

Liste des abréviations

ANI	Average Nucleotid Identity
cDNA	ADN complémentaire
CFU	Colony Forming Unit
CNIPT	Comité National Interprofessionnel de la Pomme de Terre
COG	Cluster of Orthologs groups
CT	Cycle treshold
CVP	Cristal Violet Pectate
CWDE	Cell Wall Degradating Enzyme
Ddi	Dickeya dianthicola
DEGs	Differentially Expressed Genes
dpi	Days post Infection
Dsol	Dickeya solani
FN3PT	Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de terre
GTA	Gene transfer Agent
ha	Hectare
HGT	Horizontal gene tranfert
HRGP	Hydroxyproline
IAA	Acide Indole 3 Acétique = Auxine
IEES	Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement
InDels	Insertions / Délétions
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
Kb	Kilobase
LFC	Log de Fold Change
LPS	Lipopolysaccharide
MAP	Microbiologie Adaptation, Pathogénie
Mb	Mégabase
MCP	Méthyl accepting Chemotaxis Protein
MLSA	Multi Locul Sequence Analysis
NAHL	N-Acyl Homosérine Lactone
PAMs	Peptides Anti Microbien
PB	Phosphate Buffer
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QS	Quorum Sensing
ROS	Reactive Oxygen species
rpm	Rotation par Minute
RT	Reverse Transcriptase
SIPRE	Semence, Innovation, Protection, Recherche, Environnement

SNPs	Single Nucleotide Polymorphisme
spp	Species pluralis
subsp	Sub species
TCS	Two Component System
TE	Tampon d'Elution
TY	Tryptone Yeast
UV	Ultra Violet
WT	Wild Type

Table des matières

Remerciements	1
Liste des abréviations	3
Avant-propos	9
Chapitre I : Introduction Générale	15
1. Le genre bactérien <i>Dickeya</i> et <i>Pectobacterium</i>	15
1.1. Taxinomie.....	15
1.2. Génomes	16
2. Epidémiologie	17
2.1. Les maladies de la jambe noire et de la pourriture molle.....	17
2.2. Emergence et distribution des <i>Dickeya spp.</i>	18
2.3. Distribution des hôtes de <i>Dickeya spp.</i>	20
3. Pouvoir pathogène et processus infectieux	20
3.1. Voie d'entrée et processus infectieux des <i>Dickeya</i>	20
3.2. Déterminants de la virulence.....	21
3.2.1. Les enzymes de dégradation de la paroi végétale	22
3.2.2. Les systèmes de sécrétion.....	22
3.2.3. La mobilité et le chimiotactisme	23
3.2.4. Production de sidérophores	23
3.2.5. Autres facteurs de virulence	23
3.3. Régulation de la virulence.....	24
3.4. Quorum sensing chez <i>Dickeya</i>	26
3.5. Bilan sur la pathogénie des <i>Dickeya</i>	28
4. Adaptation de la bactérie à son environnement	28
4.1. Adaptation à l'environnement acide et aux peptides anti-microbiens.....	28
4.2. Adaptation aux conditions d'anaérobiose dans les tissus végétaux.....	29
4.3. Adaptation aux ROS produits par la plante en réponse à l'infection.....	30
4.4. Adaptation au stress osmotique résultant de la lyse des cellules végétales	30
4.5. Le transfert horizontal de gènes.....	31
5. Invasion biologique : terminologie et définitions	34
5.1. Concept d'envahisseur.....	35
5.2. Concept d'établissement d'une communauté	35
5.3. Conséquence de l'invasion	36
Objectifs de thèse	37
Chapitre II : Répartition des populations pathogènes au sein de parcelles – Problématique de distribution	41
1. Contexte scientifique.....	41
2. Présentation des travaux.....	41
3. Contributions	42

4. Materials and Methods.....	43
5. Results.....	44
6. Discussion.....	47
Chapitre III : Pathogénicité, compétition et exploitation de la niche écologique chez <i>D. dianthicola</i> et <i>D. solani</i>	51
1. Contexte scientifique.....	51
2. Présentation des travaux.....	51
3. Contributions	51
4. Material and methods.....	53
5. Results.....	57
6. Discussion.....	69
Chapitre IV : Expression des fonctions de virulence et exploitation de la niche des <i>D. dianthicola</i> et <i>D. solani</i>	73
Partie 1 : Etude de l'expression des gènes associés à la virulence.....	73
1. Contexte scientifique.....	73
2. Présentation des travaux.....	73
3. Contributions	74
4. Material and methods.....	75
5. Results.....	79
6. Discussion.....	89
Partie 2 : Etude du transcriptome de <i>D. solani</i>	91
1. Contexte scientifique.....	91
2. Présentation des travaux.....	91
3. Contributions	91
4. Material and methods.....	93
5. Results.....	95
6. Discussion.....	101
Chapitre V : Discussion générale et perspectives.....	105
Références Bibliographiques	115
Annexes	125

Avant-propos

Avant-propos

La pomme de terre est originaire de la Cordillère des Andes où elle poussait à l'état sauvage. Domestiquée par les Incas il y a plus de 8000 ans, elle fut introduite d'abord au XVI^{ème} siècle en Espagne par les conquistadors de retour des Amériques. Elle se diffuse vers l'Italie puis le sud de la France et l'Allemagne. Il faudra attendre le milieu de ce même siècle pour une propagation en Angleterre. En France, avant 1700, elle était réservée à l'alimentation des animaux. Ce n'est qu'au cours du XVIII^{ème} siècle que les efforts de promotion d'Antoine Parmentier et le travail des sélectionneurs ont permis le développement de sa culture.

La pomme de terre appartient à la famille des Solanacées qui compte plusieurs espèces cultivées comme le tabac (*Nicotiana tabacum*), la tomate (*Solanum lycopersicum*), l'aubergine (*Solanum melongena*) ou les piments (*Capsicum spp.*). Le genre *Solanum* regroupe environ 1100 espèces dont plus de 200 sont tubéreuses (Rousselle et al, 1996). On recense aujourd'hui plusieurs milliers de variétés de pomme de terre dans le monde entier. En France, environ 200 sont inscrites au catalogue officiel des espèces et variétés végétales, et donc autorisées à la culture. On estime à une bonne centaine les variétés cultivées actuellement. Les cultivars de pomme de terre sont autotétraploïdes et hétérozygotes (48 chromosomes = $2n = 4x$). Son génome, séquencé lors du projet *international Potato Genome Sequencing Consortium* en 2011, est composé de 844 Mpb et 39 031 gènes (Xu et al., 2011).

La pomme de terre possède d'une part un système aérien et un système souterrain d'autre part (Figure 1). Ce dernier comprend le tubercule mère, le système racinaire et les tiges souterraines ou stolons qui se développeront pour donner naissance aux tubercules fils. Dès sa formation, le tubercule de pomme de terre subit une période de repos végétatif. D'origine physiologique et appelé dormance vraie, ce phénomène empêche le tubercule de germer même s'il est dans de bonnes conditions de germination (température de 18 à 20°C, hygrométrie supérieure à 90%). Cette première phase est suivie d'une période de dormance déterminée par des conditions défavorable au développement de la plante. Cette période de repos végétatif peut varier de 17 à 40 semaines selon les variétés. Le cycle annuel de la pomme de terre se déroule en 3 étapes clés (Figure 2) :

- Une phase de croissance végétative : le tubercule planté en terre va donner à partir de ses germes, des tiges feuillées et des rameaux au-dessus du sol, et des stolons au-dessous du sol.
- Une phase de tubérisation : les extrémités des stolons cessent de croître et se renflent pour donner naissance aux ébauches des tubercules fils. Cette étape se prolonge jusqu'à la mort

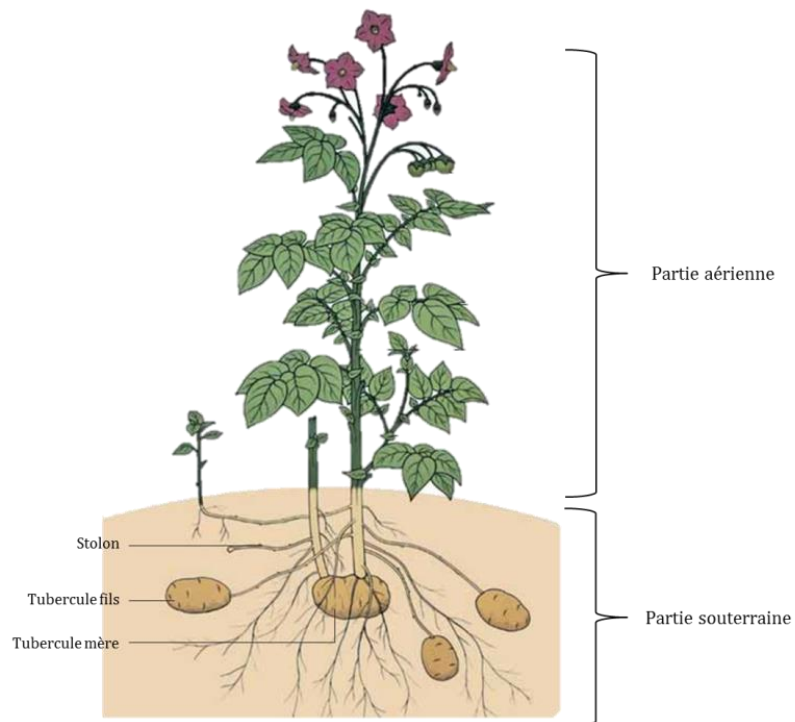


Figure 1: Représentation schématique d'un plant de pomme de terre

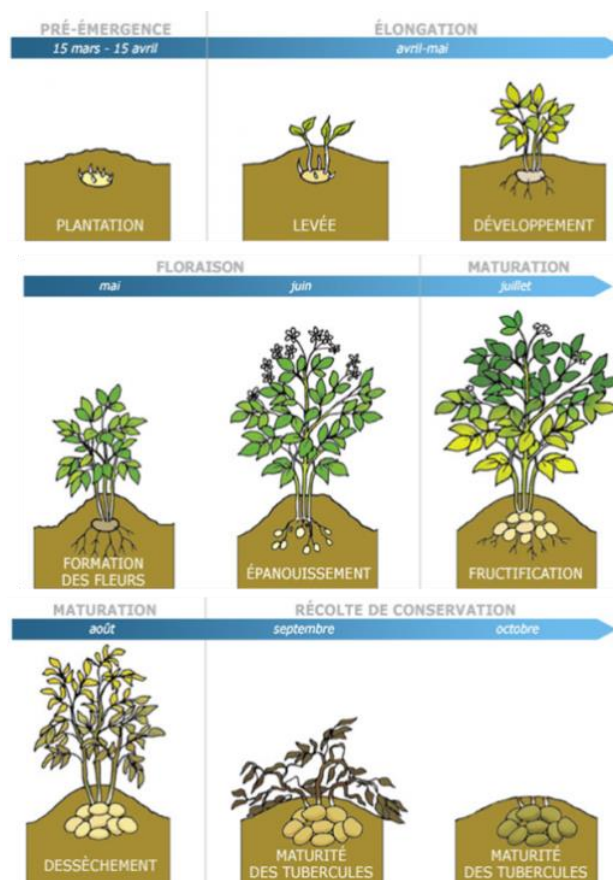


Figure 2 : Cycle de la pomme de terre

- de la plante. Les tubercules fils sont matures lorsque le feuillage de la plante est complètement desséché.
- Une phase de repos végétatif : à la mort de la plante (qu'elle soit naturelle ou artificielle) les tubercules fils sont incapables de germer.

La consommation moyenne annuelle mondiale est estimée aujourd'hui à 32 kg/ habitant. L'Asie consomme près de la moitié des pommes de terre produites dans le monde mais au vu de sa population, sa consommation annuelle par habitant est modeste, 24 kg en 2005. Les plus gros consommateurs restent les Européens avec une consommation de près de 87 kg/habitant/an (source : FAOstat 2012). Aujourd'hui, malgré une consommation moins importante qu'il y a 50 ans, la pomme de terre reste un produit incontournable de l'alimentation des Français, ils en consomment environ 50 kg/habitant/an (source : CNIPT).

Solanum tuberosum est cultivée dans plus de 150 pays et représente aujourd'hui la 4ème culture vivrière la plus importante à l'échelle mondiale après le maïs, le riz et le blé (Thomas et Sansonetti, 2009). Les surfaces mondiales de culture sont en constante augmentation surtout dans les pays en voie de développement (Leff *et al.*, 2004). Environ 380 millions de tonnes sont produites dans le monde dont 80 % en Europe et en Asie (Zaag and Horton, 1983) (FAOstat, 2014) (Figure 3). La France, avec une production de plus de 8 millions de tonnes sur une surface d'environ 170 000 ha était en 2014 au 8ème rang mondial et au 3ème rang européen des pays producteur de pomme de terre.

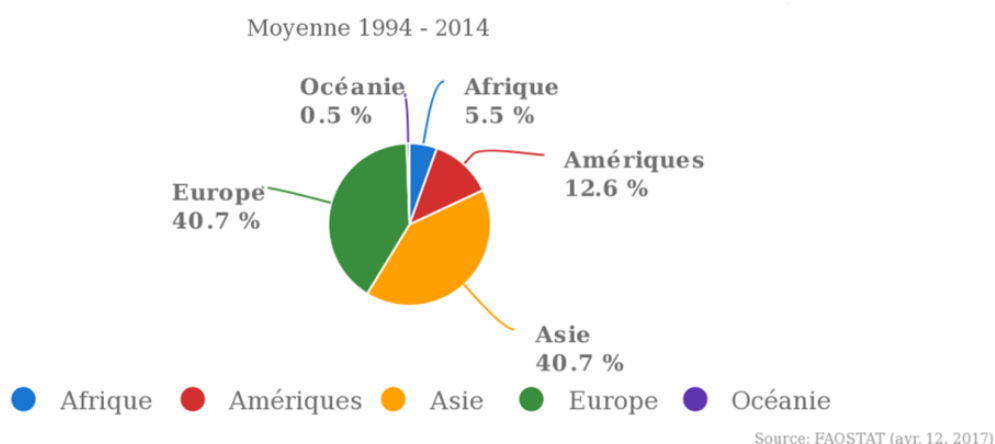


Figure 3 : Répartition de la production de pomme de terre dans le monde.

En France, la production de pommes de terre est organisée en 3 filières : la filière consommation (pommes de terre destinées au marché du frais, à la conservation et à la transformation), la filière féculé (destinées à l'industrie papetière, l'agro-alimentaire, les matériaux et le textile...) et la filière plants ou semences (destinées à de nouvelles plantations) qui représente 10 % de la production annuelle. Les tubercules de consommation et féculé qui représentent respectivement 75% et 15% de la production annuelle sont produits à partir de tubercules de plants sains, contrôlés et certifiés. Environ 340 000 plants de pommes de terre ont été certifiés en 2013.

La pomme de terre peut être la cible de nombreuses maladies (plus de 200 recensées en France), causées par différents agents pathogènes (champignons, bactéries, virus) ou ravageurs (pucerons, doryphores, nématodes...) qui peuvent toucher tant les cultures que les tubercules en conservation (Arora and Khurana, 2004). Même si les ravageurs sont à la base d'importants dommages sur les cultures de pomme de terre et font l'objet de recherches actives, les plus néfastes et les plus étudiés restent les agents pathogènes. La perte de rendement due à ces agents pathogènes est estimée à 2% en France (rapport annuel de la FN3PT de 2010). La maladie la plus importante dans le monde est sans conteste le mildiou, dû à *Phytophthora infestans*, un oomycète. Cette maladie continue de causer des dégâts dans toutes les régions où les conditions environnementales lui sont favorables. On estime à 4 milliards d'euros le coût annuel induit par le mildiou de la pomme de terre au niveau mondial.

Les virus ont, eux, une importance économique non négligeable puisque 10% des motifs de refus à la certification des plants en France étaient dus aux maladies virales en 2010 (rapport annuel de la FN3PT de 2010). L'une des maladies virales les plus sérieuses est la maladie des tâches annulaires nécrotique causée par le virus Y de la pomme de terre (PVY). Ce virus de la famille des Potyviridae rend les tubercules impropres à la vente. Les virus sont souvent transmis par des insectes comme le puceron qui sont les principaux vecteurs.

Les bactéries sont aussi responsables de dégâts importants sur les cultures de pomme de terre. Les bactéries macergènes *Pectobacterium* et *Dickeya*, responsables de la jambe noire sur tige et de la pourriture molle sur tubercule étaient à elles seules, responsables de près de 50% des motifs de refus français en 2010 (rapport annuel de la FN3PT de 2010), ce qui représente une perte économique de l'ordre de plusieurs millions d'euros.

Chapitre I

Chapitre I : Introduction Générale

1. Le genre bactérien *Dickeya* et *Pectobacterium*

1.1. Taxinomie

Les bactéries pectinolytiques du genre *Dickeya* et *Pectobacterium* sont des bacilles de la famille des Enterobacteriaceae. Elles sont anaérobies facultatives et munies de flagelles péritriches (Charkowski, 2006). Ces phytopathogènes provoquent le flétrissement, la pourriture de la tige et la maladie de la pourriture molle sur de nombreuses cultures. Elles se distinguent des autres entérobactéries pathogènes par les nombreuses enzymes de dégradation de la paroi cellulaire végétale qu'elles produisent. Au cours des dernières décennies, les entérobactéries qui causaient la maladie de la pourriture molle étaient classées dans le genre *Erwinia* (Winslow *et al.*, 1920).

Après la première proposition de Waldee en 1942, des travaux de phylogénie, basés sur des données d'hybridation ADN-ADN, la sérologie, les caractéristiques phénotypiques et biochimiques, ainsi que l'analyse des séquences ADN (Hauben *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 1997) ont conduit à un changement de nomenclature des *Erwinia* pectinolytiques vers le genre *Pectobacterium*. Cependant, les avancées scientifiques en taxinomie ont permis l'obtention d'une nouvelle nomenclature reclassifiant ainsi les *Pectobacterium* en deux genres distincts : les *Pectobacterium chrysanthemi* deviennent les *Dickeya* et les *Pectobacterium carotovorum* deviennent les *Pectobacterium* (Samson *et al.*, 2005). *In fine*, cette classification est maintenue avec plusieurs espèces et sous espèces. Le genre *Dickeya* est très diversifié avec de nombreuses espèces divisées en différents pathovars et biovars (Charkowski, 2006; Nassar *et al.*, 1996). Les principales espèces de *Dickeya* associées à la pourriture molle de la pomme de terre sont *D. dianthicola*, *D. dadantii*, *D. paradisiaca*, *D. chrysanthemi* et *D. zae* (Samson *et al.*, 2005). Récemment, une nouvelle espèce émergente, *D. solani* a été identifiée dans plusieurs pays européens (Toth *et al.*, 2011). Le Tableau 1 ci-après résume et reprend les changements de nomenclature des genres *Dickeya* et *Pectobacterium* associés à la pomme de terre.

Ancienne Nomenclature	Nomenclature proposée	Hôte	Référence
<i>Erwinia carotovora</i>			
<i>subsp. atroseptica</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Pomme de terre, tomate	(Gardan <i>et al.</i> , 2003)
<i>subsp. betavasculorum</i>	<i>P. betavasculorum</i>	Betterave, tournesol, pomme de terre, artichaut	(Gardan <i>et al.</i> , 2003)
<i>subsp. brasiliensis</i>	<i>P. carotovorum subsp. brasiliense</i>	Pomme de terre	(Duarte <i>et al.</i> , 2004; Nabhan <i>et al.</i> , 2012)
<i>subsp. carotovora</i>	<i>P. carotovorum</i>	Plusieurs hôtes	(Hauben <i>et al.</i> , 1998)
<i>subsp. odorifera</i>	<i>P. carotovorum subsp. odoriferum</i>	Chicorée, poireau, céleri	(Hauben <i>et al.</i> , 1998)
<i>subsp. wasabiae</i>	<i>P. wasabiae</i>	Raifort	(Gardan <i>et al.</i> , 2003)
<i>subsp. parmentieri</i>	<i>P. parmentieri</i>	Pomme de terre	(Khayati <i>et al.</i> , 2016)
<i>E. chrysanthemi</i>			
	<i>P. chrysanthemum</i>	Plusieurs hôtes	(Hauben <i>et al.</i> , 1998)
<i>pv. dieffenbachia</i> (2, 3)	<i>Dickeya dieffenbachia</i> <i>D. dadantii</i>	Plusieurs hôtes	(Samson <i>et al.</i> , 2005)
<i>pv. dianthicola</i> (1, 7, 9)	<i>D. dianthicola</i>	Plusieurs hôtes	(Samson <i>et al.</i> , 2005)
<i>pv. paradisiaca</i> (3)	<i>D. paradisiaca</i>	Plusieurs hôtes	(Samson <i>et al.</i> , 2005)
<i>pv. zaeae</i>	<i>D. zaeae</i>	Plusieurs hôtes	(Samson <i>et al.</i> , 2005)
<i>pv. chrysanthemi</i>	<i>D. chrysanthemi</i>	Plusieurs hôtes	(Samson <i>et al.</i> , 2005)
<i>pv. parthenii</i>	<i>D. chrysanthemi</i> <i>D. solani sp. nov.</i>	Pomme de terre	(Jan M. van der Wolf <i>et al.</i> , 2014)

Tableau 1 : Récapitulatif de la nomenclature des espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya*. Modifié d'après Charkowski (2006).

1.2. Génomes

Aujourd'hui, le génome de nombreuses souches de *Dickeya* a été séquencé et sont disponibles sur NCBI (Khayati *et al.*, 2014; Leighton Pritchard *et al.*, 2013; Raoul Des Essarts *et al.*, 2015). Ces séquences montrent que la taille des génomes des entérobactéries du genre *Dickeya* ne dépasse pas les 5 Méga bases et que chaque espèce dispose d'un core-génome largement conservé. Peu de génomes de *Dickeya* contiennent des éléments plasmidiques (Khayati *et al.*, 2015; L. Pritchard *et al.*, 2013). La séquence du génome de la souche type de *D. solani* représentée Figure 4 a récemment été publiée et révèle un chromosome circulaire unique de 4,9 Mb et un pourcentage en GC approchant les 56%. L'annotation prédit 4208 gènes incluant 4059 séquences codantes, 104 gènes ARN et 45 pseudo-gènes (Khayati *et al.*, 2016). Les arbres phylogénétiques construits à partir des séquences du gène *fliC* montrent une proximité forte entre les différentes espèces de *Dickeya* (van Vaerenbergh *et al.*, 2012). Des études de génomique comparative ont révélé que 3700 gènes sont conservés entre *D. solani* 3337 et *D. dadantii* 3937, incluant les gènes de virulence (Pédron *et al.*, 2014). Moins de 100 variations (SNPs/InDels) entre les génomes d'une population de *D. solani* ont été détectées lors d'une étude récente et la présence de transferts horizontaux inter et intra-spécifique de gènes a été rapportée prouvant la plasticité des génomes du genre *Dickeya* (Khayati *et al.*, 2015).

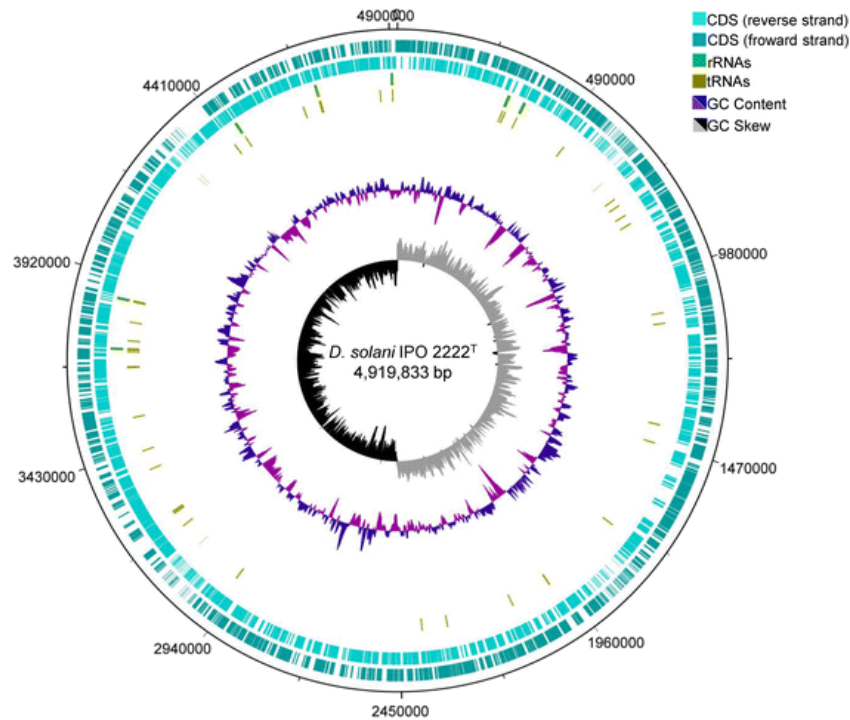


Figure 4 : Carte du chromosome circulaire de la souche *D. solani* IPO2222. D'après Khayi et al. (2016)

2. Epidémiologie

2.1. Les maladies de la jambe noire et de la pourriture molle

Les bactéries pathogènes du genre *Dickeya* sont difficilement contrôlables en raison de leur capacité de persistance dans les sols ou de latence asymptomatique sur le tubercule mère. Elles peuvent ainsi être répandues par plusieurs vecteurs comme les eaux d'irrigation ou les insectes. Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables (température, humidité) elles peuvent se multiplier et infecter rapidement les plantes ou les tubercules (Pérombelon, 2002). Ces pathogènes disposent d'un arsenal enzymatique important regroupant des pectinases, des cellulases, des protéases et des xylanases capables de dégrader la paroi végétale et causer ainsi les maladies de la jambe noire et de la pourriture molle (Charkowski, 2006). Les symptômes de la maladie s'expriment en végétation et/ou en stockage. En végétation, un manque de levée, résultant de la pourriture précoce du tubercule semence ou de l'attaque des germes avant ou lors de l'émergence peut s'observer rapidement après plantation (Pérombelon *et al.*, 1988). Le symptôme le plus typique est celui de la jambe noire sur tige (Figure 5, A), variant d'une pourriture humide brun foncée à noire de la base des tiges, à des nécroses plus ou moins sèches. Ce symptôme est provoqué par les bactéries, qui une après avoir attaqué le tubercule mère, remontent jusqu'à la tige, l'envahissent et la dégradent grâce à leur activité pectinolytique (Pérombelon, Kelman, 1987). Dans certains cas seule des nécroses internes suivies d'un phénomène de « tiges creuses » se développent. Des jaunissements et/ou flétrissement du feuillage peuvent être associés à la

jambe noire et sont favorisé par des conditions climatiques chaudes et sèches (Hélias, 2008). Les symptômes peuvent se présenter sur une seule tige de la plante comme sur plusieurs et peuvent ou non être associés entre eux. Les tubercules peuvent aussi présenter des symptômes qui se développent pendant la culture ou durant le stockage. Ces symptômes se traduisent par des pourritures molles et humides du tubercule, très souvent nauséabondes (Figure 5, C). En conservation, les pourritures molles peuvent entraîner la contamination rapide des tubercules avoisinants. Dans le cas d'attaques localisées aux lenticelles, les pourritures sont qualifiées de lenticellaires (Figure 5, B). Un séchage adéquat des tubercules peut toutefois bloquer leur développement (Hélias, 2008).

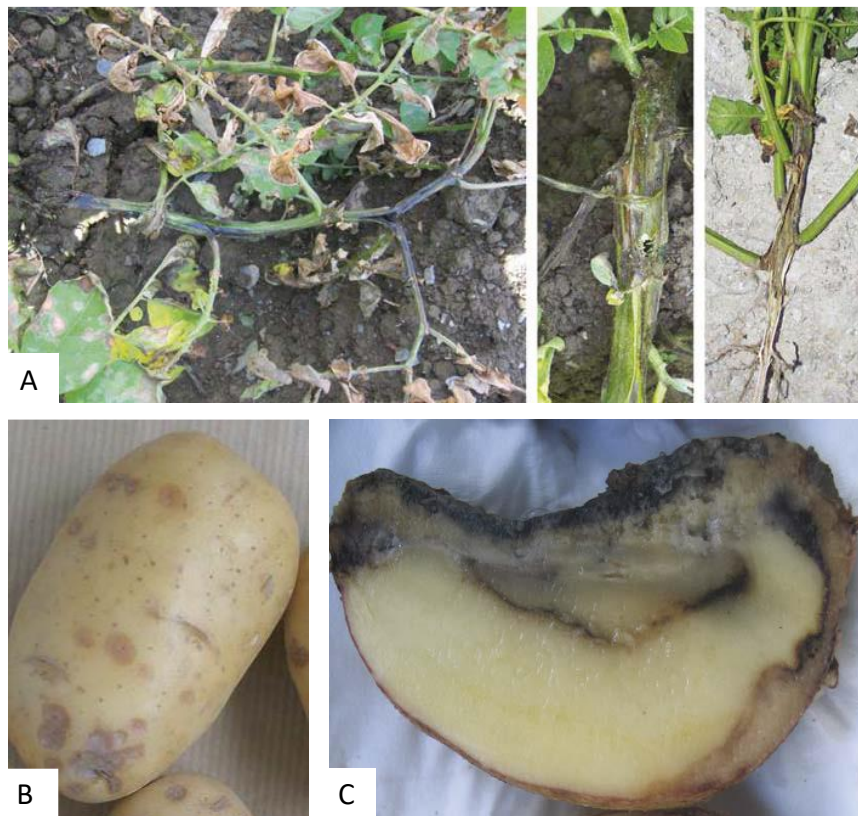


Figure 5 : Symptômes de jambe noire et de pourriture molle sur *Solanum tuberosum*. **A**, symptôme de jambe noire sur tige. **B**, Pourriture lenticellaire. **C**, pourriture molle sur tubercule. D'après V. Hélias (2008)

2.2. Emergence et distribution des *Dickeya* spp.

Avant les années 1970, les *Pectobacterium* étaient les uniques responsables de la maladie de la jambe noire en France. La plupart des souches de *Dickeya* sont considérées comme adaptées aux températures élevées et sont donc fréquentes dans les climats chauds et tropicaux. Cependant, depuis environ 40 ans, *D. dianthicola* est aussi associée aux maladies de la jambe noire et de la pourriture molle sur les plants de pommes de terre en Europe. En conséquence les isolats

européens de *D. dianthicola* sont donc considérés comme adaptés à un climat plus frais. Au cours de la dernière décennie, des souches de *Dickeya* appartenant à un nouveau clade ont été isolées de plants de pomme de terre malades dans de nombreux pays. En 2004-2005, des souches de *Dickeya* atypiques ont été identifiées en Finlande à partir de plants de pommes de terre présentant des symptômes de pourriture et de flétrissement de la tige et des tubercules présentant une pourriture (Laurila *et al.*, 2008). Des souches de *Dickeya* similaires ont été identifiées après 2005 à partir de plantes symptomatiques dans plusieurs pays européens (Sławiak *et al.*, 2009), en Israël (Tsrör *et al.*, 2009) et en Géorgie (Tsrör Lahkim *et al.*, 2011). Ces souches ont été décrites comme une nouvelle espèce appelée *Dickeya solani* (J. M. van der Wolf *et al.*, 2014). Des souches similaires ont été identifiées à partir de plantes ornementales aux Pays-Bas, ce qui a conduit à l'hypothèse que *D. solani* est passé des plantes ornementales à la pomme de terre aux Pays-Bas, et il se répand maintenant avec des tubercules de pommes de terre (Toth *et al.*, 2011). Aujourd'hui, les pathologies à *Dickeya* sévissent partout dans le monde, essentiellement en zones tropicales et subtropicales, mais sont aussi retrouvées dans les régions tempérées comme l'Europe (Figure 6).



Figure 6 : Répartition connue des *D. dianthicola* sur tous les hôtes en Europe ainsi que la distribution de *D. solani* et d'autres espèces de *Dickeya* sur pomme de terre en Europe. (●) Distribution de *D. dianthicola* sur tous les hôtes ; (⊠) *Dickeya* spp. sur pomme de terre ; (○) *D. solani* sur pomme de terre. D'après Toth *et al.* (2011).

2.3. Distribution des hôtes de *Dickeya* spp.

Les bactéries du genre *Dickeya* sont pathogènes d'un grand nombre de plantes, comprenant 16 familles de dicotylédones et 10 familles de monocotylédones, avec comme hôtes remarquables la banane, le maïs, la pomme de terre et la tomate (Ma *et al.*, 2007; Samson *et al.*, 2005). Outre les plantes d'intérêts agronomiques majeurs, les *Dickeya* toutes espèces confondues s'attaquent à de nombreuses plantes ornementales (ex. chrysanthème). La pourriture des bulbes causée par les *Dickeya*, et notamment *D. zeae* est l'une des maladies majeures rencontrée sur les jacinthes entraînant des pertes économiques importantes aux Pays-Bas (Jafra *et al.*, 2009) (Figure 7).

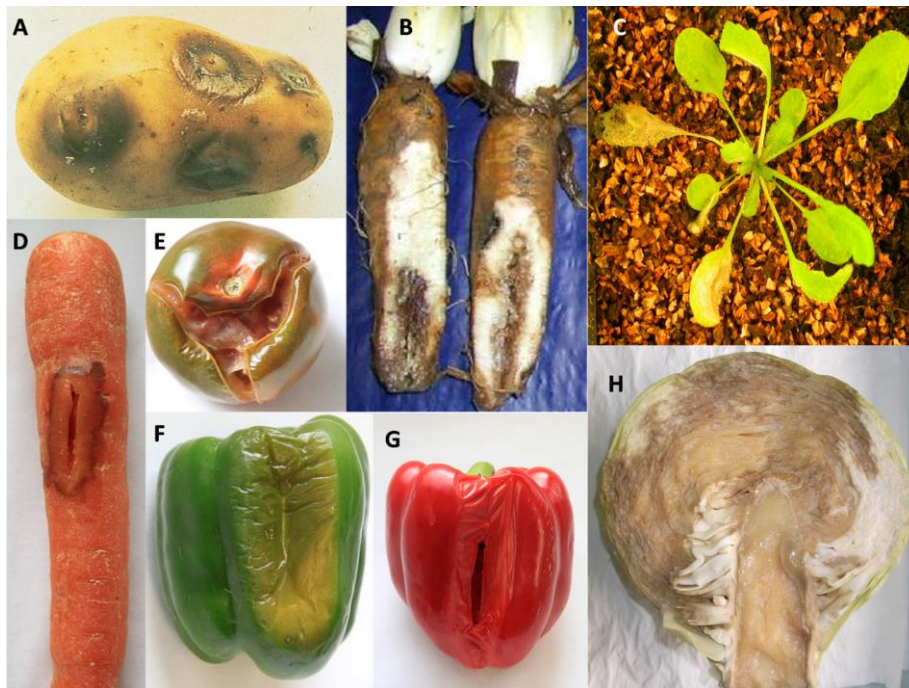


Figure 7 : Symptômes typique de pourriture molle causée par *Dickeya* sur différentes plantes hôtes. **A**, tubercule de pomme de terre. **B**, Racines d'endives. **C**, *Arabidopsis thaliana*. **D**, Carotte. **E**, Tomate. **F**, Poivron vert. **G**, Poivron rouge. **H**, Chou. D'après Reverchon *et al.* (2013).

