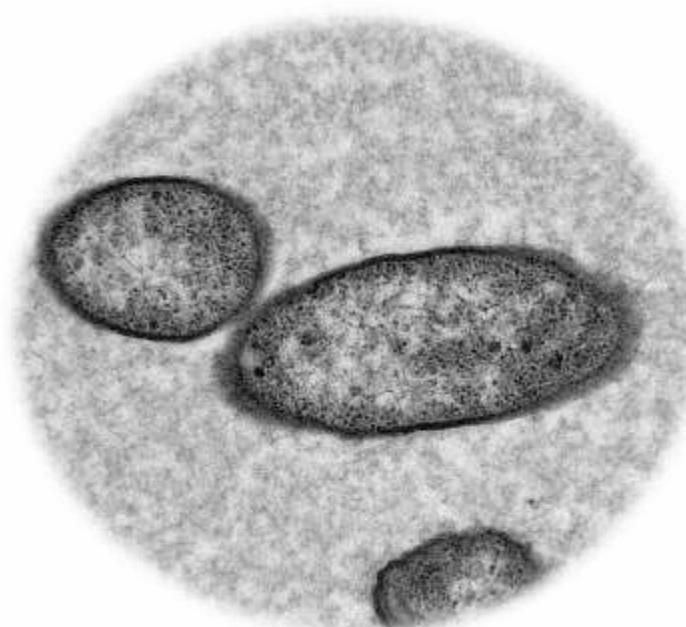
Gram négatif (-)

Flagelle polaire



EPS (xanthane)

Pigment jaune (xanthomonadine)



Pseudomonas cichorii

Bâtonnet

Gram négatif (-)

Flagelle polaire



EPS (alginate)

Pigment vert (pyoverdine)

Toussaint, 1999; Poplawski et coll., 2000; Gumus et coll., 2010

Conti et coll., 1994; Bultreys et coll., 2004



Lutte contre les maladies bactériennes

Très peu de produits phytosanitaires homologués

Cuivre

Phytotoxique à de faibles doses

Cas de tolérance

Pratiques culturales préventives

Éviter les périodes d'humidité prolongées

Désinfecter le matériel

Effectuer une rotation des cultures

Limiter les déplacements dans les champs infectés

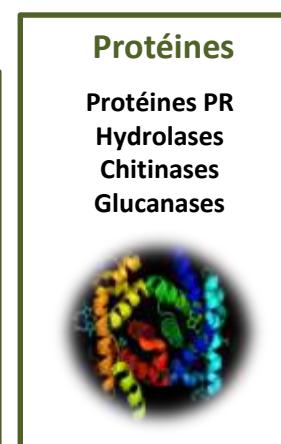
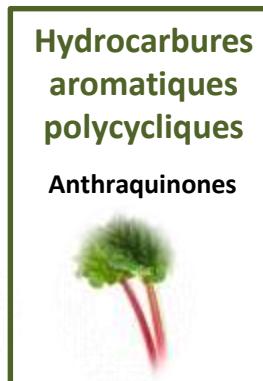
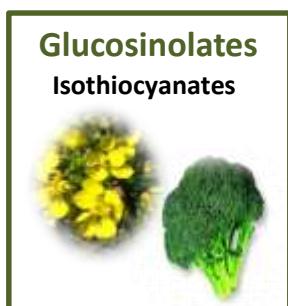


Blancard, 2003; Toussaint, 2008

Composés antimicrobiens chez les végétaux

Les plantes constituent un immense réservoir de composés ayant des propriétés antimicrobiennes.

Une multitude de composés antifongiques et antibactériens ont été extraits des plantes sauvages et cultivées.



Scalbert, 1991; Brown et Morra, 1997; Benhamou et Picard, 1999; Copping et Duke, 2007; Ncube et coll., 2008; Dayan et coll., 2009; Pino et coll., 2013



Utilisation des végétaux à des fins phytosanitaires

Maladie(s)

Pourridié noir des racines du fraisier
(*Rhizoctonia* spp.)



Pomme de terre:
Pourriture sèche (*Fusarium* spp.)
Rhizoctonie (*Rhizoctonia solani*)
Gale commune (*Streptomyces scabiei*)



Blanc de la tomate (*Oidium neolyopersici*)



Blanc de la tomate (*Leveillula taurica*)
Blanc du concombre (*Sphaerotheca fuliginea*)



Extrait végétal/Résidus de culture

Résidus de culture de moutarde chinoise
(Glucosinolates)



Extrait de quinoa
(Saponines)



Extrait à base d'ail
(Allicine)



Extrait de renouée de Sakhaline
(Anthraquinones)



Konstantinidou-Doltsinis et Schmitt, 1998; Lazzeri et coll., 2003; Konstantinidou-Doltsinis et coll., 2006; Richard, 2007; Al-Mughrabi et coll., 2010



Programme de recherche sur la valorisation des extraits forestiers

Hypothèse

Certains extraits d'essences forestières contiennent des composés antibactériens qui, appliqués sur les feuilles de laitue, limitent le développement de la tache bactérienne et de la maladie des taches et des nervures noires sans causer de symptômes de phytotoxicité.

Objectifs

Évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne contre *X. campestris* pv. *vitians* et *P. cichorii* de différents extraits d'essences forestières

Déterminer *in vitro* la dose phytotoxique 5% de l'extrait sélectionné

Évaluer en serre l'effet de l'application foliaire de l'extrait sélectionné sur le développement de la tache bactérienne et de la maladie des taches et des nervures noires de la laitue

Identifier dans l'extrait sélectionné le(s) composé(s) ayant des propriétés antibactériennes



Essences forestières à l'étude



Abies balsamea
(Sapin Baumier)



Larix laricina
(Mélèze laricin)



Picea mariana
(Épinette noire)



Pinus strobus
(Pin blanc)



Acer saccharum
(Érable à sucre)



Acer rubrum
(Érable rouge)



Alnus incana subsp. rugosa
(Aulne rugueux)



Prunus avium
(Merisier)



Picea glauca
(Épinette blanche)



Populus tremuloides
(Peuplier faux-tremble)



Pinus banksiana
(Pin gris)



Quercus rubra
(Chêne rouge d'Amérique)

Préparation des extraits

Écorces, branches,
aiguilles, feuilles



Broyées mécaniquement
<2 mm



Macérées dans différents solvants
(eau, éthanol, acétone, méthanol)



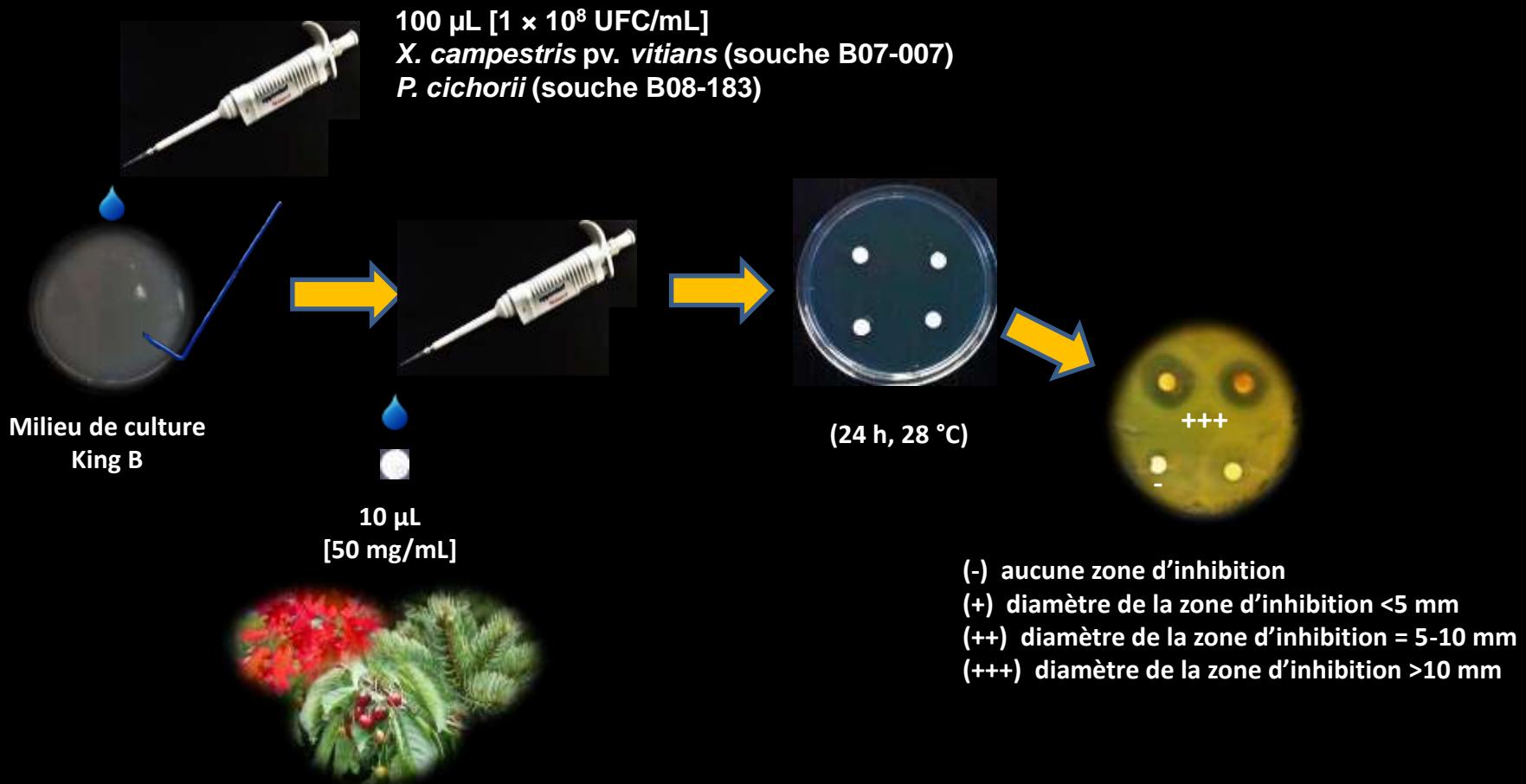
Évaporation des solvants
(évaporateur rotatif)



