



HAL
open science

**Extraction, caractérisation et purification de
bactériocines provenant du complexe d'espèces bactérien
Ralstonia solanacearum : vers une stratégie innovante
dans la lutte contre le flétrissement bactérien**

Stéphane Ramin Mangata, Eva Caly Simbou, Hasina Rasoamanana,
Stéphanie Javegny, Yann Pecrix, Stéphane Poussier

► **To cite this version:**

Stéphane Ramin Mangata, Eva Caly Simbou, Hasina Rasoamanana, Stéphanie Javegny, Yann Pecrix, et al.. Extraction, caractérisation et purification de bactériocines provenant du complexe d'espèces bactérien *Ralstonia solanacearum* : vers une stratégie innovante dans la lutte contre le flétrissement bactérien. CNRIUT 2023 Saint Pierre - La Réunion, IUT de Saint Pierre, Jun 2023, Saint Pierre (La Réunion), La Réunion. hal-04326678

HAL Id: hal-04326678

<https://hal.science/hal-04326678>

Submitted on 6 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Extraction, caractérisation et purification de bactériocines provenant du complexe d'espèces bactérien *Ralstonia solanacearum* : vers une stratégie innovante dans la lutte contre le flétrissement bactérien

Stéphane RAMIN-MANGATA¹, Eva CALY SIMBOU¹, Hasina RASOAMANANA¹, Stéphanie JAVEGNY², Yann PECRIX², Stéphane POUSSIER¹

stephane.ramin-mangata@univ-reunion.fr / eva.caly_simbou@cirad.fr /
hasina.rasoamanana@univ-reunion.fr / stephanie.javegny@cirad.fr / yann.pecrix@cirad.fr /
stephane.poussier@univ-reunion.fr

¹ IUT, Université de La Réunion

Laboratoires des Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieux Tropical, CIRAD UMR C53 PVBMT

² CIRAD, UMR PVBMT, F-97455 Saint-Pierre, La Réunion, France

Thèmes – *Biologie - Environnement*

Résumé – Les bactéries du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (ceRs) causent le flétrissement bactérien. Cette maladie cause de graves dégâts dans les cultures maraîchères. Les bactéries du ceRs sont regroupées en fonction de leur phylotype et de leur sequevar. Dans la zone du Sud-Ouest de l'Océan Indien, les souches du phylotype I sequevar 31 sont majoritaires dans les petites îles alors que celles du phylotype I-18 le sont à Madagascar. Cette différence de distribution pourrait être expliquée par la production de bactériocines, molécules antibactériennes à spectre d'action étroit. Ainsi, nous montrons, *in vitro*, qu'une souche I-18 sécrète des bactériocines actives dans une gamme de pH située entre 3 et 11. L'activité antibactérienne du filtrat de culture de la souche I-18 est spécifique vis-à-vis d'une souche I-31 et n'inhibe pas la croissance d'autres bactéries présentes au niveau du sol. *In planta*, le filtrat de culture I-18 inhibe le flétrissement bactérien induit par la souche I-31. Ces résultats sont encourageants pour la mise en place d'un traitement innovant contre le flétrissement bactérien. En effet, aucun traitement n'est disponible actuellement.

Mots-Clés – *Bactériocine, Ralstonia solanacearum, Lutte biologique, Flétrissement bactérien*

1 Introduction

Le flétrissement bactérien est actuellement considéré comme la 2^e phyto bactériose au niveau mondial. Cette pathologie est causée par les bactéries du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (ceRs). Le ceRs est ainsi capable d'induire un flétrissement bactérien sur plus de 200 espèces végétales dans 54 familles botaniques différentes (1).

Le ceRs est constitué de trois espèces de bacilles à coloration de Gram négative : *R. pseudosolanacearum*, *R. solanacearum* et *R. syzygii*. Ces trois espèces sont réparties en 5 phylotypes (groupes de souches phylogénétiquement proches). Les espèces de *R. pseudosolanacearum* comprennent les souches du phylotype I et III originaires d'Asie et d'Afrique, respectivement. Les espèces de *R. solanacearum* regroupent les souches du phylotype IIA et IIB originaires d'Amérique. L'espèce *R. syzygii* contient les souches du phylotype IV originaires d'Indonésie, du Japon et d'Australie. Au sein de chaque phylotype, une classification plus fine peut être établie. Cette classification permet de faire la distinction entre des sequevars. Ainsi, les souches présentant au minimum 99% de similitude dans la séquence du gène de l'endoglucanase (*egl*) sont rassemblées dans un même sequevar (2).

