

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

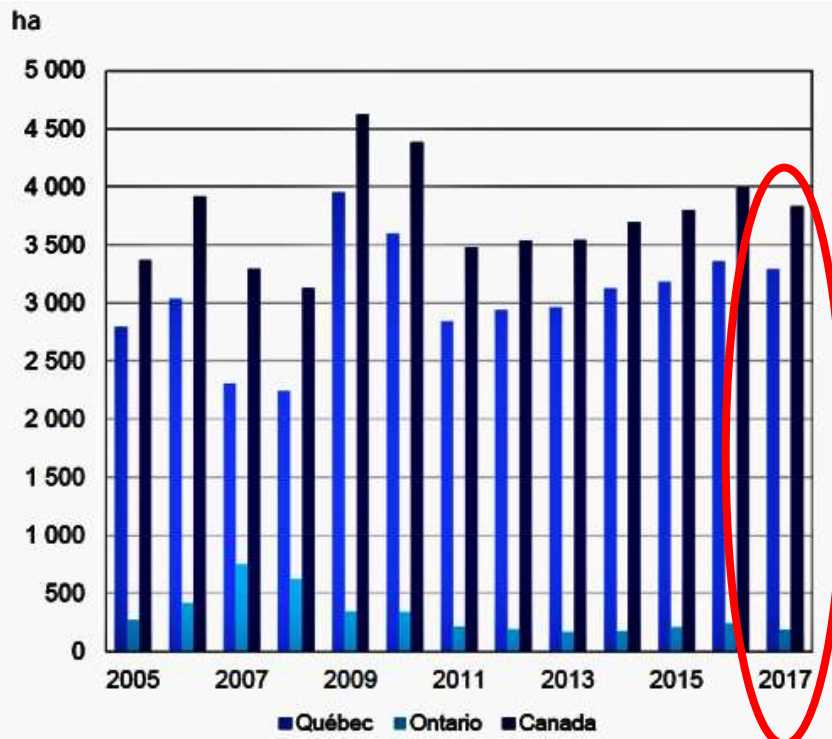


Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation
Département de phytologie



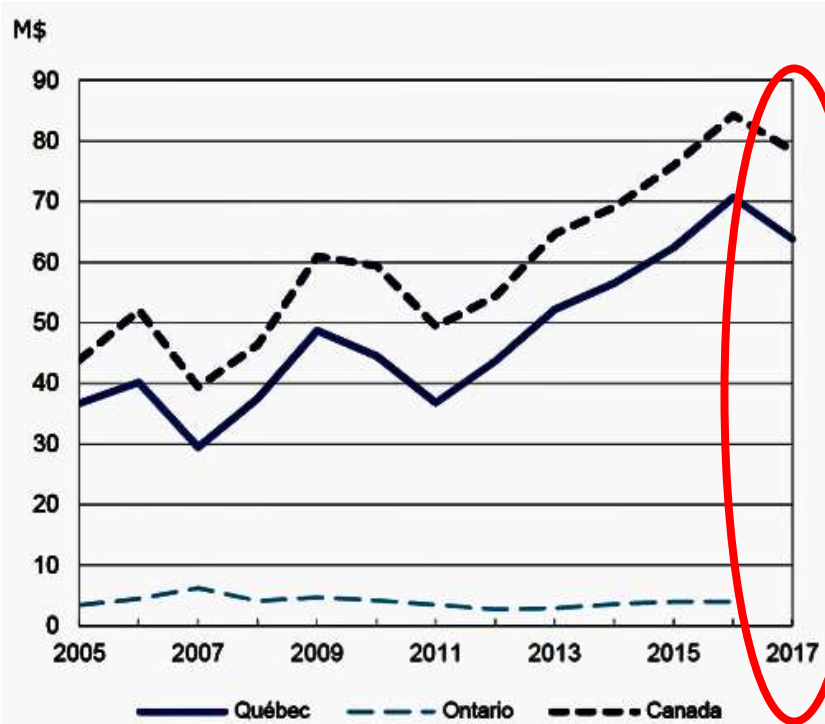
Quelques statistiques!

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



85,8%

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



81,4%



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



Maladies bactériennes de la laitue



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



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



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



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



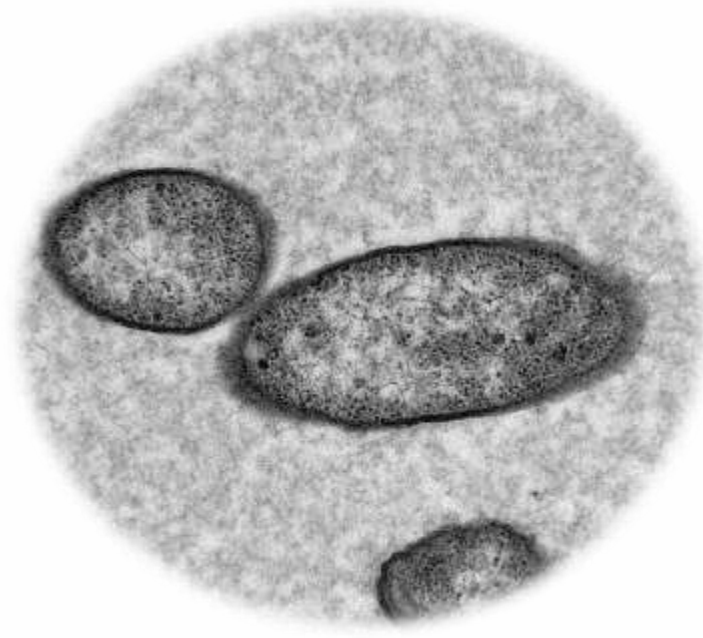
Les bactéries à l'étude

Xanthomonas campestris pv. *vitians*

Bâtonnet
Gram négatif (-)
Flagelle polaire



EPS (xanthane)
Pigment jaune (xanthomonadine)



Pseudomonas cichorii

Bâtonnet
Gram négatif (-)
Flagelle polaire



EPS (alginate)
Pigment vert (pyoverdine)



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.

Organo-sulfurés

Allicine



Glucosinolates

Isothiocyanates



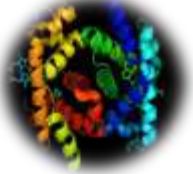
Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Anthraquinones



Protéines

Protéines PR
Hydrolases
Chitinases
Glucanases



Terpènes

Résines (canaux résinifères)
Saponines
Caroténoïdes
Xanthophylles



Composés phénoliques

Phénols simples
Acides phénoliques
Lactones
Stilbénoides
Flavonoïdes
Anthocyanes
Lignines
Tanins



Utilisation des végétaux à des fins phytosanitaires

Maladie(s)		Extrait végétal/Résidus de culture
Pourridié noir des racines du fraisier (<i>Rhizoctonia</i> spp.)		Résidus de culture de moutarde chinoise (Glucosinolates) 
Pomme de terre: Pourriture sèche (<i>Fusarium</i> spp.) Rhizoctonie (<i>Rhizoctonia solani</i>) Gale commune (<i>Streptomyces scabiei</i>)		Extrait de quinoa (Saponines) 
Blanc de la tomate (<i>Oïdium neolycopersici</i>)		Extrait à base d'ail (Allicine) 
Blanc de la tomate (<i>Leveillula taurica</i>) Blanc du concombre (<i>Sphaerotheca fuliginea</i>)		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)