Conservation à température pièce



Évaluation de l'activité antibactérienne



Résultats

Activité antibactérienne des différents extraits à base d'espèces forestières

Espèce forestière	Résidus utilisés ^a	Nom de l'extrait	Zone d'inhibition ^b	
			<i>X. campestris</i> pv. <i>vitis</i>	<i>P. cichorii</i>
Sapin baumier	Ecorce	Sapin 1	- ^d , - ^e , - ^f	-, -, -
<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.	Aiguilles	Sapin 2	-, -, -	-, -, -
		Sapin 3	-, -, -	-, -, -
Érable rouge	Feuilles	Érable r. 1	-, -, -	-, -, -
<i>Acer rubrum</i> L.		Érable r. 2	-, -, -	-, -, -
Érable à sucre	Ecorce	Érable s. 1	-, -, -	-, -, -
<i>Acer saccharum</i> Marsh.	Feuilles	Érable s. 2	++, ++, ++	++, ++, ++
		Érable s. 3	+++, ++++, +++	+++, ++++, +++
		Érable s. 4 ^c	++, ++, ++	++, ++, ++
		Érable s. 5 ^c	+++, ++++, +++	+++, ++++, +++
		Érable s. 6 ^c	+++, ++++, +++	+++, ++++, +++
Aulne rugueux	Ecorce	Aulne 1	+, +, +	+, +, +
<i>Alnus incana</i> subsp. <i>Rugosa</i> (Du Roi) R.T. Clausen.				
Mélèze laricin	Ecorce	Mélèze 1	-, -, -	-, -, -
<i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch		Mélèze 2	-, -, -	-, -, -
Épinette blanche	Branches	Épinette 1	-, -, -	-, -, -
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	Aiguilles	Épinette 2	-, -, -	-, -, -
Épinette noire	Ecorce	Épinette 3	-, -, -	-, -, -
		Épinette 4	-, -, -	-, -, -
		Épinette 5	-, -, -	-, -, -
		Épinette 6	-, -, -	-, -, -
		Épinette 7	-, -, -	-, -, -
Pin gris	Ecorce	Pin g. 1	-, -, -	-, -, -
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.				
Pin blanc	Ecorce	Pin b. 1	-, -, -	-, -, -
<i>Pinus strobus</i> L.				
Peuplier faux-tremble	Ecorce	Peuplier 1	-, -, -	-, -, -
<i>Populus tremuloides</i> Michx.				
Merisier	Ecorce	Merisier 1	-, -, -	-, -, -
<i>Prunus avium</i> (L.) L.				
Chêne rouge	Ecorce	Chêne 1	++, ++, ++	++, ++, ++
<i>Quercus rubra</i> L.				

^aLes résidus utilisés ont été macérés dans un mélange eau/éthanol (50%, v/v), sauf Sapin 3, Érable s. 6, et Épinette 4 (éthanol 95%); Mélèze 2 et Épinette 5 (eau); Épinette 6 (acétone); Épinette 7 (méthanol)

^b Aucune zone d'inhibition (-), diamètre de la zone d'inhibition <5 mm (+), diamètre de la zone d'inhibition of 5–10 mm (++) , diamètre de la zone d'inhibition >10 mm (+++)

^c Feuilles récoltées au sol à l'automne

^{d, e, f} Répliques 1, 2, 3

Résultats

Activité antibactérienne des différents extraits à base d'espèces forestières

Espèce forestière	Résidus utilisés ^a	Nom de l'extrait	Zone d'inhibition ^b	
			<i>X. campestris</i> pv. <i>vitis</i>	<i>P. cichorii</i>
Sapin baumier	Ecorce	Sapin 1	- ^d , - ^e , - ^f	-, -, -
<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.	Aiguilles	Sapin 2	-, -, -	-, -, -
		Sapin 3	-, -, -	-, -, -
Érable rouge	Feuilles	Érable r. 1	-, -, -	-, -, -
<i>Acer rubrum</i> L.		Érable r. 2	-, -, -	-, -, -
Érable à sucre	Ecorce	Érable s. 1	-, -, -	-, -, -
<i>Acer saccharum</i> Marsh.	Feuilles	Érable s. 2	++, ++, ++	Érable s. 2 
		Érable s. 3	+++, +++, +++	++, ++, ++
		Érable s. 4 ^c	++, ++, ++	+++, +++, +++
		Érable s. 5 ^c	+++, +++, +++	+++, +++, +++
		Érable s. 6 ^c	+++, +++, +++	+++, +++, +++
Aulne rugueux	Ecorce	Aulne 1	+, +, +	Érable s. 3 
<i>Alnus incana</i> subsp. <i>Rugosa</i> (Du Roi) R.T. Clausen.				Érable s. 4 ^c
Mélèze laricin	Ecorce	Mélèze 1	-, -, -	Érable s. 5 ^c
<i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch		Mélèze 2	-, -, -	Érable s. 6 ^c
Épinette blanche	Branches	Épinette 1	-, -, -	Aulne 1 
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	Aiguilles	Épinette 2	-, -, -	+
Épinette noire	Ecorce	Épinette 3	-, -, -	+
<i>Picea mariana</i> (Miller) Britton, Sterns		Épinette 4	-, -, -	+
		Épinette 5	-, -, -	+
		Épinette 6	-, -, -	+
		Épinette 7	-, -, -	+
Pin gris	Ecorce	Pin g. 1	-, -, -	-
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.				-
Pin blanc	Ecorce	Pin b. 1	-, -, -	-
<i>Pinus strobus</i> L.				-
Peuplier faux-tremble	Ecorce	Peuplier 1	-, -, -	-
<i>Populus tremuloides</i> Michx.				-
Merisier	Ecorce	Merisier 1	-, -, -	-
<i>Prunus avium</i> (L.) L.				-
Chêne rouge	Ecorce	Chêne 1	++, ++, ++	Chêne 1 
<i>Quercus rubra</i> L.				+++, +++, +++
				+++, +++, +++

^aLes résidus utilisés ont été macérés dans un mélange eau/éthanol (50%, v/v), sauf Sapin 3, Érable s. 6, et Épinette 4 (éthanol 95%); Mélèze 2 et Épinette 5 (eau); Épinette 6 (acétone); Épinette 7 (méthanol)