3. Pouvoir pathogène et processus infectieux

3.1. Voie d'entrée et processus infectieux des *Dickeya*

Dickeya peut vivre comme épiphyte ou comme saprophyte dans les sols ou dans les eaux souterraines jusqu'à rencontrer un hôte potentiel. Elles y sont fortement compétitives et excluent d'autres bactéries par inhibition de croissance par contact en impliquant les systèmes de sécrétion de type V et VI (Aoki *et al.*, 2010). Les 3 stades principaux lors de l'infection du végétal sont :

- Adhésion à la surface de la plante et pénétration dans les tissus par les blessures ou ouvertures naturelles
- Invasion de l'apoplaste

- Dégradation de la paroi

Dickeya peut résider dans les espaces intercellulaires végétaux, causant une infection latente, ne présentant aucun symptôme. Différents obstacles doivent être surmontés afin de permettre la multiplication des bactéries et déclencher la maladie (disponibilité de nutriments, défenses de l'hôte). Cependant la principale condition environnementale permettant le passage de la période de latence à la maladie est la disponibilité en eau (Pérombelon, 2002). La maladie se manifeste alors par la destruction des parois des cellules végétales entraînant l'apparition de pourriture. Cette destruction résulte, comme détaillé ci-dessous, de l'expression d'une batterie d'enzymes comme les pectinases, les protéases et les cellulases.

3.2. Déterminants de la virulence

Chez le genre bactérien *Dickeya*, la plupart des études de génétique et de virulence ont été réalisées chez la souche *Dickeya dadantii* 3937 isolée de *Saintpaulia ionantha*, qui est aujourd'hui la souche modèle la plus étudiée parmi les *Dickeya*. *D. dadantii* 3937 est capable d'infecter un grand nombre de plantes, incluant la pomme de terre et cause des symptômes de jambe noire. La paroi cellulaire de la plante est un maillage complexe et dynamique de polymères (cellulose, hémicellulose, pectine) et représente une barrière que *Dickeya* doit traverser pour coloniser le tissu végétal (Figure 8).

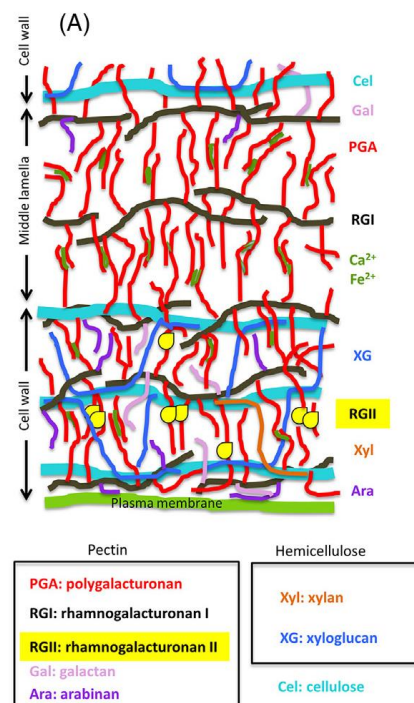


Figure 8 : Schéma simplifié de la structure de la paroi d'une cellule végétale. D'après Reverchon et al., (2016)

3.2.1. Les enzymes de dégradation de la paroi végétale

La virulence de *Dickeya* est fortement corrélée à sa capacité à synthétiser et à sécréter des enzymes dégradant la paroi cellulaire végétale (ou cell wall degrading enzymes, CWDE), comprenant de nombreuses pectinases qui jouent un rôle prépondérant dans la virulence des *Dickeya* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014). Parmi ces pectinases, se trouvent des dizaines de pectates-lyases, des pectine-estérases, une pectine-lyase, des polygalacturonases et une oligogalacturonate-lyase. Cette grande diversité de pectinases est sans doute associée à la grande complexité du polymère à dégrader qu'est la paroi de la cellule végétale. Parmi les CWDE, *Dickeya* exprime aussi deux cellulases, EGZ et EGY, codées par les gènes *celZ* et *celY* respectivement, qui semblent jouer un rôle mineur dans la pathogénie. Pour finir, *Dickeya* exprime 4 protéases PrtA, PrtB, PrtC et PrtG (Wandersman *et al.*, 1987), une glucuronoxylanase, XynA (Keen *et al.*, 1996) et une endogalactanase périplasmique, GanA (Delangle *et al.*, 2007).

3.2.2. Les systèmes de sécrétion

La sécrétion de molécules joue un rôle primaire dans l'interaction du pathogène avec son hôte. Chez les bactéries à coloration de Gram négative, 6 systèmes de sécrétion ont été décrits jusqu'à présent (Figure 9) (Tseng *et al.*, 2009). Lors de l'infection de la cellule hôte, *Dickeya* utilise principalement les systèmes de sécrétion I, II et III.

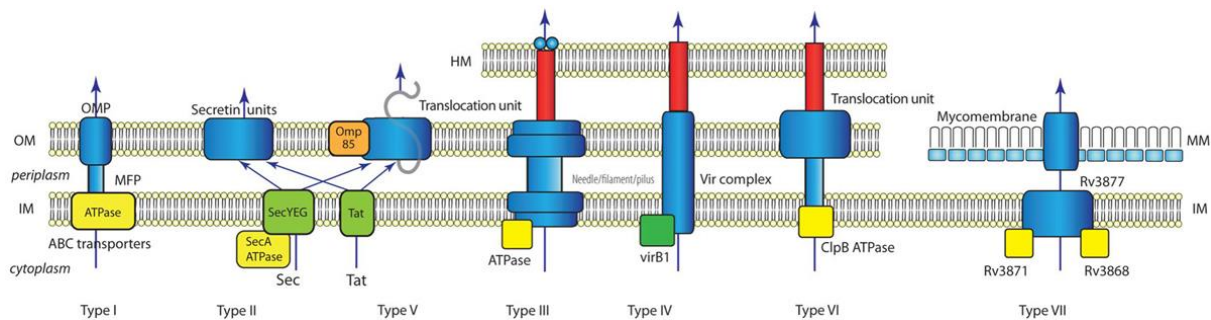


Figure 9 : Schéma simplifié des systèmes de sécrétion chez les bactéries. **HM**, membrane de l'hôte. **OM**, membrane externe. **IM**, membrane interne. **MM**, mycomembrane. **MFP**, protéine fusionnée à la membrane. **OMP**, protéine de membrane externe. Les ATPases et protéines chaperonnes sont colorées en jaune. D'après Tseng *et al.*, (2009)

Les pectinases et cellulases sont sécrétées par les systèmes de sécrétion de type II et les protéases par le système de sécrétion de type I (Reverchon and Nasser, 2013). La mutation du système de sécrétion de type II inhibe la macération des tissus, ce qui illustre l'importance des enzymes de dégradation et de leur sécrétion dans le milieu, dans la pathogénèse. Le système de sécrétion de type III ou Hrp intervient lui aussi dans l'expression de la virulence (Yang *et al.*, 2002). Seule la protéine CdiA/HecA est sécrétée par le système de sécrétion de type V, et contribue à l'adhérence de la bactérie sur les tissus (Rojas *et al.*, 2002).

3.2.3. La mobilité et le chimiotactisme

La mobilité et le chimiotactisme sont essentiels à *Dickeya* afin de trouver un site d'entrée pour l'apoplaste. *Dickeya* présente en particulier une réponse chimiotactique forte à l'acide jasmonique qui est produit par les tissus végétaux blessés, facilitant ainsi l'infection (Antunez-Lamas *et al.*, 2009). Le génome de *D. dadantii* 3937 code pour 47 protéines contenant le domaine MCP (methyl carrier chemotactic protein). Ce résultat contraste avec le nombre moyen de gènes MCP trouvés dans d'autres Entérobactéries: 29 MCP par génome (Río-Álvarez *et al.*, 2015).

3.2.4. Production de sidérophores

Dans l'apoplaste, *Dickeya* produit deux sidérophores : la chrysobactine et l'achromobactine, qui permettent à celle-ci de faire face à la faible disponibilité en fer dans la plante. Le fer étant un élément essentiel dans les réactions enzymatiques, son acquisition par la bactérie est donc primordiale (Franza and Expert, 2013). Cependant, le fer est aussi un métal dangereux du fait de sa capacité à générer des ROS (reactive oxygen species) (Cornelis *et al.*, 2011). C'est pour cette raison que *Dickeya* produit plusieurs protéines de stockage du fer comme FntA, Bfr et Dps, qui contribuent à la virulence, illustrant l'importance d'un contrôle parfait de l'homéostasie du fer pendant l'infection (Boughammoura *et al.*, 2008).

3.2.5. Autres facteurs de virulence

La production de ROS est un des premiers moyens de défense par la plante face à une infection par un pathogène (Lamb and Dixon, 1997). Pour résister au stress oxydatif, *D. dadantii* produit des enzymes anti-oxydantes comme des superoxydes dismutases, des catalases ou encore un pigment bleu, l'indigoidine, qui permet de capturer les ROS (Reverchon *et al.*, 2002). Les systèmes qui protègent la bactérie des peptides anti-microbiens (PAMs) sécrétés par la plante hôte sont aussi activés. Par exemple, le système de transport SapABCDF, responsable de l'import des PAMs et leur dégradation protéolytique dans le cytoplasme, est nécessaire pour la virulence de *Dickeya* (López-Solanilla *et al.*, 1998).

Au regard du grand nombre de facteurs agissant sur la virulence chez *Dickeya*, il est prédit qu'une infection effective requiert une expression spatiotemporelle correcte des différents facteurs de virulence, en réponse aux changements des conditions environnementales, résultant des interactions entre les deux partenaires (Sepulchre *et al.*, 2007).

3.3. Régulation de la virulence

La production des enzymes de macération et celle des autres facteurs de virulence est contrôlée par une régulation fine en réponse aux différents signaux environnementaux. Les changements dans l'environnement doivent être traduits en un signal compréhensible, souvent une petite molécule qui peut être rapidement synthétisée et dégradée. Ensuite, ce signal doit interagir avec un régulateur de transcription, soit directement, soit à travers des capteurs et des protéines transductrices (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996).

Des études sur la régulation de la virulence chez *Dickeya* ont conduit à l'identification de plusieurs régulateurs majeurs nommés KdgR, PecS, PecT, CRP, H-NS, Fis, Fur, GacA, SlyA et MfbR (Charkowski *et al.*, 2012).

La production du répresseur Fis est régulée par la croissance bactérienne. Il est principalement synthétisé au début de la phase exponentielle. Fis agit sur les fluctuations de topologie de l'ADN. Sa forte concentration au sein de la cellule active les facteurs requis au stade précoce de l'infection (flagelle et détoxification des composés anti-bactériens) et réprime les facteurs requis pour les phases plus tardives de l'infection (production des enzymes de dégradation).

Pendant les phases précoces et intermédiaires de l'infection, les bactéries sont confrontées à un stress acide et oxydatif, ce qui provoque un relâchement de l'ADN. L'activité régulatrice de H-NS et de PecT étant dépendante de la topologie de l'ADN, ce relâchement leur permet d'être dans leur forme active et donc de réprimer l'expression des gènes *pel* qui codent pour la synthèse des enzymes de macération. Dans les conditions acides, KdgR et PecS répriment aussi l'expression de ces gènes, et MfbR et GacA sont sous leurs formes inactives, ce qui également renforce l'inhibition de l'expression des gènes de production d'enzymes de macération.

A pH acide, la solubilité du fer augmente et le complexe Fur-Fe²⁺ réprime les gènes *pel* et les gènes d'utilisation du fer mais active les gènes impliqués dans le stockage de celui-ci.

Dans l'apoplaste, les bactéries se multiplient en catabolisant le sucrose, le glucose et le fructose qui y sont les principaux carbohydrates présents. Le transport de ces sucres dans la bactérie par un système de phospho-transférases entraîne la production de cAMP, activant la production d'enzymes de macération. De plus, le catabolisme entraîne une accumulation d'acétate qui va activer le régulateur GacA qui réprime à son tour RsmA et PecT et donc permettre la production

d'enzymes de macération. L'alcalinisation des tissus active le régulateur MfbR ce qui entraîne la production d'enzymes. Une fois l'infection avancée et les enzymes de dégradation sécrétée, il résulte une dégradation de la pectine et une production de 2-keto-3-deoxygluconate (KDG), qui est l'inducteur intracellulaire inactivant le répresseur KdgR.

Ces réactions en cascade permettent la production massive d'enzymes de dégradation entraînant la macération de la plante (Reverchon *et al.*, 2013) (Figure 10).

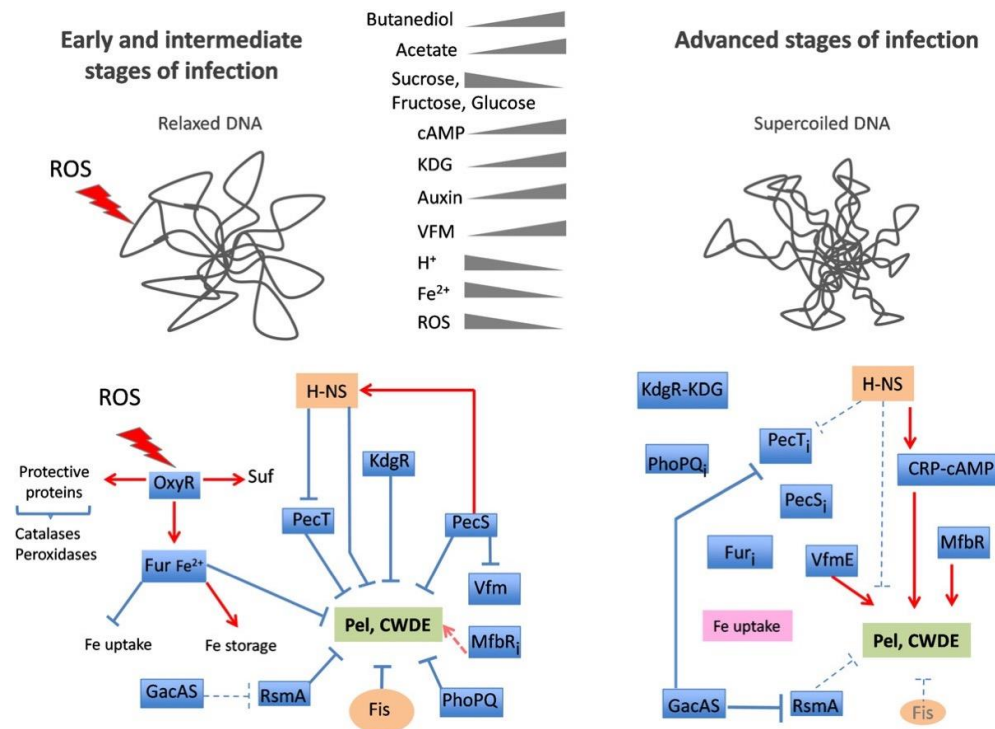


Figure 10 : Schéma simplifié des principaux régulateurs chez *Dickeya*. Les flèches indiquent l'activation, les barres bleues l'inhibition des gènes. Les changements de concentration de différentes molécules pendant la pathogénèse sont indiqués par les gradients gris. D'après Reverchon et Nasser (2013)

3.4. Quorum sensing chez *Dickeya*

Le terme quorum sensing (QS) se réfère à la capacité des bactéries à réguler l'expression des gènes en fonction de la concentration cellulaire bactérienne, i.e. la « taille » de la population concernée. Le QS repose sur la production et l'accumulation de molécules de signalisation émises et perçues par chaque cellule de la population. De nombreuses bactéries pathogènes utilisent le QS pour coordonner l'expression de leurs gènes de virulence suivant la densité de leur population (Figure 11).

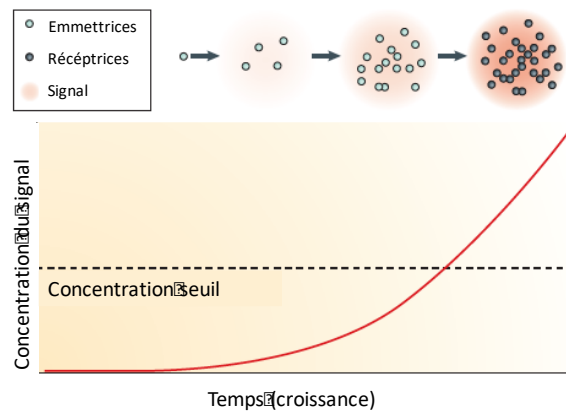


Figure 11 : Schéma générique du quorum sensing. D'après Keller et Surette (2006)

Chez *Dickeya*, comme chez d'autres bactéries, le QS peut aussi être régulé par des systèmes à deux composants (TCS : *two component system*) (Keller and Surette, 2006; Parkinson and Kofoid, 1992). Les TCS sont composés d'un senseur de signal, souvent membranaire associé à un régulateur cytoplasmique de réponse. Chez *Dickeya* et *Pectobacterium*, plus de 30 TCS ont été identifiés comme les systèmes ExpS/ExpA, PehR/PehS, PhoP/PhoQ (Hyytiäinen, 2005) mais tous ne contrôlent pas le QS. Dans le cas de *Dickeya*, la molécule signal QS sécrétée fait partie de la classe des N-acyl homosérines lactones (NAHL) (Barnard and Salmond, 2007). *D. dadantii* possède le système de QS ExpI-ExpR, analogue dans son mécanisme, au système LuxI-LuxR de *Photobacterium fischeri*. L'inactivation du gène *expI* codant pour la synthèse des acyl-homosérine lactone (AHL), ou du récepteur/régulateur *expR*, n'affecte pas significativement la production des enzymes de dégradation, *in vitro* ou *in planta* (Mhedbi-Hajri *et al.*, 2011). Récemment, un cluster de 25 kb, appelé *vfm* a été découvert chez *D. dadantii*. Ce cluster code pour un nouveau système de QS essentiel à la production d'enzymes de macération et à la pathogénèse (Nasser *et al.*, 2013). Ce cluster code pour des protéines affichant des similarités avec des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides-gras. Il a été proposé que les produits des gènes *vfm* dirigent la production et l'export d'une molécule signal composé d'acides aminés et d'acides gras. L'activation des cibles des gènes *vfm* est réalisé par un système de contrôle hiérarchique : le signal est perçu par le

système VfmH-VfmI, qui active l'expression du gène *vfmE* codant pour un régulateur AraC. VfmE active ensuite la transcription des gènes codants pour les enzymes de dégradation et l'expression des opérons *vfm*. Ce système QS apparaît comme différent des autres systèmes déjà connus et le locus *vfm* n'est pas répandu chez les espèces bactériennes pathogènes, mais est conservé chez les *Dickeya* (Figure 12).

Des analyses de transcriptomes ont révélées que le cluster *vfm* est induit par les peptides anti-microbiens produits par la plante en réponse à une infection bactérienne (Rio-Alvarez *et al.*, 2012) et est réprimé par PecS, un régulateur global de virulence. Ce régulateur, de la famille MarR, réprime directement la production d'enzymes de dégradation, celles des protéines de flagelle, la synthèse de biosurfactant et les systèmes de résistance au stress oxydatif (Reverchon *et al.*, 2002). De plus, en modulant les gènes *vfm* et *hns*, PecS établit un lien entre deux baromètres importants de la régulation de l'expression des gènes de virulence : H-NS pour les conditions environnementales et Vfm pour la densité cellulaire.

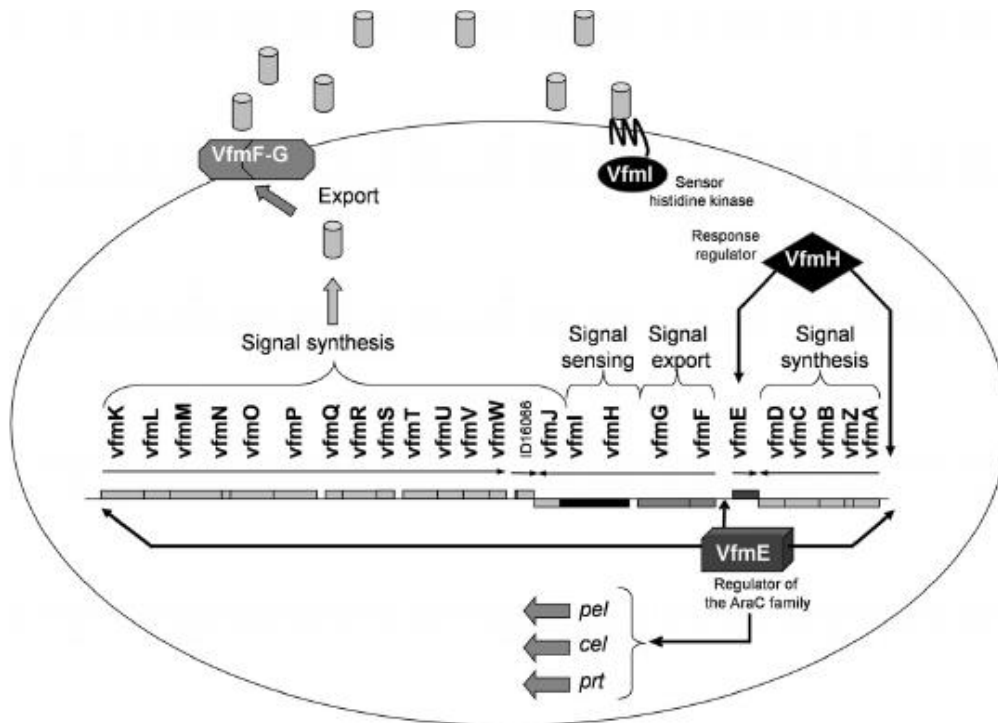


Figure 12 : Modèle de la fonction de protéines Vfm. Les opérons *vfmAZBCD* et *vfmKLMNOPQRSTUVWXYZVW* sont impliqués dans la synthèse de signaux Vfm. Ces signaux sont exportés via un transporteur ABC, VfmF-VfmG. Ce signal s'accumule dans le milieu extérieur jusqu'à un seuil où sa perception entraîne la phosphorylation du système VfmI-VfmH. Le régulateur VfmH phosphorylé se fixe sur les régions régulatrices VfmA et VfmE qui activent l'expression de l'ARN polymérase. Le régulateur VfmE est ensuite produit et il active à son tour les gènes codants pour les enzymes de dégradation de la paroi. VfmE active aussi les opérons *vfmAZBCD*, *vfmFGHIJ* et *vfmKLMNOPQRSTUVWXYZVW* ce qui augmente les niveaux de transcrits codant pour la synthèse de signaux Vfm. D'après Nasser *et al.*, (2013).

3.5. Bilan sur la pathogénie des *Dickeya*

La colonisation de la plante par les *Dickeya* est un processus multifactoriel mettant en jeu les principaux déterminants et régulateurs cités plus haut. Un schéma récapitulatif est montré Figure 13.

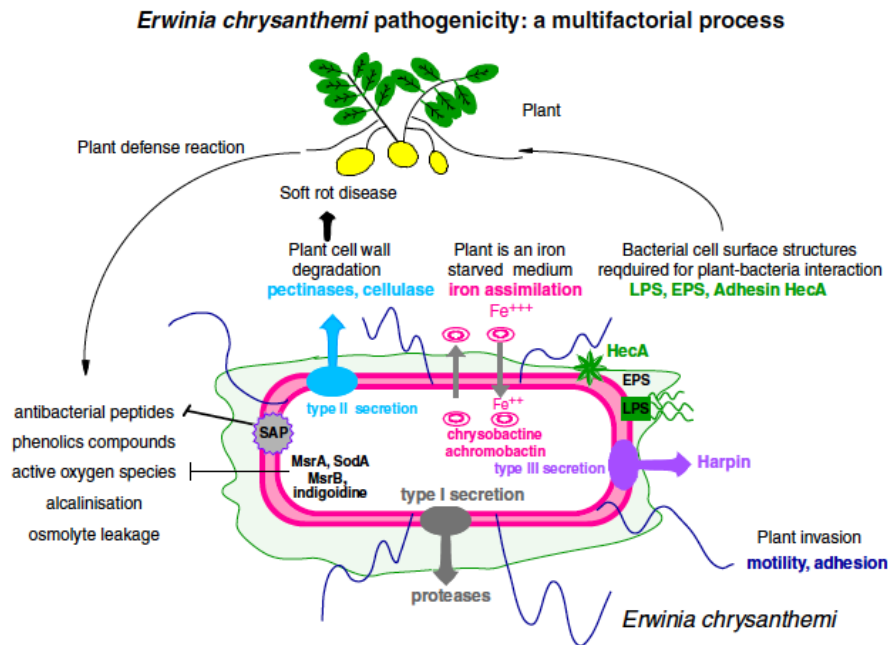


Figure 13 : Description schématique des interactions entre *Dickeya* et sa plante hôte. D'après Sepulchre et al., (2007)

4. Adaptation de la bactérie à son environnement

L'adaptation des bactéries aux changements de niches écologiques ou à l'acquisition de capacité à coloniser de nouveaux environnements est un élément clé de l'évolution microbienne. Le passage vers des niches plus spécialisées est souvent lié à l'acquisition de nouveaux ensembles de gènes via un transfert horizontal de gènes permettant par exemple d'utiliser des métabolites précédemment indisponibles. Une perte de gènes et / ou l'inactivation de gènes important dans une niche plus généraliste peuvent aussi être observées. Dans certains cas, des réarrangements plus importants du génome peuvent se produire, tels que l'incorporation d'îlots génétiques entiers, fournissant une gamme de nouvelles capacités phénotypiques (Altermannt, 2012).

4.1. Adaptation à l'environnement acide et aux peptides anti-microbiens

Lorsque *Dickeya* infecte une plante, les bactéries colonisent le liquide apoplastique ayant un pH situé entre 5 et 6,5 (Grignon and Sentenac, 1991). Lors de la lyse cellulaire le pH de la plante passe d'acide à basique (Effantin *et al.*, 2011; Nachin and Barras, 2000). Pour faire face à

l'environnement acide de l'apoplaste végétal, *Dickeya* induit la production de l'auxine, acide indole-3-acétique (IAA) (Jiang *et al.*, 2016), qui est connue pour stimuler la résistance bactérienne au stress, comme l'irradiation UV, l'évolution de la salinité et l'acidité, améliorant ainsi la survie et la persistance dans l'environnement de la plante (Duca *et al.*, 2014). En outre, cette auxine favorise l'ouverture stomatique, augmentant ainsi la progression de la maladie (Kazan and Manners, 2009). De plus, la réponse transcriptionnelle de *Dickeya* au stress acide comprend également un remodelage d'enveloppe avec des modifications covalentes du lipopolysaccharide (LPS) neutralisant la charge négative nette sur le lipide A et diminuant l'interaction entre les composants chargés positivement et la surface bactérienne. Toutes ces modifications simultanées modulent les propriétés de perméabilité de l'enveloppe cellulaire facilitant l'adaptation bactérienne au stress acide (Jiang *et al.*, 2016). Le changement de pH induit aussi l'expression de systèmes à deux composants (TCS) responsable de la modification de l'enveloppe comme PhoP/PhoQ, EnvZ/OmpR et PmrA/PmrB. Le système PhoP/PhoQ est activé par une faible concentration en magnésium due à l'augmentation du pH et est aussi un régulateur de certains déterminants de la virulence (Llama-Palacios *et al.*, 2003; Venkatesh *et al.*, 2006).

Les systèmes PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB sont aussi impliqués dans les mécanismes de résistances aux peptides anti-microbiens (PAMs) (Hyytiäinen *et al.*, 2003; Rio-Alvarez *et al.*, 2012). Les mécanismes utilisés par *Dickeya* sont la dégradation protéolytique des PAMs, leurs extrusions de la cellule par des systèmes d'efflux ou la modification de la cible du PAM comme l'enveloppe par exemple (López-Solanilla *et al.*, 1998).

4.2. Adaptation aux conditions d'anaérobiose dans les tissus végétaux

Dans les tissus végétaux, *Dickeya* doit faire face à une faible disponibilité en oxygène, ce qui est un des facteurs clés du développement de la pourriture molle. La synthèse de pectate lyase est induite en condition anaérobie (Hugouvieux *et al.*, 1992). La diminution d'oxygène disponible, en plus d'activer les gènes impliqués dans les mécanismes d'anaérobiose, entraîne la mise en place de nombreux processus de virulence et de pathogénicité comme l'activation de la sécrétion, l'homéostasie ou encore la motilité (Babujee *et al.*, 2012). La détection de l'anaérobiose repose sur un facteur de transcription FNR et sur les protéines de deux TCS, NarXL et ArcAB, responsables de l'activation des gènes impliqués dans le catabolisme nitrate / nitrite dans des conditions anaérobies et la répression des gènes impliqués dans d'autres voies respiratoires et fermentatives anaérobies. Babujee et ses collègues ont proposé que la croissance prolongée dans un environnement limité en oxygène imite la situation des bactéries lors de la pectinolyse avant de rencontrer la libération de ROS produit par l'hôte (Babujee *et al.*, 2012). Cela suggère que *Dickeya*

est capable d'anticiper l'environnement oxydatif induit par l'hôte avant son apparition, afin d'augmenter les chances de survie dans l'environnement de la plante.

4.3. Adaptation aux ROS produits par la plante en réponse à l'infection

Les réponses de défenses des plantes ont été analysées sur le modèle *Arabidopsis* et ont montré que l'infection par *Dickeya* est accompagnée d'une production de ROS réalisée principalement par l'action d'une NADPH oxydase avant l'apparition des symptômes (Fagard *et al.*, 2007). Suivie d'une accumulation dans la structure de la paroi cellulaire de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) et de callose (un β -1,3-glucane qui agit comme une barrière physique supplémentaire), ces observations suggèrent que l'hôte perçoit la bactérie comme un intrus et initie une réponse immunitaire. Par conséquent, les voies de signalisation de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène impliquées dans les réponses immunitaires de la plante sont induites. Pour limiter l'effet des réactions de défense des plantes, *Dickeya* produit des antioxydants essentiels à sa virulence (Hassouni *et al.*, 1999; Nachin *et al.*, 2003), des catalases et des peroxydases. La résistance aux ROS semble être régulée par OxyR, OhrR et PecS (Hommais *et al.*, 2008; Miguel *et al.*, 2000; Reverchon *et al.*, 2010). *Dickeya* synthétise également un pigment bleu, l'indigoïdine (*indA*, *indB* et *indC*) conférant une résistance accrue au stress oxydatif (Reverchon *et al.*, 2002). En outre, les gènes impliqués dans la production du glutathion, de la glutaredoxine et de la thiorédoxine (*gshB*, *gor*, *grxA*, *trxC*, *trxB*, *gstB*, ABF-0020419) qui réduisent la formation de liaisons disulfure et neutralisent l'oxydation des protéines cytoplasmiques, sont surexprimés en présence de ROS (Jiang *et al.*, 2016).

La plupart des gènes codant pour des protéines de chimiotaxie sont également autorégulés probablement pour permettre aux bactéries d'échapper à des environnements hostiles et promouvoir une invasion ultérieure. À ce stade, il existe deux scénarios possibles : soit (1) les réactions de défense des plantes sont suffisamment fortes pour arrêter la progression bactérienne menant à une infection avortée, ou (2) les bactéries s'adaptent au stress oxydatif, se déplacent dans les tissus voisins et continuent à croître jusqu'à une densité bactérienne suffisante pour atteindre le quorum, initiant la synthèse des CWDE (Lebeau *et al.*, 2008). Dans ce dernier cas, la macération des tissus végétaux et la lyse cellulaire se produisent et, par conséquent, la libération des teneurs vacuolaires dans l'apoplaste crée des conditions de choc osmotique pour les bactéries.

4.4. Adaptation au stress osmotique résultant de la lyse des cellules végétales

Pour faire face aux différences de pression osmotique rencontrées pendant l'infection, *Dickeya* induit deux lignes de réponses temporellement séparées. La réponse rapide au niveau de l'activité protéique implique une absorption de potassium, alors que la réponse secondaire consiste en

l'absorption d'osmoprotectants tels que la proline, la glycine bêtaïne triméthylammonium, la choline, la tétrahydropyrimidine ectoine et le pipécolate présents dans les environs, et la synthèse de quantités élevées de solutés compatibles pour éviter des augmentations nuisibles de la concentration ionique et maintenir l'électroneutralité du cytoplasme (Gouesbet *et al.*, 1995). *Dickeya* est capable d'absorber tous les osmoprotectants mentionnés ci-dessus par deux transporteurs : OusA (transporteur H⁺ ProP chez *E. coli*) responsable de l'absorption de la glycine bêtaïne, de la proline, de l'ectoine et de l'acide pipécolique (Gouesbet *et al.*, 1996), et OusB (transporteur ABC ProU chez *E. coli*) responsable de l'absorption de glycine bêtaïne (Choquet *et al.*, 2005). L'accumulation de ces osmoprotecteurs réduit la production de pectate lyases (Gouesbet *et al.*, 1995), ce qui indique que l'induction spécifique du gène *pelE* sous haute osmolarité est inhibée en présence d'osmoprotecteurs. En l'absence d'osmoprotecteurs dans l'environnement, *Dickeya* favorise l'accumulation de glutamine, de glutamate et d' α -glucosylglycérate, un osmolyte ionique également présent dans certaines archées halophiles (Goude *et al.*, 2004). En plus de l'afflux de K⁺, la salinité élevée induit l'expression de gènes impliqués dans l'extrusion des ions sodium, crucial pour un métabolisme normal, les concentrations cytosoliques élevées en sodium affectant la disponibilité en eau et étant toxiques pour l'activité de nombreuses enzymes. Étant donné que la stabilité et le repliement des protéines sont profondément affectés par les changements dans l'activité de l'eau, les cellules doivent supporter un repliement protéique correct dans des conditions de pression osmotique externe accrue. L'augmentation de l'osmolarité est l'un des principaux stimuli détectés par le système RcsCDB-RcsF, qui est responsable de l'accumulation d'exopolysaccharides pour protéger les cellules de la dessiccation et l'inhibition de la motilité en réprimant directement le régulateur de transcription flagellaire des gènes *FlhDC* (Bontemps-Gallo *et al.*, 2013; Madec *et al.*, 2014). Ceci est conforme à l'absence d'exigence de motilité au stade tardif de l'infection lorsque les bactéries dégradent massivement la pectine. À ce stade, à mesure que les bactéries atteignent leur objectif ultime, les cellules cessent également de produire le signal quorum-sensing Vfm.