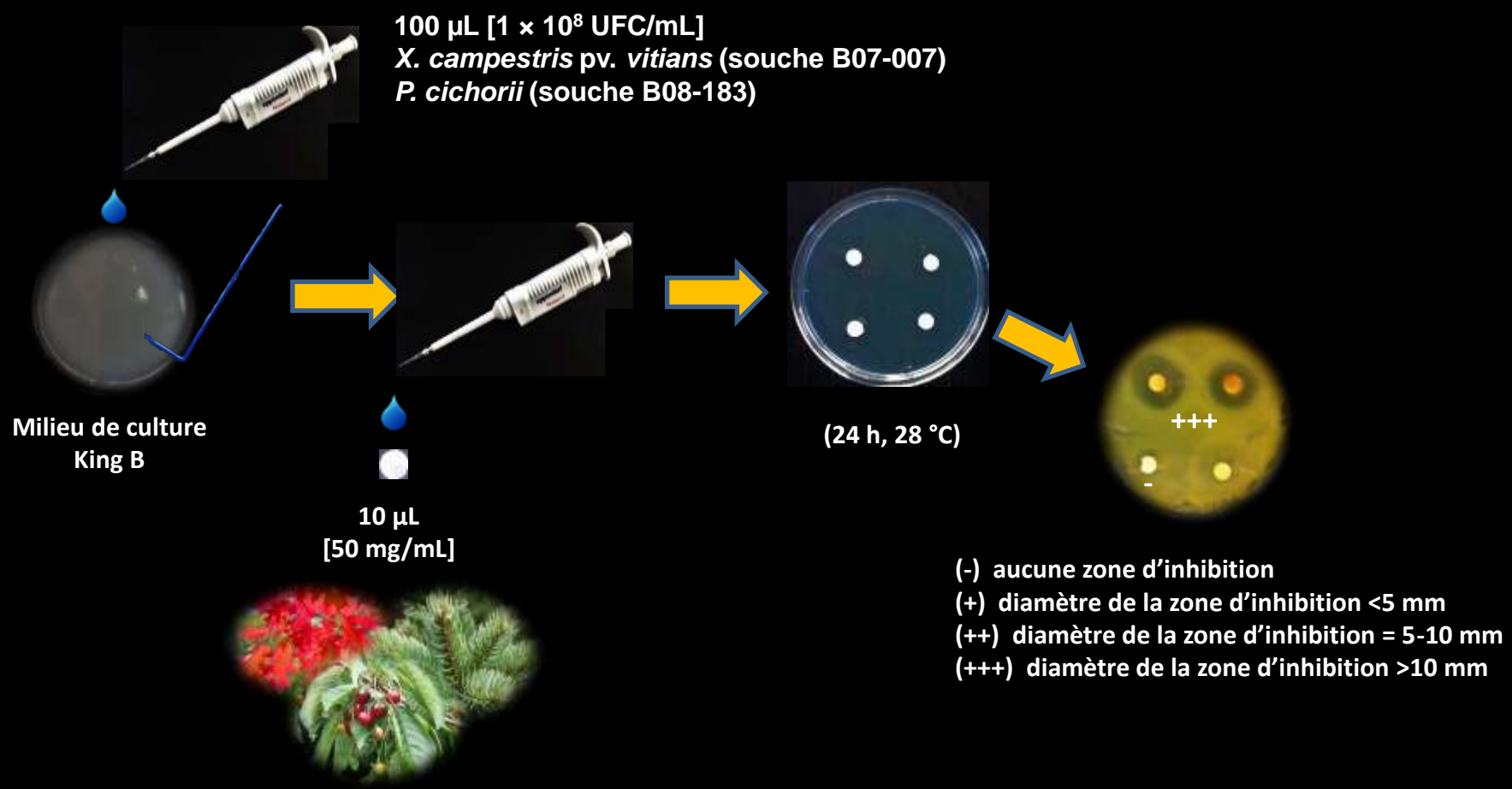
Évaporation des solvants
(évaporateur rotatif)



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>vitiensis</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.	Ecorce	Mélèze 1	-, -, -	-, -, -
Mélèze laricin		Mélèze 2	-, -, -	-, -, -
<i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch	Branches	Épinette 1	-, -, -	-, -, -
Épinette blanche		Épinette 2	-, -, -	-, -, -
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	Aiguilles	Épinette 3	-, -, -	-, -, -
Épinette noire	Ecorce	Épinette 4	-, -, -	-, -, -
<i>Picea mariana</i> (Miller) Britton, Sterns		Épinette 5	-, -, -	-, -, -
		Épinette 6	-, -, -	-, -, -
		Épinette 7	-, -, -	-, -, -
Pin gris	Ecorce	Pin g. 1	-, -, -	-, -, -
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.	Ecorce	Pin b. 1	-, -, -	-, -, -
Pin blanc				
<i>Pinus strobus</i> L.	Ecorce	Peuplier 1	-, -, -	-, -, -
Peuplier faux-tremble				
<i>Populus tremuloides</i> Michx.	Ecorce	Merisier 1	-, -, -	-, -, -
Merisier				
<i>Prunus avium</i> (L.) L.	Ecorce	Chêne 1	++, ++, ++	++, ++, ++
Chêne rouge				
<i>Quercus rubra</i> L.				

^a Les 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} Réplicats 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>vitiensis</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.	Écorce	Mélèze 1	- , - , -	- , - , -
Mélèze laricin		Mélèze 2	- , - , -	- , - , -
<i>Larix laricina</i> (Du Roi) K. Koch	Branches	Épinette 1	- , - , -	- , - , -
Épinette blanche		Épinette 2	- , - , -	- , - , -
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss		Épinette 3	- , - , -	- , - , -
Épinette noire		Épinette 4	- , - , -	- , - , -
<i>Picea mariana</i> (Miller) Britton, Sterns		Épinette 5	- , - , -	- , - , -
		Épinette 6	- , - , -	- , - , -
		Épinette 7	- , - , -	- , - , -
Pin gris	Ecorce	Pin g. 1	- , - , -	- , - , -
<i>Pinus banksiana</i> Lamb.	Écorce	Pin b. 1	- , - , -	- , - , -
Pin blanc		Peuplier 1	- , - , -	- , - , -
<i>Pinus strobus</i> L.	Écorce	Merisier 1	- , - , -	- , - , -
Peuplier faux-tremble		Chêne 1	++ , ++ , ++	++ , ++ , ++
<i>Populus tremuloides</i> Michx.	Écorce	Chêne 1	++ , ++ , ++	++ , ++ , ++
Merisier		Chêne 1	++ , ++ , ++	++ , ++ , ++
<i>Prunus avium</i> (L.) L.	Écorce	Chêne 1	++ , ++ , ++	++ , ++ , ++
Chêne rouge		Chêne 1	++ , ++ , ++	++ , ++ , ++
<i>Quercus rubra</i> L.	Écorce	Chêne 1	++ , ++ , ++	++ , ++ , ++
		Chêne 1	++ , ++ , ++	++ , ++ , ++

^a Les 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} 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

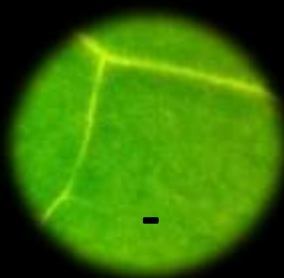
25 mg/mL



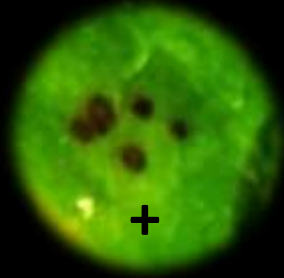
25 μ L



(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

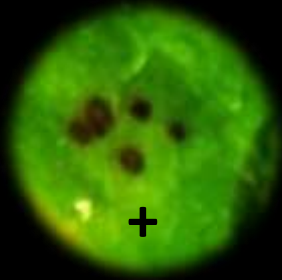
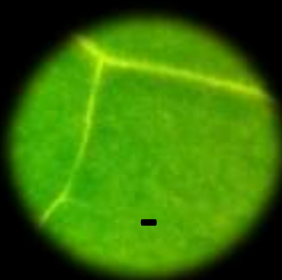
25 mg/mL