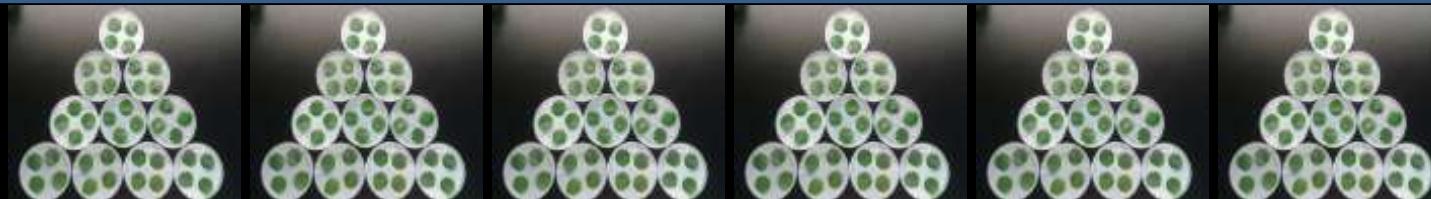
^bAucune zone d'inhibition (-), diamètre de la zone d'inhibition <5 mm (+), diamètre de la zone d'inhibition of 5–10 mm (++) , diamètre de la zone d'inhibition >10 mm (+++)

^cFeuilles récoltées au sol à l'automne

^{d,e,f}Réplicats 1, 2, 3



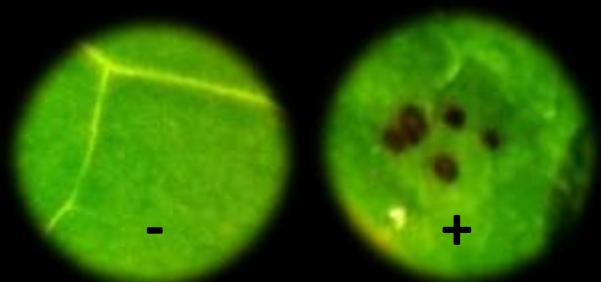
Détermination de la dose phytotoxique 5% (DP5)



0 mg/mL 5 mg/mL 10 mg/mL 15 mg/mL 20 mg/mL 25 mg/mL



(4 jours, 22 °C)

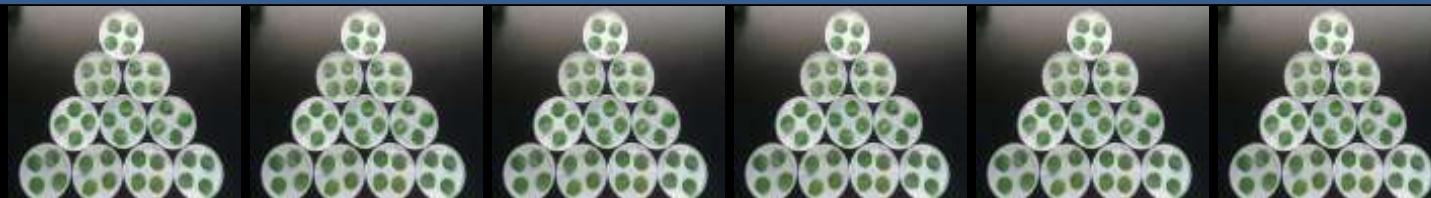


Absence (-) ou présence (+) de symptômes de phytotoxicité





Détermination de la dose phytotoxique 5% (DP5)

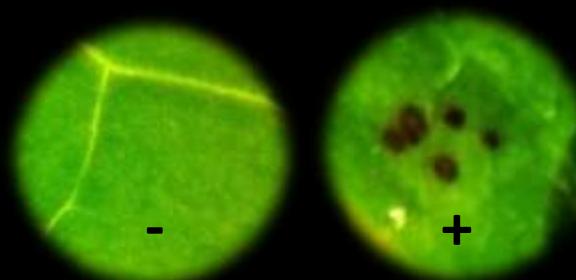


0 mg/mL 5 mg/mL 10 mg/mL 15 mg/mL 20 mg/mL 25 mg/mL



25 µL

(4 jours, 22 °C)



$DP5 = 1,6 \text{ mg/mL}$

Absence (-) ou présence (+) de symptômes de phytotoxicité

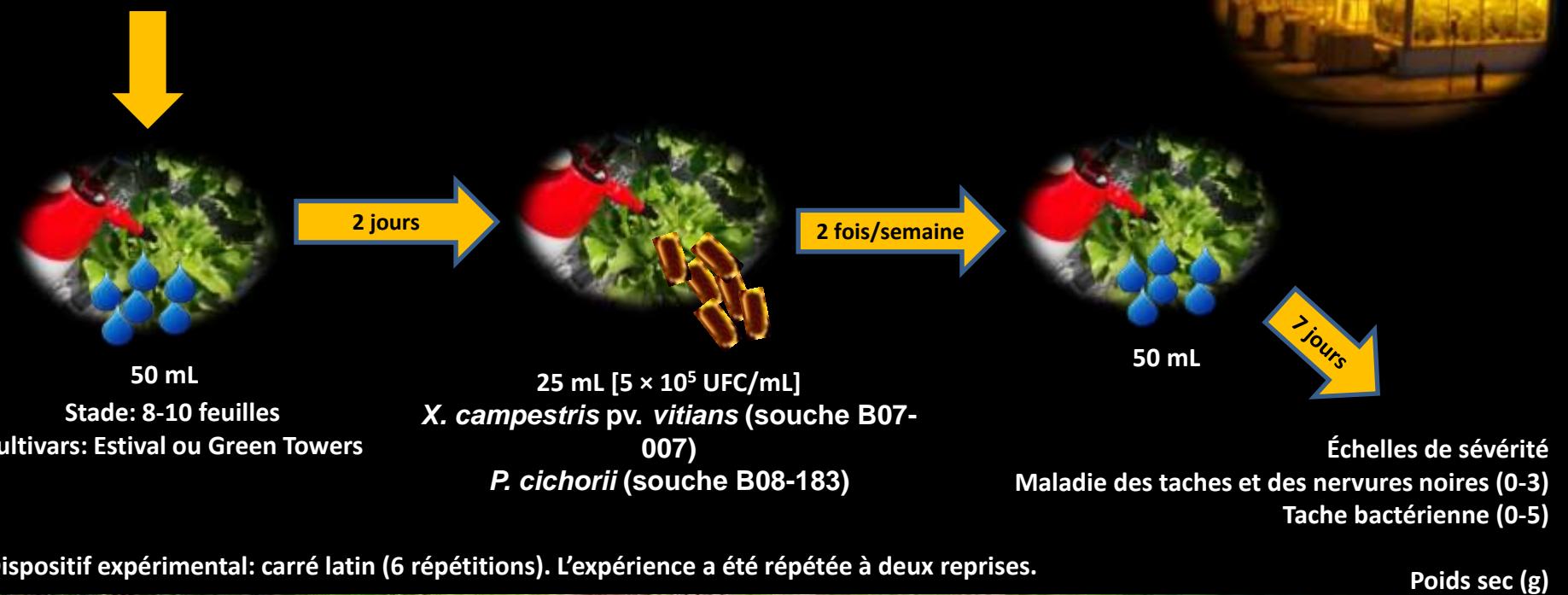


Méthodologie



Effet de l'extrait de feuilles d'érable à sucre sur le développement de la tache bactérienne et de la maladie des taches et des nervures noires

Extrait (0,8; 1,6; 3,2 g/L)
Sels de l'acide phosphoreux
Acide citrique/Acide lactique
Témoin (eau)

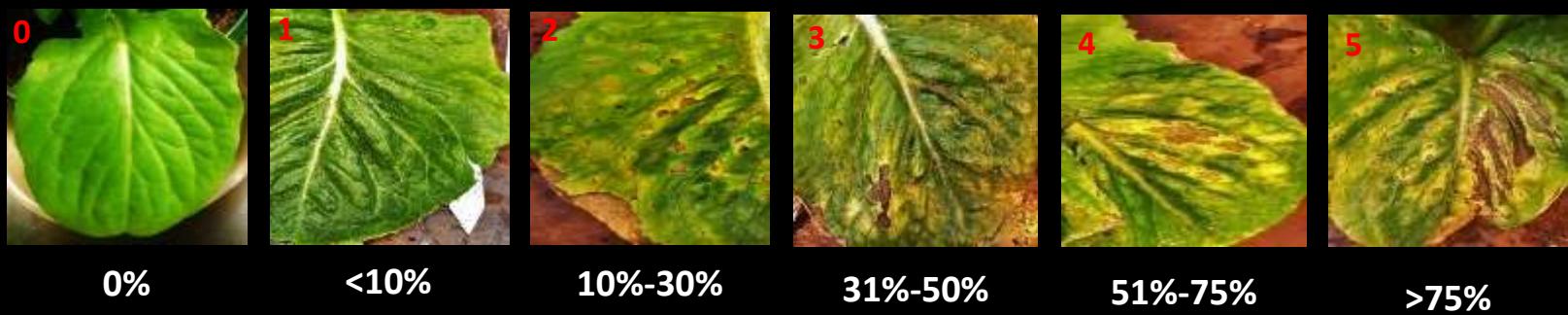




Échelles de sévérité



Maladie des taches et des nervures noires (0-3)