4.5. Le transfert horizontal de gènes

Le transfert horizontal de gènes (HGT) est un processus dans lequel un organisme intègre du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant. Le HGT est un mécanisme largement reconnu pour l'adaptation des bactéries et des archées. La résistance aux antibiotiques microbiens et la pathogénicité sont souvent associées au HGT, mais la portée du HGT s'étend bien au-delà des organismes pathogènes (Soucy *et al.*, 2015). Il existe trois systèmes principaux d'échange de matériel génétique :

- La conjugaison qui consiste en un transfert d'ADN d'une bactérie à une autre, généralement de la même espèce, via un contact de cellule à cellule (par pili par exemple).
- La transformation, ce mécanisme est commun chez les bactéries, moins chez les eucaryotes. Elle consiste en la prise d'un matériel génétique extracellulaire (provenant d'une bactérie morte...) par un autre organisme. Elle est souvent utilisée en génie biologique afin d'insérer de nouveaux gènes dans des bactéries.
- La transduction, processus par lequel l'ADN d'une bactérie est transporté dans une autre bactérie par le biais d'un virus bactérien (ou phage).

D'autres mécanismes de transfert de gènes, tels que les agents de transfert de gène (GTA) et la fusion cellulaire, ont été plus récemment décrits (Lang *et al.*, 2012; Naor and Gophna, 2013) (Figure 14).

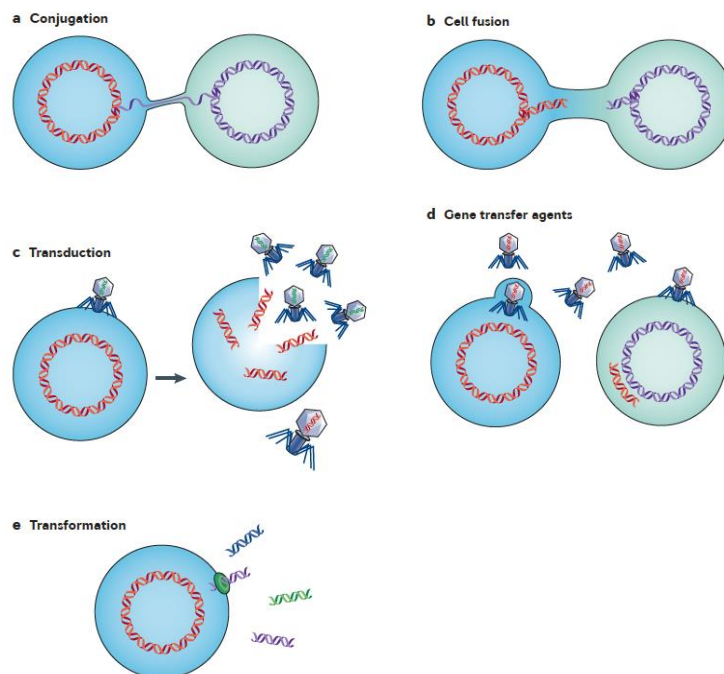


Figure 14 : Mécanismes de transfert de gènes. **A**, La conjugaison se produit à travers le contact cellulaire donneur-récepteur, et l'ADN monocaténaire est transféré de la cellule donneuse à la cellule receveuse. **B**, La fusion cellulaire diffère de la conjugaison en ce que l'ADN est échangé bidirectionnellement après contact cellulaire et formation de pont entre deux cellules. **C**, transduction : transfert de gènes médié par le phage. **D**, Les agents de transfert de gènes (GTA) sont des phages qui ne reconnaissent plus leur propre ADN et ne portent que des fragments aléatoires d'ADN hôte. Comme le prophage, ils résident dans le génome de la cellule hôte. **E**, la transformation : l'ADN est absorbé par l'environnement environnant ; Dans l'image, l'ADN est représenté comme entrant dans la cellule sous la forme double brin, bien que de nombreux systèmes d'absorption d'ADN dégradent l'un des brins lors de l'entrée de la cellule. D'après Soucy et al., (2015).

Dans de nombreux cas, la quantité et la source du transfert horizontal de gènes peuvent être liées au mode de vie d'un organisme. Par exemple, les hyperthermophiles bactériens semblent avoir échangé des gènes avec des archées dans une plus grande mesure que d'autres bactéries, alors que le transfert de certaines classes de gènes eucaryotes est le plus fréquent dans les bactéries parasites et symbiotiques (Koonin *et al.*, 2001).

Très souvent, les transferts horizontaux ont lieu entre espèces proches, voir du même genre. Les gènes transférés horizontalement chez *D. solani* se sont révélés venir de *D. dianthicola*, espèce très proche colonisant la même niche écologique (Khayati *et al.*, 2015). Des transferts peuvent aussi avoir lieu entre des individus de niches écologiques différentes comme montré sur la Figure 15. Ces transferts peuvent être directs entre deux individus issus de la même niche ou de deux niches différentes mais peuvent aussi être réalisés à l'aide d'un individu intermédiaire, occupant les différentes niches. Lorsque les transferts se produisent entre un individu de la communauté résidente et un récent envahisseur, ils favorisent l'adaptation de celui-ci dans sa nouvelle niche (Soucy *et al.*, 2015).

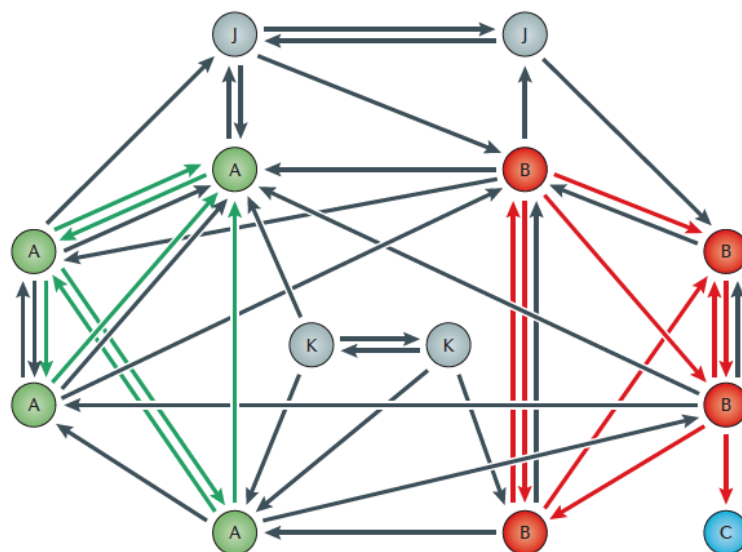


Figure 15 : Echange structuré en communauté. Les membres procaryotes de deux niches distinctes sont représentés en cercles verts et rouges (A et B); Les cercles gris (K et J) sont des espèces apparentées occupant différentes niches. Les gènes qui permettent l'adaptation de leurs hôtes à ces niches sont principalement échangés entre des membres du même créneau (flèches vertes et rouges), mais ils peuvent également être partagés avec des envahisseurs de niche récents (cercle bleu C), accélérant l'adaptation de l'envahisseur à un nouvel habitat. D'après Soucy *et al.*, (2015).

5. Invasion biologique : terminologie et définitions

Les bactéries pectinolytiques retrouvées dans les champs de pommes de terre françaises avant les années 1970 étaient essentiellement de la famille des *Pectobacterium*. Ensuite, des *Dickeya* ont commencé à être détectés de manière de plus en plus fréquente sur symptômes de jambe noire au champ. Depuis 2005, *Dickeya solani* est classé comme pathogène émergent et est retrouvé dans de nombreux pays Européens, souvent au détriment des *Pectobacterium*. Ce phénomène d'émergence peut-il être qualifié « d'invasion bactérienne » ? Les parties suivantes présentent la terminologie et les définitions liées au phénomène d'invasion biologique afin de pouvoir les repositionner sur le phénomène *Dickeya*.

Les études sur l'invasion des communautés microbiennes gagnent de l'ampleur, avec une augmentation considérable des publications sur l'invasion par des microbes pathogènes, bénéfiques ou commensaux. Une meilleure compréhension de l'invasion microbienne pourrait générer des gains importants dans de nombreux domaines, y compris la gestion des maladies humaines et animales, le développement de vaccins, et la bioaugmentation dans les industries alimentaires et environnementales. Des définitions simples sont reprises dans le Tableau 2.

Terme	Définition	Référence
Communauté microbienne	Groupe de types microbiens potentiellement interactifs dans l'espace et le temps	(Nemergut <i>et al.</i> , 2013)
Communauté résidente	Communauté spécifique considérée dans le contexte d'une éventuelle invasion	(Kinnunen <i>et al.</i> , 2016)
Etranger ou envahisseur	Un type microbien qui ne faisait pas partie de la communauté résidente avant le point d'observation	(Davis <i>et al.</i> , 2005)
Assemblage communautaire	Somme de tous les processus qui façonnent la composition d'une communauté microbienne, y compris la dispersion, la sélection, la dérive et la diversification	(Vellend, 2010)
Dispersion	Mouvement des organismes à travers l'espace, compte tenu de l'immigration et de l'émigration hors d'une communauté	(Vellend, 2010)
Sélection	Changements dans la composition de la communauté causés par des différences de fitness déterministes entre les types	(Vellend, 2010)
Dérive	Changements dans l'abondance relative des types dans une communauté au fil du temps causés par des processus stochastiques	(Vellend, 2010)
Diversification	Augmentation de la diversité des types dans une communauté causée par la génération de nouvelles variances génétique	(Vellend, 2010)
Invasion	Entrée et établissement d'un type étranger dans une communauté résidente	(Blackburn <i>et al.</i> , 2011)
Etablissement	Maintien d'une population active d'un type étranger dans une communauté résidente pendant une période de temps considérable	(Kinnunen <i>et al.</i> , 2016)

Tableau 2 : Terminologie et Définitions. D'après Kinnunen *et al.*, (2016)

5.1. Concept d'envahisseur

Une définition simple d'envahisseur revient à dire que toute espèce (ou, plus généralement, type biologique) qui ne fait pas partie de la communauté résidente peut être considéré comme un envahisseur potentiel (Davis *et al.*, 2005). Cependant d'autres chercheurs plus restrictifs définissent l'envahisseur comme une espèce (ou type biologique) capable de traverser une barrière géographique significative, élargissant sa zone géographique de base (Blackburn *et al.*, 2011). Cette absence d'origine implique l'absence d'interactions écologiques récentes avec les organismes résidents et, par conséquent, l'absence de coévolution ou de co-adaptation préalable. En conséquence, ce type d'organisme étranger aurait le potentiel de modifier radicalement la composition ou le fonctionnement de la communauté qu'il envahit, bien qu'il existe un désaccord sur ce point (Davis *et al.*, 2011). Dans ce cadre, l'envahisseur devrait également démontrer sa capacité à se disperser avec succès du point d'invasion initial vers d'autres communautés (Blackburn *et al.*, 2011) La connaissance incomplète de la biogéographie microbienne rend difficile d'évaluer la dispersion d'un type microbien au-delà de sa zone naturelle. D'autres auteurs proposent qu'un type microbien ne soit qualifié d'envahisseur que s'il entre dans un environnement ou une communauté où il n'a jamais existé (Mallon *et al.*, 2015).

5.2. Concept d'établissement d'une communauté

Bien que le premier événement dans l'invasion de la communauté - l'entrée d'un type microbien étranger - soit auto-explicatif, définir avec précision l'étape suivante- i.e. l'établissement - est plus difficile. En écologie générale, l'établissement est défini comme la persistance du type étranger en tant que population autonome dans le nouvel environnement, en raison de l'exploitation de ses ressources (Davis *et al.*, 2005). Pour de nombreuses bactéries, une seule cellule suffit théoriquement pour développer une population, mais le maintien d'une population métaboliquement active d'envahisseurs pendant une période significative, est un meilleur critère. La durée significative doit être basée sur les caractéristiques de la communauté résidente car les différentes communautés peuvent différer drastiquement en termes de temps de génération ou de biomasse. L'établissement peut être basé sur le temps de renouvellement moyen (TR) de la biomasse dans la communauté comme suit : $TR = N / (Y \times FS)$ ou N est la quantité de biomasse de la communauté résidente, Fs est le flux de substrat pour la communauté (masse de substrat par unité de temps) et Y est le rendement "efficace" de la communauté (biomasse par substrat de masse). La communauté doit être surveillée pendant quelques TR avant de conclure quant à l'établissement de l'étranger.

5.3. Conséquence de l'invasion

Un critère fortement débattu dans la définition de l'invasion est lié à ses conséquences. De nombreux chercheurs omettent l'exigence selon laquelle l'établissement de l'envahisseur a un impact négatif sur la communauté (Blackburn *et al.*, 2011; Kinnunen *et al.*, 2016). Cette omission est controversée en raison de la connotation négative du mot « invasion », mais ils soutiennent que « l'impact négatif » est un critère vague. En effet, l'« impact » peut être mesuré de multiples façons sur plusieurs atouts de la communauté (abondance des populations résidentes, richesse communautaire, attributs fonctionnels de la communauté, etc.) qui ne se rapportent pas directement à l'envahisseur, parce que l'établissement d'un l'envahisseur peut avoir des conséquences positives et négatives sur les différents membres de la communauté (Valéry *et al.*, 2008).

Objectifs de thèse

Mon travail de thèse vise à étudier les processus et traits qui ont conduit à l'émergence du pathogène *Dickeya solani* chez la pomme de terre *Solanum tuberosum*, ainsi que ses relations (coexistence et compétition) avec le pathogène résident *Dickeya dianthicola*.

La stratégie de recherche a été construite autour de 4 axes :

- Analyse de la structure des populations phytopathogènes responsables des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle dans les parcelles de pomme de terre du nord de la France ;
- Analyse de la dynamique de populations artificielles de *D. solani* et *D. dianthicola* lors de mono- et co-infection de différentes plantes hôtes ;
- Recherche et analyse de traits d'espèce liés à l'agressivité (symptômes et expression de gènes) chez les espèces *D. dianthicola* et *D. solani* ;
- Analyse du transcriptome, en condition de macération de tubercules de pomme de terre, de 3 isolats de *Dickeya solani* présentant des différences fonctionnelles (agressivité) et génomique (transfert de gènes de *D. dianthicola*).

Chapitre II

Chapitre II : Répartition des populations pathogènes au sein de parcelles – Problématique de distribution

1. Contexte scientifique

Les *Dickeya spp.* (probablement *D. dianthicola*) ont été signalés la toute première fois sur pomme de terre aux Pays-Bas dans les années 1970. Auparavant, uniquement des *Pectobacterium spp.* étaient décelés sur symptôme de jambe noire. Depuis, *D. dianthicola* est fréquemment détecté dans de nombreux pays Européens. Depuis 2004, un nouveau pathogène, *Dickeya solani* a émergé et se répand dans toute l'Europe en entraînant des pertes économiques importantes. Les symptômes causés par les *Dickeya spp.* sont indiscernables de ceux causés par les *Pectobacterium spp.*. En comparaison aux *Pectobacterium spp.*, les *Dickeya spp.* peuvent causer la maladie à partir d'un niveau plus faible d'inoculum et avoir une plus grande capacité à se propager à travers les tissus vasculaires de la plante. Outre leur agressivité accrue, les *Dickeya spp.* et notamment *D. solani* montrent des températures optimales de croissance plus élevées ; ces pathogènes pourraient entraîner des problèmes de maladie accrus alors que le climat de l'Europe se réchauffe. Par ailleurs, les *Dickeya spp.* semblent être moins robustes que *Pectobacterium spp.* dans les sols et les environnements autres que la plante (Toth *et al.*, 2011). Bien que les mécanismes associés à la virulence des *Pectobacterium* et *Dickeya* soient largement étudiés, les traits liés à l'émergence des *Dickeya*, leur adaptation à la plante hôte et à l'environnement (sol, eau, hôtes réservoir ou vecteur) sont moins étudiés.

2. Présentation des travaux

Ces travaux représentent l'analyse de la structure des populations pathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya* sur des parcelles déclassées de plants de pommes de terre dans le nord de la France. Lors du déclassement d'une parcelle (refus à la certification : >1% de symptôme de jambe noire sur la parcelle), des prélèvements de tissus symptomatiques sont réalisés afin d'identifier les bactéries responsables de la maladie. Cette campagne de prélèvement a eu lieu entre 2013 et 2016, et a permis de suivre de près l'installation en France, des populations émergentes de *D. dianthicola* et *D. solani*. Des tests statistiques sont ensuite réalisés afin d'observer une tendance de distribution des différentes populations pathogènes à travers les différentes parcelles.

Les résultats ci-après sont présentés en anglais afin de faciliter le travail prochain de publication.

3. Contributions

Pauline Dewaegeneire (SIPRE, Comité Nord) s'est déplacée sur le terrain et a réalisé les prélèvements lors de déclassement de parcelles. Aidée d'Euphrasie Munier (SIPRE, Comité Nord) elles ont ensuite isolé les colonies depuis les symptômes puis réalisé les PCR d'identification. Jérémy Cigna (SIPRE, Comité Nord) a quant à lui mis au point la méthode d'identification par PCR *gapA*. Le texte a bénéficié de la relecture critique de Denis Faure et de Yves Dessaux.

4. Materials and Methods

Isolation of *Dickeya* and *Pectobacterium* strains from potato field

Around 30 plants with blackleg symptoms were collected along a transept in each of 19 potato fields from 2013 to 2016. Symptomatic tissues were cut into small pieces (3-5 mm) and incubated during 1h at room temperature in a sterile solution buffer (Na_2HPO_4 , 12 H_2O 1.07%, KH_2PO_4 0.27%, pH 7.0). Bacterial suspensions were diluted and plated 48h at 28°C on CVP medium (Hélias *et al.*, 2012). Single colonies on CVP medium were purified on TY medium (tryptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L and agar 1.5 %) and then incubated 48h at 28°C. From each plant, a single isolate was kept at -80°C; a collection of 548 isolates was analysed.

Characterization of isolates

All the isolates were characterized using the taxon-specific PCR methods. The PCR assay was performed directly on liquid bacterial cultures. One single colony of each strain was cultured in 5 mL liquid TY medium (tryptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L) overnight. 2 μL of the culture were diluted with 18 μL of TE buffer, heated 10 minutes at 99°C and immediately frozen at -20°C. PCR assays were performed in 25 μL reaction mixture (final volume) containing 0.1 μL of EurobioTaq® (5u/ μL); 2.5 μL of 10X buffer; 2 μL of MgCl_2 25mM; 2.5 μL of Eurobio® mix dNTP 1mM; 1 μL of each primer 1 μM ; 13.9 μL of sterile Milli-Q® H_2O and 2 μL of lysed culture in TE buffer. PCR using Y1/Y2 or ADE1/ADE2 primers were performed to determine the genus *Pectobacterium* or *Dickeya* respectively (Darrasse *et al.*, 1994; Nassar *et al.*, 1996). Then, the *gapA* method was used to identify the species (Cigna *et al.*, 2017). PCR products were separated in 2% agarose gels in TBE buffer, at 150 V for 30 min and bands were revealed with ethidium bromide staining.

Statistical tests

The data were analysed using a Chi-square test using the Yates correction. The hypothesis tested was the cohabitation at ratio 1:1 within species or genera using a significance level of 0.05.

5. Results

Among the 19 populations collected from potato fields, all showed the presence of at least one isolate of *Pectobacterium spp.*. 3 of them did not show any *Dickeya spp.*. In the 16 plots where the two genera coexist, *Dickeya* was significantly dominant, revealing settlement of *Dickeya spp.* in the symptomatic potato fields (Tableau 3, Figure 16 Figure 17).

<i>Potato field</i>	<i>Number of Pectobacterium</i>	<i>Number of Dickeya</i>	<i>Including D. solani</i>	<i>Including D. dianthicola</i>	<i>Total</i>
1 - (2013)	31	0	0	0	31
2 - (2013)	7	24	0	24	31
3 - (2014)	7	20	0	20	27
4 - (2014)	28	0	0	0	28
5 - (2014)	19	0	0	0	19
6 - (2014)	1	27	27	0	28
7 - (2014)	6	18	18	0	24
8 - (2015)	7	24	24	0	31
9 - (2015)	2	31	8	23	33
10 - (2015)	3	26	26	0	29
11 - (2015)	2	26	0	26	28
12 - (2015)	4	27	27	0	31
13 - (2016)	1	26	10	16	27
14 (2016)	1	29	29	0	30
15 - (2016)	2	28	2	26	30
16 - (2016)	2	26	26	0	28
17 - (2016)	6	22	22	0	28
18 - (2016)	4	29	4	25	33
19 - (2016)	6	26	26	0	32

Tableau 3: Identification of bacterial genera and species isolated from 19 potato fields

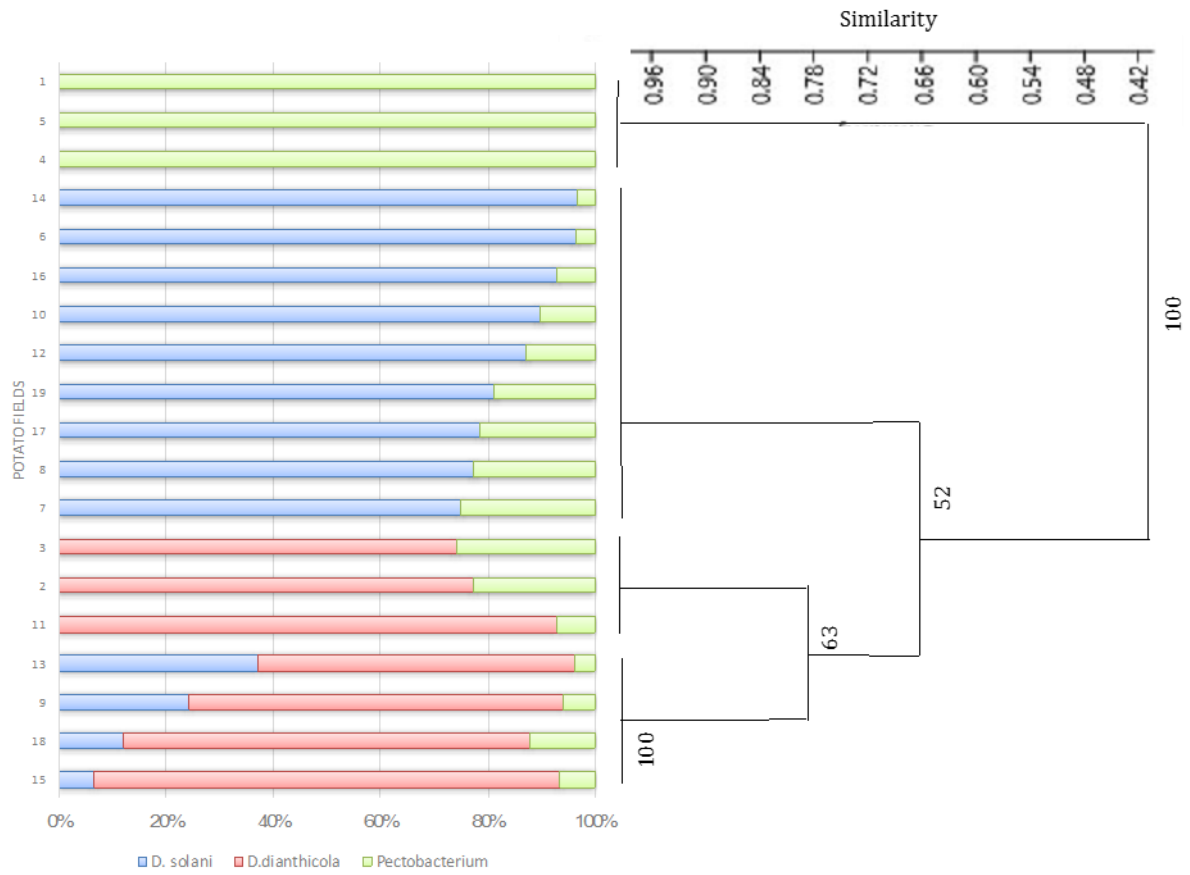


Figure 16: Composition of pathogenic population in potato fields. Clustering was realised using the hierarchical clustering paired group method (UPGMA) with bootstraps values equal to 100.

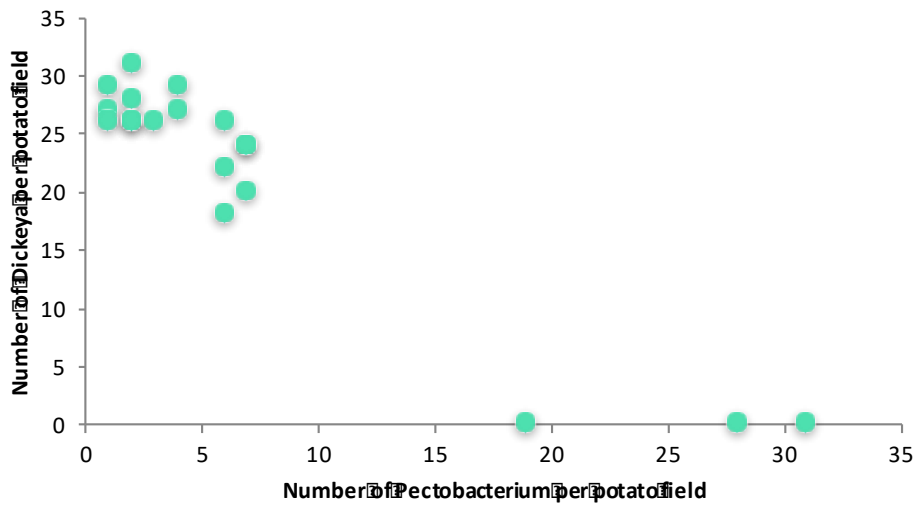


Figure 17: Distribution of bacterial genera by plot

This distribution highlights the importance of *Dickeya* among pectinolytic populations in the field. Among the 16 plots with *Dickeya*, only 4 showed the presence of *D. solani* and *D. dianthicola* simultaneously. Each time, *D. dianthicola* dominates *D. solani*. In the 12 other fields, either *D. dianthicola* (3 collected populations) or *D. solani* (9 collected populations) were identified, suggesting expansion of the *D. solani* population in the absence of *D. dianthicola* (Tableau 3, Figure 18).

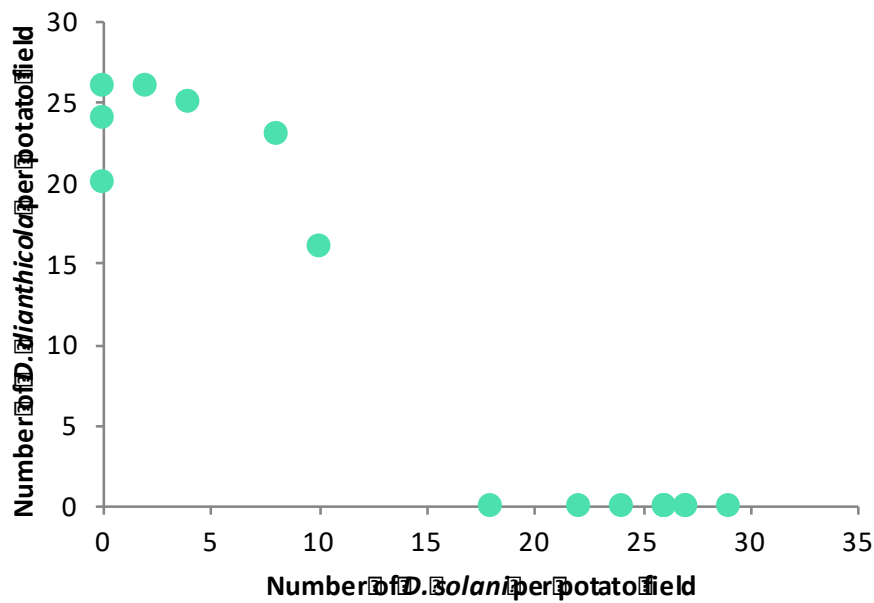


Figure 18: Distribution of *Dickeya* species by plot.

6. Discussion

Les *Pectobacterium spp.*, pathogènes endémiques de la pomme de terre, sont toujours présents dans les parcelles présentant des symptômes de jambe noire, attestant d'une parfaite adaptation à leur hôte. Lorsqu'ils leurs sont associés, les *Dickeya spp.*, dominent à chaque fois par leur nombre au sein de l'échantillonnage d'une parcelle, suggérant qu'ils seraient plus compétitifs que les *Pectobacterium spp.*

Au sein des *Dickeya spp.*, seules les espèces *D. solani* et *D. dianthicola* ont été observées. Leur distribution est dans la majorité des parcelles exclusives, mais lors de coexistences au sein d'une même parcelle, *D. dianthicola* domine *D. solani*, suggérant une meilleure adaptation du pathogène *D. dianthicola* à l'hôte pomme de terre.

Suite à ces observations, deux questions sont posées :

- Une population pathogène résidente peut-elle freiner l'installation sur une même plante hôte d'une population invasive taxonomiquement proche ?
- *D. dianthicola* est-elle plus adaptée à la plante hôte *S. tuberosum* que *D. solani* ?

Les chapitres suivants ont pour vocation de répondre à ces questions en adoptant une démarche expérimentale.

Chapitre III

Chapitre III : Pathogénicité, compétition et exploitation de la niche écologique chez *D. dianthicola* et *D. solani*

1. Contexte scientifique

La distribution des pathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya* au sein des parcelles plantées de pommes de terre suggère des relations complexes entre ces populations pathogènes (voir chapitre 1). Dans les parcelles où différentes populations coexistent, les populations de *Dickeya* semblent déplacer les populations endémiques de *Pectobacterium*. En revanche, au sein du genre *Dickeya*, *D. dianthicola* (installé depuis 50 ans environ) semble contraindre l'installation récente (10 ans environ) de *D. solani* sur la plante. Ces observations au champ soulèvent des hypothèses quant à la dynamique de ces populations pathogènes et leurs traits d'interaction avec les plantes hôtes qui peuvent être testées par l'expérimentation.

2. Présentation des travaux

Il s'agit de comprendre avec une approche expérimentale les dynamiques de population entre *D. dianthicola* et *D. solani* lors de leur interaction avec les plantes. Un panel de 5 isolats représentant la diversité connue de *D. dianthicola* et *D. solani* a été constitué pour chacune de ces espèces. Deux approches ont été mises en œuvre : une approche de populations artificielles basées sur le mélange des 5 isolats des panels de *D. dianthicola* et *D. solani* qui vise à mesurer la dynamique de population de ces espèces sous différentes conditions environnementales ; une approche individu-centrée qui vise à comparer les traits fonctionnels de chaque individu de ces deux panels et questionner leur valeur de trait d'espèce afin de donner les clés d'interprétation des observations sur le terrain.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont en anglais dans un but de publication prochaine.

3. Contributions

La collection de souches bactériennes a pu être réalisée grâce à l'aide de Frédérique Van Gijsegem (INRA, IEES Paris) et de Valerie Hélias (INRA - Agrocampus Ouest Rennes). Les génomes de la collection de souches ont été séquencés par la plateforme IMAGIF (I2BC, CNRS, Gif-sur-Yvette). Le texte a bénéficié de la relecture critique de Denis Faure et de Yves Dessaux.

4. Material and methods

Bacterial strains and growth conditions

Dickeya strains were collected from different geographical locations and dates of isolation and also from different hosts or environments (Table 4). All the strains were routinely cultured in TY medium (tryptone 5g/l; yeast extract 3g/l and agar 1,5%) at 28°C.

	<i>Name</i>	<i>Host</i>	<i>Country</i>	<i>Date of isolation</i>
<i>D. dianthicola</i>	MIE-34	Potato	Switzerland	2013
	MIE-32	Potato	Israel	2006
	MIE-33	Potato	Switzerland	1988
	Ds05.3.3	Potato	Finland	ND
	CFBP 1888	Potato	France	1988
	CFBP 2015	Potato	France	1975
	CFBP 2982	Kalanchoe blossfeldiana	France	1988
	Dw04 9K	River water	Finland	ND
	RNS 04.9	Potato	France	2004
	RNS 10.20.2A	Potato	France	2010
	RNS 11.47.1.1A	Potato	France	2011
<i>D. solani</i>	<i>MIE 35</i>	Potato	Switzerland	2005
	IPO 2222	Potato	Netherlands	2007
	PPO 9019	Muscari	Netherlands	2006
	PPO 9134	Hyacynth	Netherlands	2008
	RNS 05.1.2A	Potato	France	2005
	RNS 07.7.3B	Potato	France	2007
	3337	Potato	France	2008
	RNS 10.68.1A	Potato	France	2010
	RNS 12.6.1A	Potato	Suisse	2012
	EU3296	Potato	Israel	2008
	F8	Potato	Finland	2004
	MK16	River water	Scotland	ND
	Ds0432.1	Potato	Finland	2004

Table 4: List of strains used in this study

Molecular Phylogenic analysis

An MLSA (Multi-Locus Sequence Analysis) was performed using ten housekeeping genes (*dnaN*, *dnaX*, *rpoS*, *rpoD*, *gyrA*, *recA*, *fusA*, *gyrB*, *purA*, *gapA*) to retrieve their phylogenetic position. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the Tamura-Nei model. The tree with the highest log likelihood (-65765.9751) is shown. Initial tree for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths representing the number of substitutions per site. Evolutionary analyses were conducted using MEGA7.

Competition of artificial populations in liquid cultures

Artificial populations of *D. dianthicola* consisted in the mix of the five strains RNS 1147, CFBP 2982, CFBP1888, CFBO2015 and MIE34 in equal proportion, while artificial population of *D. solani* in that of the five strains 3337, IPO2222, PPO9019, Ds0432.1 and 0512.A. Fresh liquid TY or M9 medium (Na_2HPO_4 , $12\text{H}_2\text{O}$ 17,2 g/l; KH_2PO_4 3 g/l; NaCl 2,5 g/l; NH_4Cl 1 g/l, MgSO_4 2 mM; CaCl_2 100 μM ; D-glucose 4 g/l) were inoculated at an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0,05 ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) by a mixture at an equal ratio of artificial populations of *D. dianthicola* and *D. solani*. After growth 24h at 28°C, cultures were centrifuged 15 min at 4000 rpm and pellets of cells were harvested and store at -20°C before DNA extraction. The experiment was performed in triplicate. Statistical difference of the level of populations was calculated using the *Kruskal-Wallis* test with $p < 0,05$.