25 μ L



(4 jours, 22 °C)



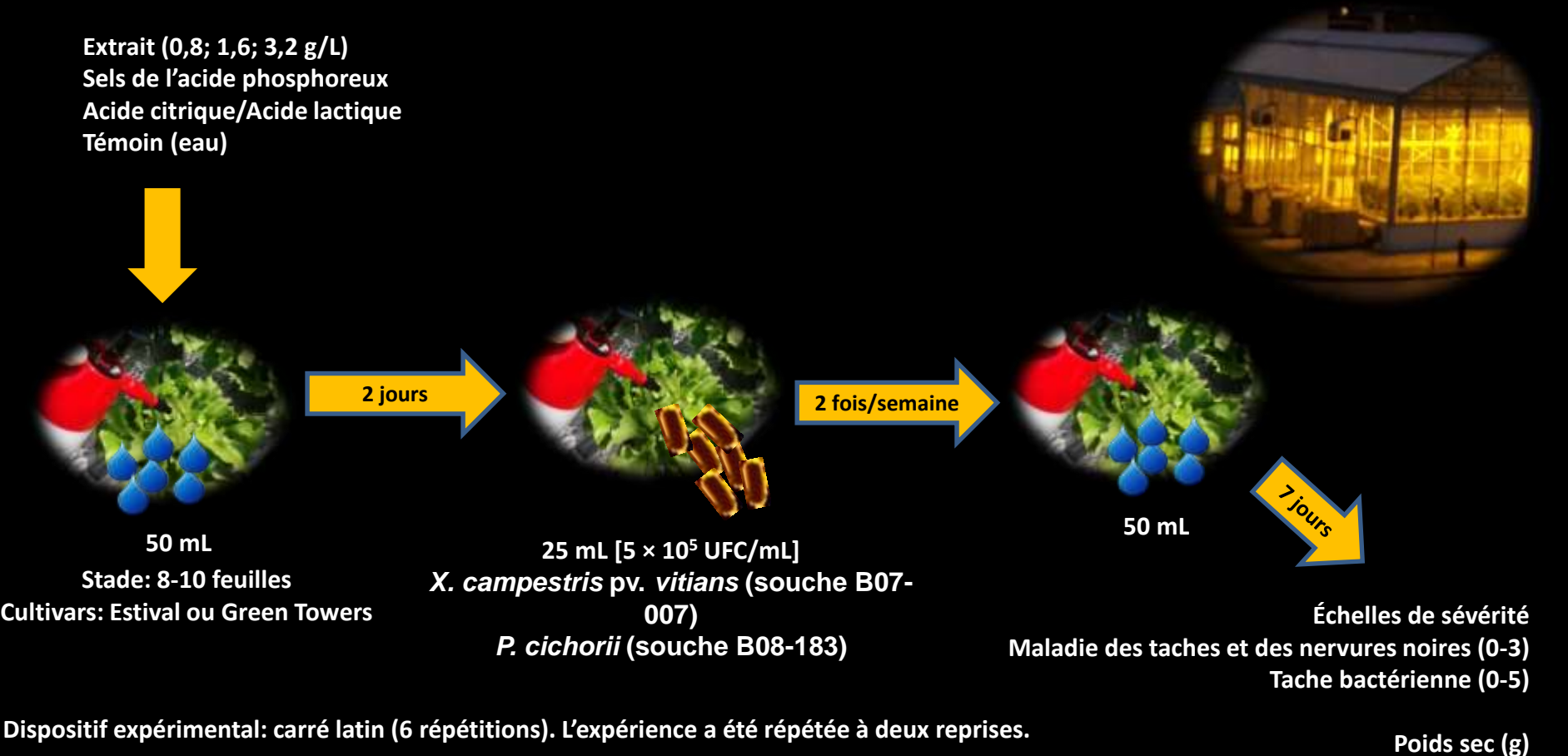
DP5 = 1,6 mg/mL

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





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

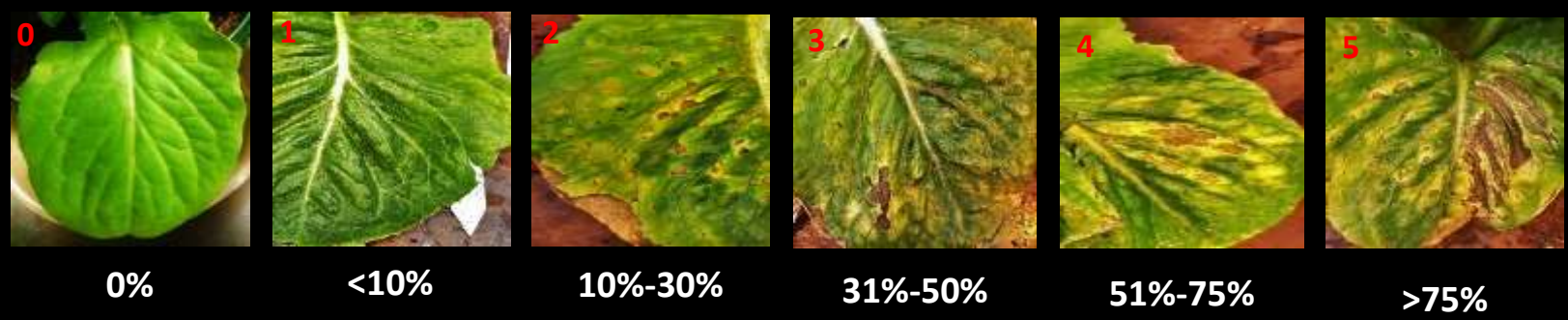




Échelles de sévérité



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

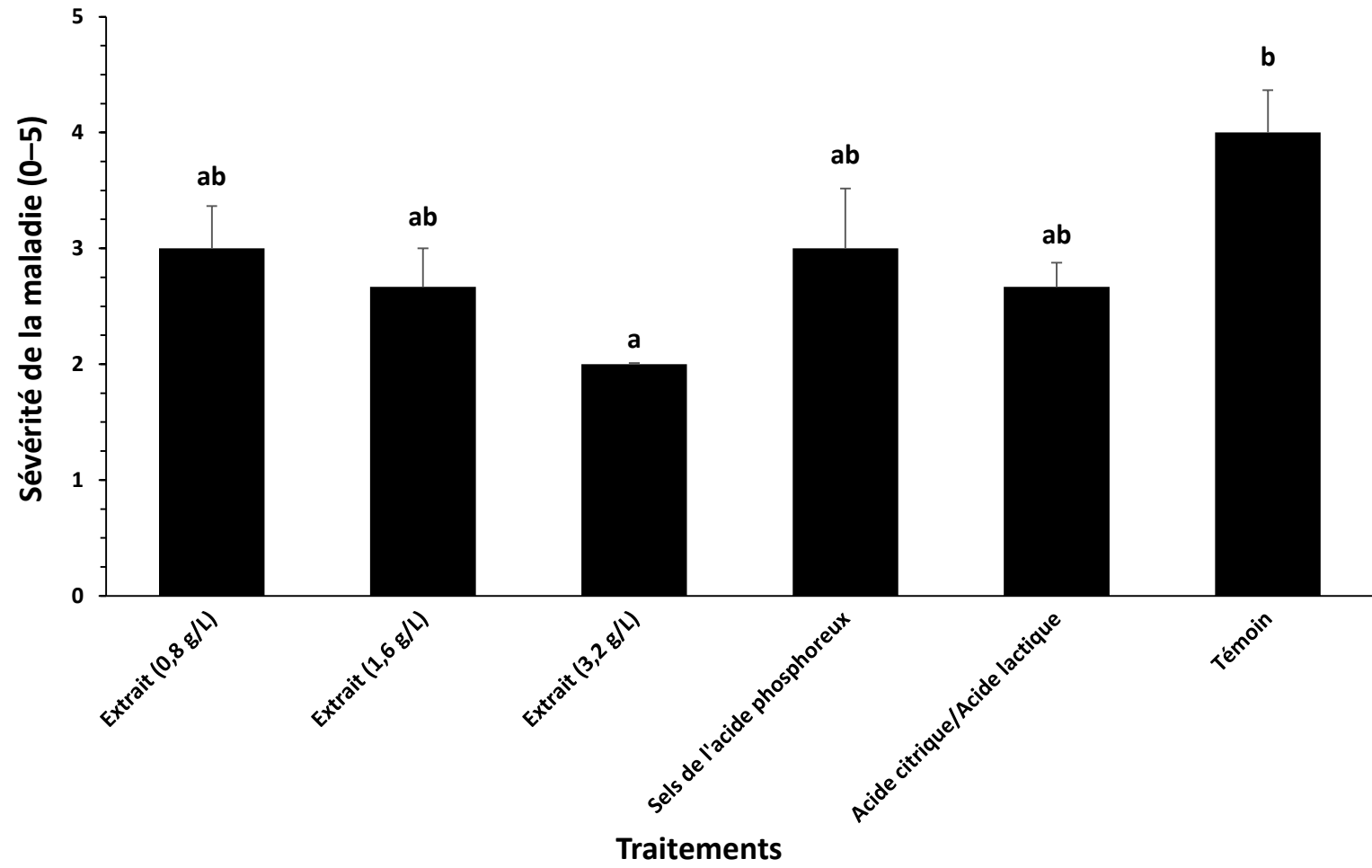
