

Sujet de thèse: Présence dispersion et diversité des entérobactéries phytopathogènes pectinolytiques dans l'environnement, impact sur l'émergence des épidémies et sur l'évolution des souches pathogènes

Directeur de thèse:
Barny Marie-Anne

barny@agroparistech.fr et barny@upmc.fr

Co-directeur(s) titulaire(s) HDR:

Co-directeur(s) non-titulaire(s) HDR:

Jacques Pédron
Enseignant chercheur à l'UPMC
Encadrement pour la partie bioinformatique et analyse génomique

Equipe:

L'équipe Communautés microbiennes dans les écosystèmes continentaux (CoMIC) est une des équipes de l'Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Paris (iEES Paris) qui réunit 6 chercheurs et enseignant-chercheurs dont les objets d'étude sont les communautés microbiennes des écosystèmes continentaux. Les travaux de cette équipe sont développés avec la volonté 1) D'inscrire ses travaux dans un cadre théorique et conceptuel solide 2) De prendre en compte diverses échelles d'étude, allant par exemple, du gène à l'étude du fonctionnement des écosystèmes 3) De s'intéresser à l'ensemble des systèmes continentaux (terrestres et aquatiques) 4) De s'appuyer à la fois sur des approches de terrain et sur des expérimentations en milieux contrôlés 5) D'utiliser les outils de la biologie moléculaire, en particulier les nouvelles approches de séquençage à haut débit et la PCR quantitative.

Publications récentes des directeurs de thèse avec leurs anciens doctorants:

J'ai changé de thématique de recherche en 2014, les publications indiquées ne sont donc pas reliées à mon sujet actuel
Ma dernière doctorante Sabrina Siamer a soutenu sa thèse en 2013, voilà les articles auxquels elle a été associée pour son travail de thèse

1. Degrave A, Siamer S, Boureau T, Barny MA. (2015) Mol Plant Pathol. 16 (8), 899-905
2. S. Siamer, I. Guillas, M. Shimobayashi, C. Kunz, M.N Hall and M.A Barny (2014) J. Biol. Chem. 289: 18466-18477.
3. S. Siamer, S. Gaubert, T. Boureau, M-N. Brisset and M-A Barny (2013) FEMS Microbiol. Lett. 342:54-41
4. S. Siamer, O. Patrit, M. Fagard, N. Belgareh-Touzé, and M-A. Barny (2011) FEBS Open Bio 1:23-28.
5. T. Boureau, S. Siamer, C. Perino, S. Gaubert, O. Patrit, A. Degrave, M. Fagard, E. Chevreau and M-A Barny (2011) Mol. Plant Microbe Interact. 24: 577-584.

Descriptif du sujet de thèse et méthodes envisagées:

Les entérobactéries pectinolytiques (EBP) appartenant aux genres *Dickeya* et *Pectobacterium* 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 ou l'endive. Les EPB utilisent un cocktail d'enzymes impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire végétale comme principal facteur de virulence expliquant les symptômes de pourriture observés sur les plantes. Il existe une large communauté scientifique s'intéressant aux EBP pathogènes sur plantes, de nombreux génomes de souches pathogènes sont séquencés et l'émergence de nouvelles souches épidémiques est régulièrement observée.

Les mécanismes conduisant à l'émergence des ces souches épidémiques sont mal compris et nous faisons l'hypothèse que les réservoirs environnementaux non hôtes sont des éléments clés du processus d'émergence. Afin d'appréhender les processus d'émergence, nous cherchons au sein de l'équipe CoMic de l'IEES à mieux comprendre 1) quels sont les réservoirs environnementaux hébergeant les EBP et 2) quelle est la diversité des EBP associée à ces réservoirs. Le sujet de thèse proposé participe à la compréhension de ces deux aspects complémentaires.

1) Quels sont les réservoirs environnementaux hébergeant les EBP ?

La présence/abondance/diversité des EBP dans l'eau est attestée mais mal caractérisée. Nous avons échantillonné les EBP, depuis octobre 2015 sur une base trimestrielle, au niveau de 21 sites répartis le long du bassin versant de la Durance et de ses affluents. Ce bassin versant est intéressant car il présente un gradient d'altitude et d'urbanisation : la haute Durance est une rivière alpine tandis que la basse Durance participe à l'irrigation d'une région à vocation agricole. Cet échantillonnage a permis d'obtenir une représentation de la répartition des EBP le long de ce gradient et d'isoler 400 souches. Les paramètres physico chimique de l'eau échantillonnée ont été mesurés (T°, conductivité, pH, teneur en oxygène, nitrates, nitrites, azote et phosphore total dissous, DOC) et une analyse de l'usage des terres des sous-bassins versants est actuellement en cours en collaboration avec l'INRA d'Avignon. Cet échantillonnage prendra fin en octobre 2017. L'étudiant en thèse participera à la dernière campagne de prélèvement ainsi qu'à l'analyse des données recueillies. Notamment, il devra d'estimer en utilisant des analyses multivariées l'impact des facteurs physico-chimiques sur la distribution des EBP, il cherchera également à établir s'il existe un lien entre les distributions d'EBP observées et l'usage des terres.