Competition of artificial populations in planta

A mixture (ratio 1:1) of *D. dianthicola* and *D. solani* artificial populations was used for inoculating potato tubers and plants and hyacinths. The inoculation method was the same than that used for aggressiveness assays, i.e. injection of 10^7 CFU for tubers and watering with 10^9 CFU/plants in greenhouse assay. Before infection, an aliquot of *D. dianthicola* and *D. solani* mixture was centrifuged and stored frozen for DNA extraction. Macerated tissues were recovered and dissociated in 10 ml PB buffer (Na_2HPO_4 2,7 g/l; NaH_2PO_4 0,4 g/l; pH 7,2) under agitation. After elimination of rotten tissues, the macerate was centrifuged 15 min at 4000 rpm and the supernatant was discarded. Pellets of cells were harvested and store at -20°C for DNA extraction. Statistical difference of the level of populations was calculated using the *Kruskal-Wallis* test with $p < 0,05$.

Bacterial DNA extraction

DNA extractions were performed using the MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Illumina) according to the manufacturer protocol for cells samples. Both samples were quantified by NanoDrop and analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel with ethidium bromide staining.

Quantification of *D. dianthicola* and *D. solani* populations using TaqMan qPCR

Levels of populations were quantified by TaqMan technology. Specific primers were available in the lab (confidential sequences) for *D. solani* and *D. dianthicola*. The TaqMan probes were labelled with the 5'-end reporter dye FAM-6-carboxyfluorescein or Yakima Yellow and 3'-end quencher dye (BHQ-1). For each TaqMan qPCR, 2 µl sample were mixed with 18 µl reaction mix containing 10 µl 2X of FastStart Essential Probe Master (Roche), 0,5 µM of each forward and reverse primer and 0,2 µM of associate dye. For both TaqMan protocols, the thermal cycling conditions included an initial 2 min incubation at 50 °C and 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles, consisting in 10 s at 95 °C and an annealing temperature of 62°C for 80 s. Analysis of runs was done by automatic threshold calculation within the LightCycler® 96 software version.

Statistical analysis of competitiveness assays

For each competitiveness assay, competitive index (CI) were calculated as previously described (Macho *et al.*, 2010) and then transformed to a square root so the values follow a normal distribution (Shapiro-Wilk normality test, P value > 0.05). Each CI (square root transformed) was analyzed using Student's t-test. The null hypothesis was mean CI is not significantly different from 1 (P value < 0.05 was used).

Aggressiveness of individual strains on potato tubers and chicory leaves

Assessment of aggressiveness was carried out on potato tuber (Cv. Bintje) and on chicory leaves (Cv. Witloof). Ten tubers were infected by infiltration of each pathogen (at 10⁷ CFU/tuber). The experiment was performed five times; hence 500 tubers were infected and analysed. After four days of incubation at 24°C, five aggressiveness categories were considered and attributed to each infected tuber. A pathological index was calculated using the following formula:

$$\text{Pathological Index} = \frac{\sum(\text{number of tubers per class} \times \text{class coefficient})}{\text{Total of tubers}} \times 100$$

For chicory, 10 leaves were infected by infiltration of each pathogen (10⁷ CFU/leaf). After 24h at 24°C, the lengths of macerated tissues were measured. The experiment was performed three times; hence 300 chicory leaves were infected and analysed. Results were represented as

normalized values. Heterogeneity of species/ strains was assessed using a *Kruskal-Wallis* test with p value <0,05. Statistical significance of the pairwise comparisons between strains/species was calculated using a post-hoc *Tukey* test with p<0,05.

Aggressiveness of individual strains and of artificial populations on potato and hyacinth plants in greenhouse

Aggressiveness was also measured on hyacinths and potato plants growing in greenhouse. Fifteen potato plants (3 weeks post tuber plantation) and 8 hyacinths (4 weeks post bulb plantation) were infected by watering the soil with each pathogen (at 10^9 CFU/ plant). The symptoms on plants were recorded every 2 days along a 70 days post infection (dpi) period. Plants were grown under controlled environment in a greenhouse at 23°C with a 12 hours photoperiod.

To test aggressiveness of artificial populations 15 potato plants (3 weeks post tuber plantation) and 8 hyacinths (4 weeks post bulb plantation) were infected by watering the soil with each artificial population (*D. solani*, *D. dianthicola* and mixture of both, at 10^9 CFU/ plant). A set of potato plants were wounded by cutting roots with a knife before infection. Plants were grown under controlled environment in a greenhouse with a 12 hours photoperiod at 23°C, and a set of potato plants at 28°C for testing high temperature conditions.

Virulence assays were statistically analysed to infer the aggressiveness variability within strains on different plant environments. Heterogeneity of strains/species was assessed using a *Kruskal-Wallis* test with p<0,05. Statistical significance of the pairwise comparisons between strains/species was calculated using a post-hoc *Tukey* test with P value <0,05.

Growth inhibition of individual strains on agar plates

For each strain of *D. dianthicola* and *D. solani*, bacterial lawns of 10^6 CFU were performed on TY agar plates. Five μ l of each strain adjusted to 10^9 CFU were spot on the bacterial lawn. Agar plates were incubated for 24 h at 28°C. Inhibition halo were measured.

5. Results

The *D. dianthicola* and *D. solani* panel

Genome of 24 *D. dianthicola* and *D. solani* isolates were sequenced by Illumina technology. Ten concatenated housekeeping genes were aligned to construct a relation tree between them. All the *D. solani* isolates clustered and were separated from the other pectinolytic species. As described previously (Khayi *et al.*, 2015), only *D. solani* strain 0512A was slightly distant from the *D. solani* core population. Isolates of *D. dianthicola* were clearly distinguished from other species. MLSA also revealed 3 clusters within genomic groups within the *D. dianthicola* species. Most strains belonged to one of these clusters, while each of the two others encompassed only two strains. *D. solani* and *D. dianthicola* panels were constituted according to their position in the MLSA (every genomic cluster was represented) and their isolation conditions (plant host, years and location). The *D. solani* panel encompassed the strains 3337, IPO2222^T, 0512A, 0432.1 and PPO9019, while the *D. dianthicola* panel, the strains RNS 1147, CFBP 1888, CFBP 2982, CFBP 2015 and MIE34 (Figure 19).

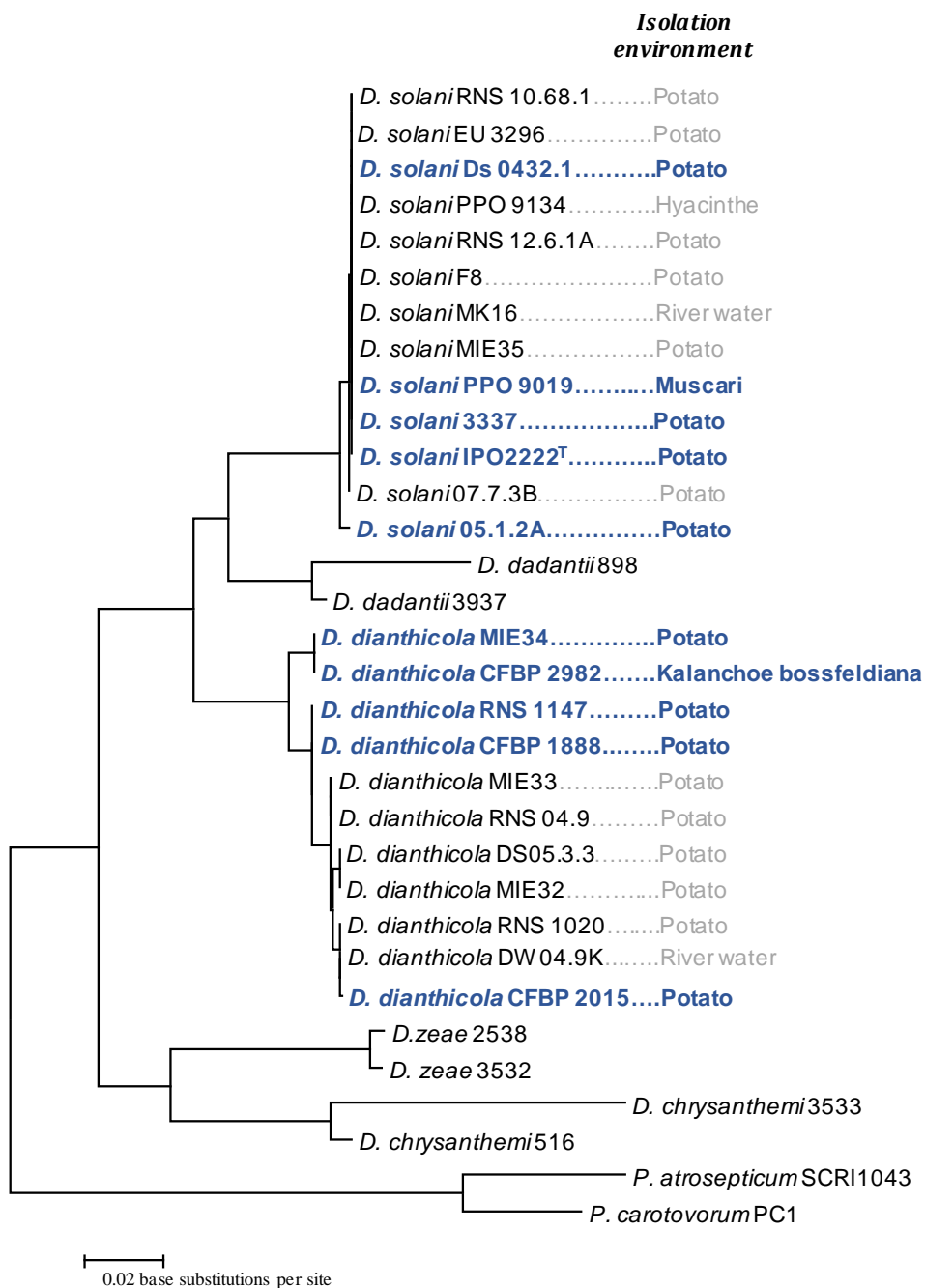


Figure 19: MLSA based on 10 concatenated housekeeping genes (*dnaN*, *dnaX*, *rpoS*, *rpoD*, *gyrA*, *recA*, *fusA*, *gyrB*, *purA* and *gapA*). Strains written in blue were those selected for the study.

A/ Aggressiveness and competitiveness of artificial populations

***D. dianthicola* population was more aggressive and competitive on potato plant than *D. solani* population**

Aggressiveness assays were carried out on potato plants under different conditions. Plants roots were wounded or did not before infection by the pathogen population; then after infection the unwounded and wounded plants were cultures under two temperatures, 23 or 28°C. Three *Dickeya* populations were inoculated: the *D. solani* artificial population, the *D. dianthicola* artificial population and a mix of both. *D. dianthicola* population was more aggressive than the *D. solani* population regardless of the root wounding or temperature parameters. *D. dianthicola* population caused at least 46% of symptomatic plants whereas the *D. solani* population induced symptoms on 33% of plants at best. However, the number of symptomatic plants significantly increased ($p=10^{-9}$) when roots were wounded before infection, regardless the temperature or bacterial population used. An increased temperature reduced the symptoms provoked by *D. dianthicola* population, while temperature did not affect those induced by *D. solani* population. Finally, when plants were infected by a mixture of both population, the symptomatic values closely approximated those caused by *D. dianthicola* population alone (Figure 20).

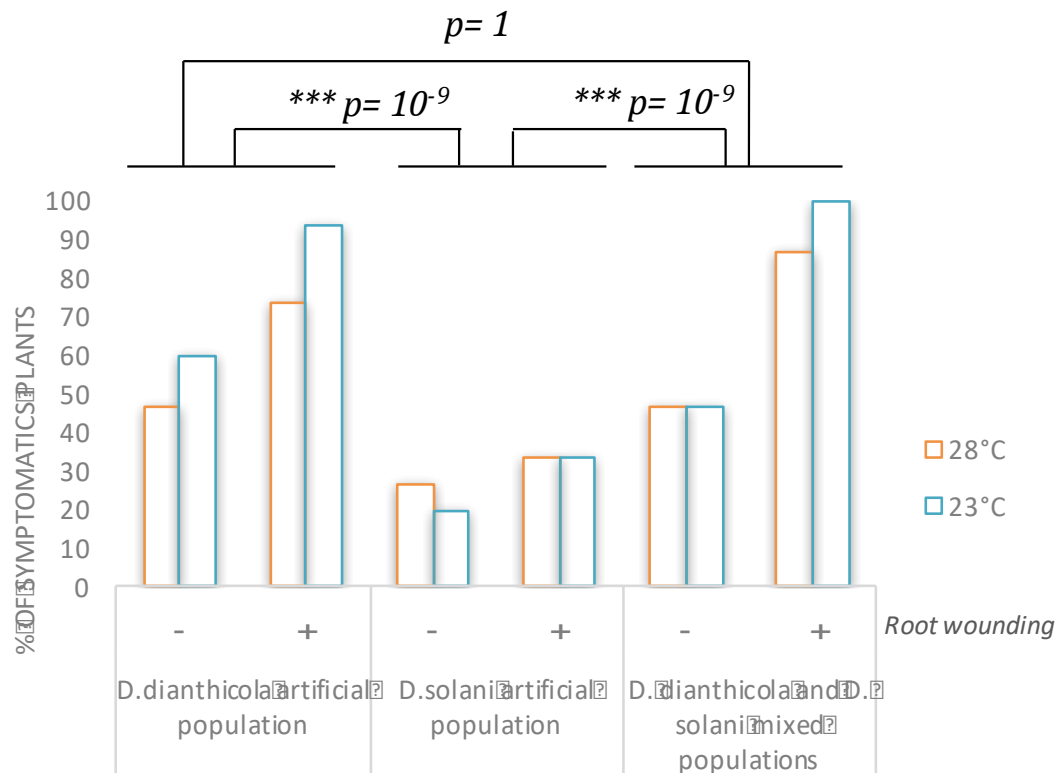


Figure 20: Aggressiveness assays of artificial populations on whole potato plants. Experiment was done in 15 independent plant for each condition. Statistical differences were calculated by the Kruskal-Wallis and Tukey test. * : $0,05 \leq p \leq 0,1$ ** : $0,01 \leq p \leq 0,05$ ***: $p \leq 0,001$

At 23°C, the first symptoms appeared 30 days after inoculation. The *D. dianthicola* population had a faster kinetics of symptom development than the *D. solani* population, reaching 60% of symptomatic plants when they were not wounded and 93% of symptomatic plants when they were before inoculation. *D. solani* population reached 20% and 33% respectively. The fastest kinetics was observed with mixed infections; it reached 46% of symptomatic plants when they were not wounded and 100% at 56 dpi when the plants were wounded. Finally, when plants were infected by a mixture of both populations, the symptomatic values closely approximated those caused by the *D. dianthicola* population alone. In plants infected by the mix of the two populations, quantification by qPCR revealed that *D. dianthicola* population dominated the *D. solani* population in the symptom zone, regardless of root injury prior to inoculation (Figure 21, A).

At 28°C, the first symptoms appeared 20 days after inoculation, 10 days earlier than at 23°C. As at 23°C, the *D. dianthicola* had the fastest kinetics of infection, reaching 73% and 46% of symptomatic plants when they were wounded or not, respectively. The appearance of the symptoms generated by population of *D. solani* were faster (30 dpi) at 28°C than at 23°C (51 dpi) but reach a maximum value immediately. Concerning the mixed inoculations, symptomatic plants reached 46% when they were not wounded and 86% when they were (Figure 21, A). Finally, when plants were infected by a mixture of both population, the symptomatic values closely approximated those caused by *D. dianthicola* population alone. In plants infected by the mix of the two populations, quantification by qPCR reveals that *D. dianthicola* population dominated the *D. solani* population in the symptom zones. CI values suggest that the *D. dianthicola* population had better fitness in the whole plant, regardless of temperature or root injury before inoculation.

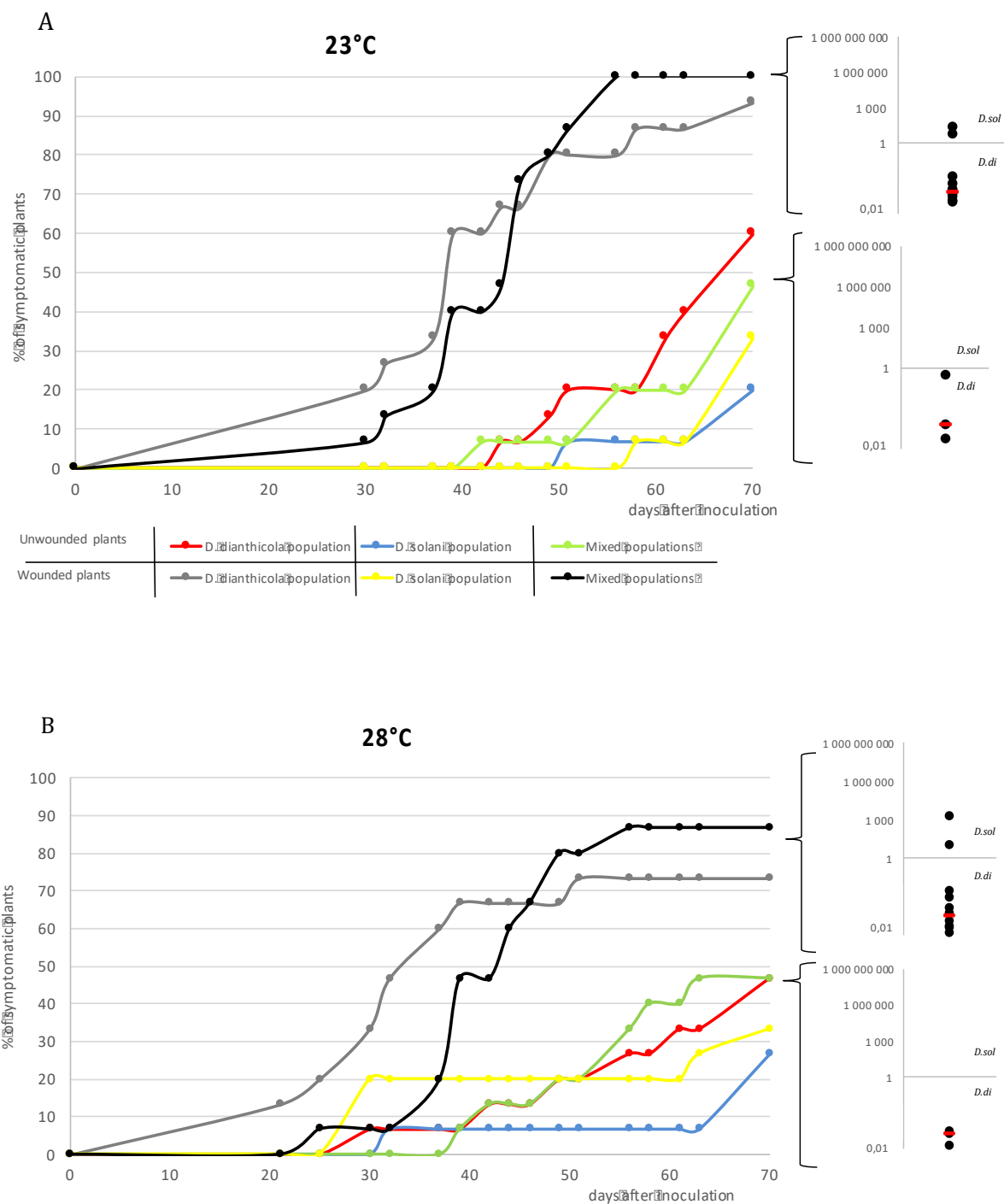


Figure 21: Kinetics of symptoms and competition assays on whole potato plants. **A**, Kinetics of symptoms and competitive index (CI) at 23°C. **B**, Kinetics of symptoms and competitive index at 28°C. Experiment was done in 15 independent plants for each condition. CI was defined as the *D. solani* population/*D. dianthicola* population ratio within the output sample divided by the corresponding ratio in the inoculum. The median of CI values is shown in red.

***D. solani* population dominated *D. dianthicola* population in potato tuber**

Competition assays were carried on potato tubers to determine whether the fitness of the populations depended on compartment within the plant. When they were inoculated separately, populations of *D. dianthicola*, *D. solani* or the mixed populations had the same growth kinetics in tubers. Therefore, populations could colonise the potato tuber as an ecological niche ($p > 0,05$). When tubers were infected with a mixture of both populations, the *D. dianthicola* population was found to multiply less efficiently than the *D. solani* population regardless of temperature. CI value showed a better competitive capability of *D. solani* population in tubers at 23°C and at 28°C, a feature that suggests a better fitness of the population of *D. solani* in tubers. (Figure 22).

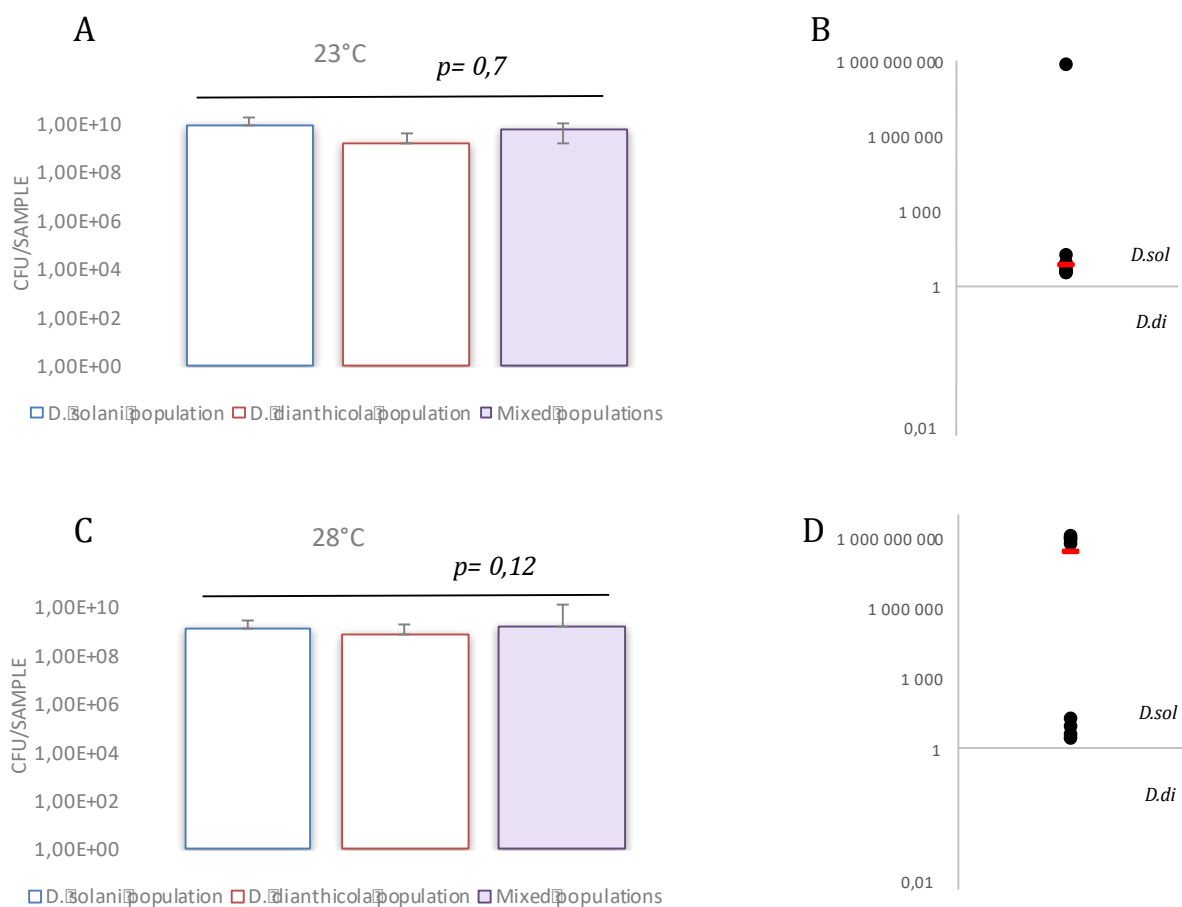


Figure 22: Internal growth and competition assays on tubers. **A**, Growth of artificial population of *D. dianthicola*, *D. solani*, and mix of both in potato tubers at 23°C. **B**, CI values of the two populations of *D. dianthicola* and *D. solani* at 23°C. **C**, Growth of artificial population of *D. dianthicola*, *D. solani*, and mix of both in potato tubers at 28°C. **D**, CI values of the two populations of *D. dianthicola* and *D. solani* at 28°C. CI was defined as the *D. solani* population/*D. dianthicola* population ratio within the output sample divided by the corresponding ratio in the inoculum. The median of CI values was shown in red. Experiment was done in 10 independent replicates. Statistical differences were calculated by the Kruskal-Wallis test. * : $0,05 \leq p \leq 0,1$ ** : $0,01 \leq p \leq 0,05$ *** : $p \leq 0,001$

***D. solani* population was more aggressive and competitive on hyacinth plants than *D. dianthicola* population**

Aggressiveness assays were carried out on hyacinths. Three *Dickeya* populations were inoculated : the *D. solani* artificial population, the *D. dianthicola* artificial population and a mix of both. *D. solani* population was more aggressive than the *D. dianthicola* population causing 50% and 25% of symptomatic plants, respectively. When plants were infected by a mixture of both populations, the symptomatic values and kinetics were at the intersection of the two populations. CI value indicated a better competitive capability of *D. solani* population in hyacinths, a feature that suggests a better fitness and a better adaptation of the population of *D. solani* to hyacinths (Figure 23).

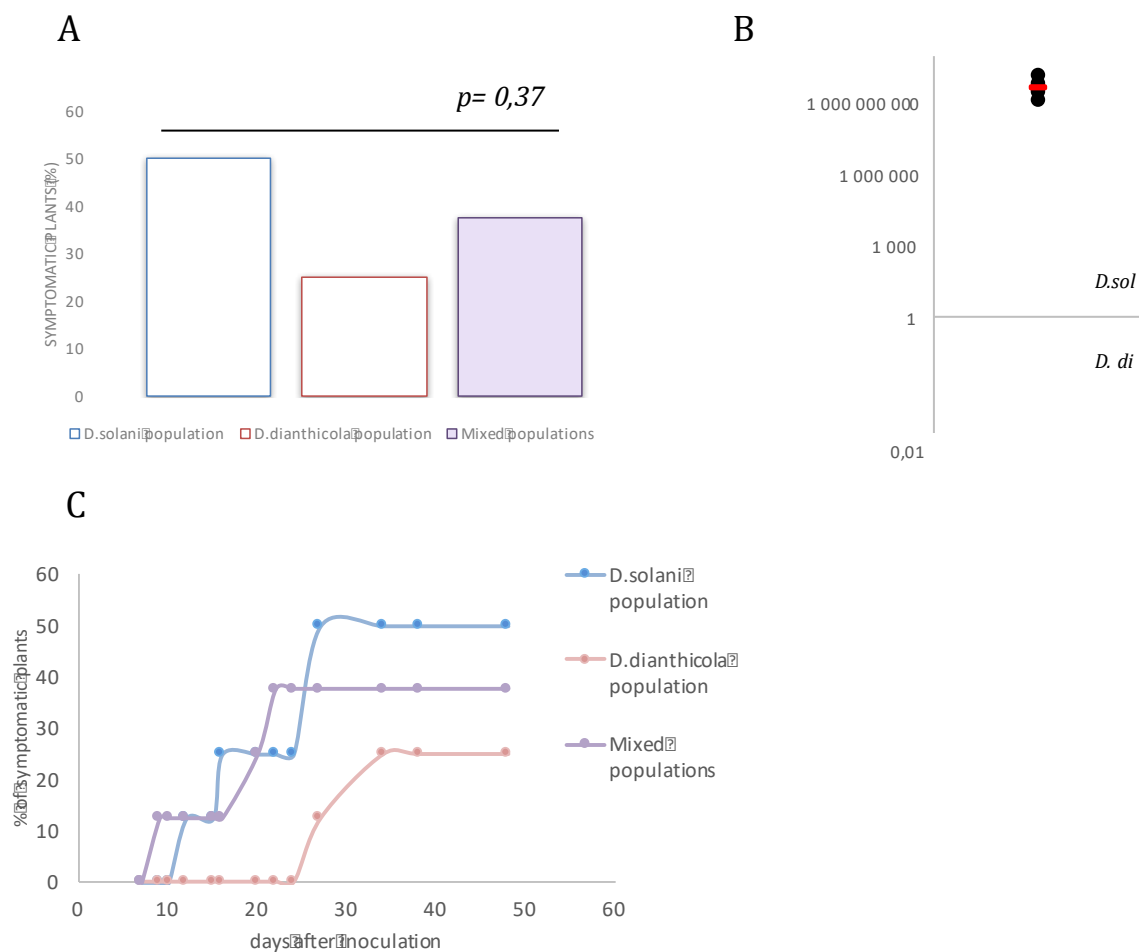


Figure 23: Aggressiveness and competition assays on hyacinths. **A**, Aggressiveness of artificial populations of *D. dianthicola*, *D. solani* and mix of both in hyacinth plants. **B**, CI of the two populations of *D. dianthicola* and *D. solani* in hyacinths. CI was defined as the *D. solani* population/*D. dianthicola* population ratio within the output sample divided by the corresponding ratio in the inoculum. The median of CI values was shown in red. **C**, Kinetic of symptoms on hyacinth plants of the *D. dianthicola*, *D. solani* and mix of both populations. The experiment was done in 8 independent replicates. Statistical differences were calculated by the Kruskal-Wallis test. * : $0,05 \leq p \leq 0,1$ ** : $0,01 \leq p \leq 0,05$ *** : $p \leq 0,001$

***In vitro* competition assays between *D. solani* and *D. dianthicola* populations**

When *D. dianthicola* or *D. solani* artificial populations were inoculated separately, they reached a cell density (UFC/ml) similar to that reached when both populations were co-inoculated in TY rich medium or M9 minimal medium (Figure 24, A, C and E). When both populations were co-inoculated, the *D. dianthicola* population decreased significantly in M9 medium and TY medium at 23°C and was undetectable after 24 h of co-culture in TY medium at 28°C. The CI values showed that *D. solani* population appears highly competitive in liquid culture *in vitro* (Figure 24, B, D and F).

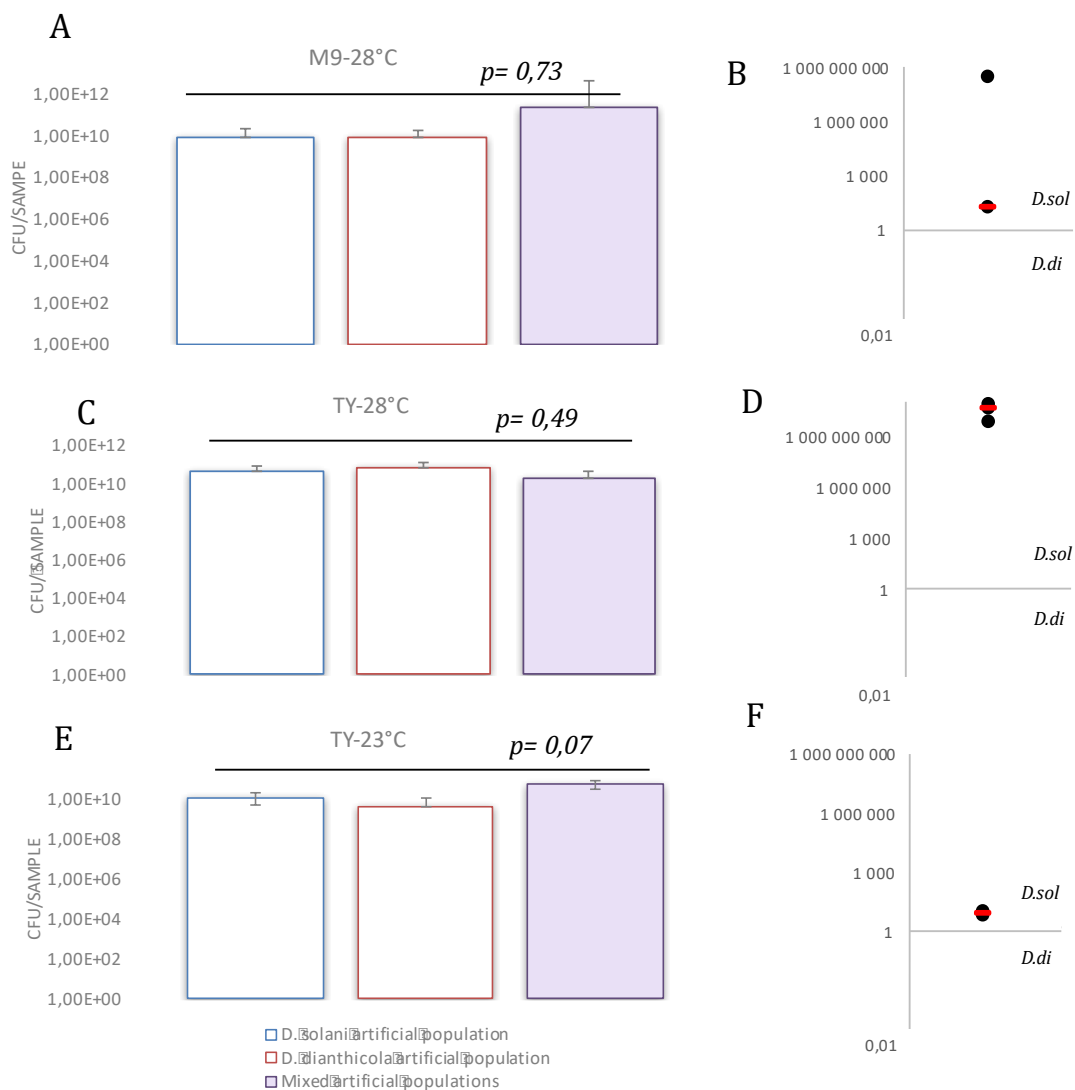


Figure 24: Bacterial growth and competition assays *in vitro* of artificial populations of *D. dianthicola* or *D. solani*. **A**, Population growth in M9 medium at 28°C. **B**, CI of populations in M9 medium at 28°C. **C**, Population growth in TY medium at 28°C. **D**, CI of populations in TY medium at 28°C. **E**, Populations growth in TY medium at 23°C. **F**, CI of populations in TY medium at 23°C. CI was defined as the *D. solani* population/*D. dianthicola* population ratio within the output sample divided by the corresponding ratio in the inoculum. The median of CI values is shown in red. All the experiments were done at 24 hours post-inoculation. Experiments were done in 3 independent replicates. Statistical differences were calculated by the Kruskal-Wallis and Tukey tests. * : $0,05 \leq p \leq 0,1$ ** : $0,01 \leq p \leq 0,05$ *** : $p \leq 0,001$

B/ Individual aggressiveness and competitiveness : are they traits of species?