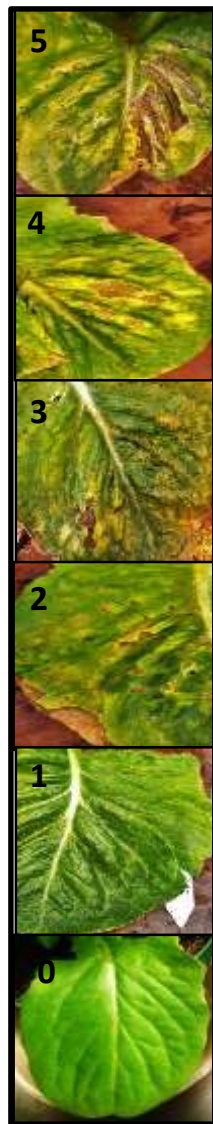


Tache bactérienne (0-5)





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

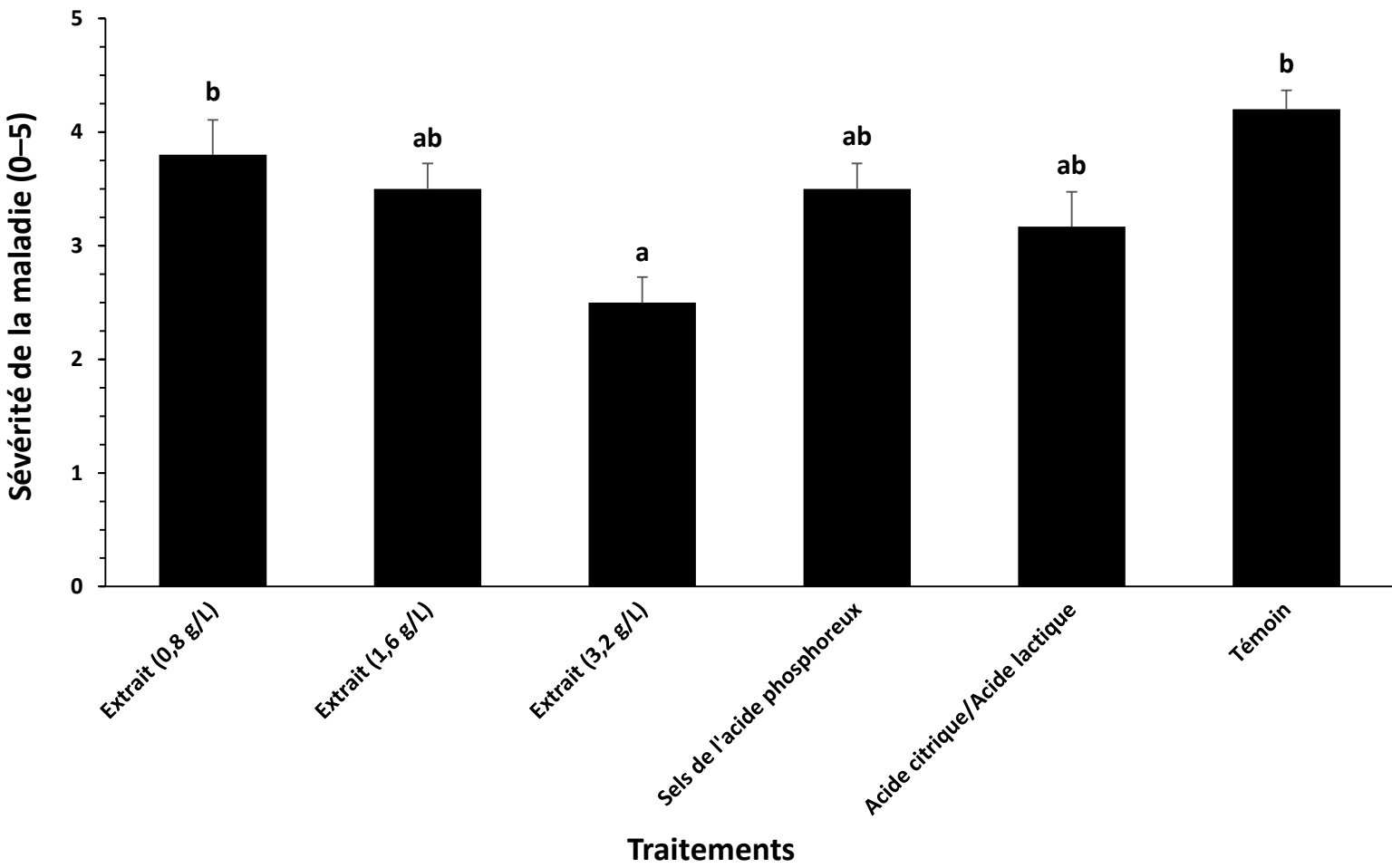


Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions \pm l'erreur standard.
Les moyennes surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Tukey; $P \leq 0,05$).