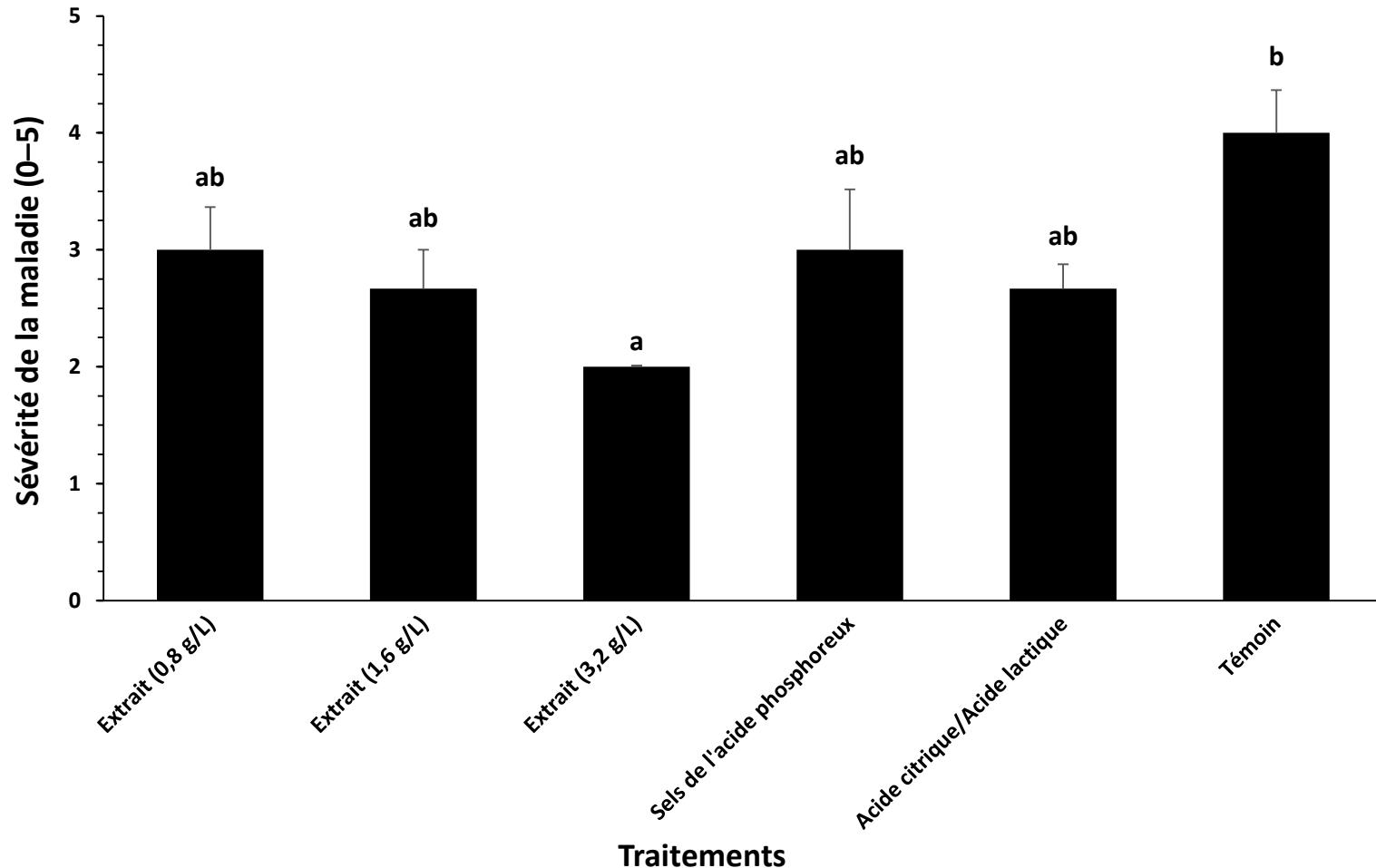
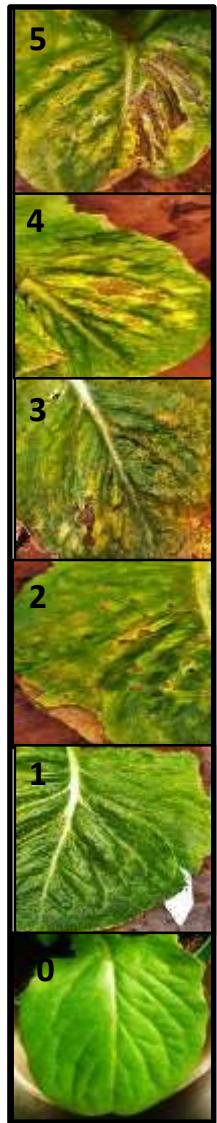


Tache bactérienne (0-5)





Effet de l'extrait de feuilles d'érable à sucre sur la sévérité de la tache bactérienne (exp. 1)

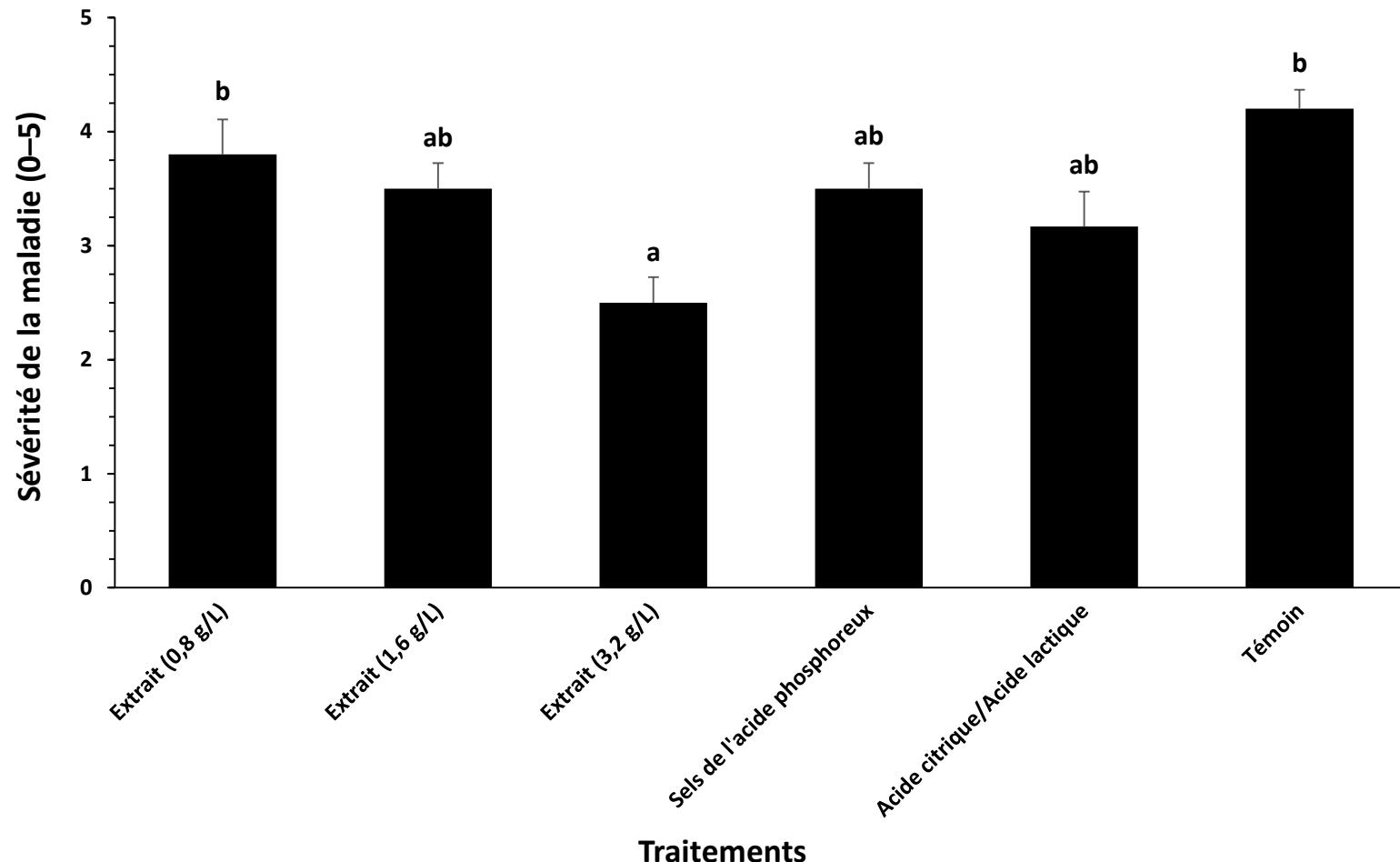


Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions \pm l'erreur standard.
Les moyennes surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Tukey; $P \leq 0,05$).





