

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement, Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé :LMSM

Adresse : 5 rue Saint-Germain – 27000 Evreux

Responsable du Laboratoire: Marc Feuilloley

Responsable de l'encadrement : Laurent Quillet MCF HDR

Téléphone :0232769451

Fax :

E-mail :laurent.quillet@univ-rouen.fr

Co-encadrant éventuel : Christophe Regard MCF (U.PSud- Orsay)

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 : Utilisation de la phagothérapie pour lutter contre une bactérie phytopathogène de laitue : *Xanthomonas hortorum* pv. *Vitians*.

Lieu du stage : Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, Bâtiment IRESE B, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Rouen, 76821 Mt St Aignan cedex

Responsable du stage : Laurent Quillet Maître de Conférences, HDR

Tel (33) 02 32 76 94 51 / e-mail : laurent.quillet@univ-rouen.fr

Problématique :

La Bactériose de la laitue est une maladie infectieuse d'origine bactérienne qui provoque des dégâts pouvant aller jusqu'à la destruction de la récolte et des pertes économiques importantes pour les maraîchers. La bactérie *Xanthomonas hortorum* pv. *Vitians* (*Xhv*) est responsable de cette maladie (Sahin et Miller, 1995). Cette **bactérie**, connue pour sévir plutôt dans les régions chaudes, est maintenant largement répandue. Elle a été signalée dans de nombreux pays, sur laitues et chicorées, en particulier en Australie, en Afrique du Sud, aux USA, au Venezuela, au Japon (Bradbury, 1986),

au Canada (Carisse et al., 2000), en Corée du sud (Myung et al., 2010), en Nouvelle Zélande (Boesewinkel, 1977), et dans plusieurs pays européens comme l'Allemagne, l'Italie, la Russie ((Bradbury, 1986) la Turquie (Sahin, 2000). **En France**, elle semble être en recrudescence ces dernières années et occasionne des dégâts très importants. En région Normandie, entre autres, des parcelles entières sont parfois envahies en quelques jours et la quasi-totalité des salades altérées ne peut être commercialisée.

Actuellement, aucun traitement permettant de lutter efficacement contre la maladie n'existe. Certaines méthodes ont, malgré tout, été développées pour tenter d'empêcher le développement de la maladie comme le traitement des graines à l'hypochlorite de sodium, l'utilisation de variétés de laitues résistantes à la bactérie (Sahin et Miller, 1997), l'utilisation de bactéricides comme le cuivre ou les antibiotiques (Carisse et al., 1999). Mais ces traitements n'ont pas permis d'éradiquer la maladie qui continue à se développer au niveau mondial.

Des stratégies alternatives doivent donc être étudiées afin de stopper ou pour le moins diminuer le développement de la maladie. Ainsi, l'activation des mécanismes de résistance de la plante (Lows et al., 2001), l'utilisation de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes des bactéries de la rhizosphère bénéfiques à la croissance et à la santé des plantes (PGPR, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), (Obradovic et al., 2002), l'utilisation de bactéries antagonistes (Wilson et al., 2002), ont été testés sur différentes maladies dues à des bactéries phytopathogènes avec des résultats intéressants, mais jamais satisfaisants car difficilement reproductible et pas toujours efficace.

Aussi l'utilisation d'une autre technique reposant cette fois sur l'utilisation de bactériophages, la phagothérapie, peut-elle constituer une solution attractive.

La phagothérapie :

Dans la nature, les phages sont présents partout où il y a des bactéries qui sont les hôtes d'au moins un phage. Un phage ne s'attaque qu'à l'espèce bactérienne pathogène ciblée.

La thérapeutique qui utilise les phages pour traiter les infections bactériennes est appelée phagothérapie. Cette technique a été tout d'abord utilisée contre de nombreuses bactéries pathogènes humaines, mais a été remplacée par l'utilisation des antibiotiques à partir des années 1940. L'apparition de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques relance actuellement le débat sur l'utilisation de cette technique contre les bactéries pathogènes humaines mais également végétales.

Dans notre étude, la phagothérapie sera effectivement utilisée pour lutter contre des bactéries phytopathogènes. Cette technique présente de nombreux avantages, en particulier le fait que les bactériophages lytiques soient des composants naturels de la biosphère, non toxiques pour les cellules eucaryotiques, et leur préparation facile et peu coûteuse.