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

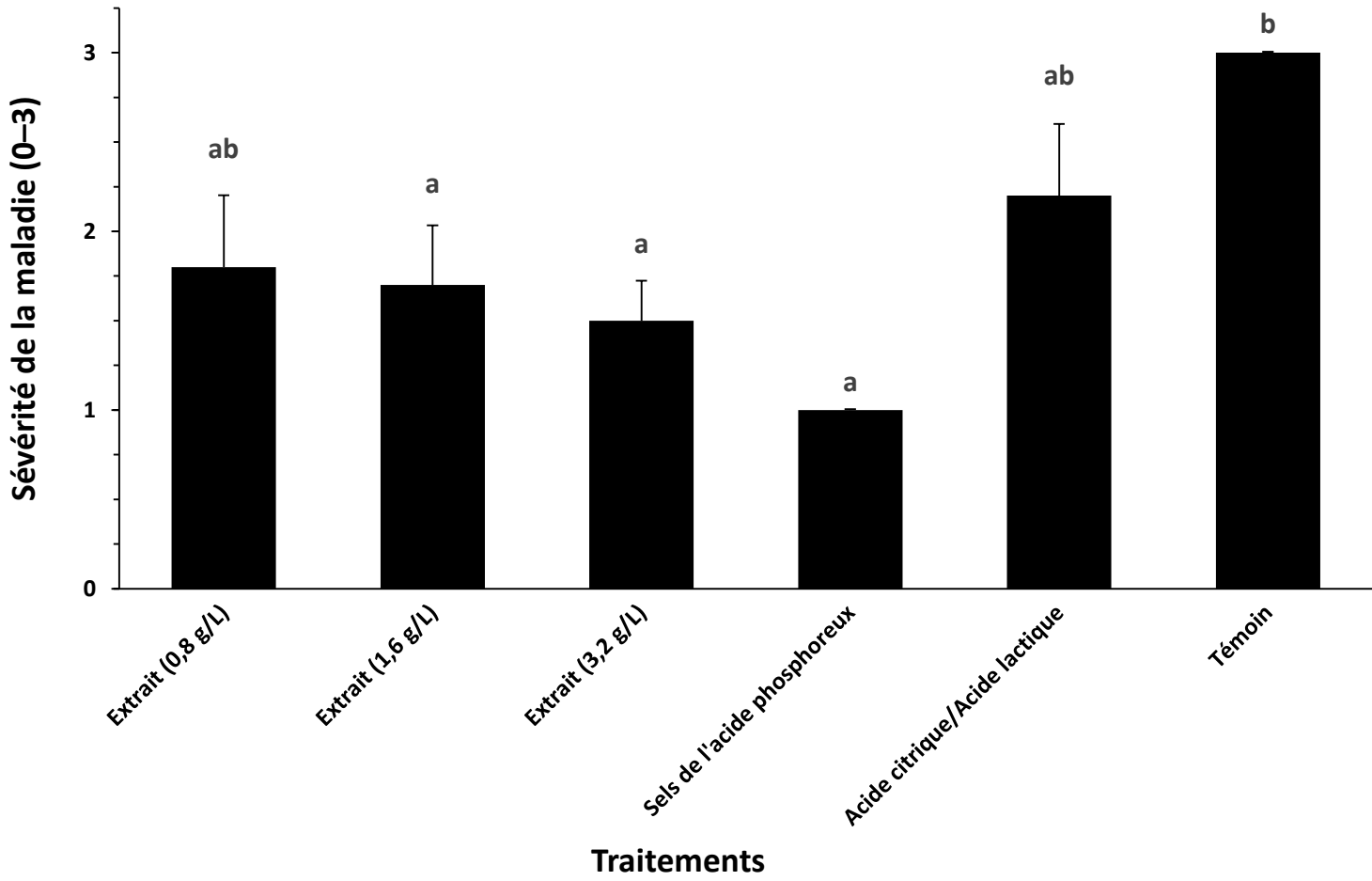


Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions \pm l'erreur standard.
Les moyennes surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Tukey; $P \leq 0,05$).





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

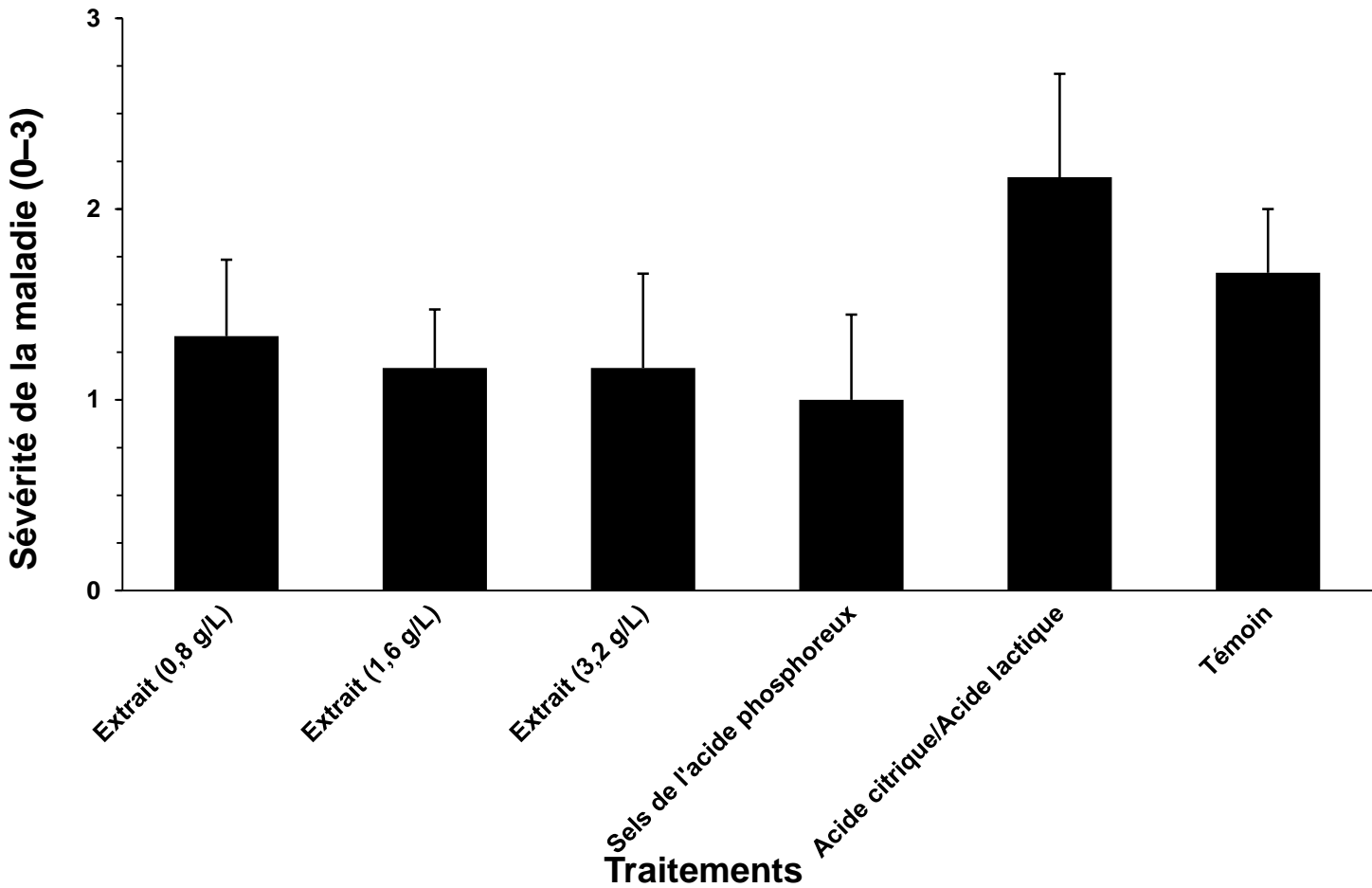


Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions \pm l'erreur standard.
Les moyennes surmontées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (Test de Tukey; $P \leq 0,05$).





