

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC)
Adresse : avenue de la Terrasse 91198 Gif-sur-Yvette
Responsable du Laboratoire / Entreprise : Thierry Meinell
Responsable de l'encadrement : Denis Faure
Téléphone : 01 69 82 34 98
E-mail : denis.faure@i2bc.paris-saclay.fr
Site web de l'unité : <http://www.i2bc.paris-saclay.fr/>
Site web de l'équipe d'accueil : <http://www.cgm.cnrs-gif.fr/spip.php?article412&lang=fr>

Perspectives de poursuite de thèse :

oui
 non

avec une bourse spécifique
 oui
 non

2. Titre, description du sujet, approches utilisées, références (2 pages maximum) :

Titre : Identification des traits du pathogène *Agrobacterium tumefaciens* impliqués dans la colonisation de plantes hôtes et non-hôtes par une approche à haut débit.

Le pathogène *Agrobacterium tumefaciens* est responsable d'une maladie (galle du collet) affectant un large spectre de plantes d'intérêt agronomique (ex. tomate, peuplier) et ornemental (ex. rosier). Le plasmide Ti (pTi) porte les principaux gènes de virulence et le T-DNA qui est l'ADN bactérien transféré à la plante. Le phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* est unique dans le monde vivant de par sa capacité à réaliser deux processus successifs de transfert horizontaux lors de son cycle infectieux. D'une part, il transfère une partie (l'ADN-T) de son plasmide de virulence (pTi) dans le génome nucléaire de cellules de l'hôte, et ainsi provoque le développement d'une tumeur végétal au sein de laquelle il prolifère; d'autre part, il transfère son plasmide pTi aux bactéries présentes dans les tumeurs mais non-pathogènes et ainsi dissémine les gènes de virulence portés par le pTi.

Ce pathogène est aussi capable de coloniser la rhizosphère des plantes hôtes (ex. tomate) et non-hôtes (ex. maïs). La rhizosphère est la fraction du sol sous influence du système racinaire des plantes. *A. tumefaciens* appartient au groupe fonctionnel des bactéries dites rhizosphériques dont la croissance est stimulée par la présence du végétal. La population d'*A. tumefaciens* montre un effectif qui augmente d'un facteur 100 à 1000 entre un sol nu (sans plante) et un sol rhizosphérique (Haudecoeur et al 2009 Mol Plant Microbe Interact. 22:529-37; Krimi et al 2002 Appl Environ Microbiol. 68:3358-65). Comme il n'existe pas de procédé de lutte chimique contre *A. tumefaciens*, les approches prophylactiques ou de lutte biologique (ex. compétiteurs bactériens) sont essentielles. Afin de pouvoir prévenir la colonisation de la rhizosphère des plantes hôtes et non-hôtes (ces dernières pouvant jouer le rôle de réservoir), il est important de connaître les traits de ce pathogène impliqués dans la colonisation de la rhizosphère. Malheureusement, si de nombreuses publications étayent les étapes de pathogénie (transfert et intégration du T-DNA), aucune donnée, à notre connaissance, ne décrit les gènes et fonctions d'*A. tumefaciens* impliqués dans le processus de colonisation racinaire.

Dans ce projet de stage M2, nous proposons l'utilisation d'une approche de « *transposon sequencing* » ou Tn-seq (van Opijnen et al 2009 Nat Methods. 6:767-72) qui a été testée au laboratoire courant 2016. Cette approche combine des principes de génétique et d'écologie tout en s'appuyant sur les nouvelles technologies de séquençage à haut débit (Illumina). Cette méthode permet d'identifier les gènes dont l'inactivation modifie la compétitivité bactérienne sous une pression environnementale donnée. Elle se divise en quatre étapes clés : (1) obtenir une population de mutants de transposition chez l'organisme étudié, *A. tumefaciens* souche C58 ; (2) exercer sur cette population de mutants une pression de sélection permettant d'avantager (ou désavantager) les mutants porteurs de mutations bénéfiques (ou néfastes) à leur compétitivité ; (3) extraire l'ADN total de cette population avant et après la pression de sélection ; (4) amplifier et séquencer les sites d'insertions des transposons afin d'identifier les mutations sélectionnées (dont la fréquence augmente) ou contre-sélectionnées (dont la fréquence diminue). L'ensemble de ces étapes sont conduites au laboratoire sauf le séquençage à haut débit qui est réalisé par la plateforme de séquençage de notre unité de recherche (I2BC).

