

Projet de thèse : LES PHAGES, UN OUTIL DE BIOCONTRÔLE DES MALADIES DES PLANTES CAUSÉES PAR *PSEUDOMONAS SYRINGAE* ? ÉTUDE DE LA BIODIVERSITÉ DES PHAGES EN MILIEU AGRICOLE ET APPROCHES EXPÉRIMENTALES

Encadré par : Cindy Morris (HDR, PV INRAE), Annette Bérard (HDR, UMR 1114 EMMAH Avignon Université-INRAE), Clara Torres-Barceló (PV INRAE)

Partenaire : GRCETA Basse-Durance (groupement de conseillers agricoles qui apportent des conseils techniques aux producteurs ; www.grceta.fr)

Co-financement : 1/2 bourse de thèse département SPE INRAE

Résumé :

La thèse a pour objectif d'établir une base scientifique fiable pour l'utilisation efficace des phages (les virus des bactéries) comme agents thérapeutiques pour lutter contre des maladies bactériennes des plantes. Les phages, en tant que membres du microbiote naturel, sont des alternatives prometteuses aux antibiotiques dans le domaine médical, qui est confronté à l'émergence d'infections bactériennes résistantes aux antibiotiques. L'influence du contexte agricole sur la prédation des bactéries phytopathogènes par les phages n'est pas actuellement appréciée. En particulier, l'influence des pesticides, tel que le cuivre, sur la biodiversité et activité de ces phages n'a été jamais évalué. Ce projet de thèse vise à identifier les principaux facteurs de prévalence, de diversité et d'impact des phages sur la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* dans des vergers d'abricotiers de la région PACA, fréquemment impactés par le chancre bactérien. Les approches comprennent des analyses métagénomiques de la diversité et de la prévalence des phages dans le paysage agricole, des mesures environnementales, des études expérimentales avec phages, bactéries et contaminants en laboratoire, et la mise en place de collections de phages de *P. syringae* candidats pour le biocontrôle. Le projet permettra d'être à la pointe dans un domaine scientifique peu développé en France.

A. Enjeux scientifiques et socio-économiques

Les bactéries pathogènes représentent une menace croissante pour la santé humaine et la sécurité alimentaire, malgré des décennies de recherche consacrées à leur biologie^{1,2}. La gestion des maladies comprend l'amélioration génétique et déploiement de cultivars de plantes résistantes ou l'application de pesticides, dont certains à base de cuivre, largement appliqués en vergers. Des ravageurs résistants à ces deux mesures apparaissent de plus en plus souvent, et les métaux lourds tel que le cuivre se sont révélés toxiques pour l'environnement³⁻⁵. Les bactéries pathogènes ont leurs propres ennemis naturels, principalement des bactériophages (ci-après dénommés "phages"), qui sont des virus spécialisés qui n'infectent que les bactéries. Les phages apparaissent comme une stratégie prometteuse de lutte biologique contre les agents pathogènes, mais de nombreux défis subsistent⁶. Les phages font partie du microbiote associé aux plantes, mais on sait très peu de choses sur leur prévalence en milieu agricole et sur leur rôle dans l'écologie et l'émergence des maladies bactériennes des plantes⁷. La prédation par les phages pourrait modifier de manière significative la diversité génétique et le potentiel de virulence des bactéries dans les communautés microbiennes naturelles, mais ce type d'interactions est encore inexploré pour les pathogènes bactériens des plantes^{8,9}. Au niveau expérimental, le cuivre a une activité bactéricide et virucide, et c'est un facteur d'induction des prophages (les phages qui se trouvent intégrés dans le génome des bactéries) prouvé, mais son impact sur la biodiversité et l'activité des phages à des concentrations environnementales n'a pas été exploré dans les agrosystèmes^{10,11}. Les objectifs de ce projet sont de parvenir à une compréhension approfondie des interactions naturelles entre les phages et les bactéries pathogènes des plantes afin de gérer avec succès les maladies à l'avenir.