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

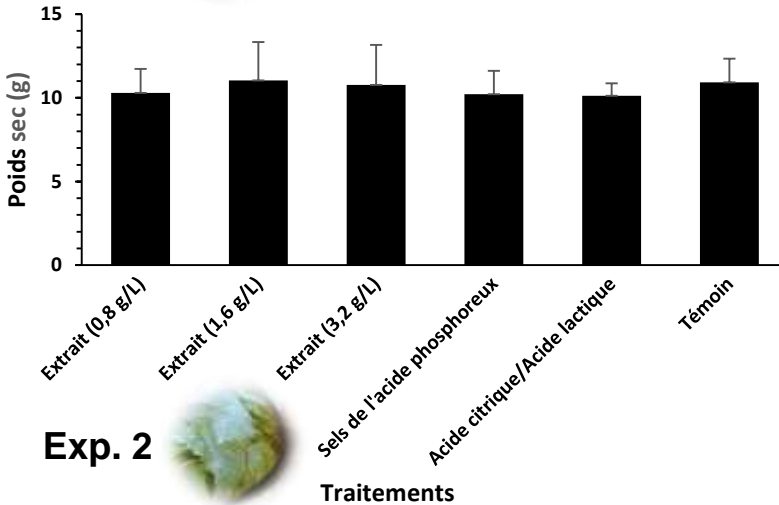
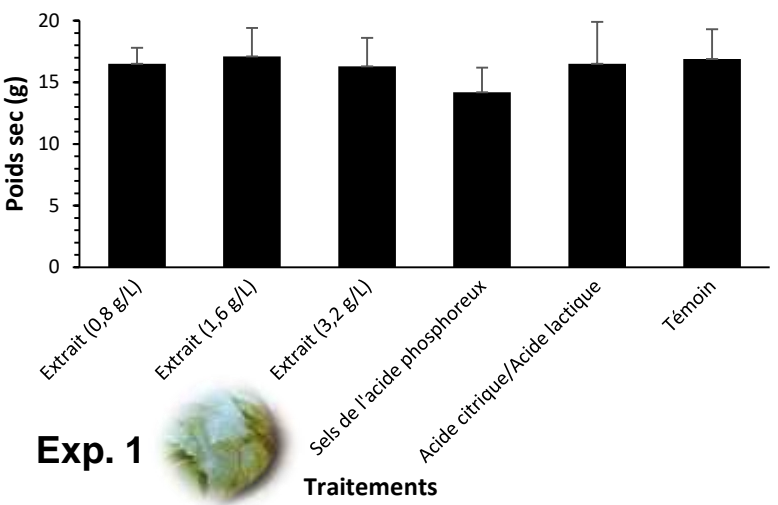
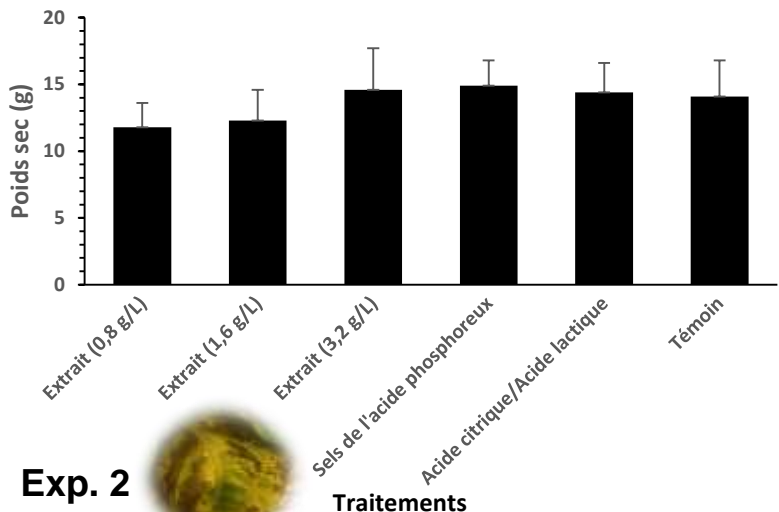
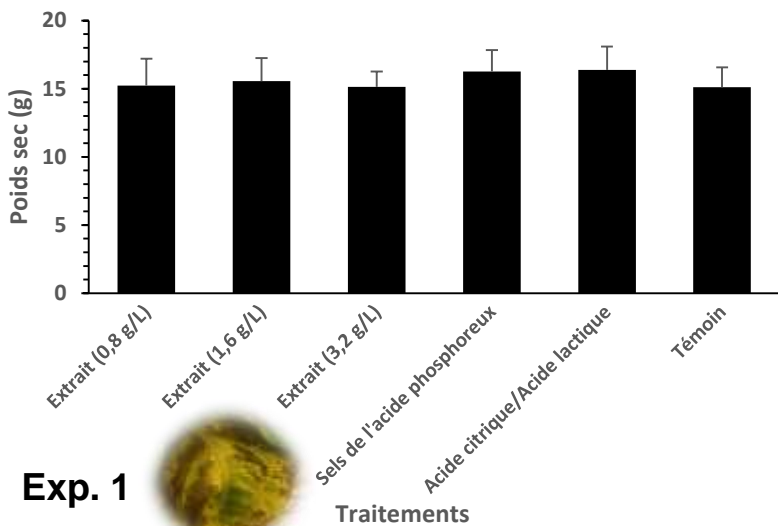


Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions \pm l'erreur standard.
Les moyennes ne sont pas significativement différentes ($P \leq 0,05$).





Effet des traitements sur le poids sec des plants de laitue

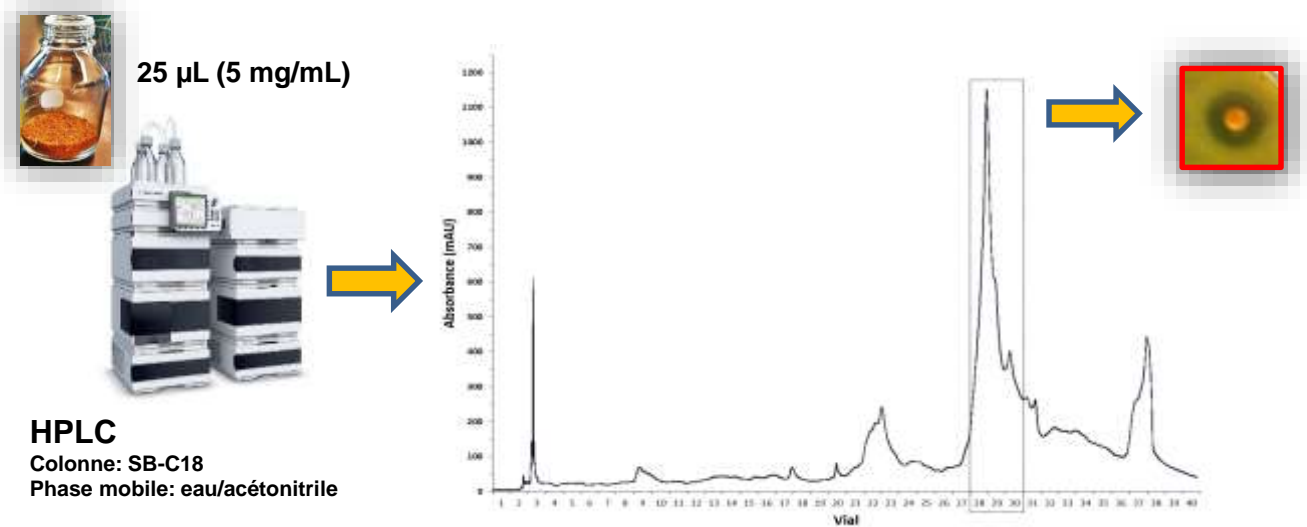


Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions \pm l'erreur standard. Les moyennes ne sont pas significativement différentes ($P \leq 0,05$).