En 2016, une banque de mutants a été construite chez *A. tumefaciens* C58, inoculée sur plant de tomate, puis ré-isolée. L'ADN de cette population de mutants a été extrait et le séquençage des bordures est en cours. Ces travaux donneront des informations sur la représentativité de banque de mutants construite, mais aussi les premiers résultats les gènes importants dans la compétitivité d'*A. tumefaciens* colonisant la rhizosphère d'une plante hôte.

Les objectifs de ce stage sont :

- 1) d'exploiter les données acquises de l'expérience préparatoire conduite en 2016 sur plants de tomate ;
- 2) de réaliser une infection de la rhizosphère de différentes plantes hôtes (luzerne, tomate, pomme de terre) et non-hôtes (blé, maïs) afin d'identifier et comparer les traits impliqués dans la colonisation rhizosphérique par *A. tumefaciens*.

L'attendu scientifique majeur est l'identification des traits associés à la compétitivité du pathogène *A. tumefaciens* colonisant la rhizosphère de plantes hôtes et non-hôtes ; ainsi identifier des cibles potentielles pour le développement de méthodes de contrôle de ce processus. A plus long terme, ce travail permettra aussi d'entreprendre d'étude des traits de la plantes favorisant ou limitant sa colonisation par ce pathogène.

L'attendu en termes de formation est l'acquisition par l'étudiant M2 de connaissances générales et de techniques en écologie moléculaire.

Des acquis en microbiologie (manipulation stérile) ou biologie moléculaire (extraction d'ADN, PCR) sont des atouts pour réaliser ce stage.

Publications récentes (2012-2016) sur la thématique *A. tumefaciens* par l'équipe d'accueil:

- Lang J, Gonzalez-Mula A, Taconnat L, Clement G, Faure D. 2016. The plant GABA signaling downregulates horizontal transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* virulence plasmid. *New Phytol.* 210(3):974-83.
- Lang J, Faure D. 2016. Plant GABA:proline ratio modulates dissemination of the virulence Ti plasmid within the *Agrobacterium tumefaciens* hosted population. *Plant Signal Behav.* 11(5):e1178440.
- Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure D. 2016. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol Rev.* 40(1):86-116.
- El Sahili, S.Z. Li, J. Lang, C. Virus, S. Planamente, M. Ahmar, B. G. Guimaraes, M. Aumont-Nicaise, A. Vigouroux, L. Soulère, J. Reader, Y. Queneau, D. Faure & S. Moréra. 2015. A Pyranose-2-phosphate motif is responsible for both antibiotic import and quorum-sensing regulation in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS Pathogens* 11(8): e1005071.
- Lang J, Vigouroux A, Planamente S, El Sahili A, Blin P, Aumont-Nicaise M, Dessaux Y, Moréra S, Faure D. 2014. *Agrobacterium* uses a unique ligand-binding mode for trapping opines and acquiring a competitive advantage in the niche construction on plant host. *PLoS Pathog.* 10(10):e1004444.
- Lang J, Faure D. 2014. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front Plant Sci.* 5:14.
- Lang J, Planamente S, Mondy S, Dessaux Y, Moréra S, Faure D. 2013. Concerted transfer of the virulence Ti plasmid and companion At plasmid in the *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumour. *Mol Microbiol.* 90(6):1178-89.

Planamente S, Mondy S, Hommais F, Vigouroux A, Moréra S, Faure D. 2012. Structural basis for selective GABA binding in bacterial pathogens. *Mol Microbiol.* 86(5):1085-99.