Pseudomonas syringae est un pathogène de plantes omniprésent, qui est à l'origine de jusqu'à 60 % des pertes de rendement dans une grande variété de cultures, notamment les arbres fruitiers et à noix, les légumes et les plantes ornementales¹². Il n'existe pas de mesures de gestion efficaces contre les maladies causées par *P. syringae*, et le secteur

agricole exige des solutions durables. *P. syringae* a un statut d'organisme modèle, avec de nombreuses données génétiques et phénotypiques disponibles. Dans ce projet, le/la doctorant.e élucidera la dynamique des populations de la bactérie phytopathogène *P. syringae* et de ses phages par la métagénomique et des approches expérimentales. À notre connaissance, aucune approche métagénomique de la dynamique des bactéries et de leurs phages en contexte agricole n'est disponible, mais elle pourrait révéler les relations entre la prévalence des phages et les maladies des plantes dans la nature, et indiquer quand et où appliquer des phages pour un contrôle efficace des maladies bactériennes. Des chercheurs en Italie, en Belgique, en Nouvelle-Zélande, au Chili ou en Corée ont isolé des phages qui infectent *P. syringae* et qui pourraient avoir le potentiel de contrôler les maladies induites¹³⁻¹⁵. Le projet proposé, et la collecte ultérieure de phages de *P. syringae*, sera sans précédent en France.

B. Questions de recherche

Le contexte agricole choisi est celui des abricotiers de la région PACA que l'unité INRAE-PV a étudié précédemment dans des projets comme le CASDAR CHABABRI (2017), et avec des nombreux producteurs.trices appartenant au groupement GRCETA, partenaire du projet¹⁶. Diverses variables agricoles (données épidémiologiques, paysagères et climatiques) des vergers seront récupérées. Des résultats récents de l'unité INRAE-PV démontrent que la variabilité génétique des souches de *P. syringae* pathogènes pour l'abricot est beaucoup plus importante que ce qui avait été signalé précédemment, et que la pathogénicité d'une souche ne peut être prédite par la position phylogénétique ou par des caractéristiques phénotypiques communes¹⁶. L'unité EMMAH a déjà montré que les produits phytopharmaceutiques (dont le cuivre) ont un impact important sur la biodiversité et les services écosystémiques dans les milieux aquatiques et les parcelles agricoles^{17,18}. Ce projet pourrait révéler le rôle des phages dans l'évolution et la pathogénicité des pathogènes bactériens des plantes.

Les questions scientifiques du projet sont les suivantes :

- 1) Les phages influencent-ils les communautés bactériennes et leur agressivité dans la nature ? Pour cela, le/la doctorant.e mettra en relation la présence et la diversité des phages et les caractéristiques bactériennes au cours du temps avec les variables phytosanitaires et agricoles.
- 2) La co-évolution expérimentale des phages et des bactéries en laboratoire permet-elle de prédire la virulence des bactéries vis à vis des plantes ? Cette tâche permettra d'identifier des relations de cause à effet qui ne sont pas nécessairement visibles dans les relations statistiques basées sur les données de terrain.
- 3) Les produits phytopharmaceutiques ont-ils un impact sur l'efficacité des agents de biocontrôle à contrôler les bactéries ? Pour cela, le/la doctorant.e utilisera le cuivre comme modèle, l'analysera dans le milieu agricole et testera *in vitro* son effet sur l'activité des phages.