***D. dianthicola* strains were more aggressive than *D. solani* strains on potato plants**

Aggressiveness assays were carried out on potato plants for each strain composing artificial populations. Strains of *D. dianthicola* were more aggressive than strains of *D. solani* causing about 50% of symptomatic plants while *D. solani* strains caused near 15% of symptomatic plants. The aggressiveness of strains was significantly different ($p = 0,008$) between *D. solani* and *D. dianthicola* and suggested that variability of aggressiveness on potato plant was a species traits (Figure 25).

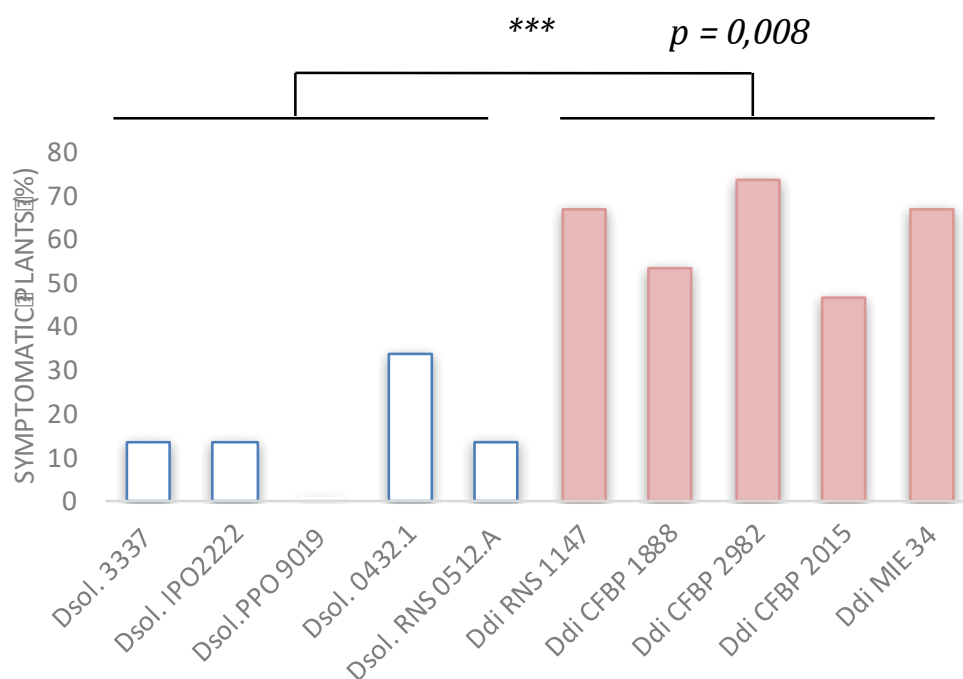


Figure 25: Aggressiveness assays of strains composing the two artificial populations on potato plants. Experiment was done in 15 independent plants. Statistical differences were calculated by the Kruskal-Wallis test. *: $0,05 \leq p \leq 0,1$ **: $0,01 \leq p \leq 0,05$ ***: $p \leq 0,001$

***D. solani* strains were more aggressive than *D. dianthicola* strains on potato tubers**

Aggressiveness assays were carried out on potato tubers for each strain composing artificial populations. Aggressiveness assays on tubers showed that strains composing the *D. solani* population were more aggressive on tubers than strains composing the *D. dianthicola* artificial population. The strain *D. solani* 0432.1 was the more aggressive with a pathological index around 90%. The strain the less aggressive was *D. dianthicola* CFBP 1888 with a pathological index around 40%. (Figure 26).

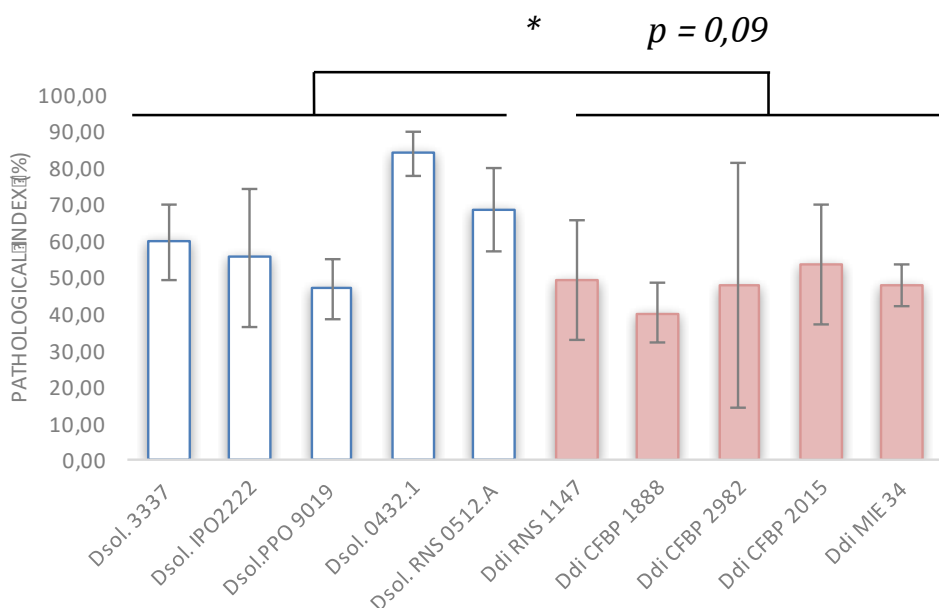


Figure 26: Aggressiveness assays of strains composing the two artificial populations on potato tubers. Experiment was done in 10 independent replicates. Statistical differences were calculated by the Kruskal-Wallis test. *: $0,05 \leq p \leq 0,1$ **: $0,01 \leq p \leq 0,05$ ***: $p \leq 0,001$

***D. solani* strains were more aggressive than *D. dianthicola* strains on hyacinths**

Aggressiveness assays were carried out on potato hyacinths for each strain composing artificial populations. Aggressiveness assays showed significant differences ($p=0,08$) in virulence between the strains composing the *D. solani* population and the strains composing the *D. dianthicola* population. The strain *D. solani* 3337 and *D. solani* RNS 0512A were highly aggressive on hyacinth and caused 60% of symptomatic plants while the others strains of *D. solani* caused 25 and 40% of symptomatic plants (Figure 27).

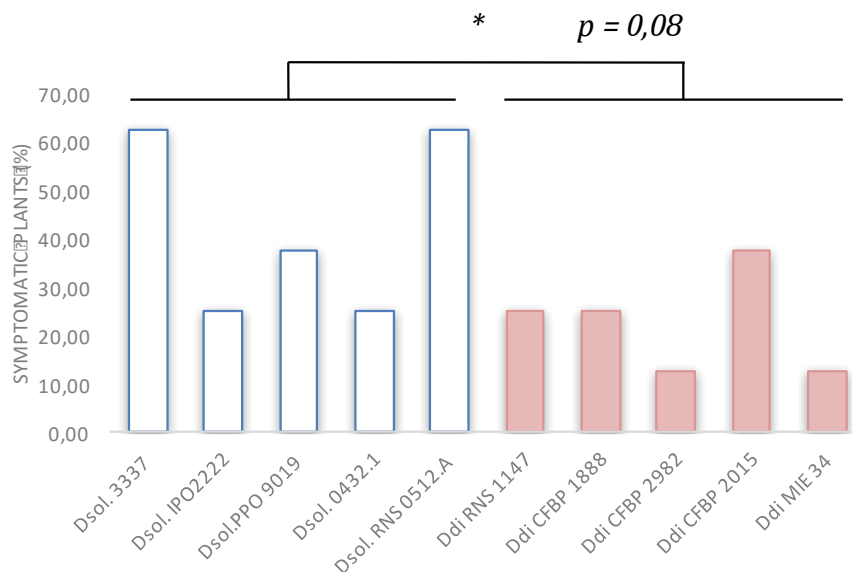


Figure 27: Aggressiveness assays of strains composing the two artificial populations on hyacinths. Experiment was done in 8 independent replicates. Statistical differences were calculated by the Kruskal-Wallis test. *: $0,05 \leq p \leq 0,1$ **: $0,01 \leq p \leq 0,05$ ***: $p \leq 0,001$

***D. solani* strains were more aggressive than *D. dianthicola* strains on chicory leaves**

Aggressiveness assays were carried out on chicory leaves for each strain composing artificial populations. Strains of *D. solani* were more aggressive than strains of *D. dianthicola* causing longer maceration on leaves than *D. dianthicola* strains. The aggressiveness of strains was significantly different ($p = 0.02$) between *D. solani* and *D. dianthicola* and suggested that was a species traits (Figure 28).

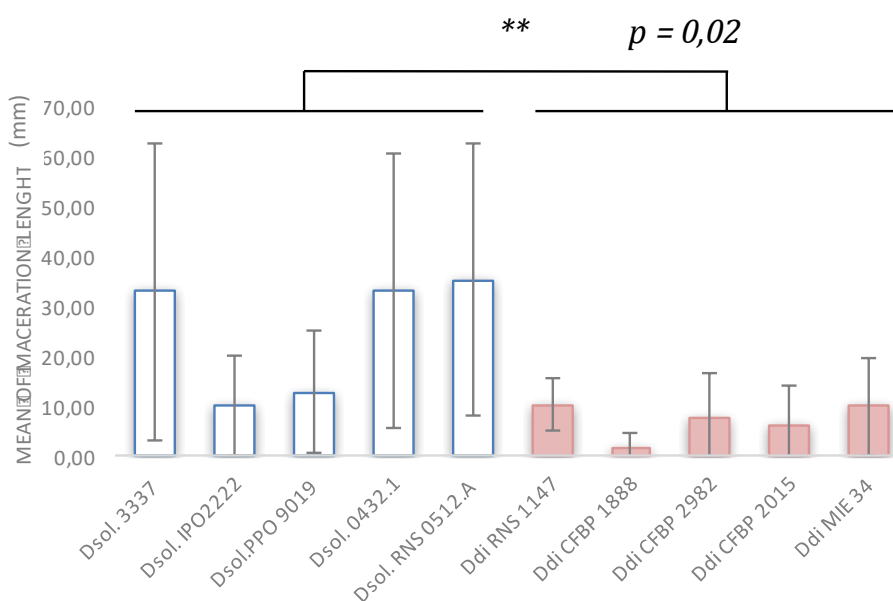


Figure 28: Aggressiveness assays of strains composing the two artificial populations on chicory leaves. Experiment was done in 10 independent replicates. Statistical differences were calculated by the Kruskal-Wallis test. *: $0,05 \leq p \leq 0,1$ **: $0,01 \leq p \leq 0,05$ ***: $p \leq 0,001$

Individual growth inhibition assays on agar plates

Growth inhibition assays were conducted on TY agar plates with all the 10 *D. solani* and *D. dianthicola* strains to each other. After 24 h of incubation, 8 strains inhibited growth of some others. The strains *D. dianthicola* 1888, *D. solani* IPO2222 and *D. solani* 9019 impaired growth of some strains belonging to the same species only, while *D. dianthicola* 1147, *D. dianthicola* MIE34 and *D. solani* 0512A inhibited the growth of some strains (but not all) of two species. However, *D. dianthicola* 2015 and *D. solani* 3337 did not show any inhibitory activity. Growth inhibition capacity in TY medium did not appeared as a species trait but as strain dependant characteristics (Figure 29).

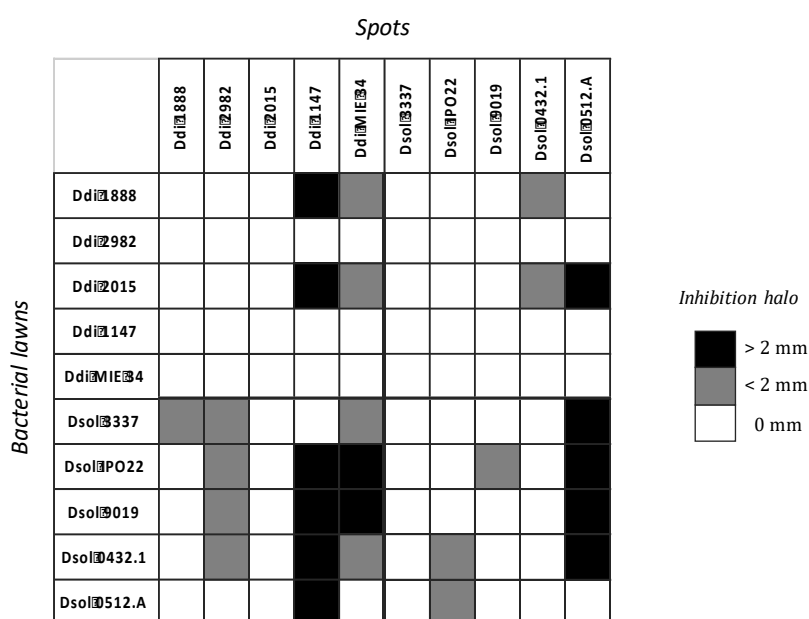


Figure 29: Individual growth inhibition assays on TY agar plates after 24 h of incubation at 28°C.

6. Discussion

Les *D. dianthicola* et les *D. solani* présentent de nombreuses différences sur le plan fonctionnel et notamment en termes de pathogénicité. Les populations artificielles se comportent différemment selon l'environnement qu'elles ont à coloniser. La population artificielle de *D. dianthicola* se montre beaucoup plus agressive et compétitive sur plantes entières de pommes de terre en serre. Ces résultats expérimentaux reflètent les données recueillies sur le terrain, notamment sur les parcelles de pommes de terre au nord de la France.

La population artificielle de *D. solani* se montre, quant à elle, très agressive et très compétitive lorsqu'elle est inoculée sur jacinthes, injectée directement dans les tubercules de pommes de terre ou en milieu liquide riche ou minimum. Cette population rencontre des difficultés lors de la colonisation de la plante par la rhizosphère, lors de la pénétration des tissus. Ces données renforcent l'hypothèse d'une adaptation à l'hôte pomme de terre des *D. solani*, originellement pathogènes d'une ou de plantes ornementales de type « bulbe ».

La meilleure adaptation des *D. dianthicola* pour l'hôte pomme de terre est sans doute régie par le temps d'établissement de la communauté pathogène de *D. dianthicola* (depuis 50 ans environ) à comparer à celle de *D. solani* (10 ans environ).

Les tests individuels d'agressivité sont corrélés avec les tests sur populations et révèlent que l'agressivité différentielle est un trait d'espèce.

Suite à ces observations trois questions sont posées :

- La différence d'agressivité entre les populations de *Dickeya* est-elle due à une expression différentielle des gènes de virulence ?
- La compétitivité est-elle liée à l'expression de gènes spécifique permettant la colonisation d'une niche préférentielle ?
- Existe-il une variabilité de l'expression des gènes de virulence entre des isolats de la même espèce ?

Le chapitre suivant a pour vocation d'y répondre en adoptant une démarche de transcriptomique

Chapitre IV

Chapitre IV : Expression des fonctions de virulence et exploitation de la niche des *D. dianthicola* et *D. solani*

Partie 1 : Etude de l'expression des gènes associés à la virulence

1. Contexte scientifique

Comme vu précédemment, l'agressivité d'une espèce et sa capacité à coloniser la niche vis-à-vis d'une autre sont surtout corrélées à son adaptation à l'hôte. Ainsi *D. dianthicola* présente une facilité d'invasion sur plant de pomme de terre en étant très agressive. *D. solani* est très agressif lorsqu'il est inoculé dans les tubercules mais nettement moins sur plante entière. Ces niveaux d'agressivité différents pourrait-être corrélés à une expression de gènes différente d'une espèce à l'autre.

2. Présentation des travaux

Afin d'apporter de nouvelles réponses aux problématiques liées aux *Dickeya*, il s'agissait ici de collecter des données d'expression géniques, et ce dans plusieurs conditions sur pomme de terre. L'expression de gènes associés à la virulence tels que les pectate lyases ou impliqués dans la production de sidérophores a été comparée chez les souches de *D. solani* et *D. dianthicola* en condition de macération sur tubercules et sur tiges mais aussi en condition de culture libre sur milieu riche. De plus, l'expression de gènes impliqués dans la dégradation de sucres comme le L-rhamnose et le D-arabinose, trait spécifique d'espèces, a aussi été comparée chez les deux espèces afin de déterminer si la colonisation de la niche était associée à une spécificité d'utilisation de ses sucres. Parallèlement, dans le but de rechercher un éventuel gain de fitness en lien avec l'acquisition d'une fonction, des tests ont été menés sur tubercules mettant en compétition la population artificielle de *D. dianthicola* et une souche mutante de *D. solani*. Cette souche est devenue capable de transporter et d'utiliser le L-rhamnose comme source de carbone, tout comme *D. dianthicola*. Ces tests nous apportent des réponses essentielles quant à la colonisation et l'utilisation des ressources dans la niche écologique de chaque espèce.

Les résultats de ce chapitre sont présentés en anglais pour une publication prochaine.

3. Contributions

La collection de souches bactériennes a pu être réalisée grâce à l'aide de Frédérique Van Gijsegem (INRA, IEES Paris) et de Valerie Hélias (FN3PT/INRA - Agrocampus Ouest Rennes). Les expériences en serre, les prélèvements de symptômes et les extractions d'ARN ont été faites avec Kévin Robic, dans le cadre de son stage de Master 2. Les plaques Biologs identifiant les propriétés d'utilisation des sucres par les bactéries, comme sources de carbone, ont été réalisées par Yannick Raoul des Essarts dans le cadre de sa thèse (2012-2015). Enfin, Sylvie Reverchon (MAP, Lyon) a effectué la construction de la souche mutante utilisée dans cette étude. Le texte a bénéficié de la relecture critique de Denis Faure et de Yves Dessaux.



4. Material and methods

Bacterial strains and growth conditions

Dickeya strains were collected from different geographical locations, dates of isolation and hosts and environments (Table 5). All the strains were routinely cultured in TY medium (tryptone 5g/l; yeast extract 3g/l and agar 1,5%) at 28°C. The growth curves of *Dickeya* were computed by monitoring the optical density at 600 nm.

	<i>Name</i>	<i>Host</i>	<i>Country</i>	<i>Date of isolation</i>
<i>D. dianthicola</i>	MIE-34	Potato	Switzerland	2013
	CFBP 1888	Potato	France	1988
	CFBP 2015	Potato	France	1975
	CFBP 2982	Kalanchoe blossfeldiana	France	1988
	RNS 11.47.1.1A	Potato	France	2011
<i>D. solani</i>	IPO 2222	Potato	Netherlands	2007
	PPO 9019	Muscari	Netherlands	2006
	RNS 05.1.2A	Potato	France	2005
	3337	Potato	France	2008
	Ds0432.1	Potato	Finland	2004

Table 5 : List of strains used in this study

RNA extractions

RNAs were extracted from 3 growth conditions per strain: exponential growth, maceration on tubers and maceration on stems. Exponential growth was obtained in culture performed in TY medium. Bacterial cells were collected when culture reached an optical cell density (OD₆₀₀) of 0,6. For each strain, 30 tubers were infected by infiltration of 10⁷ UFC. At 5 days post infection, soft rots of tubers were crushed into 10 ml of GL20 (20% RNA protect (RNA protect Cell Reagent, Qiagen) and 80 % buffer KPO₄ 50 mM). To obtain stem macerates, 10 young potatoes were infected by watering the soil with 10⁹ CFU of each pathogen. Symptomatic tissues were recovered when they appeared and immediately frozen in liquid nitrogen. All RNAs extractions were carried out using the the MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Illumina) according to the manufacturer protocol for cells samples. Both samples were quantified by NanoDrop and analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel with ethidium bromide staining.

Evaluation of gene expression by RT-qPCR

cDNAs were prepared from 1µg of RNA using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Saint-Remy-les-Chevreuse, France) following the manufacturer instructions. RT-qPCRs were performed on a Lightcycler® 96 (Roche) apparatus. Each sample was run in duplicate. Expression values were normalized using *rpoB* and *yafS* as reference genes (Chapelle *et al.*, 2015; Hommais *et al.*, 2011). The comparative CT ($\Delta\Delta CT$) method was used to measure relative expression (Livak and Schmittgen, 2001). Primers were designed online using Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) and are listed in Table 6

Species	Primer name	Forward	Reverse
	<i>Dsol-pelA-1</i>	5'-CTGATCGCTGGCATGATGAC-3'	5'-CTGAGCGCACTGGTGAATTC-3'
	<i>Dsol-pelD-1</i>	5'-GCGTGGTCAAGGCGTTTAAAC-3'	5'-CAGACTGGTGGTGATGGTTTG-3'
	<i>Dsol-pelE</i>	5'-AGTGGGATGCGGCAGTAATC-3'	5'-TCCTGCGAGCCATTGTTGTC-3'
	<i>Dsol-rpoB-1</i>	5'-TCATGCCCTGGAACGGTTAC-3'	5'-CTTCCGCACCGATGTAAACG-3'
	<i>Dsol-yafS-1</i>	5'-GCCCTAGCCCAATCAAACCTG-3'	5'-CGATTCCGCATCAGGTCAAC-3'
<i>D. solani</i>	<i>Dsol-rhaM</i>	5'-GCCTTTGTGATGCAGGTCTTC-3'	5'-TCCAGCGTTCTCCGATTTCG-3'
	<i>Dsol-rhaB</i>	5'-TGCCGTTCAACACCCTCTAC-3'	5'-CCGCTGTCCAGATTCAACAAC-3'
	<i>Dsol-gabD</i>	5'-GCCGTTGTTCCCGTTTGAC-3'	5'-CCCAGCCCTGATTGTTTCAC-3'
	<i>Dsol-Lfuc</i>	5'-GCCGTTGCTCATCTCAAAG-3'	5'-ACCTGCGTCCCTTCGTAATG-3'
	<i>Dsol-csbE</i>	5'-GGAGATCGAGAACCTGCTACTG-3'	5'-CGGTCCGGCAGTTTGTAGTC-3'
	<i>Dsol-acsD</i>	5'-AGGGCTGGAATCGCATCATG-3'	5'-GGCGACGGTTGTTTCAGTTC-3'
	<i>Ddi-pelA-1</i>	5'-GCAGCGTCCACAGTTTCAAC-3'	5'-CACCACCTGCACGCTTTG-3'
	<i>Ddi-pelD-1</i>	5'-GCGTCACCTTCCACAACAAC-3'	5'-CTTTGACCACGCTGCATTCC-3'
	<i>Ddi-pelE</i>	5'-GCGTCACCTTCCACAACAAC-3'	5'-CTTTGACCACGCTGCATTCC-3'
	<i>Ddi-rpoB-1</i>	5'-TCCGGGATTCTGAGCAAAGC-3'	5'-TTTACCACGACGTTCAACAC-3'
	<i>Ddi-yafS-1</i>	5'-CCAGCACAAACATCCCAGAAG-3'	5'-ACACGTCTGGCTGTCAATCG-3'
<i>D. dianthicola</i>	<i>Ddi-rhaM</i>	5'-AATACCGCCGCCGTCATG-3'	5'-GGGTTGGCAGGCATAATGTC-3'
	<i>Ddi-rhaTr</i>	5'-TAGTGGTCGGCACTCTGATG-3'	5'-AAGCAAAGCCCGAGGAGAAG-3'
	<i>Ddi-rhaB</i>	5'-GCATTGACACCCTGCATATCG-3'	5'-TCGGACAGATTCCGCACTTC-3'
	<i>Ddi-gabD</i>	5'-CGATTCTAACCGCCGAACAG-3'	5'-CGATGCCCTGCTTGATAACC-3'
	<i>D-csbE</i>	5'-GCGGAAGGACTGGTGAACCTAC-3'	5'-AGTAGCCCGAAAGGTGTAG-3'
	<i>D-acsD</i>	5'-CAGAGCGAGCAGGGATTGTG-3'	5'-GTTGGCGCCGATATGCAATC-3'

Table 6: Primers used in this study

Identification of species-specific genes

Previous studies have shown that *D. solani* and *D. dianthicola* are not able to use the same sugars as carbon sources (thesis Yannick Raoul des Essart). Identification of species-specific genes was performed using the CLC Genomics Workbench v7.0.0 software (CLC Inc, Aarhus, Denmark). After identifying operons involved in the degradation of L-rhamnose and D-arabinose on the reference genome of *D. dadantii* 3937, each gene was mapped (80% identity, 80% length) on *D. solani* and *D. dianthicola* reference genomes. Genes of these operons were BLASTed (CLC parameters: automatic determination of the word and bubble sizes with no scaffolding) on all *Dickeya* genomes available.

Construction of the mutant strain *D. solani* 3337-*rhaT*

The *D. solani* 3337-*rhaT* strain was constructed by cloning the *D. dianthicola rhaT* gene that encodes a rhamnose transporter between the *EcoRI* and *HindIII* sites of the vector pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1995). The vector was then electroporated into *D. solani* strain 3337 and selected with resistance to kanamycin using standard procedures. The mutant strain was verified for its ability to grow on L-rhamnose as sole carbon source prior to use.

Competition assays *in planta*

A mixture (ratio 1:1) of *D. dianthicola* population and *D. solani* 3337-*rhaT* mutant was used to inoculate potato tubers. The inoculation method was the same as that used for aggressiveness assays (injection of 10^7 CFU per tuber). Before infection, an aliquot of *D. dianthicola* and *D. solani* mixture was centrifuged and stored by freezing for DNA extraction. Macerated tissues were recovered and dissociated into 10 ml of PB buffer (Na_2HPO_4 2,7 g/l; NaH_2PO_4 0,4 g/l; pH 7,2) under agitation. After elimination of rotten tissues, the macerate suspension was centrifuged 15 min at 4000 rpm and the supernatant was discarded. Pellets of cells were harvested and stored at -20°C for DNA extraction. Statistical significance of the difference of population densities was assessed using the Kruskal-Wallis test with P value $<0,05$.

Bacterial DNA extraction

DNA extractions were performed using the MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Illumina) according to the manufacturer protocol for cells samples. Both samples were quantified by NanoDrop and analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel with ethidium bromide staining.

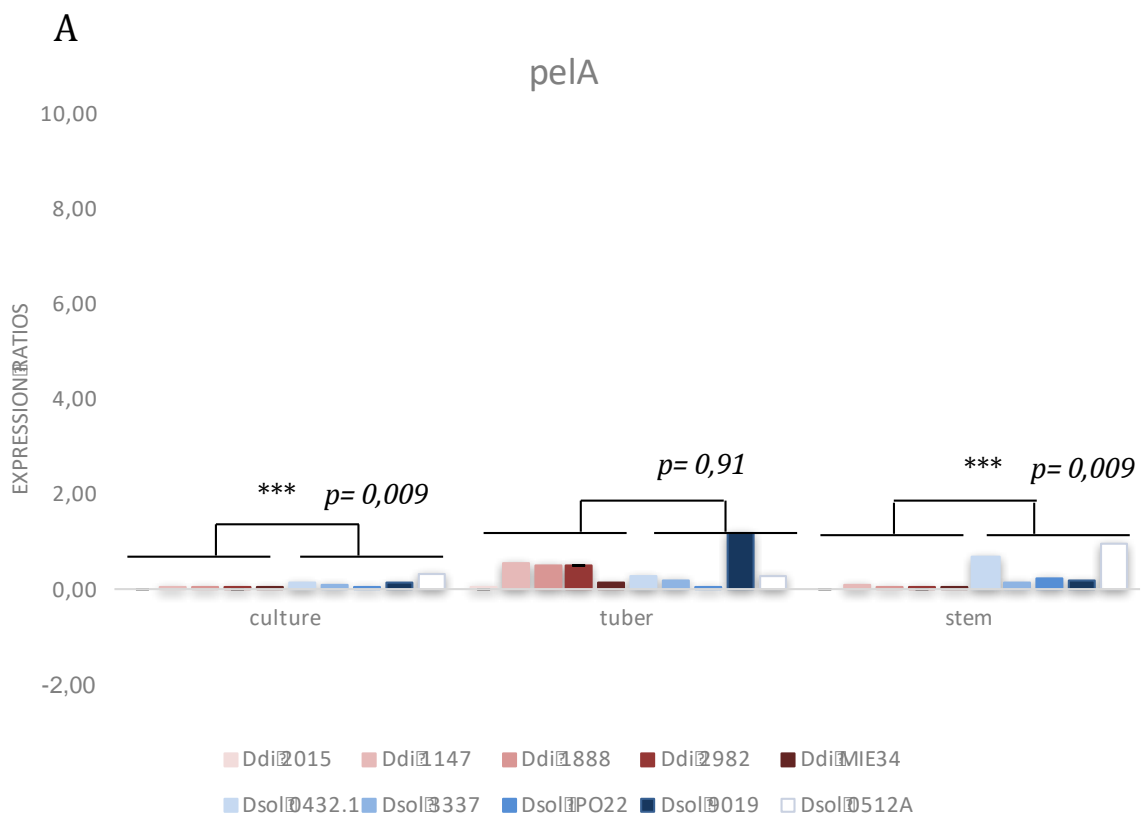
Quantification of *D. dianthicola* and *D. solani* populations using SybrGreen qPCR

Levels of populations were quantified using Sybrgreen technology. Specific primers were available in the lab (confidential sequences) for *D. solani* 3337 and *D. dianthicola*. For each Sybrgreen qPCR, 1 µl sample was mixed with 14 µl reaction mix containing 8 µl 2X of FastStart Essential DNA Green Master (Roche) and 3 µM of each forward and reverse primer. For both Sybrgreen protocols, the thermal cycling conditions included an initial 10 min phase at 95 °C, followed by 40 cycles, consisting of 15 s at 95 °C and an annealing temperature of 62°C for 15 s and 15 s at 72°C. To finish, a melting 15 s step at 95 °C was added. Analysis of runs was done by automatic threshold calculation within the LightCycler® 96 software version.

5. Results

Pectate lyases genes were more expressed in *D. solani* than in *D. dianthicola*

Expression levels of genes coding pectate lyase A, D and E were analyzed by RT-qPCR in each strain of *D. solani* and *D. dianthicola* under different conditions: culture, macerated tissues on tubers and macerated tissues on stems. *pelA* was the less expressed gene both in *D. dianthicola* and *D. solani* strains, and under in all conditions. Expression of *pelA* in *D. solani* strains and *D. dianthicola* strains was significantly different in culture and in macerated stems ($p < 0,05$) but not significantly in tubers (Figure 30, A). *pelD* was the most expressed pectate lyase under maceration conditions. In culture, *pelD* was almost non expressed. In tubers, the expression level of *pelD* (relative to the two housekeeping genes) of *D. dianthicola* expressed it 1 to 1.5 times more and the *D. solani* about 3 times more than the housekeeping genes. In stems, the *D. dianthicola* expressed it from 0.5 to 2.5 times whereas the *D. solani* expressed it up to 7 times more than in culture. Their difference of expression were highly significant ($p < 0,05$) (Figure 30, B). *pelE* was weakly expressed by the *D. dianthicola*, even in the condition of maceration in the tubers or the stems. This gene was more expressed by the *D. solani* in maceration conditions like 2 times in tubers and 5 times in stems (Figure 30, C). Pectates lyase genes were highly expressed in *D. solani* strain especially in stems.