Dans la zone du sud-ouest de l'océan Indien (SOOI), des études épidémiologiques menées ces dernières années ont révélé la présence de 4/5 phylotypes du ceRs. Ces travaux ont également mis en évidence de fortes différences de prévalence entre souches. Au niveau des petites îles comme La Réunion, Rodrigue, Mayotte, Les Comores et Les Seychelles le flétrissement bactérien est majoritairement dû aux souches appartenant au phylotype I sequevar 31 (I-31). En revanche, à Madagascar, la phytopathologie est principalement causée par des souches du phylotype I sequevar 18 (I-18) (3). Cette situation épidémique contrastée semble indiquer l'existence de mécanismes de compétitions sous-jacents entre ces différentes souches. En effet, de nombreuses bactéries sont capables de sécréter une grande variété de substances toxiques afin de tuer leurs compétitrices au sein de la même niche écologique. Il peut s'agir soit de molécules à large spectre, capables de tuer un grand nombre d'autres espèces de bactéries, soit de molécules aux actions plus spécifiques appelées bactériocines et qui ne ciblent de façon spécifique que des souches phylogénétiquement proches de la bactérie tueuse (4).

Chez les bactéries à Gram négatif, les bactériocines sont classées en fonction de leur taille. Ainsi, on distingue les microcines (<10kDa), les colicines (25-80kDa) et les tailocines (type queue de phage, 1 000-10 000kDa) (4).

Chez le ceRs, aucune bactériocine n'a encore été

caractérisée au niveau moléculaire. Récemment, nous avons montré que les souches I-18 et I-31 majoritaires dans le SOOI, présentaient des activités de type bactériocines ciblant des souches d'autres sequevars tels que I-33, I-46 ou encore I-15 peu prévalentes dans cette région. De plus, nous avons montré que les activités de type bactériocines de certaines souches I-18 ciblaient les souches I-31 des petites îles du SOOI (Rasoamanana *et al*, 2022, article accepté). Ces résultats suggèrent d'une part que la divergence de distribution du ceRs dans les îles du SOOI pourrait être en partie expliquée par les activités de type bactériocines des lignées I-31 et I-18 et d'autre part que les molécules antimicrobiennes produites par les souches I-18 et ciblant les souches I-31 pourraient être utilisées contre ces dernières souches épidémiques dans les petites îles du SOOI comme agent de biocontrôle.

Ainsi, l'objectif de cette étude est i) de tester l'activité des bactériocines produites par ces 2 types d'espèces, ii) d'extraire, de purifier et de caractériser ces bactériocines et iii) d'évaluer le potentiel des bactériocines produites par les souches I-18 comme agent de biocontrôle du flétrissement bactérien induit par les souches I-31.

2 Matériels et méthodes

2.1 Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches utilisées pour cette étude proviennent des différentes îles de la zone SOOI et sont issues de la collection RUN de souches internationales du ceRs conservées en cryotubes au laboratoire PVBMT. Nous avons utilisé la souche RUN3012 (I-31) majoritaire à La Réunion, et la souche RUN6499 (I-18) isolée à Madagascar. Les bactéries ont été cultivées sur milieu Kelman gélosé supplémenté en TTC pendant 24-48h à 28°C. Pour l'extraction des protéines, 1000 mL de culture bactérienne sont ensemencés à une concentration de 10⁵ UFC/ml en bouillon nutritif pendant 24h à 28°C sous agitation à 150 rpm.

2.2 Extraction des protéines sécrétées

L'ensemble des protéines sécrétées est récolté après centrifugation de la culture bactérienne liquide. Le surnageant est filtré (porosité 0,22 µm). Une étape de fractionnement en fonction de la masse moléculaire est également réalisée. Après une précipitation au sulfate d'ammonium, les protéines sécrétées subissent une succession de filtration sur membrane Amicon avec des tailles de séparation différentes (50kDa, 100kDa).

2.3 Test d'activité des bactériocines *in vitro*

Des tests de compétitions sont réalisés en déposant des spots de 10µL de filtrat de culture de souches potentiellement productrices sur des boîtes de Petri contenant du milieu Kelman fraîchement ensemencé en

masse avec la souche cible (Rasoamanana *et al.*, 2022). Les boîtes de Petri sont ensuite incubées 48h à 28°C et l'activité antibactérienne du filtrat est évaluée macroscopiquement en observant le halo d'inhibition formé autour du spot suivant un score compris entre 0 et 4 (0 = pas d'halo donc pas d'activité antibactérienne, 4 = halo franc et large donc forte activité antibactérienne). Des tests similaires ont été réalisés sur 19 souches proches ou non des souches du ceRs.