Le projet comprend quatre approches :

1. Diversité des phages de *Pseudomonas syringae*

Contrairement aux bactéries, les phages ne partagent pas un gène commun et il est difficile d'associer leurs hôtes bactériens en se basant uniquement sur leur information génomique. Dans la première approche, le projet vise à compiler un catalogue de phages de *P. syringae* qui sera analysé ultérieurement dans la dynamique spatio-temporelle par un séquençage à haut débit. En s'appuyant sur les connaissances épidémiologiques du partenaire (GRCETA), le/la doctorant.e échantillonnera des vergers d'abricotiers (20 environ), dans des sites agricoles de la région PACA. Les échantillons seront prélevés dans des environnements associés à *P. syringae*, soit l'eau d'irrigation et la litière des vergers. À partir de ces échantillons, le/la doctorant.e créera une collection unique de phages de *P. syringae* que il/elle caractérisera avec précision. L'évaluation des familles de phages sera effectuée par microscopie électronique. Les génomes des phages des clones individuels isolés seront séquencés et analysés selon des méthodes récemment établies, pour estimer la diversité des phages présents dans nos échantillons¹⁹⁻²¹. Les phages sont connus pour être, en général, spécifiques d'une espèce ou sous-espèce bactérienne, ce qui constitue un avantage pour un agent de biocontrôle sûr. Le/la doctorant.e

évaluera la gamme d'hôtes des phages sur un panel de souches de *P. syringae* déjà présentes dans la collection du laboratoire et représentant la diversité génétique de ce complexe d'espèces. Cette première collection de phages de *P. syringae* en France abritera des candidats potentiels pour de futures approches de biocontrôle.

2. Biogéographie des phages

Les 20 vergers d'abricotiers seront échantillonnés à trois saisons différentes sur une période de deux ans. Le/la doctorant.e extraira l'ADN bactérien et viral, et estimera la diversité et la quantité relative des phages et de leurs hôtes *P. syringae* apparentés par une analyse métagénomique. En détail, il/elle entreprendra une analyse de gènes marqueurs ciblant des gènes bactériens spécifiques pour évaluer la diversité bactérienne et le séquençage de l'ensemble des génomes des phages pour évaluer leur diversité. Différents paramètres environnementaux et agroécologiques seront également compilés, notamment les variables climatiques, l'incidence passée et présente des maladies, les pratiques agricoles, les variétés de plantes et les données physico-chimiques sur l'eau d'irrigation et le sol. Le/la doctorant.e mettra en relation la présence et la diversité des phages et des bactéries et leur dynamique temporelle avec l'incidence des maladies et le type d'environnement, afin de tester l'hypothèse selon laquelle les phages influencent les communautés bactériennes de *P. syringae* et leur agressivité dans la nature.

3. Test expérimental pour valider l'hypothèse dérivée

La troisième approche consistera à quantifier expérimentalement les prédictions issues des données de terrain. Sur la base des résultats obtenus sur le terrain, des consortiums microbiens semi-naturels comprenant une sélection des variantes génétiques et des phages de *P. syringae* trouvés dans les environnements agricoles, seront mis en place en laboratoire. Au moins 3 types de consortiums microbiens avec 8 répliques chacun, seront cultivés et une proportion de la population transférée pendant 2 à 3 semaines dans du nouveau milieu pour permettre une croissance continue, à fin d'étudier l'évolution des bactéries et phages dans des conditions contrôlées. Le/la doctorant.e suivra la dynamique des phages-bactéries par des approches de séquençage et testera la virulence des bactéries survivantes dans des plantes. Cette approche expérimentale cherchera à comprendre les forces sélectives qui façonnent les traits génétiques et/ou phénotypiques des microbes dans un environnement simplifié.

4. Essai de l'effet du cuivre sur les phages

Ensemble à l'unité EMMAH, le/la doctorant.e identifiera les méthodes pour analyser la quantité de cuivre dans les environnements agricoles étudiés, tels que les litières des abricotiers et l'eau d'irrigation^{3,18}. Les résultats indiqueront les doses de cuivre environnementales à tester sur la viabilité d'au moins 5 phages candidats de la collection, et leur effet inhibiteur vis à vis de différentes souches de *P. syringae*.