Effet de l'extrait de feuilles d'érable à sucre sur la sévérité de la tache bactérienne (exp. 2)



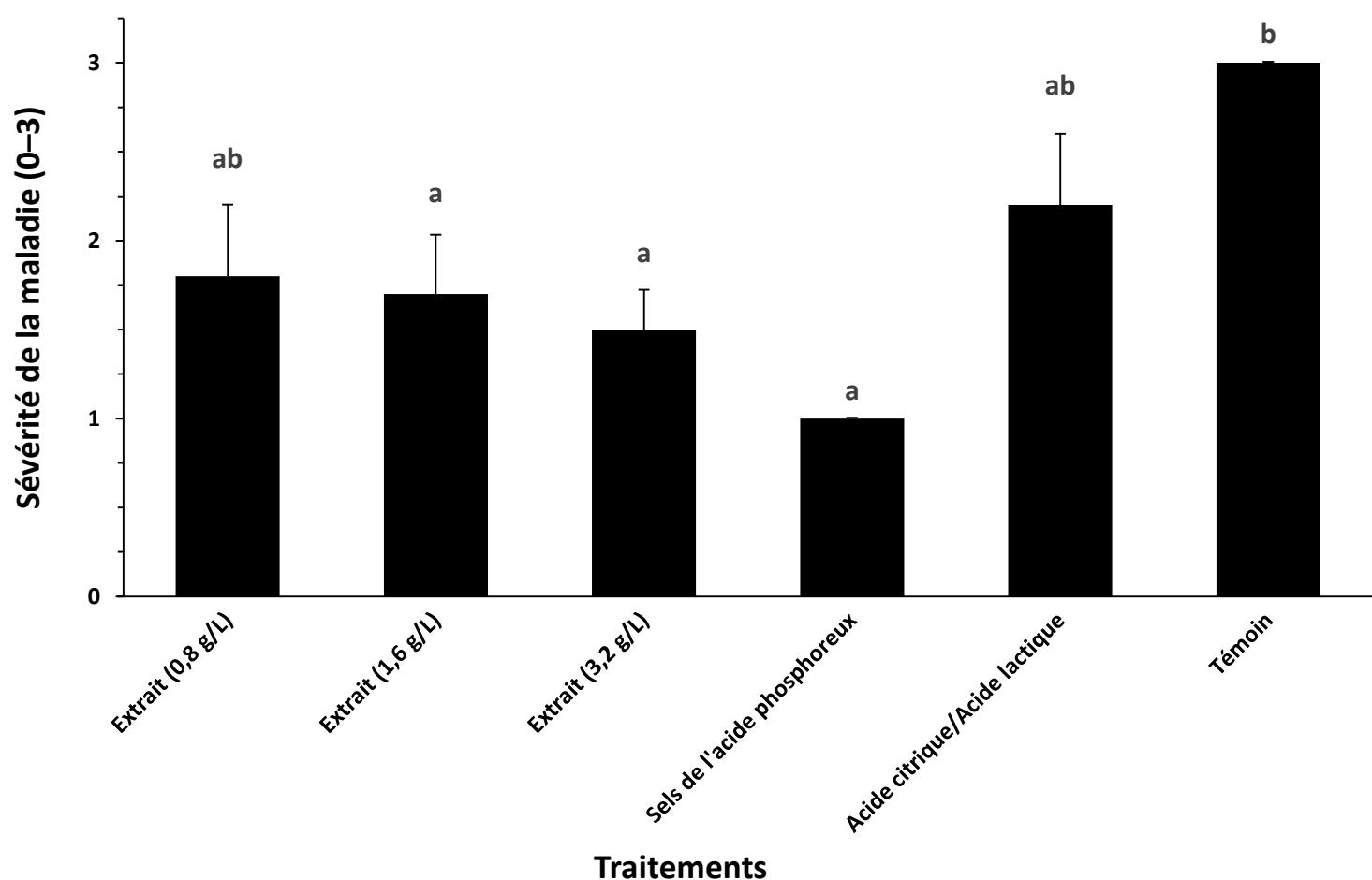
Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions \pm l'erreur standard.

Les moyennes surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Tukey; $P \leq 0,05$).



Résultats

Effet de l'extrait de feuilles d'érable à sucre sur la sévérité de la maladie des taches et des nervures noires (exp. 1)



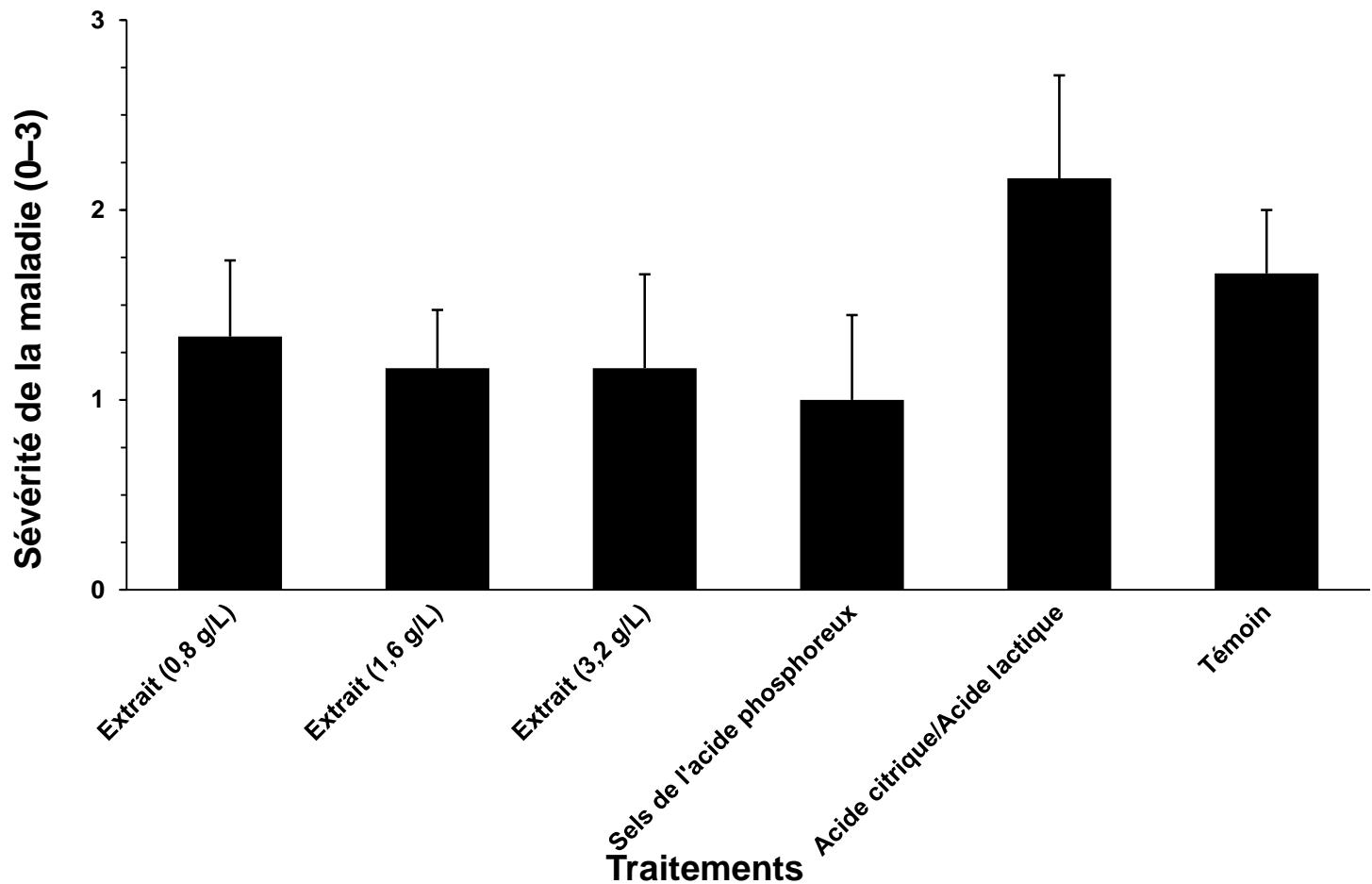
Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions \pm l'erreur standard.