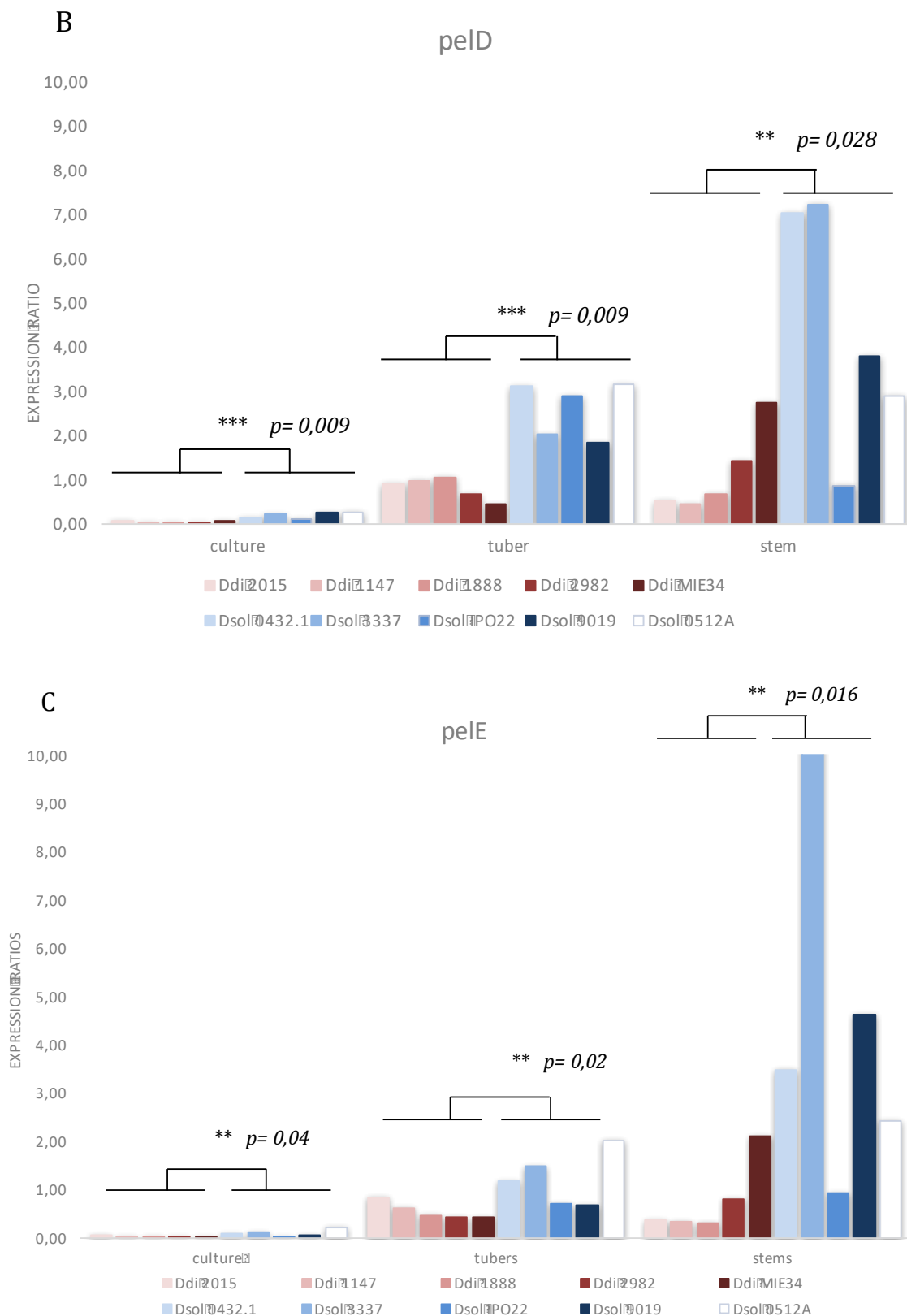
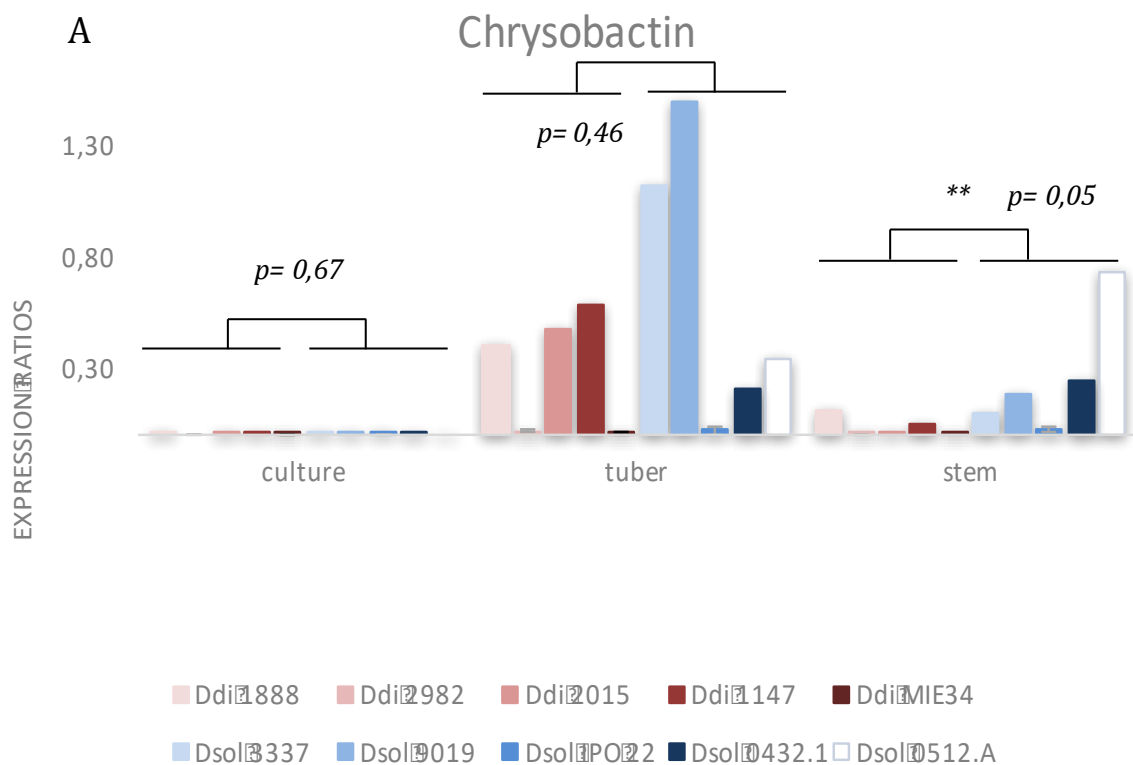


Figure 30: expression levels of pectate lyase A, D and E for five strains of *D. dianthicola* and five strains of *D. solani* in different conditions : culture, macerated tubers and macerated stems. Statistical differences between expressions were calculated by the Kruskal-Wallis test. * : $0,05 < p < 0,1$ ** : $0,01 < p < 0,05$ *** : $p \leq 0,001$

Expression of genes involved in siderophores production was not linked to the species

Expression levels of genes involved in production of siderophores such as achromobactin (*acsD*) and chrysobactin (*cbsE*) were analysed by RT-qPCR in each strain of *D. dianthicola* and *D. solani* under different conditions: exponential growth, maceration in tubers and maceration in stems. In culture, *cbsE* and *acsD* were repressed in both *D. dianthicola* and *D. solani* strains. In strains of both species, the *cbsE* gene was repressed or only poorly expressed in stems and expressed in tubers (Figure 31, A). A similar overall pattern was observed for the *acsD* gene (Figure 31, B). More importantly, expression of these genes was not significantly different between *D. solani* and *D. dianthicola* strains. It was not correlated with aggressiveness or fitness of species but was strain-dependant. Moreover, expression of these genes was variable within different samples of the same strain (not shown). This could be related to a proper metabolic rate of the bacterium within a population at a given time.



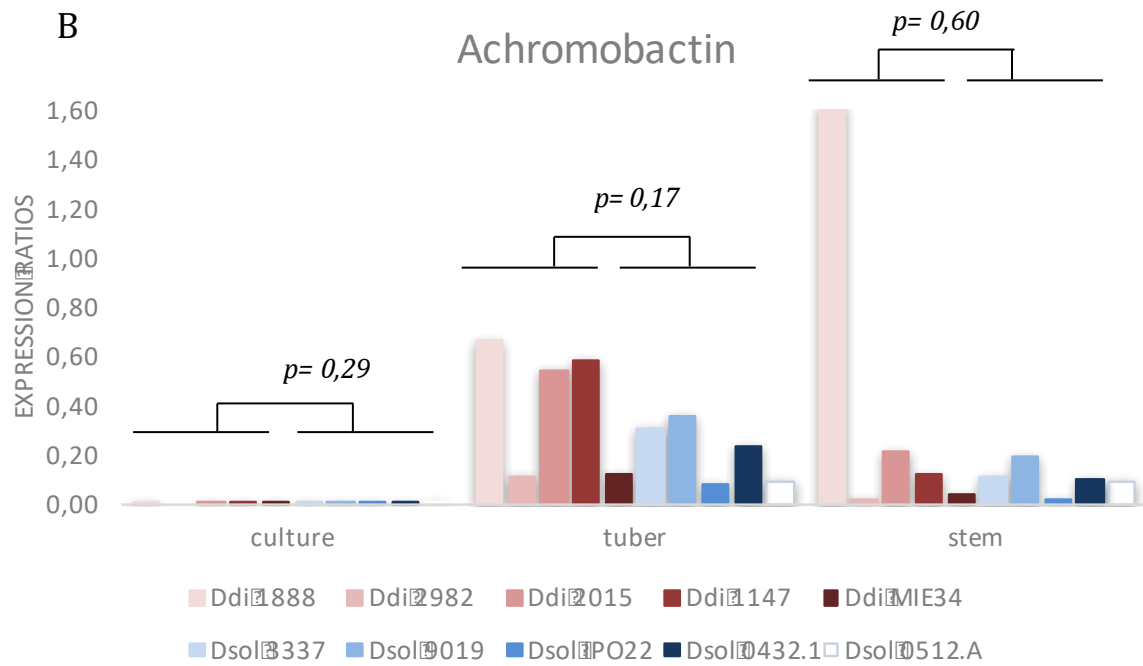


Figure 31: Expression levels of two genes involved in siderophores production for five strains of *D. dianthicola* and five strains of *D. solani* in different conditions : culture, macerated tubers and macerated stems.. **A**, *cbsE* (chrysobactin synthase E) and **B**, *acsD* (achromobactin synthase D). Statistical differences between expressions were calculated by the Kruskal-Wallis test. * : $0,05 < p < 0,1$ ** : $0,01 < p < 0,05$ *** : $p \leq 0,001$

Difference of utilization of sugars as carbon sources

Previous studies have shown that *D. dianthicola* and *D. solani* were not able to use the same sugars as carbon sources. Biologs plates have shown that L-rhamnose could be used by *D. dianthicola* and D-arabinose by *D. solani*. These data were verified by determination of the growth curve of these bacteria in minimal medium supplemented with these sugars as sole carbon sources (Figure 32). For utilization of L-rhamnose, bioinformatics studies revealed that *rhaT*, a gene coding for the transport of rhamnose into the cell, was absent in *D. solani* (Figure 33). This gene encoded the first step in the degradative pathway of this sugar (Figure 35).

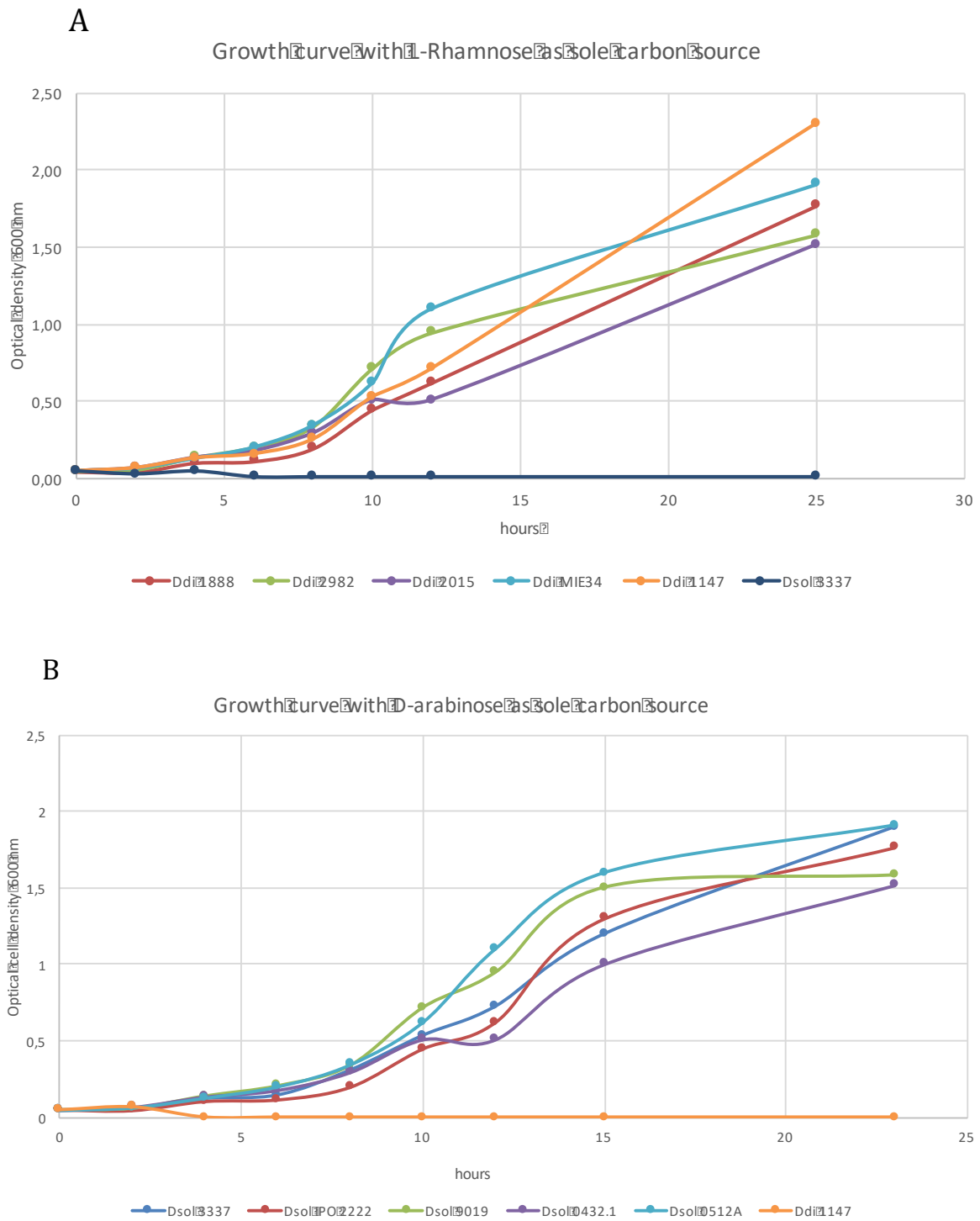


Figure 32 : Growth curves of isolates of *D. dianthicola* and *D. solani* in M9 medium supplemented with L-rhamnose (A) or D-arabinose (B)

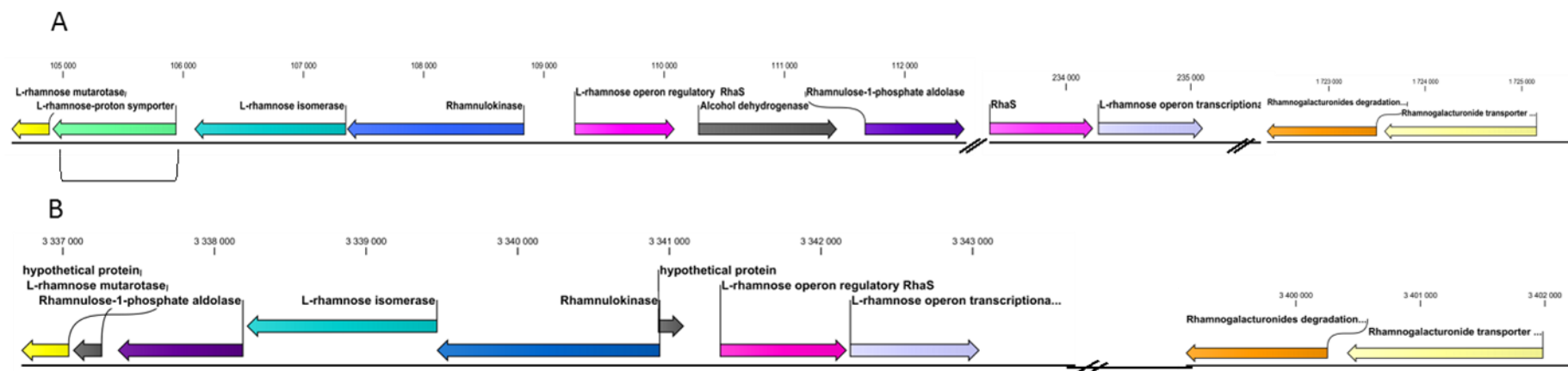


Figure 33: L-rhamnose operon. A, Composition of rhamnose operon in *D. dianthicola*. B, Composition of rhamnose operon in *D. solani*.

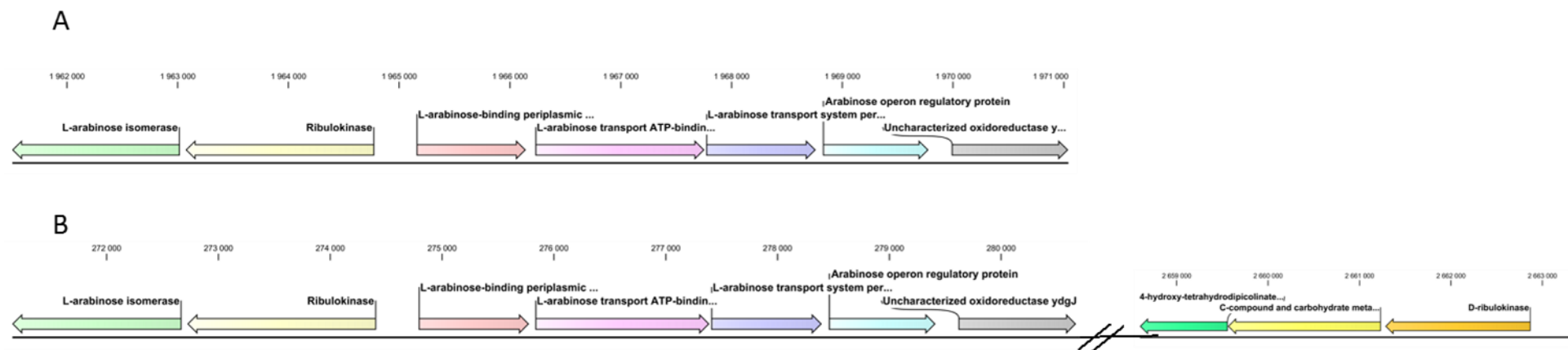


Figure 34: D-arabinose operon. A, Composition of D-arabinose in *D. dianthicola*. B, Composition of D-arabinose operon in *D. solani*.

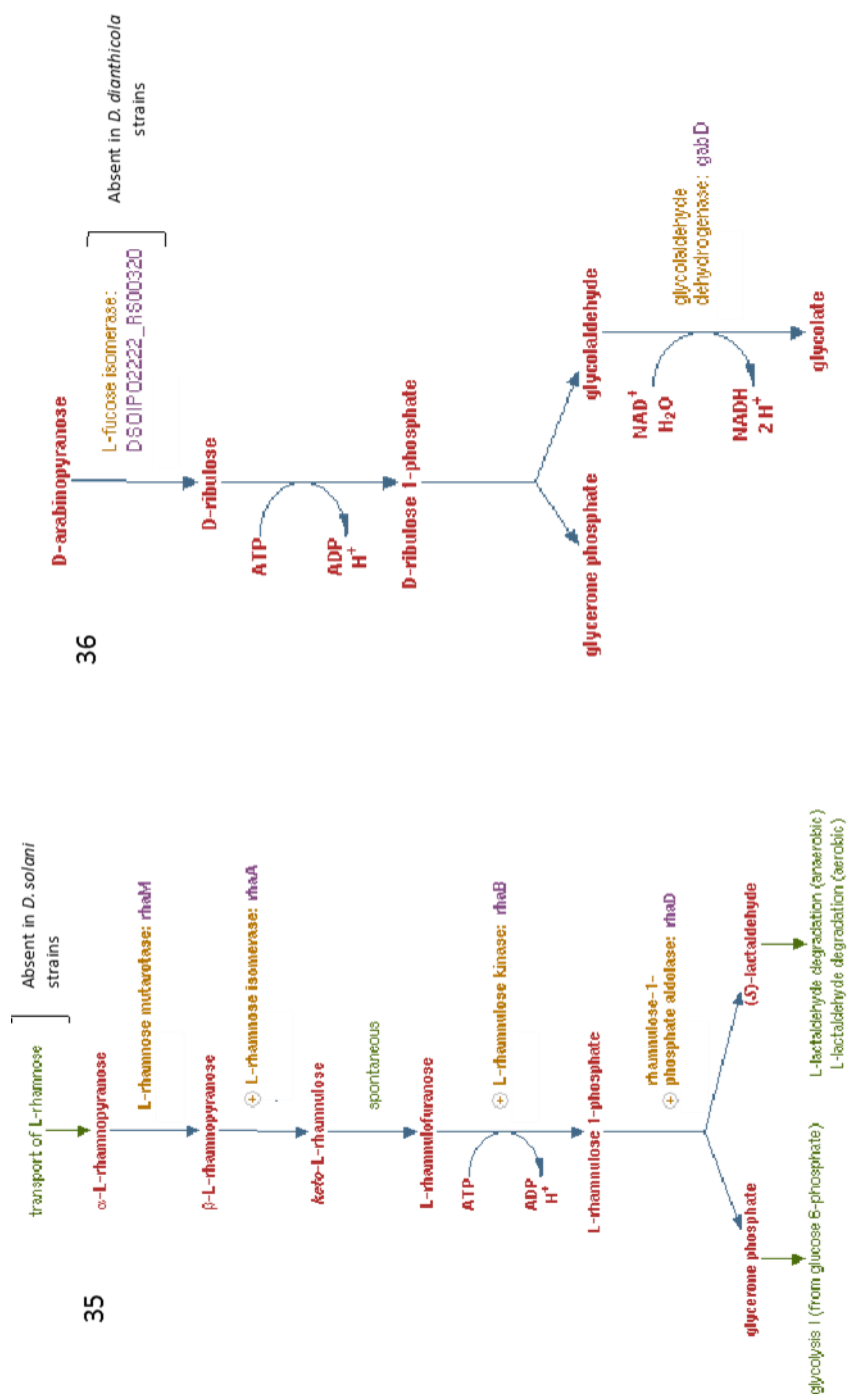


Figure 35: Degradation pathway of L-rhamnose in *D. dianthicola*

Figure 36: Degradation pathway of D-arabinose in *D. solani*.

Bioinformatics studies also evidenced the absence of several genes involved in the degradation of D-arabinose in *D. dianthicola*. (Figure 34). Moreover, a gene coding for a L-fucose isomerase, was absent in *D. dianthicola*. This gene encoded the first step in the degradative pathway of this sugar (Figure 36).

Primers were designed in several genes composing the pathway of both sugars for *D. dianthicola* and *D. solani*. Expression levels were analyzed in one strain of *D. dianthicola* and one strain of *D. solani* by RT-qPCR under different conditions: exponential growth, macerated tubers and macerated stems. In *D. dianthicola*, *rhaT* was more expressed in tubers than in any other environments, tuber being the main source of rhamnose in the plant. Genes involved in the degradation of L-rhamnose such as *rhaM* or *rhaB* were also more expressed in tubers. The low level of expression in *D. solani* indicates that there was a different way of entry than by the transporter (Figure 37). Conversely, genes involved in D-arabinose degradation like *lfuC* or *gabD* were more expressed in *D. solani* essentially in tubers which were the main source of arabinose in plant (Figure 38).

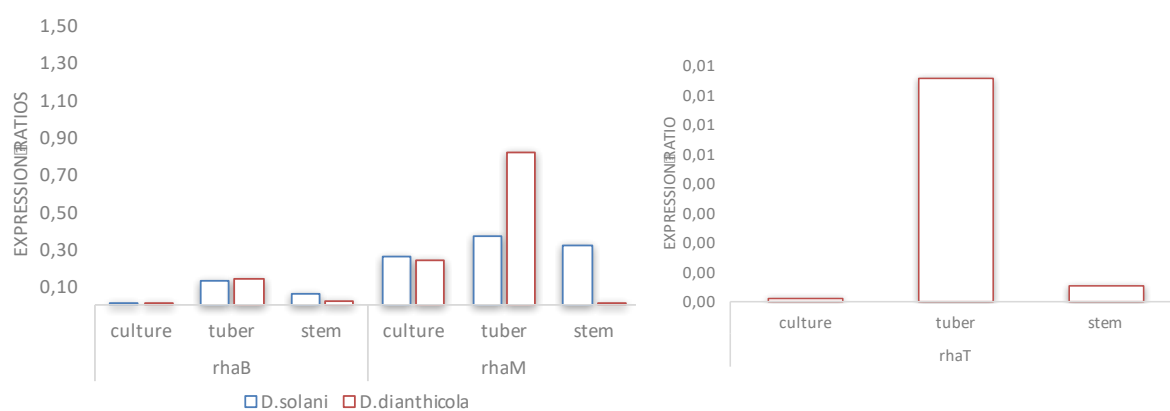


Figure 37: Expression levels of genes involved in L-rhamnose degradation in *D. dianthicola* and *D. solani*.

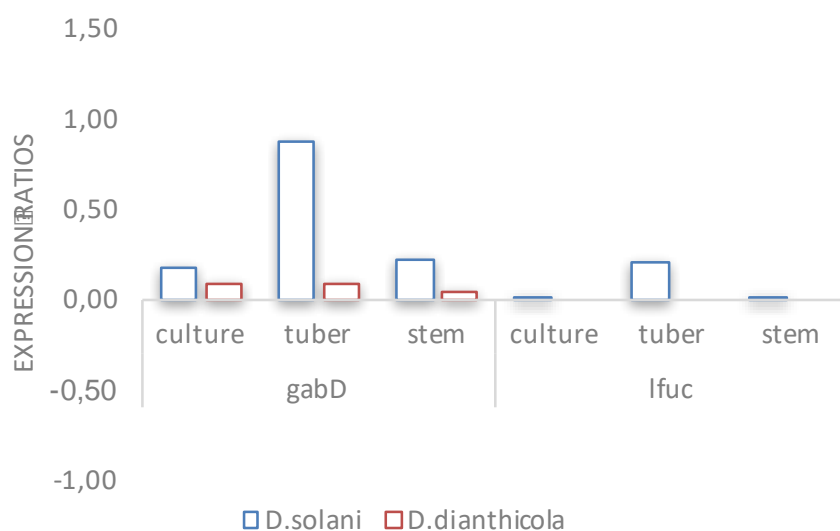
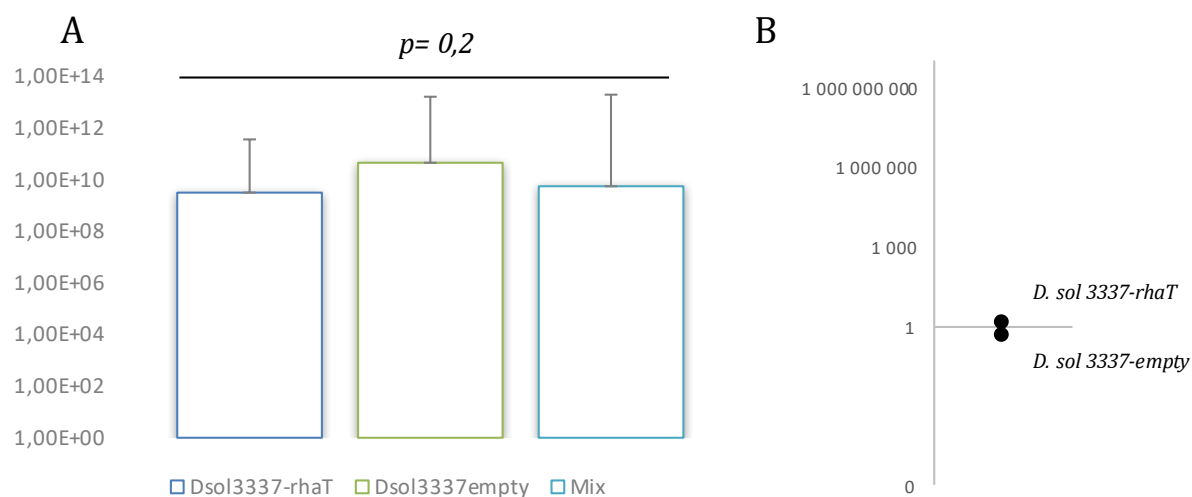


Figure 38: Expression levels of genes involved in D-arabinose degradation in *D. dianthicola* and *D. solani*.

Addition of the rhamnose transporter RhaT to a strain of *D. solani* did not improve its fitness in tubers

The *rhaT* gene was introduced in *D. solani* strain 3337. The resulting strain, 3337-*rhaT*, gained the ability to grow on L-rhamnose as sole carbon source. Strain 3337 that harbors the empty cloning vector (i.e. 3337EV), strain 3337-*rhaT*, and population of *D. dianthicola* were then used in competition assays in tubers to assess whether the fitness of a strain or a population may depend on the capacity to use some sugars as substrates. When inoculated separately, populations of *D. dianthicola*, *D. solani* strains 3337EV and 3337-*rhaT* exhibited the same growth characteristics in tubers, indicating that all strains and populations could colonise the potato tuber. When tubers were infected by a mixture of *D. solani* strains 3337-*rhaT* and 3337EV, CI values were around one for both strains, indicating that no competitive advantage to one or the other strain was observed. Addition of the rhamnose transporter and the gained ability to utilize this sugar as a carbon source therefore did not give an increased fitness to the strain (Figure 39, A and B). In agreement, when tubers were infected by a mixture of *Dsol3337-rhaT* and population of *D. dianthicola*, *D. solani* 3337-*rhaT* was found to multiply more efficiently than the *D. dianthicola* population (Figure 39, C and D). a similar result was obtained when tubers were infected by a mixture of *D. solani* 3337-EV and population of *D. dianthicola*, i.e. *D. solani* 3337-EV was found to multiply more efficiently than the *D. dianthicola* population. (Figure 39, E and F). *D. solani* already had an advantage over *D. dianthicola* in colonizing the tuber (previous chapter). Giving him the ability to metabolize rhamnose did not allowed him to be even more competitive.



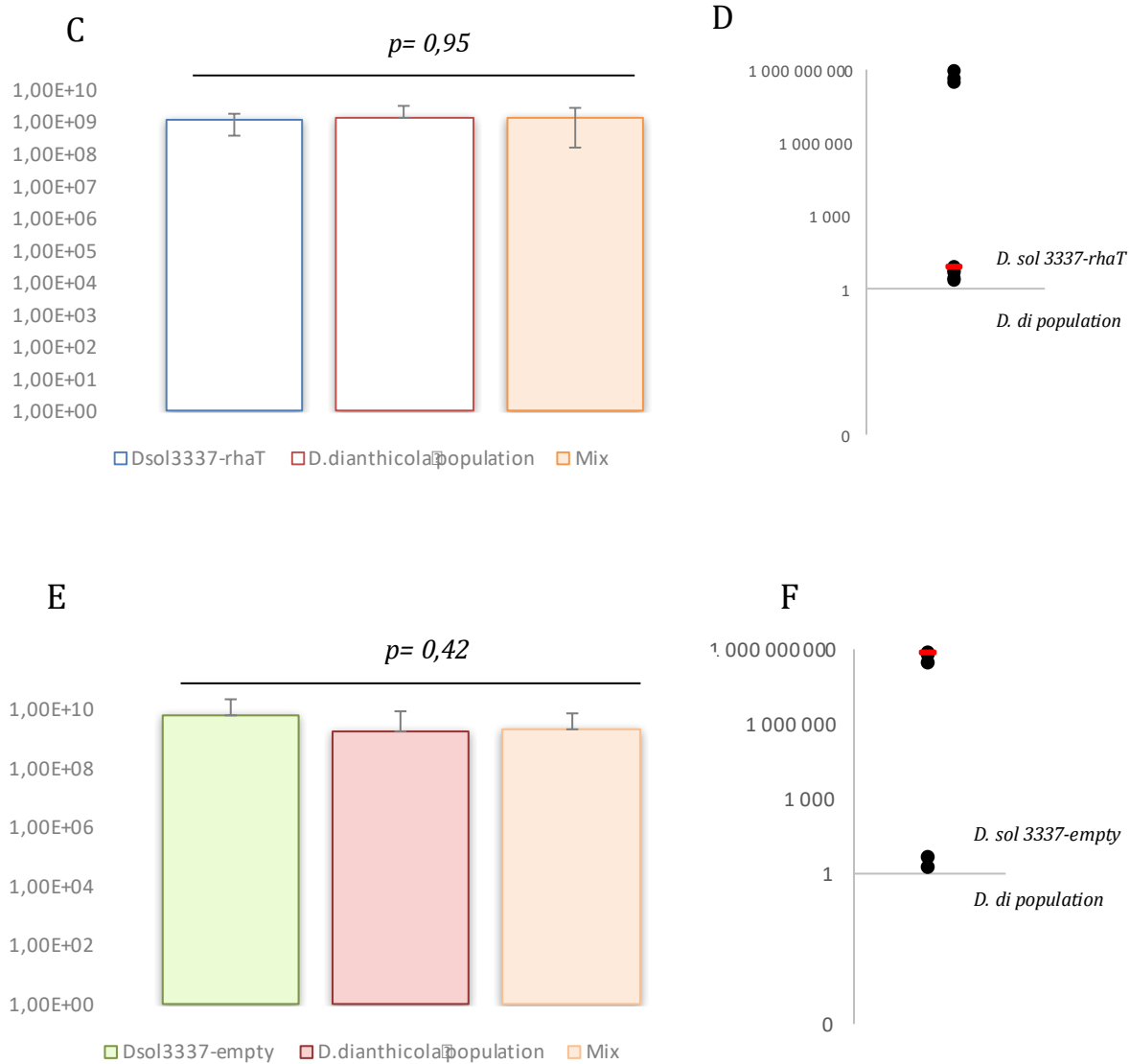


Figure 39: Internal growth and competition assays in tubers. **A**, Internal growth of mutant strains *D. solani* 3337-rhaT, *D. solani* 3337-EV and the mix of both and their CI values. **B**, Internal growth of mutant strain *D. solani* 3337-rhaT, artificial population of *D. dianthicola* WT (1147, 1888, 2982, 2015 and MIE34) and the mix of both and their CI values. **C**, Internal growth of mutant strain *D. solani* 3337-EV, artificial population of *D. dianthicola* WT as previously and the mix of both and their CI values. Competitive Index was defined as the *D. solani* population/*D. dianthicola* population ratio within the output sample divided by the corresponding ratio in the inoculum. The median of CI values was shown in red. Experiments were done on 10 tubers. All the experiments were done at 5 days post-inoculation. Statistical differences between expressions were calculated by the Kruskal-Wallis test. * : $0,05 < p < 0,1$ ** : $0,01 < p < 0,05$ *** : $p \leq 0,001$

6. Discussion

Si la notion de virulence est souvent associée à la proportion de symptôme créée par une souche, elle est donc fortement liée à l'expression de gènes de production d'enzymes de dégradation. Ici, les pectate lyases sont fortement exprimées par les *D. solani*, en condition de macération dans les tubercules ou sur tige. Le fait qu'elles expriment plus fortement ces gènes par rapport aux *D. dianthicola*, montrent qu'elles ont un potentiel de macération plus important sur plante.

Aucune spécificité d'espèce n'est notable pour l'expression des gènes de synthèse de chrysobactine et d'achromobactine. Les souches de *D. solani* ou de *D. dianthicola* expriment ces gènes dans les conditions de macération de manière souche dépendante. L'expression de ces gènes n'est donc pas liée à un trait d'espèce.

L'utilisation de sucres différents par les *D. solani* et les *D. dianthicola* pourrait-être liée à une utilisation de niche écologique et ce dans une hypothèse d'hôte préférentiel. De plus, les gènes en aval du transporteur de rhamnose sont exprimés faiblement chez les *D. solani*, montrant qu'une autre voie d'entrée est utilisée par l'espèce pour tout de même utiliser le L-rhamnose et ceci, même en absence du transporteur.

Lorsqu'elle est mise en compétition contre une population de *D. dianthicola*, la souche *D. solani* 3337-*rhaT* est très compétitive. Cependant l'ajout de ce transporteur ne lui confère pas d'avantage vis-à-vis de la souche *D. solani* 3337 portant le vecteur vide. Les *D. solani* sont de manière naturelle, plus compétitive que les *D. dianthicola* dans les tubercules de pomme de terre. Cette compétitivité est donc liée à un autre trait que l'utilisation des sucres.

Partie 2 : Etude du transcriptome de *D. solani*

1. Contexte scientifique

Dans un travail précédent, il a été montré que les différentes souches de *D. solani* étaient très proches génétiquement. En effet, en utilisant la souche *D. solani* 3337 comme référence, l'ANI value est de 99,90 % pour toutes les souches exceptée *D. solani* 0512A qui elle, présente une ANI value de 98,92 %. Certaines souches de *D. solani* ont subi un transfert horizontal de gènes depuis d'autres souches de *D. solani* ou depuis l'espèce *D. dianthicola*. Parmi ces souches, *D. solani* PPO 9019 contient 12 régions génomiques provenant d'évènements de transferts horizontaux depuis l'espèce *D. dianthicola* ainsi qu'un plasmide de 4.3 kb. Ce plasmide montre une identité complète (100%) avec un plasmide de *Burkholderia ambifaria* (Khayal et al., 2015). D'une façon générale, des études génomiques portant sur *Dickeya spp.* ont été menées. Les études de transcriptomique elles, sont encore peu nombreuses.