C. Partenariat scientifique

Au sein de l'unité de Pathologie Végétale d'Avignon, ce projet bénéficiera de l'expertise de l'équipe Mistral en bactériologie et biocontrôle, et de l'équipe Virologie en virologie et évolution. Notre projet contribuera et bénéficiera des conférences, ateliers et collaborations du réseau français Phages.fr²². Le projet de thèse bénéficiera également de l'expertise de l'unité EMMAH, dans les domaines de l'écotoxicologie microbienne et de l'hydrophysique en contextes agronomiques et aquatiques^{3,17}. Le projet sera développé en étroite collaboration avec le partenaire agricole GRCETA, un organisme référent en matière d'arboriculture fruitière.

D. Références bibliographiques

1. Cox, J. A. G. & Worthington, T. The ' Antibiotic Apocalypse ' – Scaremongering or Scientific Reporting ? *Trends Microbiol.* **25**, 167–169 (2017).
2. Rios, A. C. *et al.* Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological Research* vol. 191 51–80 (2016).
3. Dorigo, U., Berard, A., Rimet, F., Bouchez, A. & Montuelle, B. In situ assessment of periphyton recovery in a river contaminated by pesticides. *Aquat. Toxicol.* **98**, 396–406 (2010).

4. Brunetto, G. *et al.* Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. *Chemosphere* vol. 162 293–307 (2016).
5. He, L. Y. *et al.* Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. *Appl. Soil Ecol.* **44**, 49–55 (2010).
6. Kingwell, K. Bacteriophage therapies re-enter clinical trials. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 515–516 (2015).
7. Koskella, B. & Taylor, T. B. Multifaceted Impacts of Bacteriophages in the Plant Microbiome. *Annu. Rev. Phytopathol.* **56**, 361–380 (2018).
8. Jensen, M. A., Faruque, S. M., Mekalanos, J. J. & Levin, B. R. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 4652–4657 (2006).
9. Seed, K. D. *et al.* Evolutionary consequences of intra-patient phage predation on microbial populations. *Elife* **3**, 1–10 (2014).
10. Soliman, M. Y. M., Medema, G., Bonilla, B. E., Brouns, S. J. J. & van Halem, D. Inactivation of RNA and DNA viruses in water by copper and silver ions and their synergistic effect. *Water Res. X* **9**, 100077 (2020).
11. Lee, L. H. *et al.* Induction of temperate cyanophage AS-1 by heavy metal - Copper. *BMC Microbiol.* **6**, (2006).
12. Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, R. W. & Mansfield, J. W. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: From 'has bean' to supermodel. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 617–627 (2011).
13. Frampton, R. A. *et al.* Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2216–2228 (2014).
14. Holtappels, D. *et al.* Preparing for the KIL: Receptor analysis of *pseudomonas syringae* pv. *porri* phages and their impact on bacterial virulence. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
15. Rabiey, M. *et al.* Phage biocontrol to combat *Pseudomonas syringae* pathogens causing disease in cherry. *Microb. Biotechnol.* **13**, 1428–1445 (2020).
16. Parisi, L. *et al.* Bacteria from four phylogroups of the *Pseudomonas syringae* complex can cause bacterial canker of apricot. *Plant Pathol.* **68**, 1249–1258 (2019).
17. Crouzet, O. *et al.* Soil photosynthetic microbial communities mediate aggregate stability: Influence of cropping systems and herbicide use in an agricultural soil. *Front. Microbiol.* **10**, 1–15 (2019).
18. Larras, F. *et al.* Pollution-induced community tolerance (PICT) as a tool for monitoring Lake Geneva long-term in situ ecotoxic restoration from herbicide contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 4301–4311 (2016).
19. Moraru, C., Varsani, A. & Kropinski, A. M. VIRIDIC—A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses. *Viruses* **12**, 1268 (2020).
20. Meier-Kolthoff, J. P. & Göker, M. VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics* **33**, 3396–3404 (2017).
21. Adriaenssens, E. M. & Rodney Brister, J. How to name and classify your phage: An informal guide. *Viruses* **9**, (2017).
22. Froissart, R., Brives, C., Breyton, C. & Le Marrec, C. 'French Phage Network' Annual Conference 2018-Fourth Meeting Report. in *Viruses* (2019). doi:10.3390/v11050470.