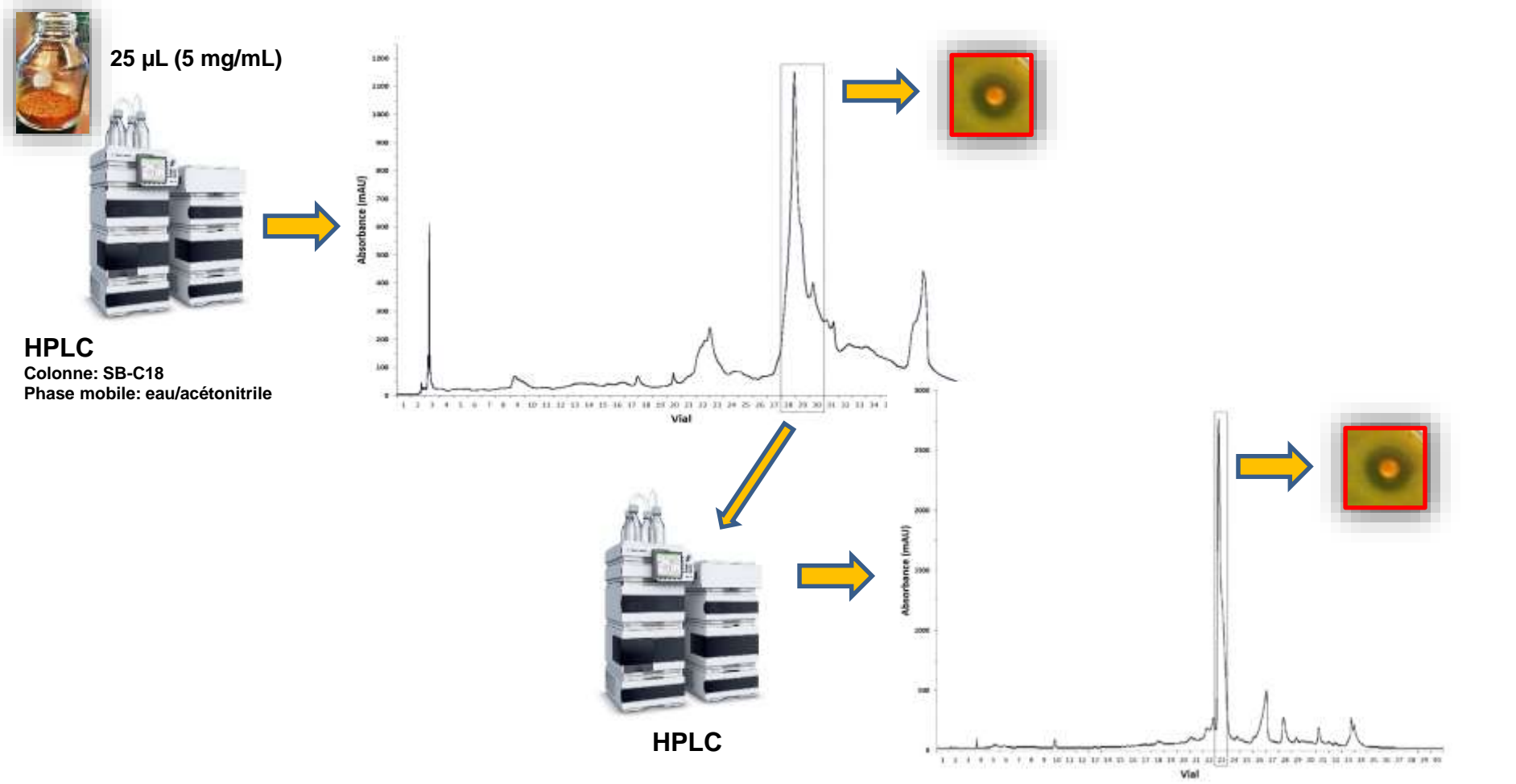


Fractionnement de l'extrait de feuilles d'érable à sucre et évaluation de l'activité antibactérienne



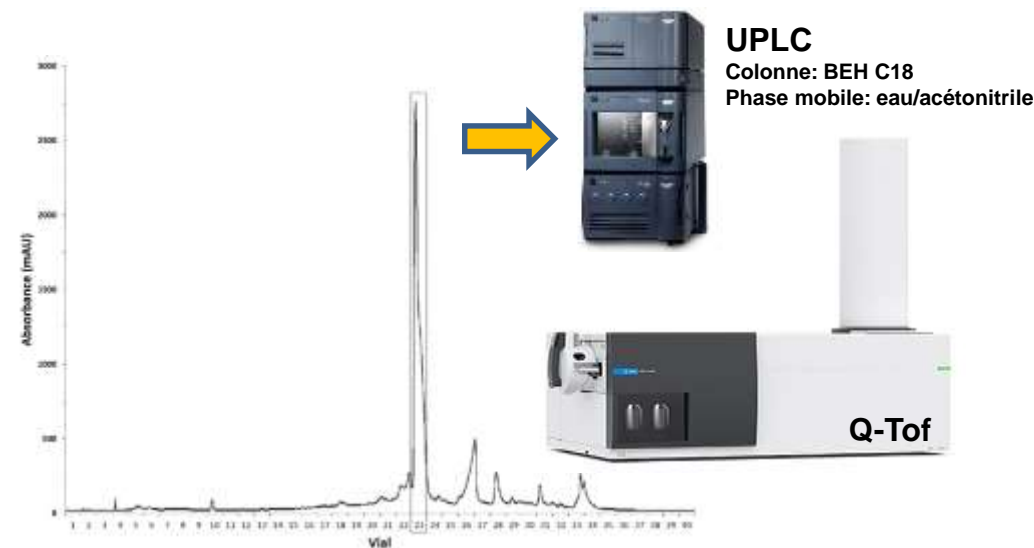


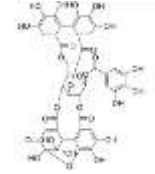
Fractionnement de l'extrait de feuilles d'érable à sucre et évaluation de l'activité antibactérienne