Les moyennes surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Tukey; $P \leq 0,05$).



Résultats

Effet de l'extrait de feuilles d'érable à sucre sur la sévérité de la maladie des taches et des nervures noires (exp. 2)



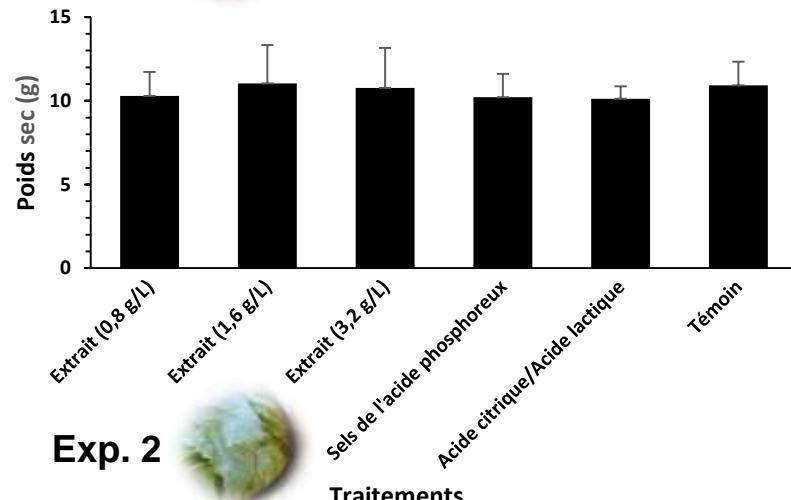
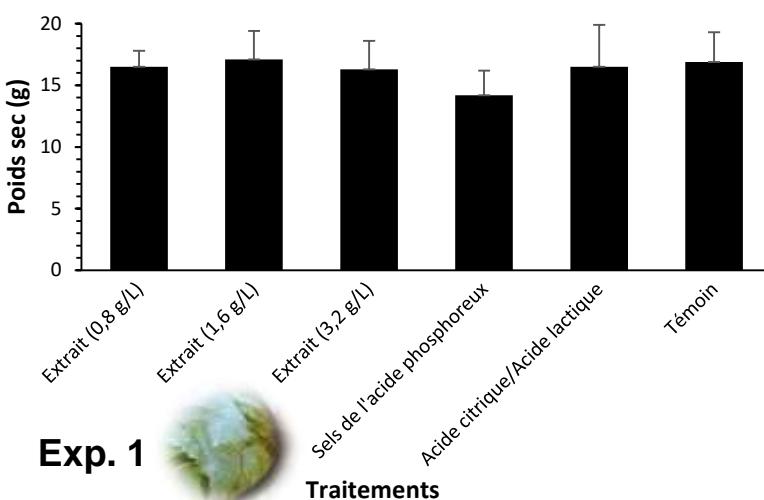
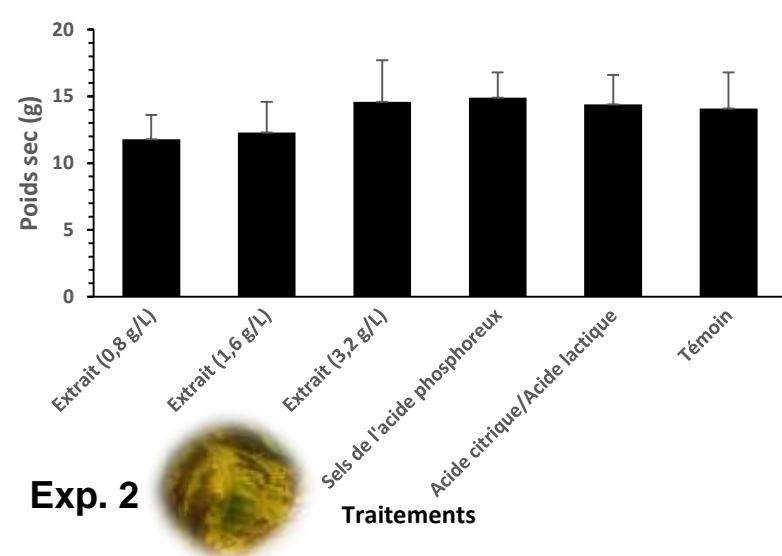
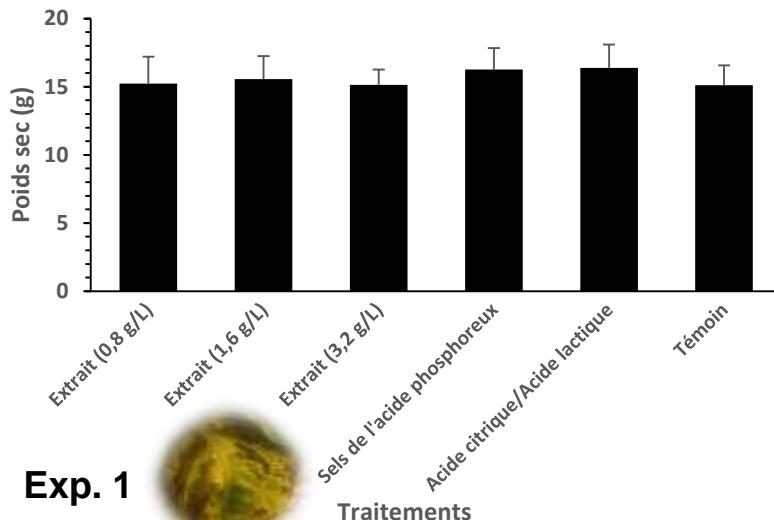
Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions \pm l'erreur standard.

Les moyennes ne sont pas significativement différentes ($P \leq 0,05$).



Résultats

Effet des traitements sur le poids sec des plants de laitue



Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions \pm l'erreur standard. Les moyennes ne sont pas significativement différentes ($P \leq 0,05$).

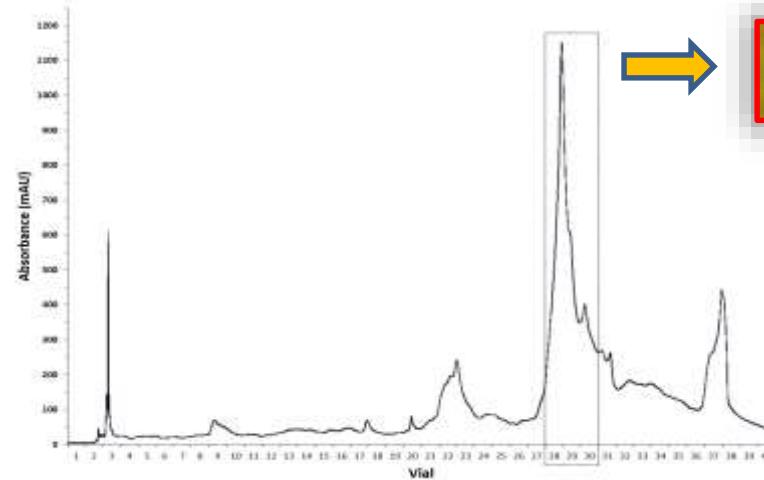




Fractionnement de l'extrait de feuilles d'érable à sucre et évaluation de l'activité antibactérienne



25 µL (5 mg/mL)



HPLC

Colonne: SB-C18

Phase mobile: eau/acétonitrile





Fractionnement de l'extrait de feuilles d'érable à sucre et évaluation de l'activité antibactérienne



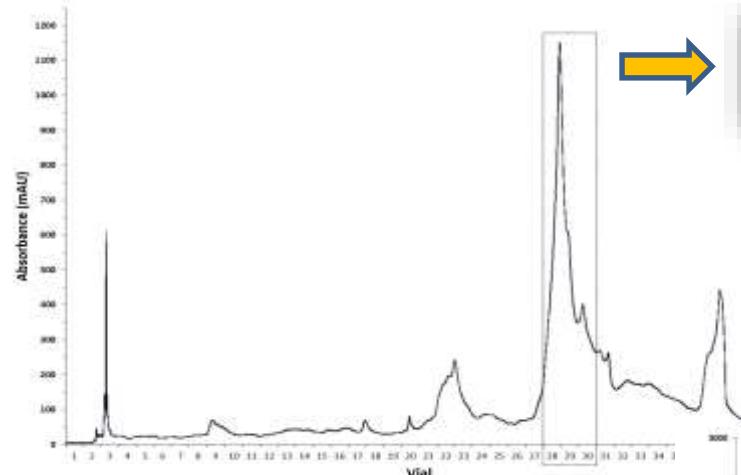
25 µL (5 mg/mL)