2.4 Test d'activité des bactériocines, *in planta*

Les essais, *in planta*, ont été réalisés sur des plants de tomates de 3 semaines cultivés sous serre puis transférés le jour de l'inoculation en chambre de culture (28°C, 80% d'hygrométrie relative et 12h de photopériode). L'inoculation est réalisée en repotant les plantes dans de la terre contaminée par la souche RUN3012 (I-31, La Réunion) à 10^6 UFC.g⁻¹ de terre. Les plants ainsi infectés ont été arrosés une fois ou 2 fois avec une dilution (1:4) du filtrat de culture de RUN6499 (I-18, Madagascar). Des témoins sans arrosage ou dont la terre n'a pas été contaminée ont été inclus.

3 Résultats

3.1 L'activité bactériocine du filtrat de la souche I-18 vis-à-vis de la souche I-31 est optimale entre pH3 et pH11, *in vitro*.

Dans une série de tests de compétition, l'activité des filtrats bactériens de la souche RUN6499 (I-18) a été évaluée à différents pH sur la souche RUN3012 (I-31). Dans nos conditions expérimentales, le filtrat de la souche RUN6499 a présenté une activité antibactérienne dans une gamme de pH comprise entre 3 et 11. Par ailleurs, un chauffage du filtrat à 100°C et un traitement à la protéinase K ont entraîné la perte d'activité antibactérienne confortant ainsi l'hypothèse d'une activité bactériocine.

3.2 Les bactériocines de la souche I-18 ciblent spécifiquement les souches du ceRs.

Pour confirmer la spécificité d'action des bactériocines, nous avons testé leur potentiel d'inhibition de croissance sur 19 souches proches ou non des souches du ceRs. Les scores d'inhibition vis-à-vis de ces souches ont été quasi nuls et ont conforté notre hypothèse sur les bactériocines.

3.3 L'activité antibactérienne du filtrat RUN6499 semble liée aux protéines de poids moléculaire supérieur à 100kDa.

Il existe plusieurs types de bactériocines. Lors d'une stratification plus fine en fonction du poids moléculaire, nous avons pu constater que seul le filtrat protéique à haut poids moléculaire (>100kDa) présentait une activité

antibactérienne similaire à celle du filtrat protéique pur. Ainsi, l'activité bactériocine serait conférée par une ou plusieurs protéines de haut poids moléculaire.

3.4 Le filtrat protéique de la souche I-18 empêche le flétrissement bactérien induit par la souche I-31, *in planta*.

En conditions contrôlées, le filtrat protéique de la souche RUN6499 (I-18) a été capable d'empêcher la phytobactériose induite par la souche RUN3012 (I-31) que ce soit en arrosage unique ou en arrosage multiple (Figure 1). En perspectives nous envisageons de faire soit des traitements avant l'inoculation pour évaluer le potentiel préventif soit des traitements après inoculation pour évaluer le potentiel curatif des bactériocines des souches de I-18.



Figure 1 : Photographie des plants de tomates T4 en terre contaminée avec I-31 après traitement avec un filtrat I-18.

4 Conclusions

La distribution des souches du ceRs est inégale dans la zone du SOOI. Cette divergence pourrait s'expliquer par la sécrétion de bactériocines des souches prévalentes dans l'environnement pour lutter contre les autres souches compétitrices. Ainsi, nous avons pu montrer que la forte prévalence du phylotype I-18 à Madagascar et du phylotype I-31 à La Réunion pourrait en partie s'expliquer par la sécrétion d'une ou plusieurs bactériocines. Ces résultats sont encourageants dans la mise en place de nouveaux traitements biologiques innovants. En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de moyen de lutte efficace contre le flétrissement bactérien. Après isolement et caractérisation, la production des bactériocines et leur utilisation comme agent de biocontrôle pourrait constituer une nouvelle stratégie de lutte innovante contre le flétrissement bactérien.

Références

1. T. Denny, "Plant pathogenic *Ralstonia* species" in *Plant-Associated Bacteria*, S. S. Gnanamanickam, Ed. (Springer Netherlands, 2006), pp. 573–644.
2. M. Fegan, P. Prior, *How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex* (APS Press, 2005).
3. H. Rasoamanana, *et al.*, Contrasting genetic diversity and structure among Malagasy *Ralstonia pseudosolanacearum* phylotype I populations inferred from an optimized Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis scheme. *PLOS ONE* **15**, e0242846 (2020).
4. J. Zou, H. Jiang, H. Cheng, J. Fang, G. Huang, Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Int J Biol Macromol* **117**, 781–789 (2018).