Identification du composé antibactérien



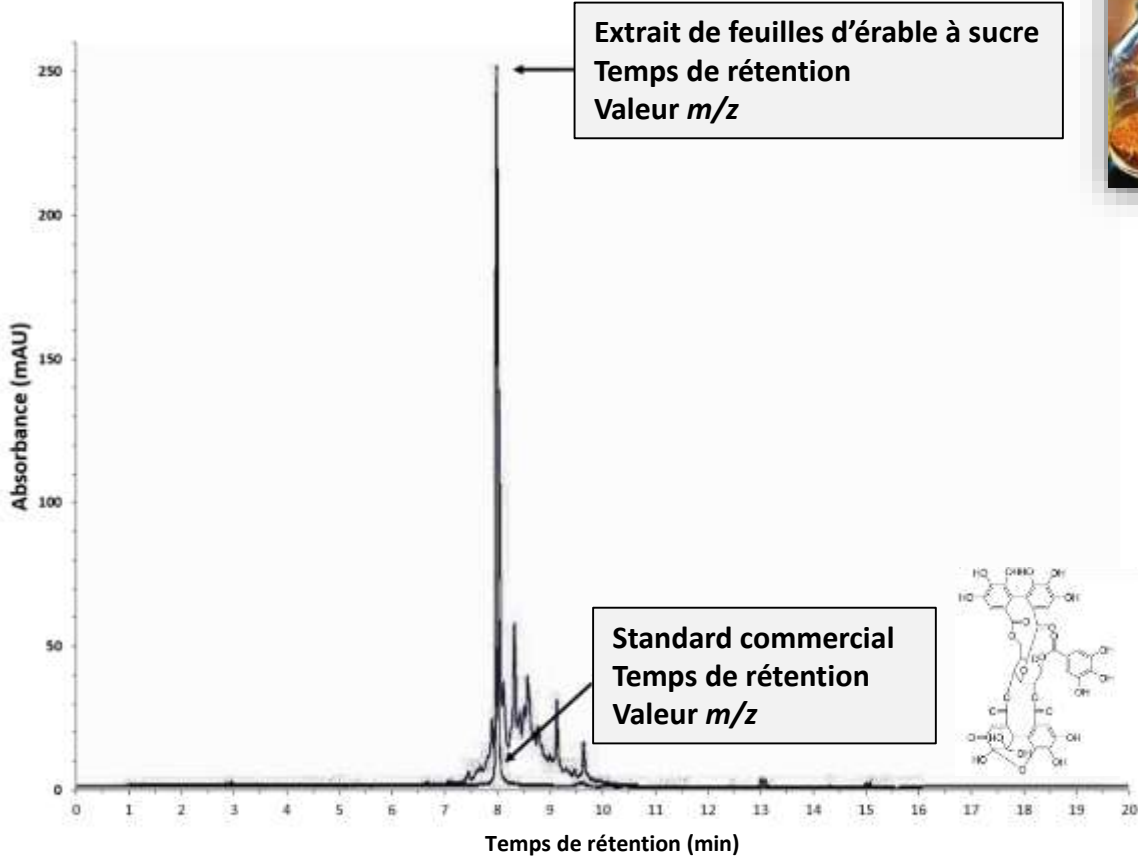




Confirmation de l'identité du composé antibactérien



UPLC-UV-QDa



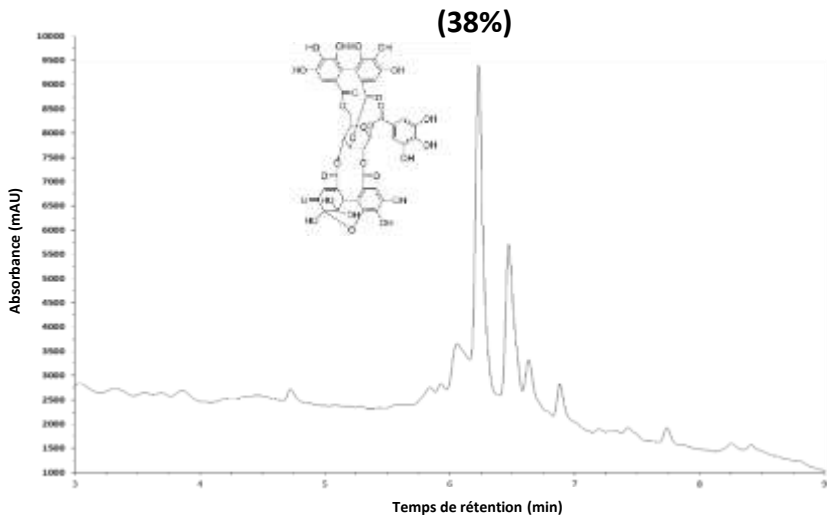
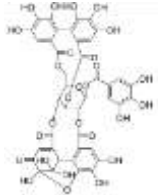
Purification



(14%)



UPLC-UV-QDa

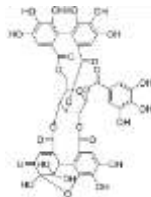


Colonne chromatographique
Gel de silice C18
Éluants: eau/acétonitrile

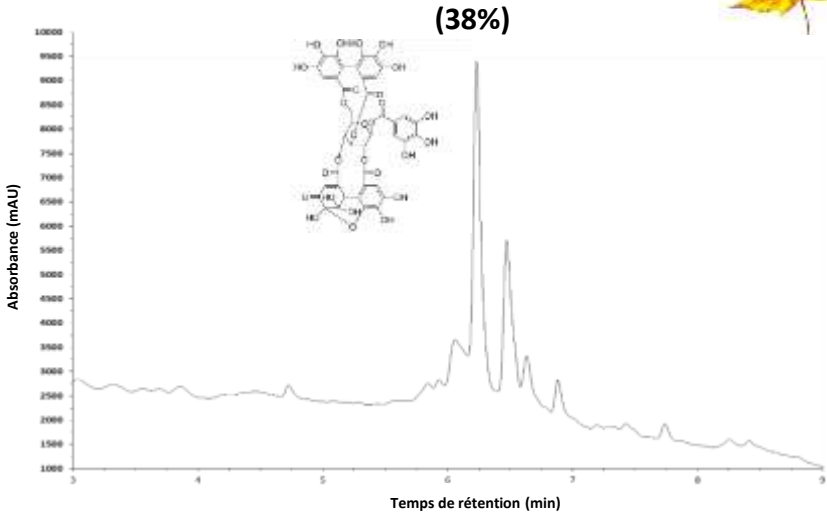




(14%)



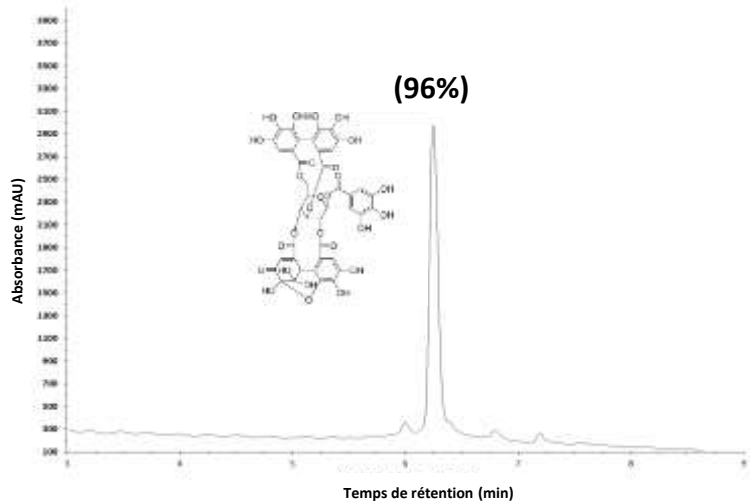
UPLC-UV-QDa



Colonne chromatographique



UPLC-UV-QDa



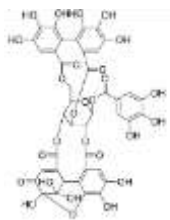
HPLC préparative
Colonne: MS C18
Phase mobile: eau/acétonitrile



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

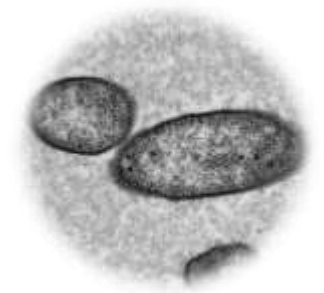
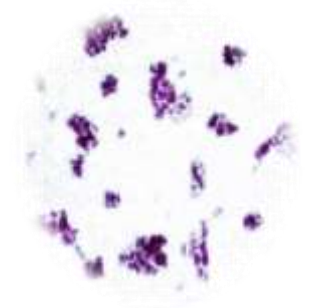
Geranium thunbergii

Perera et coll., 2012; Cheng et coll., 2017



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 et
Agroalimentaire Canada

Canada

Agriculture and
Agri-Food Canada

**Ministère
de l'Agriculture,
des Pêcheries
et de l'Alimentation**

Québec



Merci de votre attention!

Questions?