2. Présentation des travaux

Afin d'apporter de nouvelles informations sur la variabilité phénotypique des isolats au sein d'une espèce, les transcriptomes de 3 souches de *D. solani* ont été étudiés par une approche de type RNA-seq. Les 3 souches utilisées dans cette étude sont d'une part, *D. solani* IPO2222 (souche type de l'espèce), *D. solani* 0432.1 (souche la plus agressive sur tubercule de pomme de terre) et la souche *D. solani* PPO 9019 (souche ayant subi de nombreux transferts horizontaux). Ces comparaisons ont été faites en condition de macération dans des tubercules de pomme de terre afin de refléter au mieux les conditions naturelles. L'objectif de cette étude était de rechercher d'éventuelles différences d'expression de gènes et particulièrement de gènes provenant de transferts horizontaux d'une part, et de gènes liés à l'agressivité d'autre part. Les résultats ci-après sont rédigés en anglais pour un travail prochain de publication.

3. Contributions

Les séquençages et les analyses transcriptomiques ont été effectués en collaboration avec la plateforme technique IMAGIF (CNRS, Gif-sur-Yvette). Slimane Khayal à quant à lui, assemblé les génomes de référence utilisés dans cette étude. Le texte a bénéficié des relectures critiques de Denis Faure et Yves Dessaux.

4. Material and methods

Bacterial strains and growth conditions

Dickeya solani 0432.1, PPO 9019 and IPO 2222 were cultured in TY medium (tryptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L) overnight at 28°C.

Tuber infection and recovery of bacteria under maceration condition

Bacterial transcriptomes were carried out on potato tubers (*Solanum tuberosum* cv Bintje) under maceration condition. To this end, 10⁷ CFU of each strain were used to infect 10 potato tubers by injection. After four days of incubation at 24°C in a dark incubator, the soft rot zone was recovered and mixed with 10 ml of GL20 (20% RNA protect (RNA protect Cell Reagent, Qiagen) and 80 % buffer KPO₄ 50 mM). For each strain, 3 samples of 3 soft rot zones were processed. The 10th tuber was used for bacterial numeration. Samples were mixed thoroughly and filtered using 25 µm and 10 µm filters. After centrifugation (5 min, 500 g, 4°C), supernatant were recovered and filtered again using 10 µm filters. Bacteria of samples were recovered by using a Nycodenz gradient. Aliquots of cells were harvested by centrifugation and stored at -80°C.

Bacterial RNA extraction

First, pellets were resuspended in 300 µl lysis buffer (sodium acetate 0,02 M pH5,5, SDS 0,5%, EDTA 1 mM pH8) and mixed thoroughly. Then, 700 µl of hot Aquaphenol (60°C) were added and mixed again. After centrifugation 4 min at 14 000 rpm at room temperature, the aqueous phase was saved and reextracted twice as above. Five hundreds µl of a chloroform/ isoamyl alcohol (24:1) mix were added to the aqueous phases and mixed 3 times 30 sec. After centrifugation 4 min at 14 000 rpm at room temperature, 500 µl of aqueous phase were recovered. RNA were precipitated using sodium acetate 3M and cold 100% ethanol according to standard procedure. Samples were left over night at -20°C and centrifuged 1 hour at 14 000 rpm at 4°C. The supernatant was eliminated and the pellet dried and then resuspended in 50µl of RNase free H₂O. Finally, samples were treated by a RNase free DNase (Ambion) as indicated by the manufacturer.

Illumina Sequencing

The sequencing of the 3 biological replicates was carried out at the I2BC facility according to their routine protocol. First, quantity and quality of RNAs were checked (Agilent 2100 Bioanalyzer and Qubit Invitrogen). After depletion of the ribosomal RNAs, a "directional transcriptome" library was made. A step of validation of the library is necessary before sequencing. RNA sequencing was

performed by the NextSeq NS500446 using the NextSeq 500 High Output Kit. 75 cycles (single-end) were done. At the end, between 25 and 30 million of reads were obtained.

Statistical and differential analysis

Reads were mapped on the reference genome of each strain. Only gene reads mapping on 80% of their length and displaying a 90% identity have been conserved. Normalization and differential analyses were performed using generalized linear models as described in DESeq2 package (Love *et al.*, 2014). An absolute log₂ fold change > 2 was used to determine differentially expressed genes. Only the genes common to the 3 strains were analysed. Heatmaps were produced using the ComplexHeatMap package (v 1.12, (Gu *et al.*, 2016)).

RT-qPCR validation of RNA-seq data

Reverse transcription was performed with a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Saint-Remy-les-Chevreuse, France) following the manufacturer instructions. RT-qPCRs were carried out on a Roche LightCycler® 96 System using the Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I kit, all according to the manufacturer protocol (Roche, <http://www.roche.com/>). Cycling conditions were as follows: 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 5 sec and 60°C for 5 sec, then 72°C for 15 sec. Each sample was run in duplicate. The samples were normalized with *rpoB* and *yafS* as reference genes (Chapelle *et al.*, 2015; Hommais *et al.*, 2011). The comparative CT ($\Delta\Delta CT$) method was used to measure relative expression (Livak and Schmittgen, 2001). Primers used were designed online using Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) and are listed in Table 7.

Primer name (gene name)	Forward	Reverse
<i>pelE</i>	5'-AGTGGGATGCGGCAGTAATC-3'	5'-TCCTGCGAGCCATTGTTGTC-3'
<i>pelD</i>	5'-GCGTGGTCAAGGCGTTTAAC-3'	5'-CAGACTGGTGGTGTGATGGTTTG-3'
<i>ImpC</i>	5'-AGAGTTCGCCGACATCAAG-3'	5'-GGGCCTTCAAACACCGATTTC-3'
<i>cbsE</i>	5'-GGAGATCGAGAACCTGCTACTG-3'	5'-CGGTCCGGCAGTTTGTAGTC-3'
<i>cytA</i>	5'-ACAACCAGGTATCCGCCATG-3'	5'-GACCCGGTATCCTGATTAGC-3'
<i>budA</i>	5'-GGCCAGCTTTGCACTTCATC-3'	5'-GTTAAGCGCCACCAGTTCAC-3'
<i>rpoB</i>	5'-TCATGCCCTGGAACGGTTAC-3'	5'-CTTCCGCACCGATGTAAACG-3'
<i>yafS</i>	5'-GCCCTAGCCCAATCAAACCTG-3'	5'-CGATTCCGCATCAGGTCAAC-3'

Table 7: The primer set used in this study

5. Results

Annotation and profile of the *D. solani* genome

A set of 4429 genes were common to the 3 strains of *D. solani*. After being annotated on MaGe (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/>), genes were classified using COG functional categories. Out of the common genes, 1664 genes are involved in “metabolism process”, 692 genes in “cellular process”, 637 genes in “information storage and processing”, 647 genes were “poorly characterized” and 789 genes were not classified. The number of genes associated with general COG functional categories is show in Table 8.

code	value	%	Description
D	33	0,75	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
N	107	2,42	Cell motility
M	220	4,97	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
V	62	1,40	Defense mechanisms
U	51	1,15	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
O	123	2,78	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
T	96	2,17	Signal transduction mechanisms
L	149	3,36	Replication, recombination and repair
A	1	0,02	RNA processing and modification
K	316	7,13	Transcription
J	171	3,86	Translation, ribosomal structure and biogenesis
E	517	11,67	Amino acid transport and metabolism
G	267	6,03	Carbohydrate transport and metabolism
H	130	2,94	Coenzyme transport and metabolism
C	243	5,49	Energy production and conversion
P	206	4,65	Inorganic ion transport and metabolism
I	135	3,05	Lipid transport and metabolism
F	84	1,90	Nucleotide transport and metabolism
Q	82	1,85	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
S	290	6,55	Function unknown
R	357	8,06	General function prediction only
-	789	17,81	Not in COGs
Total	4429	100,00	

Table 8: Number of genes associated with COGs functional categories

Transcriptional profiles

Globally the transcriptomes of the 3 strains were close related as evidenced by the results shown in Figure 40. Transcriptomes of each strain were nevertheless compared. This comparison

revealed 154 differentially expressed genes (DEGs) for *D. solani* 0432.1 vs *D. solani* 9019 condition (62 up-regulated, 92 down-regulated), 170 DEGs for *D. solani* 0432.1 vs *D. solani* IPO2222 condition (150 up-regulated and 20 down-regulated) and 139 DEGs for *D. solani* 9019 vs *D. solani* IPO2222 (115 up-regulated and 24 down-regulated). The genes were distributed in a similar way across the different classes whether they were up- or down-regulated. The majority of DEGs were classified in the “metabolism” class. The least represented class was “information storage and processing” (Figure 41).

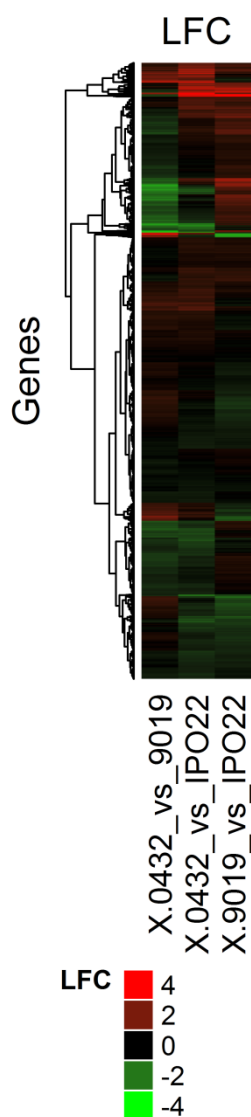


Figure 40: Heatmap of comparison transcriptome profiling data. Comparisons of *D. solani* 0432 vs *D. solani* 9019, *D. solani* 0432 vs *D. solani* IPO22 and *D. solani* 9019 vs *D. solani* IPO22. LFC: Log of Fold Change.

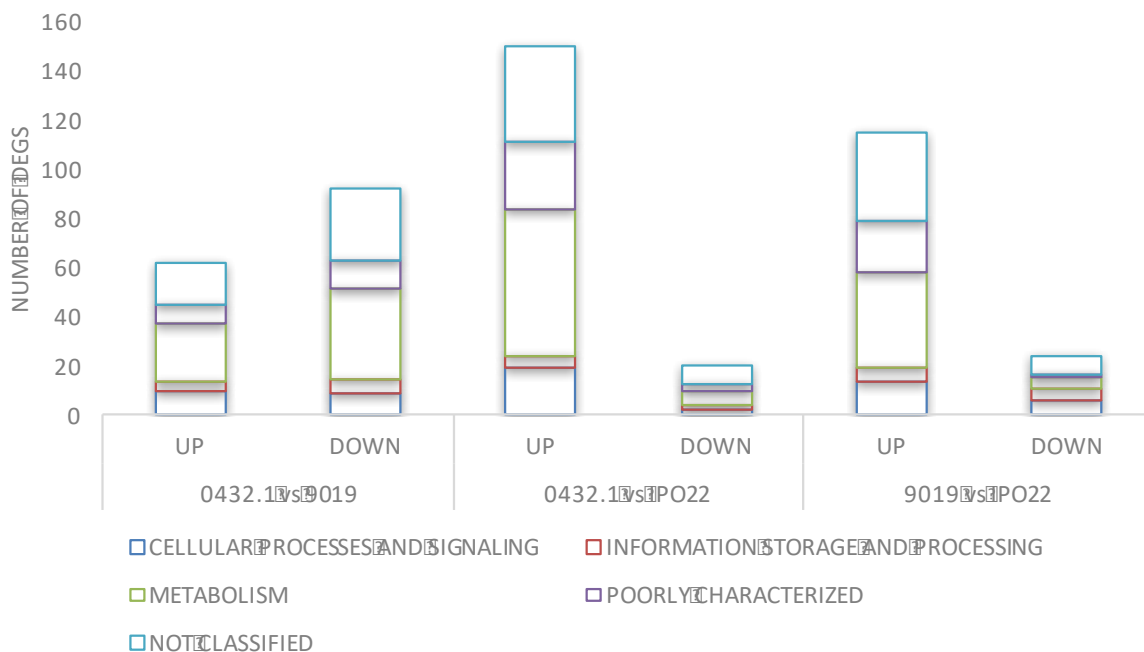


Figure 41: Number of DEGs up- or down- regulated for both conditions

Genes from replacing HGT were not differentially expressed

In *D. solani* PPO 9019, 63 genes from replacing horizontal gene transfer (from *D. dianthicola*) were clustered in 12 genomic regions. Within these 63 genes, only 3 from 3 different genomic regions were differentially expressed. The first one coded for a dehydrogenase, the second for a tRNA and the third for a hypothetical protein. Their identification number and fold change are show in Table 9.

Function	ID on IPO2222	FC 0432.1 vs 9019	FC 9019 vs IPO2222
Predicted L-lactate dehydrogenase, Fe-S oxidoreductase subunit YkgE	A4U42_00180	2,87	-2,39
tRNA:Cm32/Um32_methyltransferase	A4U42_05875	-2,09	1,26
Hypothetical protein	A4U42_06310	2,69	-2,62

Table 9: Genes differentially expressed from replacing horizontal gene transfer for the strain Dsol PPO 9019

Lot of virulence factors were up-regulated

For each comparison, the DEGs were classified. A class clustering “virulence genes” has been created. These genes coded for virulence factors such as flagellum, secretion system, cell wall degradation enzymes, chemotaxis protein or siderophore production. Among the 62 up-regulated genes detected in 0432.1 in the comparison 0432.1 vs. 9019, 12 were part of the virulence class while only 2 belonged to this class among the down-regulated ones. In the comparison of 0432.1 vs IPO2222, 35 out of 150 genes up-regulated in 0432.1 were part of the virulence class and none of the down-regulated ones. To finish, the comparison between 9019 and IPO2222 permitted the identification of 17 out of 115 up-regulated genes in 9019 as “virulence genes” and that of only 1 out of 24 down-regulated ones as a “virulence gene” (Figure 42). As shown in Figure 43, strain *D. solani* 0432.1 overexpressed many genes related to virulence compared to strain *D. solani* IPO2222. These genes were essentially enzymes like pectate lyases (7 genes), protease (3 genes), cellulose (1 gene), catalase (1gene) and genes involved in secretion system (9 genes).

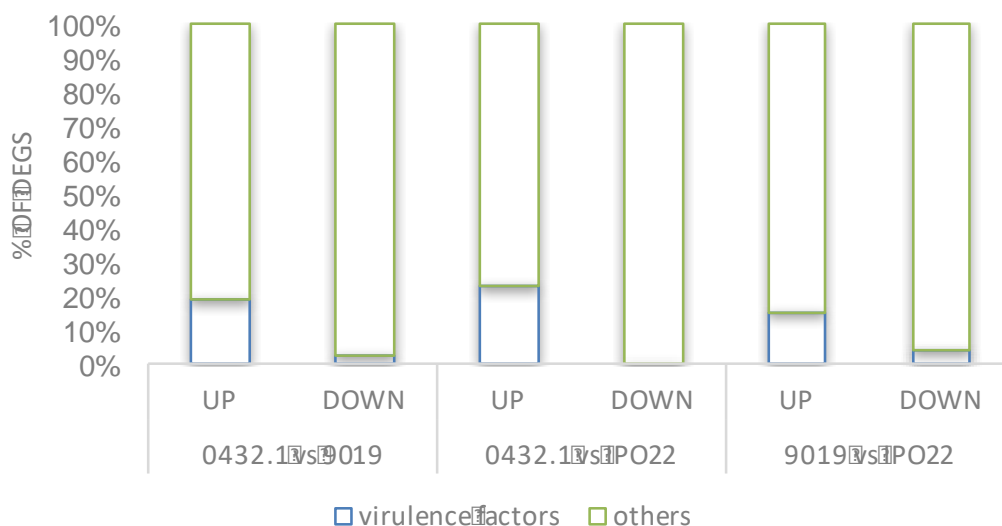


Figure 42: percentage of virulence factors among DEGs for both conditions.

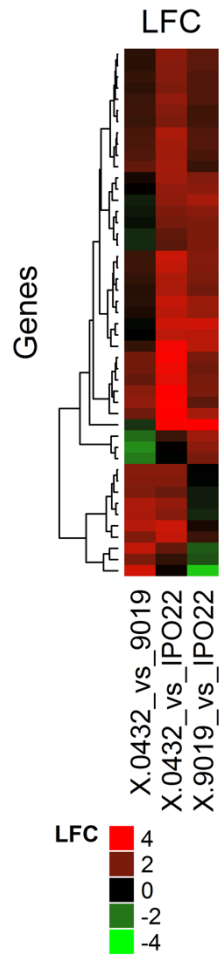


Figure 43 : Comparison of expression levels of virulence genes for both condition. LFC: Log of Fold Change

To confirm the RNA-seq data, 4 DEGs were randomly selected representing gene differentially expressed in the virulence class. The expression profiles of these genes were validated experimentally using RT-qPCR. The RT-qPCR results were in global agreement with the RNA-seq expression patterns (Figure 44).

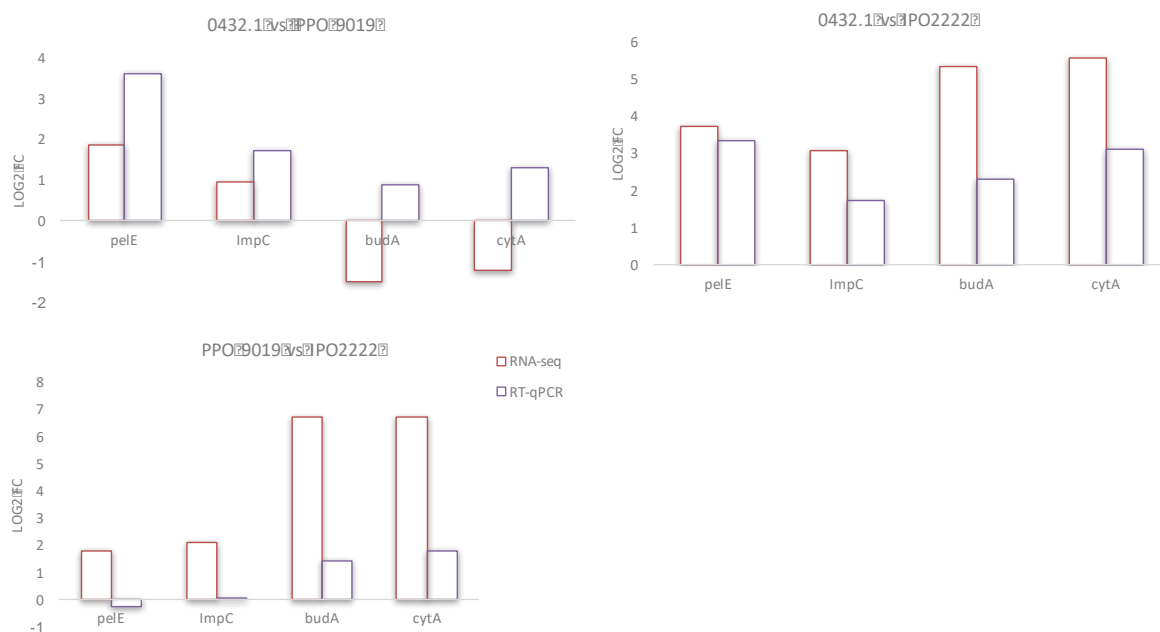


Figure 44: RT-qPCR validation of RNA-seq gene expression ratios relative to samples using 4 selected DEGs. *pelE* (pectate lyase), *impC* (type VI secretion system protein ImpC), *budA* (Alpha-acetolactate decarboxylase) and *cytA* (Type-2Aa cytolytic delta-endotoxin). *rpoB* and *yafS* were used as the reference genes, (n=3).

6. Discussion

Avec leurs profils génomiques très homogènes, les souches de *D. solani* présentent aussi des profils transcriptomiques très similaires en condition de macération dans les tubercules de pomme de terre. Seuls quelques gènes sont différentiellement exprimés entre les 3 souches.

Les gènes issus de transferts horizontaux, gènes de ménage principalement, ne sont eux pas exprimés différentiellement chez la souche *D. solani* PPO9019. La souche ne les utilise donc pas à des fins de macération ou de colonisation du tubercule.

Les différences d'agressivité observées entre les souches peuvent s'expliquer par des différences d'expression des gènes de virulence. En effet, la souche 0432.1 sur-exprime 35 gènes de virulence par rapport à la souche IPO2222 et 12 gènes de virulence par rapport à la souche 9019. Ces sur-expressions sont corrélées à la forte agressivité de la souche 0432.1 comparée à IPO2222 et 9019 et potentiellement explicatives de ce phénomène.

La souche *D. solani* 0432.1 possède une mutation ponctuelle de type transition (changement de base pyrimidique), entraînant un changement d'acide aminé (proline-sérine) dans le gène codant pour la protéine VFMB. Le gène *vfmB* est connu pour jouer un rôle clé dans la biosynthèse du signal *quorum-sensing* chez *D. dadantii*. Dans le cas de la souche *D. solani* 0432.1, une altération de la régulation QS pourrait entraîner une plus grande production d'enzymes pectinolytiques et d'autres facteurs de virulence en réponse à celui-ci.

Chapitre V

Chapitre V : Discussion générale et perspectives

Les phytopathogènes représentent un risque majeur pour la sécurité alimentaire mondiale. Ils sont capables de réduire drastiquement les rendements des cultures et d'accroître les pertes post-récoltes lors des étapes de transport et de stockage. Outre les enjeux économiques, l'émergence de phytopathogènes chez les plantes cultivées soulève d'importantes questions sur l'impact des activités humaines sur la dynamique de biodiversité. Le risque d'émergence de nouveaux pathogènes peut s'accroître avec certaines pratiques culturales, l'intensification des échanges internationaux (passagers, marchandises, denrées alimentaires) (Anderson et al. 2004, Schaad 2008), mais aussi avec les changements climatiques globaux (Strange and Scott, 2005). Le réchauffement climatique peut en effet favoriser cette émergence en jouant un rôle important sur les cultures, leur fécondité, la dispersion et la distribution des maladies et parasites des plantes (Schaad 2008, van der Waals et al. 2013). En pathologie, le développement et l'intensité des maladies par l'effet des conditions environnementales illustre parfaitement les relations triangulaires qui relient environnement, hôte et pathogène (Francl, 2001).

L'intérêt pour la culture de la pomme de terre s'est accru avec l'augmentation régulière du coût des céréales sur les marchés internationaux (DeFauw et al. 2012). Les surfaces de productions de la pomme de terre sont en augmentation dans le monde entier avec plus de 19 millions d'hectares cultivés (DeFauw et al. 2012, FAOSTAT 2013). La pomme de terre est sensible à plus de 160 maladies dont 10 d'origine bactérienne (Arora and Khurana, 2004; J. M. van der Wolf *et al.*, 2014). Les bactéries pectinolytiques des genres *Dickeya* et *Pectobacterium* font partie des 10 pathogènes de plantes les plus importants d'un point de vue économique et scientifique (Mansfield *et al.*, 2012). Ces pathogènes bactériens causent des dégâts importants dans la filière plan de pommes de terre en réduisant la qualité ainsi que le rendement lors de la culture ou au moment du stockage des tubercules (Pérombelon, 2002).

Depuis environ 10 ans, de nouvelles espèces de *Dickeya* et de *Pectobacterium* sont identifiées dans différents pays d'Europe et associées aux maladies de la jambe noire et de la pourriture molle sur la pomme de terre. C'est notamment le cas de *D. solani*, identifié dans les années 2004-2005. Elle contribue à l'augmentation de l'incidence des maladies causées par *Dickeya* (Toth *et al.*, 2011; J. M. van der Wolf *et al.*, 2014). Comprendre comment évoluent et s'adaptent ces phytopathogènes pour devenir plus agressifs ou pour être capables d'infecter de nouveaux hôtes est un enjeu majeur en protection des cultures.

Ce travail de doctorat contribue à la compréhension de la structure et de la dynamique des populations phytopathogènes de *Dickeya solani* et *Dickeya dianthicola* par des approches basées

sur la création de populations artificielles d'une part, et sur des approches individus centrés d'autre part. Etant des espèces émergentes sur pomme de terre, aucune donnée de comparaison entre *D. solani* et *D. dianthicola* n'est disponible. Dans la littérature, il apparaît des données fonctionnelles telles que l'agressivité, sur *D. dianthicola* ou sur *D. solani* mais jamais de manière simultanée. Ce travail de thèse est la première étude permettant de mieux comprendre les interactions entre ces deux espèces pathogènes mais aussi leur lien avec la plante hôte *Solanum tuberosum*. Ce travail répond à des questions essentielles en écologie notamment sur l'expansion de pathogènes, depuis un transfert d'hôte, son adaptation et installation sur une nouvelle plante hôte au détriment de populations résidentes.

1. *D. dianthicola* est mieux adapté à l'hôte *Solanum tuberosum* que *D. solani*

Les résultats apportés par l'approche expérimentale basée sur des compétitions de populations artificielles reconstituées, nous informent sur plusieurs points. Tout d'abord, les tests de compétitions sur plante entière de pomme de terre suggèrent que les *D. dianthicola* sont plus adaptés à cette plante hôte que les *D. solani*. En effet, dans les autres environnements tels que les tubercules de pomme de terre, sur jacinthes, et en milieux liquides, riche ou minimum, *D. solani* semble avoir une compétitivité plus forte que *D. dianthicola*. Aux vues des méthodes d'inoculation (arrosages de la rhizosphère pour les plantes entières de pomme de terre et de jacinthes ; et injection directe dans le tubercule ou le milieu de culture), il semblerait que *D. solani* rencontre une contrainte quant à la colonisation des racines et des tissus de plant de pomme de terre. Ces contraintes pourraient être liés aux défenses de la plante auxquelles l'espèce n'est pas adaptée ou encore à un chimiotactisme moins fort pour les exsudats racinaires (Galperin, 2005). Les plantes libèrent également des composés en réponse à des stress biotiques et abiotiques qui peuvent inhiber sélectivement certains microbes (Dingman, 2000).

2. *D. solani* exprime plus fortement ses gènes de virulence que *D. dianthicola*

L'expression des enzymes pectinolytiques telles que les pectates lyase permettent aux *Dickeya* d'exprimer leur virulence en macérant les tissus. La virulence des souches est donc associée à l'expression de ces enzymes. Les RT-qPCR sur différents isolats de *D. solani* et de *D. dianthicola* en condition de macération sur tige ou sur tubercule de pomme de terre révèlent que lorsque les *D. solani* ont franchi les contraintes liées à la colonisation, elles expriment plus fortement les gènes *pelA*, *pelD* et *pelE* que les *D. dianthicola* lors de la macération des tissus. Cela révèle un potentiel de macération beaucoup plus fort chez les *D. solani*, et suggère un potentiel de virulence plus important que les *D. dianthicola*. Bien que l'assimilation du fer par l'utilisation de sidérophores

soit fortement impliqué dans la virulence, (Dellagi *et al.*, 2009), les gènes impliqués dans la synthèse de sidérophores comme la chrysobactine et l'achromobactine, sont exprimés de manière indépendante et très variable selon les isolats de *D. solani* ou *D. dianthicola*. L'assimilation du fer par l'utilisation de sidérophores ne peut pas être considéré comme des traits spécifiques d'agressivité chez *D. solani*. Les tests individus centrés révèlent que l'agressivité des souches composant la population est corrélée à celle de la population elle-même. La différence d'expression des gènes d'agressivité est donc un trait d'espèce distinguant *D. solani* et *D. dianthicola*.

3. *D. solani* sur pomme de terre, un transfert d'hôte ?

Certaines études émettent l'hypothèse d'un transfert d'hôte de *D. solani* depuis une plante ornementale, sur laquelle elle aurait été isolée vers la pomme de terre (Parkinson *et al.*, 2014). Cette hypothèse est appuyée d'une part, par la forte agressivité des souches de *D. solani* sur jacinthe, ainsi qu'une meilleure compétitivité attestant d'une meilleure adaptation aux plantes ornementales à bulbe. Cette hypothèse est appuyée d'autre part, par la structure génomique très homogène des différentes souches de *D. solani* isolées sur pomme de terre, révélant une population émergente. En effet, leur structure est qualifiée de clonale puisqu'il existe moins de 100 SNPs entre les différentes souches de *D. solani* (Khayati *et al.*, 2015), contrairement à *D. dianthicola* qui montre plus de diversité, tant par ses différents groupes génomiques mais aussi par son nombre de SNPs supérieur à 10 000.

L'utilisation de sucres différents comme source de carbone principale témoigne de l'utilisation de niches écologiques préférentielle différentes par les deux espèces *D. dianthicola* et *D. solani*. L'utilisation de ces sucres pourrait leur conférer d'une part, un avantage en permettant aux deux espèces de *Dickeya* de se développer simultanément au sein de la même plante hôte en occupant des niches écologiques différentes. L'utilisation de niche différentes suggère une compétition pour l'utilisation des ressources moins importante ce qui faciliterait une coexistence et donc une facilité d'adaptation à l'hôte. D'autre part, l'utilisation de sucres spécifiques pourrait d'autre part, être un inconvénient pour la population émergente en accentuant les contraintes d'utilisation de ressources lors d'un changement d'hôte.

Des études ont montrées que les transferts d'hôtes sont fréquents chez les phytopathogènes, notamment chez les bactéries *Xanthomonas* (Huang *et al.*, 2013; Norman *et al.*, 1997). Ce changement est possible grâce au transfert de matériel génétique depuis une bactérie pathogène vers une bactérie non pathogène vivant dans la même niche écologique (Cesbron *et al.*, 2015). Est-ce que ces modèles évolutifs expliquent l'évolution et l'épidémiologie des maladies causées par

Dickeya ? Ces questions importantes restent à résoudre et dépendent du développement de nouvelles méthodologies reliant l'évolution, l'écologie et la pathologie végétale.

4. L'adaptation de *D. solani* à *Solanum tuberosum* : un processus en cours

Jusqu'à présent les mécanismes moléculaires qui sont à l'origine de l'adaptation de *D. solani* à l'hôte *Solanum tuberosum* n'ont pas encore été déchiffrés. Cependant l'optimum élevé de température de croissance (35-37°C)(Jaap D. Janse and M.A. Ruissen, 1988) de cette espèce et le fait qu'elle soit très virulente dans les régions chaudes telles que l'Afrique du nord, l'Australie et dans certaines régions du Pérou (Tsrer *et al.*, 2009), pourraient expliquer une adaptation du pathogène aux changements climatiques (Hélias, 2008). Dans ce sens, l'émergence de plusieurs espèces a été associée au réchauffement climatique comme *Acidovorax avenae sp. avenae*, responsable des rayures bactériennes du riz qui a émergé en Italie en 2003, pendant des périodes de températures élevées (P. cortesi, F. Bartoli, C. Pizzatti, W.Y. Song, 2005).

Des analyses de génomique ont débouchés sur une nouvelle vision de la diversité et de l'évolution des souches de *D. solani*. Des transferts horizontaux de remplacement ont été identifiés chez plusieurs souches où des régions génomiques ont été complètement remplacées par leurs homologues provenant de *D. dianthicola* (Khayy *et al.*, 2015). Ces évènements de transferts horizontaux constituent une source de diversification mais aussi une capacité d'adaptation des *D. solani* à la plante hôte *Solanum tuberosum* par l'acquisition de nouveaux traits. Les portions d'ADN échangées entre *D. dianthicola* et *D. solani* pourraient ainsi avoir un effet sur le comportement de ces pathogènes vis-à-vis de leur plante hôte et suggère une infection commune des deux pathogène de la même niche écologique. Généralement, les transferts horizontaux de gènes affectent les îlots de pathogénicités (PAIs : pathogenicity islands) qui comprennent des clusters de gènes liés à la virulence (Hacker and Kaper, 2000; Juhas *et al.*, 2009) alors que chez *D. solani*, les îlots issus de transferts horizontaux comprennent des gènes impliqués dans le métabolisme bactérien général, des gènes de ménage et des gènes qui codent pour des transporteurs membranaires. Ces gènes semblent jouer un rôle plus lié à l'adaptation écologique qu'à la virulence. De plus, aucun de ces gènes n'est surexprimé en condition de macération sur tubercule de pomme de terre.

En plus de transferts horizontaux d'îlots génomiques depuis une autre espèce, les analyses génomiques ont révélé l'acquisition d'un plasmide par la souche *D. solani* PPO 9019. Ce plasmide de 43 kpb, acquis par transfert horizontal additif, a été identifié chez *Burkholderia ambifaria* AMMD qui est une souche utilisée dans la lutte biologique contre les espèces pathogènes de *pythium* (Laevens *et al.*, 2001; Winsor *et al.*, 2008). Ce plasmide comprend plusieurs gènes qui

codent pour la machinerie assurant son maintien et son transfert (Khayl *et al.*, 2015). Les plasmides à large spectres d'hôtes tels que celui-ci sont impliqués dans le transfert de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques (Jain and Srivastava, 2013) et sont souvent retrouvés chez les bactéries à colorations de Gram négative (Hayes, 2001). Ce plasmide est un potentiel moyen d'adaptation à l'hôte pour la souche de *D. solani*. De plus, l'acquisition de plasmide a déjà été montrée comme un moyen d'évolution et d'adaptation à un hôte. L'acquisition d'un plasmide contenant des PAIs chez *Pantoea agglomerans*, un microbe commensal lui a conféré la capacité d'induire des tumeurs (Barash and Manulis-Sasson, 2009).

De plus, la sélection de variations génomiques pourrait être une étape clés dans l'évolution de l'espèce et son adaptation à l'hôte. Il existe chez certaines souches de *D. solani* un SNP entraînant un changement d'acide aminé dans le gène codant pour la protéine VfmB. La modification de cette protéine, impliquée dans la production du signal QS, pourrait entraîner une modification de l'expression des gènes associés à la virulence et régulés par QS, pour ainsi faciliter l'adaptation à l'hôte *Solanum tuberosum* (Nasser *et al.*, 2013). Cette hypothèse est renforcée par l'analyse du transcriptome de la souche *D. solani* 0432.1 ; qui bénéficie de l'allèle muté du gène *vfmB*, contrairement à la souche *D. solani* IPO2222. En condition de macération, cette souche surexprime de nombreux gènes associés à la virulence, notamment des pectates lyases et des gènes associés aux systèmes de sécrétion.