Malgré des perspectives très intéressantes en terme de diminution, voire d'élimination de bactéries responsable de maladies de plantes, peu de travaux utilisant la phagothérapie comme moyen de lutte ont pour l'instant été décrits dans la littérature : Lim et al., 2014 (Lutte contre la Pourriture de la tomate due à *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum*) ; Nagy et al., 2012 (Lutte contre le feu bactérien de la pomme et la poire dû à *Erwinia amylovora*) ; Lang et al., 2007 (Lutte contre la Brûlure de l'oignon due à *Xanthomonas axonopodis pv. Allii.*) seul un bio-pesticide à base de phages (AgriPhage™) utilisé pour lutter contre des maladies de la tomate, et dirigé à la fois contre la bactérie *Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria (Xcv)* responsable de la tache bactérienne de la tomate, contre *Pseudomonas syringae pv. tomato (Pst)* responsable de la moucheture bactérienne de la tomate, et *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis (Cmm)* responsable du chancre bactérien de la tomate, existe actuellement.

Objectifs :

Le projet très innovant aura donc pour but principal dans un premier temps d'isoler et de purifier des bactériophages spécifiques de la bactérie *Xanthomonas hortorum pv. Vitians (Xhv)*. Des isolats de *Xhv* seront également recherchés afin de permettre cette purification. Pour cela, deux types de prélèvements seront effectués : un premier sur différents tissus des plantes malades, et un second correspondant à des

échantillons de sols proches des laitues contaminées dans des exploitations de la région Normandie. Ces travaux seront effectués lors du stage de Master 2.

Dans un deuxième temps, une partie plus appliquée de l'étude sera développée, avec des essais de protection des salades par phagothérapie qui seront effectués en serre, puis au champ. Ce travail sera réalisé dans le cadre d'une thèse.

Démarches expérimentales :

Le travail consistera tout d'abord à l'isolement et la purification des phages. La gamme d'hôtes des phages sera ensuite analysée. La morphologie des phages sera étudiée par microscopie électronique. L'ADN phagique sera purifié, et l'organisation génomique et la séquence nucléotidique de chaque phage seront déterminées.

Dans le but futur de tester en serre, puis d'utiliser ces phages en champs pour protéger les salades, les phages seront isolés en utilisant soit une seule souche de *Xhv* de référence, soit des mélanges de souches issues de Normandie et d'autres régions françaises (en particulier la région Rhône -Alpes). En effet, Nagy et al. (2012) ont montré qu'un cocktail de phages dirigés contre différentes souches bactériennes de la bactérie phytopathogène *Erwinia amylovora*, et issues, entre autres, de différentes origines géographiques, permettait de lyser non seulement la bactérie phytopathogène de référence, mais présentait un spectre d'hôtes beaucoup plus large.

Ce mélange de phages devrait se montrer certainement plus efficace dans une recherche de protection optimale des plantes par phagothérapie, car il permettra de lyser des bactéries *Xhv* pouvant potentiellement évoluer et présenter certaines différences avec l'isolat de départ en fonction, en particulier, des caractéristiques physico-chimiques des sols où se développent les salades et des conditions climatiques.

Collaborations :

Cette étude sera réalisée en collaboration avec le laboratoire I2BC (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Equipe Génomique et Biodiversité des Biofilms), et en particulier avec C.Regeard qui travaille depuis de nombreuses années sur l'étude la diversité des bactériophages issus d'environnements extrêmes, ainsi que sur le rôle des bactériophages dans l'émergence de mutants, aussi bien au sein de communautés microbiennes naturelles que dans le contexte de l'utilisation de ces virus pour la thérapie (phagothérapie).

Une collaboration avec l'Equipe d'Ecologie Microbienne de l'Université Claude Bernard – Lyon 1, et en particulier F.Bertolla, qui travaille sur la Bactériose de la laitue et la bactérie *Xanthomonas hortorum* pv. *Vitians*, nous permettra de pouvoir utiliser les souches isolées de *Xhv* dans la région Rhône-Alpes et bénéficier de leur expertise dans l'expression de la maladie en fonctions des facteurs climatiques, des paramètres physico-chimiques des sols, et des souches de *Xhv* isolées.

La chambre d'Agriculture de Seine-Maritime (M.Suire, N.Corroyer) participera également à ces travaux en nous faisant bénéficier de leur compétence dans le développement de la maladie sur le terrain, et en nous permettant de localiser et de travailler sur des champs de laitues infectés par *Xhv* dans la région normande.

Candidature :

Le stage aura lieu au LMSM sur le site de Mont Saint Aignan. Les candidatures ou demandes de renseignements sont à envoyer en format électronique à Laurent Quillet. Le M2 pourra se poursuivre par une thèse en fonction des opportunités de financement.