Une autre niche réservoir que l'étudiant sera amené à explorer durant sa thèse est la niche insecte. En effet, des analyses de métagénomiques d'intestin d'insectes mettent en évidence des EBP. De plus les génomes des souches EBP pathogènes de plantes contiennent parfois des toxines d'insectes. Ces deux éléments suggèrent que les EBP peuvent être associées aux insectes. Durant les deux premières années de thèse, au printemps, les insectes seront capturés régulièrement dans des parcelles cultivées et les EBP associées seront isolés sur milieu semi sélectif CVP (Crystal Violet Pectate).

2) Quelle est la diversité EBP associées à ces réservoirs ? Ces souches peuvent elles participer directement ou indirectement à l'émergence de souches pathogènes ?

L'étudiant travaillera en priorité sur les EBP isolées dans le bassin versant de la Durance mais sera amené à décrire également la diversité des EBP associés aux insectes à l'aide des mêmes méthodologies.

Un premier positionnement phylogénétique des souches isolées sera effectué en amplifiant et en séquençant le gène de ménage *gapA* sur l'ensemble des souches de notre collection. Ce travail, déjà effectué pour 200 souches, indique que la diversité des souches de l'environnement est plus importante que la diversité des souches isolées de plantes malades. Ce travail devra être complété à l'ensemble des souches en collection.

Un sous ensemble de souches représentant une diversité maximale (environ 50) sera ensuite plus finement analysé. Leurs génomes seront séquencés, leur capacité à croître à différentes températures, leur mobilité et leur capacité métabolique (tests Biolog®) seront testées. Leur pouvoir pathogène sera analysé par inoculation sur différentes plantes hôtes. Ce test nous renseignera sur le potentiel pathogène direct de ces souches. On comparera également les génomes des EBP isolées avec ceux des EBP pathogènes. Le croisement de ces analyses permettra d'identifier des traits génomiques particuliers qui pourraient être utilisés comme marqueur d'agressivité.

Par ailleurs, dans les cas où certaines EBP isolées seraient non agressives sur plante, nous étudierons si ces souches peuvent participer

indirectement à l'émergence de souches pathogènes en évaluant leur capacité à se multiplier sur plante en présence/absence d'une souche pathogène.

Stratégie de publication:

La faible description des EBP en environnement non hôte devrait permettre plusieurs publications au cours de la thèse.

- 1) Le premier article qui devrait être finalisé en fin de première année de thèse s'intéressera à l'abondance et à la répartition des EBP dans le réseau hydrologique de la Durance en lien avec les caractéristiques physico-chimique de l'eau et l'usage des terres.
- 2) Le deuxième article s'intéressera au positionnement phylogénétique et à l'agressivité sur plante des EBP isolées dans le bassin versant de Durance
- 3) Le troisième article concernera la comparaison des génomes séquencés entre eux et avec ceux publiés des bactéries pathogènes sur plante.
- 4) Un quatrième article concernant le positionnement phylogénétique et l'agressivité sur plantes des EBP isolées d'insecte.

Réorientation possible du sujet si échecs:

Le sujet est très ouvert et comporte peu de risques associés à son déroulement étant donné que l'échantillonnage est déjà bien avancé et que la diversité des EBP observées est supérieure à celle observées avec les souches pathogènes. De plus, le financement déjà obtenu (ANR combicontrol ; projet Ec2co) nous permettent de séquencer rapidement le panel de souches qui sera plus finement analysé au cours de la thèse. Le risque principal concerne l'évaluation de la niche insecte qui est plus exploratoire mais je tiens néanmoins à y associer l'étudiant car il me semble important qu'il y ait un volet exploratoire dans un travail de thèse.

Faisabilité sur 3 ans (échancier):

Année 1:

- Dernière campagne d'isolement « Durance » octobre 2017
- Caractérisation phylogénétique de l'ensemble des souches « Durance » par séquençage du gène GapA. Choix des souches à analyser au niveau phénotypique.
- Participation à l'analyse des variables de l'environnement impactant la présence de EBP et à la rédaction article 1
- Première campagne d'isolement « Insecte »

Année 2:

- Tests phénotypiques : température, mobilité, biologie
- Tests sur plantes: au laboratoire test sur pomme de terre, à l'INRA d'Avignon test sur un panel de 5 plantes différentes (géranium, melon, maïs, tomate, carotte)
- Rédaction de l'article 2
- Début de l'analyse génomique
- Deuxième campagne d'isolement « Insecte »

Année 3:

- Positionnement phylogénétique GapA des souches « Insecte »
- Fin de l'analyse génomique
- Rédaction article 3, 4 et thèse

Profil du candidat recherché:

Compétences recherchées en microbiologie/bactériologie, analyse statistique. Les compétences en analyses phylogénétique et analyse comparative de génomes seraient un plus. Intérêt pour la recherche de terrain et en laboratoire, capacité à présenter ses résultats de manière synthétique, goût pour le travail en équipe.