

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : *Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement - IEES Paris*

Adresse : *Tour 44-45 -4e étage Pièce 408 - Case 237*

Responsable du Laboratoire / Entreprise : *Luc Abbadie*

Responsable de l'encadrement : *Marie-Anne Barny*

Téléphone : +33(0)6 08 60 11 52

Fax :

E-mail : barny@agroparistech.fr, barny@upmc.fr

Co-encadrant éventuel : *Jacques Pédron*

Perspectives de poursuite de thèse :

oui

avec une bourse spécifique

non

2. Titre, description du sujet, approches utilisées, références:

TITRE: Les bactéries phytopathogènes en environnement non-hôte : un réservoir pour l'émergence de nouvelles maladies ?

Description générale du sujet

Anticiper l'émergence des maladies et atténuer leurs impacts est un défi à relever tant pour les maladies affectant les humains, les animaux que les plantes. Les potentiels de survie, de multiplication et de dissémination des bactéries phytopathogènes dans l'environnement pouvant participer à l'émergence de nouvelles bactérioses sur plantes cultivées sont rarement évalués. Des études pionnières menées dans le laboratoire de Cindy Morris (INRA Avignon) ont montré, que l'espèce phytopathogène *Pseudomonas syringae* était présente dans des environnements variés (Morris et al., 2013), que sa dissémination pouvait s'expliquer par sa participation au cycle de l'eau (Morris et al., 2008), que sa diversité était bien plus large que celle observée sur plantes hôtes et que de nombreuses souches de l'environnement pouvaient participer à l'émergence de nouvelles maladies. Ces résultats demandent cependant à être élargis à d'autres modèles bactériens.

Les entérobactéries pectinolytiques (EBP) sont des bactéries phytopathogènes à large spectre d'hôte attaquant la majorité des familles botaniques, incluant des plantes d'intérêt agronomique comme la pomme de terre, la tomate ou l'endive (Ma et al, 2007, Czajkowski et al, 2014,). Leur large spectre d'hôte et leur diversité en font un bon modèle pour étudier les mécanismes conduisant à l'émergence des souches pathogènes sur plantes cultivées. Les EBP sont susceptibles de s'adapter rapidement à un nouvel hôte comme le démontre l'émergence récente de nouvelles espèces pathogènes sur pomme de terre (Khayal et al., 2015 ; Potrykus et al., 2016). Les mécanismes du pouvoir pathogène de ces bactéries sont bien décrits (Charkowski et al, 2012) et de nombreux génomes de souches pathogènes isolées d'hôtes variés sont séquencés. En revanche, l'émergence des épidémies est encore mal comprise et la diversité des bactéries isolées hors plantes mal documentée. Les EBP peuvent survivre dans l'environnement mais les réservoirs environnementaux ainsi que les conditions affectant leur maintien et/ou leur multiplication hors des plantes hôtes sont mal connus.

Le projet de Master sera centré sur la caractérisation d'une collection d'environ 300 souches collectées hors plantes, dans l'eau, au niveau de 21 sites du bassin versant la Durance, en octobre 2015, Février, Mai et Aout 2016. Ce bassin versant constitue un gradient environnemental intéressant car la haute Durance est essentiellement constitué de prairie alpine alors que la basse

Durance est une région agricole irriguée. De plus, la différence d'altitude entre le plus haut point de prélèvement (2098 m) et le plus bas (38 m) constitue un gradient altitudinal intéressant. Cette étude nous permettra donc d'évaluer si les EBP sont présentes tout le long du cours d'eau, à toutes les saisons ou se concentrent plus particulièrement en certains points du réseau et/ou à certaines périodes de l'année. L'analyse des souches récoltées sera effectuée en regard des variables environnementales mesurées dans l'eau lors du prélèvement (température, conductivité, pH, turbidité, matière organique) et des caractéristiques du site de prélèvement (altitude, site alpin ou agricole). Les souches seront caractérisées par analyse phylogénétique et le pouvoir pathogène d'un sous ensemble de souches sera évalué sur plante. Enfin le séquençage de génomes complets pourra être effectué sur un sous ensemble des souches présentant des niveaux d'agressivité variable sur plantes et les génomes de ses souches seront comparés aux génomes des souches pathogènes isolés de plantes malades.

Approches utilisées

Des approches de microbiologie et de biologie moléculaire classiques sont requises pour manipuler les souches, préparer les ADN et effectuer les PCR.

L'analyse phylogénétique sera effectuée suite au séquençage de deux gènes de ménages *gapA* et *recN*. Ces deux gènes de ménages ont été choisis car ils présentent des séquences variables chez les souches pathogènes de plantes et sont donc efficaces pour discriminer les divergences inter spécifiques entre les EBP. Les séquences obtenues pour nos souches seront comparées aux séquences représentatives des souches pathogènes isolées de plantes malades et utilisées pour positionner nos souches au sein de la phylogénie des EBP.

Suite à cette première classification, le pouvoir pathogène d'un sous ensemble de souches représentatives de la diversité phylogénétique des souches isolées sera testé sur tubercule de pomme de terre. 20 tubercules seront inoculés par souche testée. Des souches contrôles, représentatives des souches pathogènes sur pomme de terre seront systématiquement incluses dans tous les tests.

Les souches présentant une agressivité différentielle sur pomme de terre seront séquencées et leur génomes comparés aux génomes des souches pathogènes sur plante.

Des méthodes statistiques de bases seront utilisées pour 1) rechercher s'il existe une corrélation entre les variables environnementales et la présence/la diversité des d'EBP au sein du bassin versant 2) analyser les résultats des tests de pouvoir pathogènes.

Références

Charkowski A, Blanco C., Condemine G., Expert D., Franza T., Hayes C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Lopez Solanilla E., Low D., Moleleki L., Pirhonen M., Pitman A., Perna N., Reverchon S., Rodriguez Palenzuela P., San Francisco M., Toth I., Tsuyumu S., van der Waals J., van der Wolf J., Van Gijsegem F., Yang C_H., and Yedidia I. 2012 The Role of Secretion Systems and Small Molecules in Soft-Rot Enterobacteriaceae Pathogenicity. *Ann. Rev. Phytopathol.* 50 :425-450.

Czajkowski R., Pérombelon M. C. M., Jafra S. 2014. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot : a review. *Applied Biology*, 2014, ISSN 0003-4746.

Khayri S., Blin P., Pédrón J., Chong T.M., Chan K.G., Moumni M., Hélias V., Van Gijsegem F., Faure D. 2015. Population genomics reveals additive and replacing horizontal gene transfers in the emerging pathogen *Dickeya solani*. *BMC Genomics*. 2015 16:788.

Ma B., Hibbing M. E., Kim H.-S., Reedy R. M., Yedidia I., Breuer J., Glasner J. D., Perna N. T., Kelman A., and Charkowski A. O. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* 97:1150-1163.

Morris C. E., Sands D. C., Vinatzer B. A., Glaux C., Guilbaud C., Buffière A., Yan S., Dominguez H., and Thompson B. M. 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME Journal* 2:321-334.

Morris C. E., Monteil C. L., Berge O. 2013. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* : Linking Agriculture to Earth System Processes. Annu. Rev. Phytopathology. 51:85-104.

Potrykus, M., Golanowska, M., Sledz, W., Zoledowska, S., Motyka, A., Kolodziejska, A., Butrymowicz, J., and Lojkowska, E. 2016. Biodiversity of *Dickeya* spp. Isolated from potato plants and water sources in temperate climate. Plant Dis.