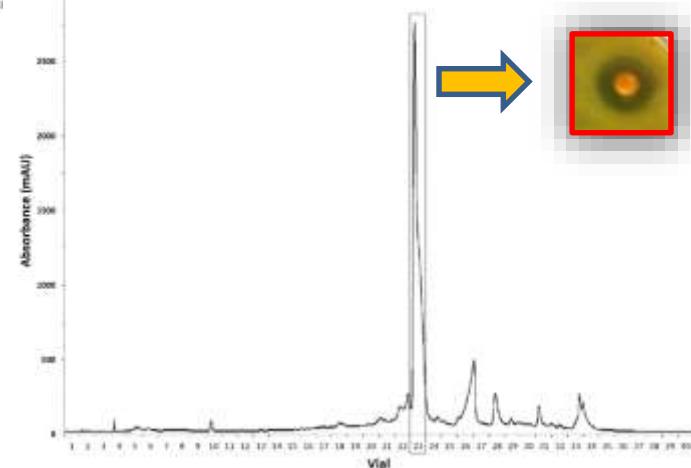
HPLC

Colonne: SB-C18

Phase mobile: eau/acétonitrile

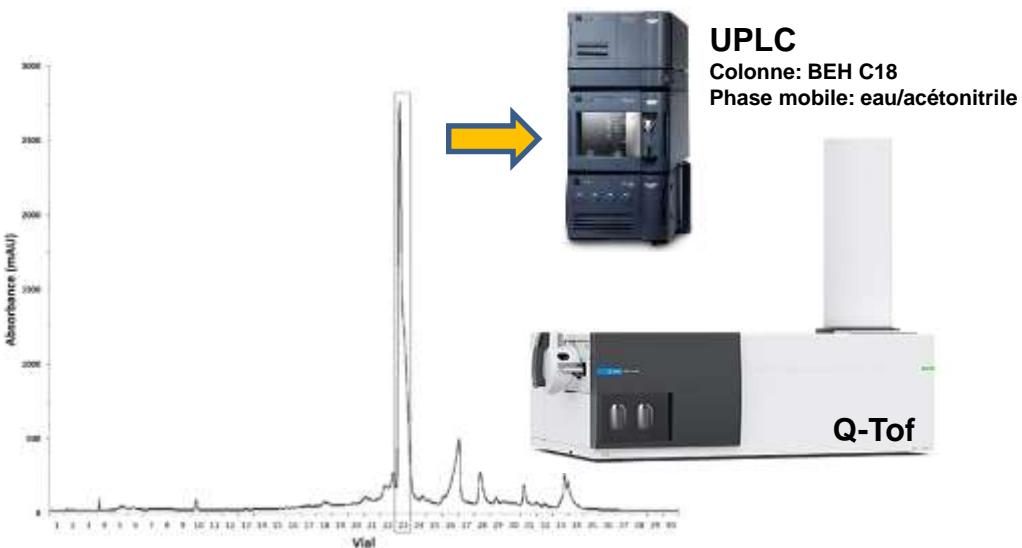


HPLC



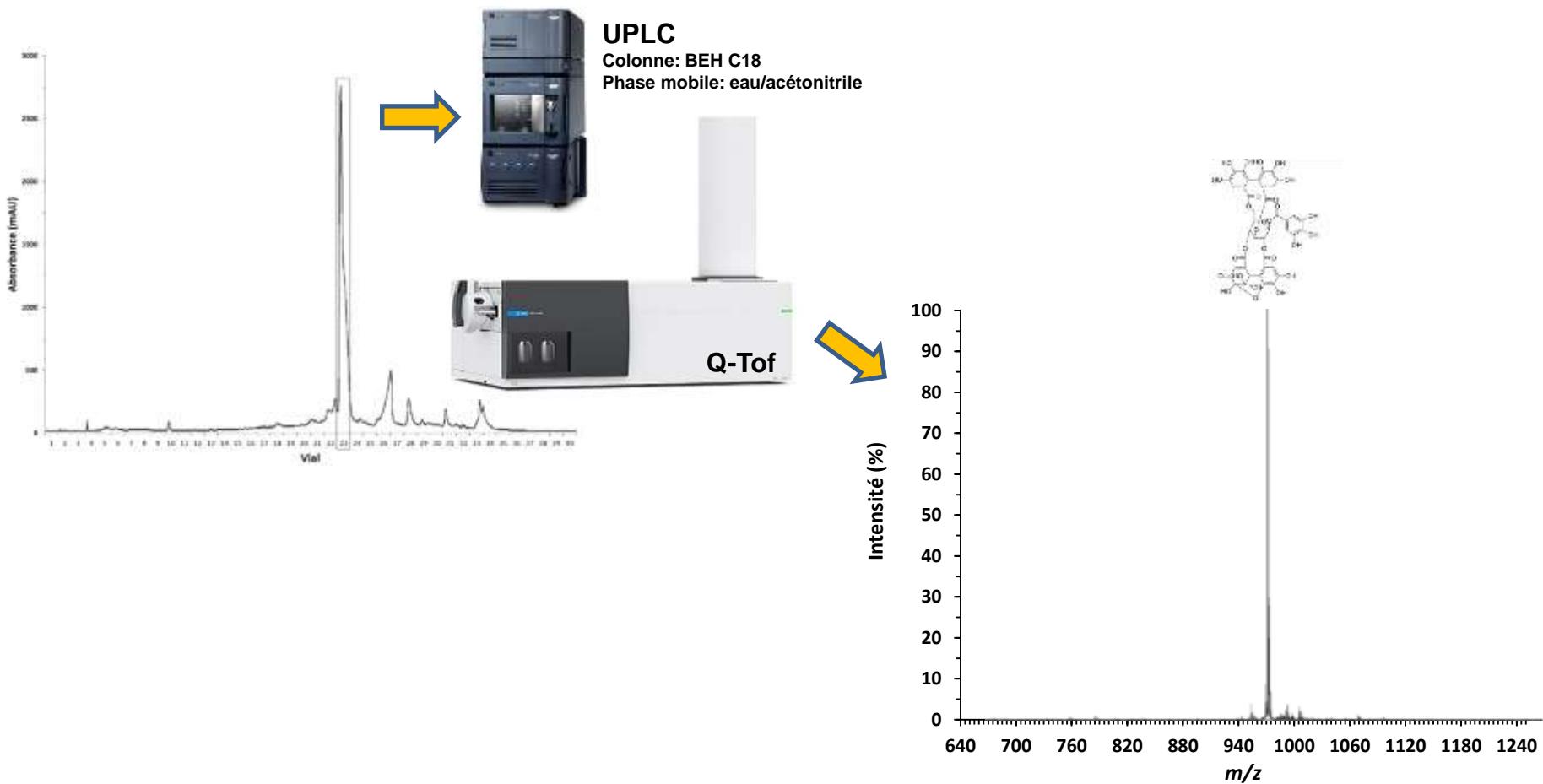


Identification du composé antibactérien





Identification du composé antibactérien

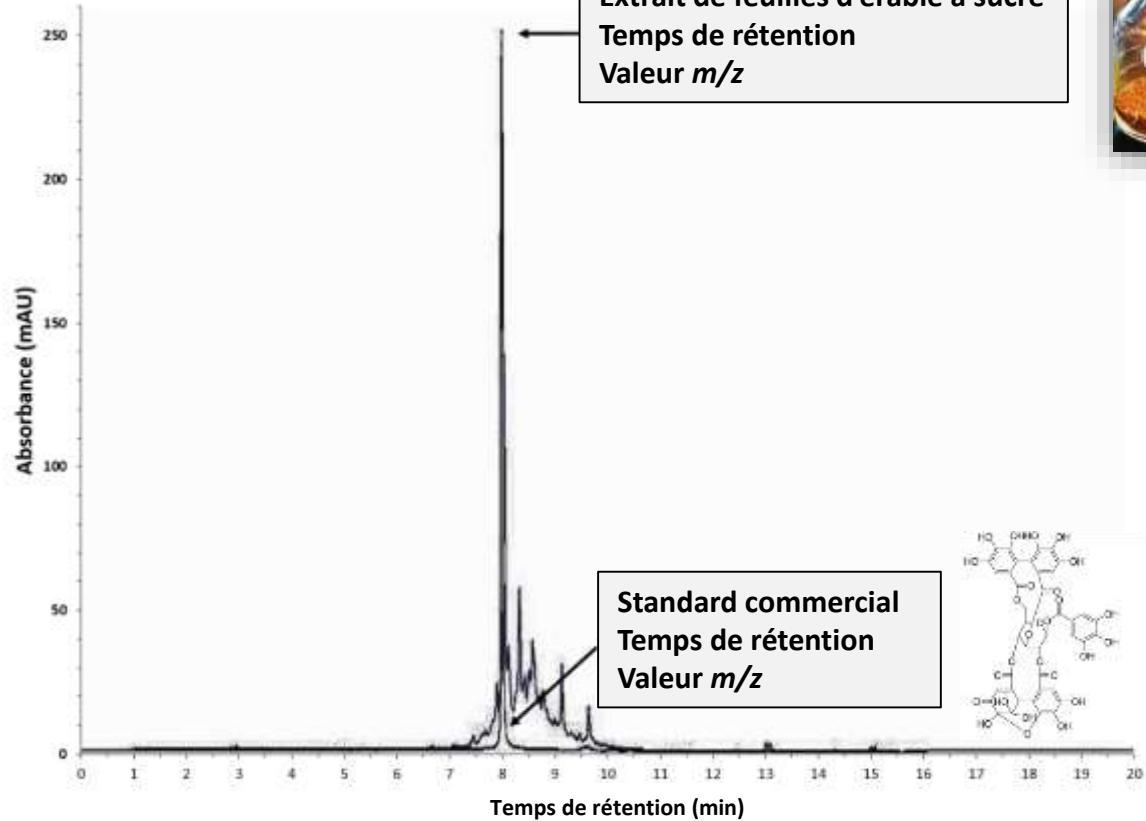




Confirmation de l'identité du composé antibactérien



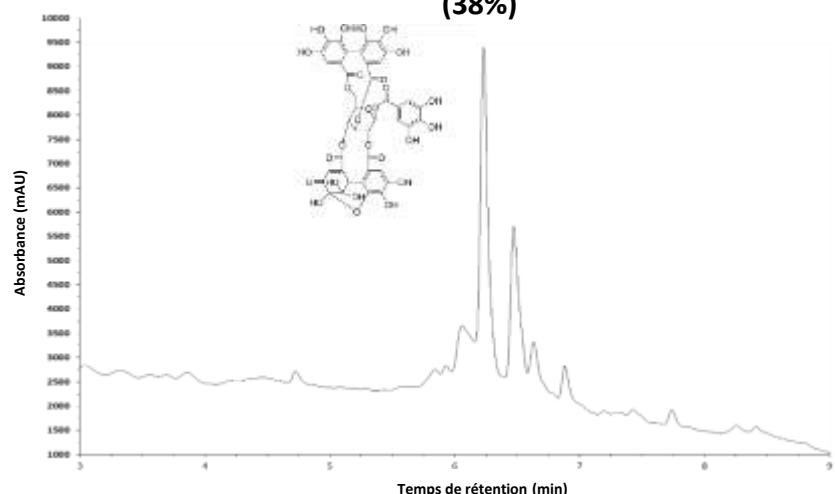
UPLC-UV-QDa



Purification



UPLC-UV-QDa



Colonne chromatographique

Gel de silice C18

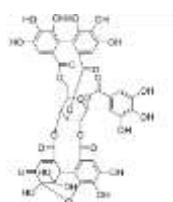
Éluants: eau/acétonitrile



Purification



(14%)



UPLC-UV-QDa

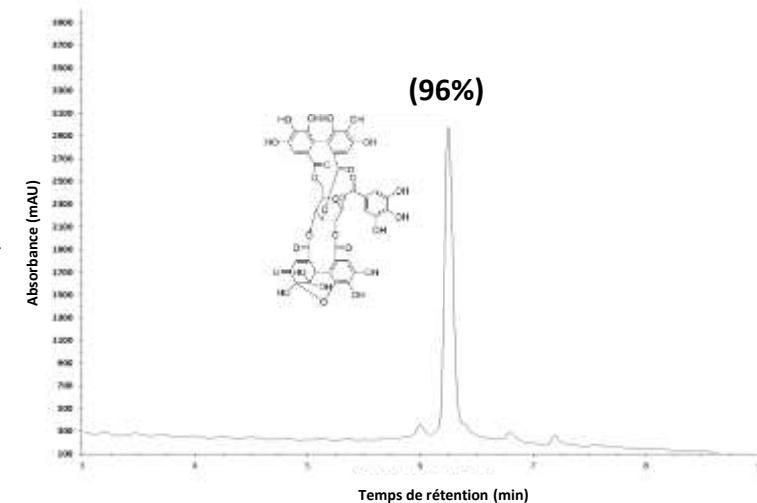
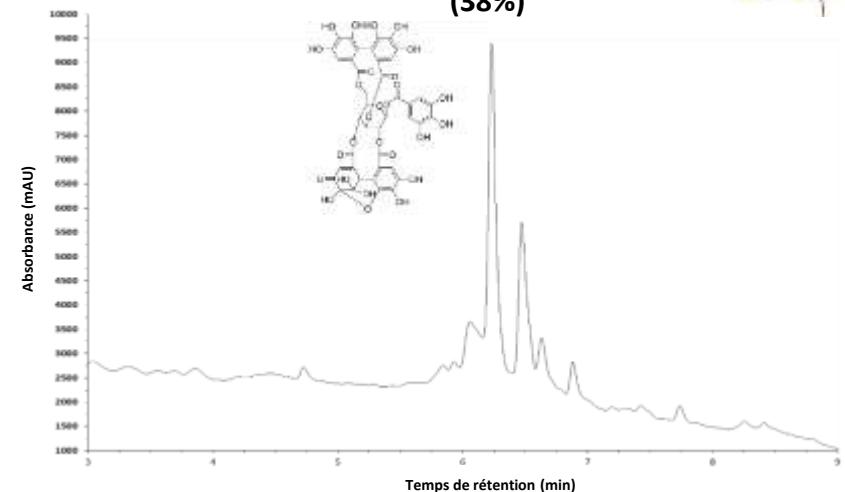
Colonne chromatographique



HPLC préparative

Colonne: MS C18

Phase mobile: eau/acetonitrile



Discussion

Extrait de feuilles d'érable à sucre

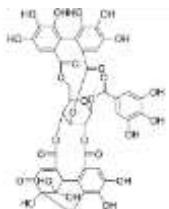
- Activité antibactérienne *in vitro* intéressante
- Répression des maladies bactériennes sans causer de symptômes de phytotoxicité

-Responsable de l'activité antibactérienne

-Responsable de l'effet répressif sur le développement des maladies
...Stimulation des défenses naturelles de la plante?

-Identifiée pour la première fois dans la litière de feuilles d'érable à sucre

-Reconnue pour ses propriétés bioactives bénéfiques
(antioxydant, anticancer, antidiabète)



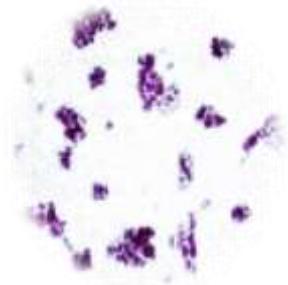
Nephelium lappaceum

Geranium thunbergii

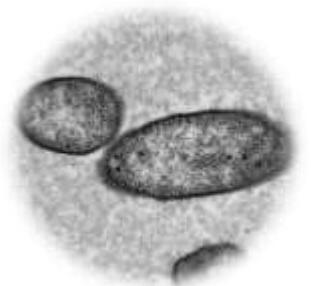


Travaux futurs

-Détermination du spectre antimicrobien



-Effet sur l'ultrastructure des bactéries



-Effet sur les défenses naturelles de la plante

-Développement d'une formulation de l'extrait de feuilles



-Analyse technico-économique



Remerciements

Merci à M^{me} Vicky Toussaint pour ses précieux conseils
et pour avoir gracieusement fourni les souches bactériennes



Agriculture and
Agri-Food Canada



Merci de votre attention!

Questions?