5. Difficulté d'invasion face à une population résidente ?

D'après les connaissances actuelles, les *Dickeya* peuvent être considérés comme des envahisseurs puisqu'ils émergent depuis quelques décennies au détriment d'une communauté résidente de *Pectobacterium* (Davis *et al.*, 2005). Son émergence récente est démontrée par l'absence de co-évolution ou d'adaptation et à sa plus faible agressivité sur l'hôte pomme de terre. Les populations de *D. solani* s'établissent dans en Europe puisqu'elles persistent en tant que population autonome dans l'environnement champs de pomme de terre (Davis *et al.*, 2005). Les conséquences de cette invasion sont multiples ; à savoir l'augmentation de l'incidence de la maladie en France, mais aussi une sélection et une dérive des populations résidentes pour arriver à un assemblage communautaire qui change la composition des communautés microbiennes.

Les données sur la répartition des populations bactériennes dans les parcelles de champs de pomme de terre du nord de la France suggèrent que les populations envahissantes sont freinées dans leur établissement par les populations résidentes. Au sein des *Dickeya*, lors de coexistence des deux espèces au sein d'une même parcelle, *D. dianthicola* domine *D. solani*, suggérant qu'elle

freine l'établissement correct de *D. solani* sur l'hôte pomme de terre afin de préserver sa niche écologique.

6. Conclusion : un scénario d'installation de *D. solani*

Ce travail de thèse donne des clés pour proposer un scénario d'émergence du pathogène *D. solani* chez la pomme terre. Ce pathogène s'installe dans les pays tempérés grâce aux échanges internationaux et s'y adapte, notamment sur les plantes à bulbe dont la culture est intensive. Après un transfert d'hôte vers la pomme de terre, les *D. solani* s'établissent dans l'ensemble de l'Europe, dont la France. N'étant pas encore adaptés à cette plante hôte, les *D. solani* subissent une pression environnementale forte à la fois de la plante hôte et des pathogènes résidents comme *D. dianthicola*. Néanmoins, *D. solani* trouve dans les tubercules un environnement favorable à leur persistance et acclimatation au nouvel hôte pomme de terre. Cette promiscuité avec *D. dianthicola* est révélée par des transferts horizontaux de gènes chez *D. solani*. D'autres modifications du génome comme l'acquisition de plasmides ou la sélection de mutations favorables pourraient aussi améliorer l'adaptation de *D. solani* à son nouvel hôte. En moins de 10 ans *D. solani* s'est installé dans le cortège des bactéries pectinolytiques des genres *Pectobacterium* et *Dickeya*, son potentiel d'adaptation laisse suggérer qu'il pourrait à moyen terme voir sa compétitivité et son agressivité encore progresser, donc représenter un danger accru pour la culture de la pomme de terre.

7. Perspectives

A l'issue de ce travail de thèse, plusieurs perspectives se dégagent quant aux interactions entre *D. dianthicola*, *D. solani* et leur hôte *Solanum tuberosum*.

Dans un premier temps, des tests permettant de vérifier l'adaptation de *D. solani* à la pomme de terre peuvent être envisagés. Des tests de compétitions entre une population de *D. solani* ayant le gène *vfmB* muté contre une population de *D. solani* avec le gène *vfmB* non muté pourra être envisagé sur tubercules de pomme de terre et sur plante entière. Une approche de séquençage permettra de quantifier les niveaux de populations afin d'observer si la mutation du gène *vfmB* entraîne un gain de fitness pour la population et une agressivité accrue.

Les gènes constituant le plasmide acquis de *Burkholderia ambifaria* chez la souche *D. solani* PPO9019 pourront être analysés, notamment sur leur niveau d'expression afin d'observer le rôle de ce plasmide notamment dans la virulence de la souche PPO9019. De plus, des compétitions entre la souche portant le plasmide et la souche dépourvue de ce plasmide pourraient être envisagés sur tubercules de pomme de terre et sur plante entière afin d'observer si ce plasmide entraîne un gain de fitness et une meilleure adaptation à la souche qui le porte.

Concernant la construction de la souche mutante *D. solani* 3337-*rhaT*, il serait intéressant de réaliser des tests de compétition sur plante entière de pomme de terre, les tests réalisés sur tubercules ne donnant pas d'information sur un gain de fitness significatif ; les *D. solani* étant déjà très compétitive vis-à-vis des *D. dianthicola* dans cet environnement. La possibilité d'utiliser ce sucre leur confère peut-être un avantage pour la colonisation de la rhizosphère et des tissus.

Pour continuer les recherches sur l'adaptation à la niche écologique, une construction chez *D. dianthicola* lui permettant d'utiliser le D-arabinose comme source de carbone au même titre que *D. solani*, nous permettrait d'évaluer si un gain de fitness est observé dans les tubercules lors de compétition contre les *D. solani*.

Il serait aussi intéressant de doser le rhamnose et l'arabinose dans les tubercules et les tiges de pomme de terre, ou encore dans quelques plantes ornementales à bulbes comme la jacinthe. Ceci pourrait confirmer l'hypothèse de niche écologique préférentielle, associée à l'utilisation spécifique de ces deux sucres.

Pour finir, un objectif à plus longs termes serait d'étudier les mécanismes qui contraignent l'entrée des *D. solani* sur l'hôte pomme de terre quels qu'ils soient. Ceci permettrait d'anticiper d'autres invasions biologiques telles que celle-ci.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Altermannt, E.** (2012) Tracing lifestyle adaptation in prokaryotic genomes. *Front. Microbiol.* **3**, 48
- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R. and Daszak, P.** (2004) Emerging infectious diseases of plants: Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.* **19**(10): 535-44.
- Antunez-Lamas, M., Cabrera, E., Lopez-Solanilla, E., et al.** (2009) Bacterial chemoattraction towards jasmonate plays a role in the entry of *Dickeya dadantii* through wounded tissues. *Mol. Microbiol.* **74**, 662–671.
- Aoki, S.K., Diner, E.J., Roodenbeke, C. t’Kint de, et al.** (2010) A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature* **468**, 439–442.
- Arora, R.K. and Khurana, S.M.P.** (2004) 6 Major Fungal and Bacterial Diseases of Potato and their Management. *Disease management of fruits and vegetables.* **1**, 189-231.
- Babujee, L., Apodaca, J., Balakrishnan, V., Liss, P., Kiley, P.J., Charkowski, A.O., Glasner, J.D. and Perna, N.T.** (2012) Evolution of the metabolic and regulatory networks associated with oxygen availability in two phytopathogenic enterobacteria. *BMC Genomics* **13**, 110.
- Barash, I. and Manulis-Sasson, S.** (2009) Recent Evolution of Bacterial Pathogens: The Gall-Forming *Pantoea agglomerans* Case. *Annu. Rev. Phytopathol* **47**, 133–52.
- Barnard, A.M.L. and Salmond, G.P.C.** (2007) Quorum sensing in *Erwinia* species. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 415–423.
- Blackburn, T.M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J.T., Duncan, R.P., Jarošík, V., Wilson, J.R.U. and Richardson, D.M.** (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends Ecol. Evol.* **26** (7), 333-339.
- Bontemps-Gallo, S., Madec, E., Dondeyne, J., et al.** (2013) Concentration of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) modulates the activation level of the RcsCD RcsB phosphorelay in the phytopathogen bacteria *Dickeya dadantii*. *Environ. Microbiol.* **15**(3), 881–894.
- Boughammoura, A., Matzanke, B.F., Böttger, L., Reverchon, S., Lesuisse, E., Expert, D. and Franza, T.** (2008) Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **190**, 1518–1530.
- Cesbron, S., Briand, M., Essakhi, S., Gironde, S., Boureau, T., Manceau, C., Fischer-Le Saux, M. and Jacques, M.-A.** (2015) Comparative Genomics of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Xanthomonas arboricola* Unveil Molecular and Evolutionary Events Linked to Pathoadaptation. *Front. Plant Sci.* **6** (126).
- Chapelle, E., Alunni, B., Malfatti, P., Solier, L., Pédrón, J., Kraepiel, Y. and Gijsegem, F. Van** (2015) A straightforward and reliable method for bacterial in planta transcriptomics: Application to the *Dickeya dadantii*/*Arabidopsis thaliana* pathosystem. *Plant J.* **82**, 352–362.

- Charkowski, A.O.** (2006) The soft rot *Erwinia*. In Plant-Associated Bacteria. *Dordrecht: Springer Netherlands*. 423–505.
- Choquet, G., Jehan, N., Pissavin, C., Blanco, C. and Jebbar, M.** (2005) OusB, a broad-specificity ABC-type transporter from *Erwinia chrysanthemi*, mediates uptake of glycine betaine and choline with a high affinity. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (7), 3389–3398.
- Cigna, J., Dewaegeneire, P., Beury, A., Gobert, V. and Faure, D.** (2017) A gapA PCR-sequencing Assay for Identifying the *Dickeya* and *Pectobacterium* Potato Pathogens. *Plant Dis.*, **12** (16) 1810.
- Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S.C. and Vinckx, T.** (2011) Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Met. Integr. biometal Sci.* **3**, 540–9.
- Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A. and Bertheau, Y.** (1994) PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism of a pel Gene as a Tool To Identify *Erwinia carotovora* in Relation to Potato Diseases. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1437–1443.
- Davis, M.A., Chew, M.K., Hobbs, R.J., et al.** (2011) Don't judge species on their origins. *Nature.* **474**, 153-154.
- Davis, M.A., Thompson, K. and Grime, J.P.** (2005) Invasibility: The local mechanism driving community assembly and species diversity. *Ecography (Cop.)*. **28** (5), 696-704.
- DeFauw, S.L., He, Z., Larkin, R.P., and Mansour, S.A.** (2012) Sustainable potato production and global food security. In, He, Z., Larkin, R. and Honeycutt W. (eds), Sustainable Potato Production : Global Case Studies. *Springer Netherlands, Dordrecht*, 3-19.
- Delangle, A., Prouvost, A.F., Coge, V., Bohin, J.P., Lacroix, J.M. and Cotte-Pattat, N.H.** (2007) Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* gan locus, involved in galactan catabolism. *J. Bacteriol.* **189** (19), 7053–7061.
- Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P. and Expert, D.** (2009) Microbial siderophores exert a subtle role in *Arabidopsis* during infection by manipulating the immune response and the iron status. *Plant Physiol.* **150**, 1687–96.
- Dingman, D.W.** (2000) Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Bruised Apple (*Malus domestica*) Tissue as Influenced by Cultivar, Date of Harvest, and Source. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1077–1083.
- Duarte, V., Boer, S.H. De, Ward, L.J. and Oliveira, A.M.R. De** (2004) Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 535–545.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D. and Glick, B.R.** (2014) Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*.
- Effantin, G., Rivasseau, C., Gromova, M., Bligny, R. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.** (2011) Massive production of butanediol during plant infection by phytopathogenic bacteria of the genera *Dickeya* and *Pectobacterium*. *Mol. Microbiol.* **82**(4), 988–997.

- Fagard, M., Dellagi, A., Roux, C., Périno, C., Rigault, M., Boucher, V., Shevchik, V.E. and Expert, D.** (2007) *Arabidopsis thaliana* expresses multiple lines of defense to counterattack *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **20**, 794–805.
- Francl, L.J.** (2001) The Disease Triangle : A Plant Pathological Paradigm Revisited. *Plant Health Instr.*
- Franza, T. and Expert, D.** (2013) Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: An “ la carte” menu. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 429–438.
- Galperin, M.Y.** (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* **5**, 35.
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R. and Samson, R.** (2003) Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 381–391.
- Goode, R., Renaud, S., Bonnassie, S., Bernard, T. and Blanco, C.** (2004) Glutamine, Glutamate, and -Glucosylglycerate Are the Major Osmotic Solutes Accumulated by *Erwinia chrysanthemi* Strain 3937. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6535–6541.
- Gouesbet, G., Jebbar, M., Bonnassie, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Himdi-Kabbab, S. and Blanco, C.** (1995) *Erwinia chrysanthemi* at high osmolarity: Influence of osmoprotectants on growth and pectate lyase production. *Microbiology.* **141**, 1407-1412.
- Gouesbet, G., Trautwetter, A., Bonnassie, S., Wu, L.F. and Blanco, C.** (1996) Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* osmoprotectant transporter gene *ousA*. *J. Bacteriol.* **178 (2)**, 447–455.
- Grignon, C. and Sentenac, H.** (1991) pH AND IONIC CONDITIONS IN THE APOPLAST. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 3–28.
- Gu, Z., Eils, R. and Schlesner, M.** (2016) Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics.*
- Hacker, J. and Kaper, J.B.** (2000) Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 641–79.
- Hassouni, M. El, Chambost, J.P., Expert, D., Gijsegem, F. Van and Barras, F.** (1999) The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Biochemistry* **96**, 887–892.
- Hauben, L., Moore, E.R.B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. and Swings, J.** (1998) Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**, 384-397.
- Hayes, F.** (2001) The Horizontal Gene Pool — Bacterial Plasmids and Gene Spread. *Heredity (Edinb).* **86**, 251–252.
- Hélias, V.** (2008) *Pectobacterium spp.* et *Dickeya spp.* de la pomme de terre: nouvelle

- nomenclature pour *Erwinia spp.*, symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie. *Cah. Agric.* **17**, 349–354.
- Hélias, V., Hamon, P., Huchet, E., Wolf, J.V.D. and Andrivon, D.** (2012) Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathol.* **61**, 339–345.
- Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Gijsegem, F. Van, Castang, S., Ligori, S., Expert, D., Nasser, W. and Reverchon, S.** (2008) PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **190 (22)**, 7508–7522.
- Hommais, F., Zghidi-Abouzid, O., Oger-Desfeux, C., Pineau-Chapelle, E., Gijsegem, F. van, Nasser, W. and Reverchon, S.** (2011) LpxC and yafS are the most suitable internal controls to normalize real time RT-qPCR expression in the phytopathogenic bacteria *Dickeya dadantii*. *PLoS One.* **6 (5)**, 20269.
- Huang, C.-H., Vallad, G.E., Adkison, H., et al.** (2013) A Novel *Xanthomonas sp.* Causes Bacterial Spot of Rose (*Rosa spp.*). *Plant Dis.* **97**, 1301–1307.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W. and Reverchon, S.** (1996) Regulation of Pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 213–257.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G. and Shevchik, V.E.** (2014) Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* **6 (5)**, 427–440.
- Hugouvieux, N., Patiat, C. and Dominguez, H.** (1992) Environmental Conditions Affect Transcription of the Pectinase Genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **174**, 7807–7818.
- Hyttiäinen, H.** (2005) Regulatory networks controlling virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora ssp. carotovora*. Thesis.
- Hyttiäinen, H., Sjöblom, S., Palomäki, T., Tuikkala, A. and Palva, E.T.** (2003) The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora ssp. carotovora*. *Mol. Microbiol.* **50 (3)**, 795–807.
- Jaap D. Janse and M.A. Ruissen** (1988) characterization and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in the Netherlands. *Am. Phytopathol. Soc.* **78 (6)**, 800–808.
- Jafra, S., Przynsowa, J., Gwizdek-Wiśniewska, A. and Wolf, J.M. Van Der** (2009) Potential of bulb-associated bacteria for biocontrol of hyacinth soft rot caused by *Dickeya zeae*. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 268–277.
- Jain, A. and Srivastava, P.** (2013) Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* **348(2)**, 87–96.
- Jiang, X., Zghidi-Abouzid, O., Oger-Desfeux, C., Hommais, F., Greliche, N., Muskhelishvili, G., Nasser, W. and Reverchon, S.** (2016) Global transcriptional response of *Dickeya dadantii* to environmental stimuli relevant to the plant infection. *Environ. Microbiol.* **18(11)**, 3651–3672.

- Juhas, M., Meer, J.R. Van Der, Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W. and Crook, D.W.** (2009) Genomic islands: Tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 376-393.
- Kazan, K. and Manners, J.M.** (2009) Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* **14** (7), 1360-1385.
- Keen, N.T., Boyd, C. and Henrissat, B.** (1996) Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **9**, 651-7.
- Keller, L. and Surette, M.G.** (2006) Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 249-258.
- Khayi, S., Blin, P., Chong, T.M., Chan, K.-G. and Faure, D.** (2016) Complete genome anatomy of the emerging potato pathogen *Dickeya solani* type strain IPO 2222T. *Stand. Genomic Sci.* **11**, 87.
- Khayi, S., Blin, P., Pédrón, J., Chong, T.-M., Chan, K.-G., Moumni, M., Hélias, V., Gijsegem, F. Van and Faure, D.** (2015) Population genomics reveals additive and replacing horizontal gene transfers in the emerging pathogen *Dickeya solani*. *BMC Genomics* **16**, 788.
- Khayi, S., Cigna, J., Chong, TM., Quêtut-Laurent, A., Chan, KG., Hélias, V., and Faure, D.** (2016) Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol* **66**, 5379-5383.
- Khayi, S., Mondy, S., Beury-Cirou, A., Moumni, M., Helias, V. and Faure, D.** (2014) Genome Sequence of the Emerging Plant Pathogen *Dickeya solani* Strain RNS 08.23.3.1A. *Genome Announc.* **2**, e01270-13.
- Kinnunen, M., Dechesne, A., Proctor, C., et al.** (2016) A conceptual framework for invasion in microbial communities. *ISME J.* **1** (7), 1751-7362.
- Koonin, E. V., Makarova, K.S. and Aravind, L.** (2001) Horizontal Gene Transfer in Prokaryotes: Quantification and Classification. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 709-42.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop II, R.M. and Peterson, K.M.** (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene Res. Triangle Park USA. Tel* **166**, 1-919.
- Kwon, S., Kang, H. and Ryu, J.** (1997) Phylogenetic Analysis of *Erwinia* Species Based on 16s rRNA Gene Sequences *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1061-1067.
- Laevens, S., Gillis, M., LiPuma, J.J., Henry, D., Vandamme, P., Mahenthiralingam, E., Speert, D.P. and Coenye, T.** (2001) *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1481-1490.
- Lamb, C. and Dixon, R. a** (1997) the Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **48**, 251-75.
- Lang, A.S., Zhaxybayeva, O. and Beatty, J.T.** (2012) Gene transfer agents: phage-like elements of

- genetic exchange. *Nat. Rev. Microbiol.* **10** (7), 472-482.
- Laurila, J., Ahola, V., Lehtinen, A., Joutsjoki, T., Hannukkala, A., Rahkonen, A. and Pirhonen, M.** (2008) Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *Eur. J. Plant Pathol.* **122**, 213–225.
- Lebeau, A., Reverchon, S., Gaubert, S., Kraepiel, Y., Simond-Côte, E., Nasser, W. and Gijsegem, F. Van** (2008) The GacA global regulator is required for the appropriate expression of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pathogenicity genes during plant infection. *Environ. Microbiol.* **10**, 545–559.
- Leff, B., Ramankutty, N. and Foley, J. a** (2004) Geographic distribution of major crops across the world. *Global Biogeochem. Cycles* **18**, GB1009.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* **25**, 402–408.
- Llama-Palacios, A., López-Solanilla, E., Poza-Carrión, C., García-Olmedo, F. and Rodríguez-Palenzuela, P.** (2003) The *Erwinia chrysanthemi* phoP-phoQ operon plays an important role in growth at low pH, virulence and bacterial survival in plant tissue. *Mol. Microbiol.* **49** (2), 347–357.
- López-Solanilla, E., García-Olmedo, F. and Rodríguez-Palenzuela, P.** (1998) Inactivation of the sapA to sapF locus of *Erwinia chrysanthemi* reveals common features in plant and animal bacterial pathogenesis. *Plant Cell* **10**, 917–924.
- Love, M.I., Huber, W. and Anders, S.** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550.
- Ma, B., Hibbing, M.E., Kim, H., et al.** (2007) Host Range and Molecular Phylogenies of the Soft Rot Enterobacterial Genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* **97**, 1150–1163.
- Macho, A.P., Guidot, A., Barberis, P., Beuzón, C.R. and Genin, S.** (2010) A Competitive Index Assay Identifies Several *Ralstonia solanacearum* Type III Effector Mutant Strains with Reduced Fitness in Host Plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**, 1197–1205.
- Madec, E., Bontemps-Gallo, S. and Lacroix, J.M.** (2014) Increased phosphorylation of the RcsB regulator of the RcsCDB phosphorelay in strains of *Dickeya dadantii* devoid of osmoregulated periplasmic glucans revealed by Phos-tag gel analysis. *Microbiology.* **160**, 2763–2770.
- Mallon, C.A., Elsas, J.D. Van and Salles, J.F.** (2015) Microbial invasions: The process, patterns, and mechanisms. *Trends Microbiol.* **23**(11), 719-29.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., et al.** (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13**(6), 614-29.
- Mhedbi-Hajri, N., Malfatti, P., Pédrón, J., Gaubert, S., Reverchon, S. and Gijsegem, F. van** (2011) PecS is an important player in the regulatory network governing the coordinated expression of virulence genes during the interaction between *Dickeya dadantii* 3937 and plants. *Environ. Microbiol.* **13**, 2901–2914.

- Miguel, E., Poza-Carrin, C., Lopez-Solanilla, E., Aguilar, I., Llama-Palacios, A., Garcia-Olmedo, F. and Rodriguez-Palenzuela, P.** (2000) Evidence Against a Direct Antimicrobial Role of H₂O₂ in the Infection of Plants by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 421–429.
- Nabhan, S., Wydra, K., Linde, M. and Debener, T.** (2012) The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic studies of pectolytic enterobacterial strains with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum*. *Plant Pathol.* **61**, 498–508.
- Nachin, L. and Barras, F.** (2000) External pH: An Environmental Signal That Helps to Rationalize pel Gene Duplication in *Erwinia chrysanthemi*. *MPMI* **13**, 882–886.
- Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D. and Barras, F.** (2003) SufC: An unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *EMBO J.* **22** (3), 427–437.
- Naor, A. and Gophna, U.** (2013) Cell fusion and hybrids in Archaea: Prospects for genome shuffling and accelerated strain development for biotechnology. *Bioengineered.* **4** (3), 126–129.
- Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R. and Bertheau, Y.** (1996) Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR- amplified fragments of pel genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (7), 228–2235.
- Nasser, W., Dorel, C., Wawrzyniak, J., Gijsegem, F. Van, Groleau, M.C., Déziel, E. and Reverchon, S.** (2013) Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of *Dickeya dadantii*. *Environ. Microbiol.* **15**, 865–880.
- Nemergut, D.R., Schmidt, S.K., Fukami, T., et al.** (2013) Patterns and Processes of Microbial Community Assembly. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77** (3), 342–346.
- Norman, D.J., Yuen, J.M.F. and Hodge, N.C.** (1997) New Disease on Ornamental Asparagus Caused by *Xanthomonas campestris* in Florida. *Plant Dis.* **81**, 847–850.
- P. cortesi, F. Bartoli, C. Pizzatti, W.Y. Song, and N. W.S.** (2005) First report of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* on rice in Italy. *J. Plant Pathol.* **87**, 75–76.
- Parkinson, J.S. and Kofoed, E.C.** (1992) COMMUNICATION MODULES IN BACTERIAL SIGNALING PROTEINS. *Annu. Rev. Genet* **26**, 71–112.
- Parkinson, N., Pritchard, L., Bryant, R., Toth, I. and Elphinstone, J.** (2014) Epidemiology of *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* in ornamental hosts and potato studied using variable number tandem repeat analysis. *Eur. J. Plant Pathol.*
- Pédrón, J., Mondy, S., Raoul des Essarts, Y., Gijsegem, F. Van, Faure, D., Essarts, Y.R. des, Gijsegem, F. Van and Faure, D.** (2014) Genomic and metabolic comparison with *Dickeya dadantii* 3937 reveals the emerging *Dickeya solani* potato pathogen to display distinctive metabolic activities and T5SS/T6SS-related toxin repertoire. *BMC Genomics* **15**, 283.
- Pérombelon, Kelman, A.** (1987) Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias* :

- proposal for revision terminology. *Plant Dis.* **71**, 283–285.
- Pérombelon, M.C.M.** (2002) Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* **51**, 1–12.
- Pérombelon, M.C.M., Lopez, M.M., Carbonell, J. and Hyman, L.J.** (1988) Effects of contamination by *Erwinia carotovora subsp. carotovora* and *E. carotovora subsp. atroseptica* of potato seed tubers and of cultivar resistance on blanking or nonemergence and blackleg development in Valencia, Spain. *Potato Res.* **31**, 591–599.
- Pritchard, L., Humphris, S., Baeyen, S., Maes, M., Vaerenbergh, J. Van, Elphinstone, J., Saddler, G. and Toth, I.** (2013) Draft Genome Sequences of Four *Dickeya dianthicola* and Four *Dickeya solani* Strains. *Genome Announc* **1**, 87–12.
- Pritchard, L., Humphris, S., Saddler, G.S., Parkinson, N.M., Bertrand, V., Elphinstone, J.G. and Toth, I.K.** (2013) Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using a PCR primer prediction pipeline for draft bacterial genome sequences. *Plant Pathol.* **62**, 587–596.
- Raoul Des Essarts, Y., Mondy, S., Hélias, V. and Faure, D.** (2015) Genome Sequence of the Potato Plant Pathogen *Dickeya dianthicola* Strain RNS04.9. *Genome Announc* **3**, 581–15.
- Reverchon, S., Gijsegem, F. Van, Effantin, G., Zghidi-Abouid, O. and Nasser, W.** (2010) Systematic targeted mutagenesis of the MarR/SlyA family members of *Dickeya dadantii* 3937 reveals a role for MfbR in the modulation of virulence gene expression in response to acidic pH. *Mol. Microbiol.* **78(4)**, 1018–1037.
- Reverchon, S. and Nasser, W.** (2013) *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 622–636.
- Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D. and Nasser, W.** (2002) Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J. Bacteriol.* **184**, 654–665.
- Río-Álvarez, I., Muñoz-Gómez, C., Navas-Vásquez, M., Martínez-García, P.M., Antúnez-Lamas, M., Rodríguez-Palenzuela, P. and López-Solanilla, E.** (2015) Role of *Dickeya dadantii* 3937 chemoreceptors in the entry to *Arabidopsis* leaves through wounds. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 685–698.
- Río-Álvarez, I., Rodríguez-Herva, J.J., Cuartas-Lanza, R., Toth, I., Pritchard, L., Rodríguez-Palenzuela, P. and López-Solanilla, E.** (2012) Genome-wide analysis of the response of *Dickeya dadantii* 3937 to plant antimicrobial peptides. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**, 523–33.
- Rojas, C.M., Ham, J.H., Deng, W.-L., Doyle, J.J. and Collmer, A.** (2002) HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 13142–13147.
- Rousselle, P., Robert, Y., and Crosnier, J.C.** (1996) La pomme de terre, production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. livre

- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W. and Gardan, L.** (2005) Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, Dick. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1415–1427.
- Schaad N.W.** (2008) Emerging plant pathogenic bacteria and global warming. In *Pseudomonas syringae*
- Sepulchre, J.A., Reverchon, S. and Nasser, W.** (2007) Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. *J. Theor. Biol.* **244**, 239–257.
- Ślawiak, M., Beckhoven, J.R.C.M. van, Speksnijder, A.G.C.L., Czajkowski, R., Grabe, G. and Wolf, J.M. van der** (2009) Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* **125**, 245–261.
- Soucy, S.M., Huang, J. and Gogarten, J.P.** (2015) Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 472–482.
- Strange, R.N. and Scott, P.R.** (2005) Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 83–116.
- Thomas, G. and Sansonetti, G.** (2009) New light on hidden treasure: International Year of the Potato 2008, an end of year review Food & Agriculture Org.
- Toth, I.K., Wolf, J.M. van der, Saddler, G., Lojkowska, E., H??lias, V., Pirhonen, M., Tsrer (Lahkim), L. and Elphinstone, J.G.** (2011) *Dickeya* species: An emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol.* **60**, 385–399.
- Tseng, T.-T., Tyler, B.M. and Setubal, J.C.** (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* **9**.
- Tsrer, L., Erlich, O., Lebiush, S., Hazanovsky, M., Zig, U., Ślawiak, M., Grabe, G., Wolf, J.M. Van Der and Haar, J.J. Van De** (2009) Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *Eur. J. Plant Pathol.* **123**, 311–320.
- Tsrer Lahkim, L., Erlich, O., Lebiush, S., Wolf, J. van der, Czajkowski, R., Mozes, G., Sikharulidze, Z. and Daniel, B. Ben** (2011) First report of potato blackleg caused by a biovar 3 *Dickeya* sp. in Georgia. *New Dis. Reports* **23**.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G.** (2012) Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1–12.
- Vaerenbergh, J. van, Baeyen, S., Vos, P. de and Maes, M.** (2012) Sequence diversity in the *Dickeya* flic gene: Phylogeny of the *Dickeya* genus and taqman® PCR for “*D. solani*”, new biovar 3 variant on potato in Europe. *PLoS One.* **7** (5), e35738.
- Valéry, L., Fritz, H., Lefeuvre, J.C. and Simberloff, D.** (2008) In search of a real definition of the biological invasion phenomenon itself. *Biol. Invasions.* **10**, 1345–1351.
- Vellend, M.** (2010) Conceptual Synthesis in Community Ecology. *Q. Rev. Biol.* **85**(2), 183–206.

- Venkatesh, B., Babujee, L., Liu, H., Hedley, P., Fujikawa, T., Birch, P., Toth, I. and Tsuyumu, S.** (2006) The *Erwinia chrysanthemi* 3937 PhoQ sensor kinase regulates several virulence determinants. *J. Bacteriol.* **188 (8)**, 3088-3098.
- Waals, J.E. van der, Krüger, K., Franke, A.C., Haverkort, A.J. and Steyn, J.M.** (2013) Climate Change and Potato Production in Contrasting South African Agro-Ecosystems 3. Effects on Relative Development Rates of Selected Pathogens and Pests. *Potato Res.* **56**, 67–84.
- Wandersman, C., Delepelaire, P., Letoffe, S. and Schwartz, M.** (1987) Characterization of *Erwinia chrysanthemi* extracellular proteases: cloning and expression of the protease genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169 (11)**, 5046-5043.
- Winslow, C.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C.J., Rogers, L.A. and Smith, G.H.** (1920) The families and genera of the bacteria final report of the committee of the society of American bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J. Bacteriol.* **5 (3)**, 191- 229.
- Winsor, G.L., Khaira, B., Rossum, T. Van, Lo, R., Whiteside, M.D. and Brinkman, F.S.L.** (2008) The *Burkholderia* Genome Database: Facilitating flexible queries and comparative analyses. *Bioinformatics.* **24 (3)**, 2803-2804.
- Wolf, J.M. van der, Nijhuis, E.H., Kowalewska, M.J., et al.** (2014) *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 768–774.
- Xu, X., Pan, S., Cheng, S., et al.** (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* **475**, 189–95.
- Yang, C.-H., Gavilanes-Ruiz, M., Okinaka, Y., Vedel, R., Berthuy, I., Boccara, M., Chen, J.W.-T., Perna, N.T. and Keen, N.T.** (2002) hrp genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 are important virulence factors. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **15**, 472–480.
- Zaag, D.E. and Horton, D.** (1983) Potato production and utilization in world perspective with special reference to the tropics and sub-tropics. *Potato Res.* **26**, 323–362.

Titre : Dynamique des interactions entre *Dickeya solani*, *Dickeya dianthicola* et leur hôte *Solanum tuberosum*

Mots clés : *Dickeya*, invasion, agressivité, adaptation, écologie

Chez la pomme de terre *Solanum tuberosum*, la jambe noire et la pourriture molle sont des maladies provoquées par des populations bactériennes associant une ou plusieurs espèces des genres *Pectobacterium* et *Dickeya*. Depuis plusieurs décennies en Europe, l'implication des *Dickeya* s'amplifie, notamment avec l'émergence récente de *D. solani* dans les années 2000. Aucun moyen de lutte curatif n'est efficace contre ces phytopathogènes ; seules des approches prophylactiques sont mises en place par les filières de production. Dans ce travail, l'analyse de la structure de populations pathogènes au sein de parcelles de pomme de terre du nord de la France montre que *D. dianthicola* et *D. solani* dominent en abondance relative les populations de *Pectobacterium*, tandis que *D. dianthicola* domine *D. solani* lorsque les deux populations coexistent. Dans une seconde partie, des populations artificielles de *D. dianthicola* et *D. solani* ont permis d'évaluer leur agressivité et leur compétitivité en serre. Tandis que la population de *D. dianthicola* confirme sa plus forte agressivité et compétitivité après infection de plantes entière de *S. tuberosum*, celle de *D. solani* s'avère plus agressive et compétitive après infection de jacinthes *Hyacinthus orientalis*, ainsi qu'en milieux de culture riche et minimum.

L'analyse individuelle des isolats composant les populations artificielles de *D. dianthicola* et de *D. solani* montre que l'agressivité différente chez l'hôte *S. tuberosum* est un trait distinctif de ces espèces pathogènes ; ce qui renforce l'hypothèse d'un transfert d'hôte récent (plantes à bulbes vers plants de pomme terre) de *D. solani*. D'une manière remarquable, dans les tissus infectés de *S. tuberosum* (tige et tubercules), les gènes de virulence *pelD* et *pelE* sont plus fortement exprimés et d'une manière plus hétérogène chez les isolats de *D. solani* que ceux de *D. dianthicola*. Une analyse transcriptomique comparative confirme la variabilité de l'expression de fonctions de virulence entre 3 isolats de *D. solani*. L'ensemble de ce travail révèle que *D. solani* est encore en phase d'adaptation à l'hôte *S. tuberosum* avec une moindre compétitivité contre *D. dianthicola* lors de co-infection mais a une expression des fonctions de virulence en condition de macération plus importante que *D. dianthicola*. Ainsi, sous condition de sélection de variations génétiques favorables à son installation sur l'hôte *S. tuberosum* et à l'amélioration de sa compétitivité contre *D. dianthicola*, *D. solani* représente un risque majeur à moyen terme pour la culture de pomme de terre

Title : Dynamics of interactions between *Dickeya solani*, *Dickeya dianthicola* and their host *Solanum tuberosum*

Keywords : *Dickeya*, invasion, aggressiveness, adaptation, ecology

Abstract: In potato plant (*Solanum tuberosum*), blackleg and soft rot are diseases caused by bacterial populations associating one or more species of the genus *Pectobacterium* and *Dickeya*. For several decades in Europe, the involvement of the genus *Dickeya* has increased, notably with the recent emergence of *D. solani* in the 2000s. No effective control exists against these plant pathogens; only prophylactic approaches are set up by the production industry. In this work, analysis of the structure of pathogenic populations in potato fields of northern France shows that *D. dianthicola* and *D. solani* dominate populations of *Pectobacterium* in relative abundance, while *D. dianthicola* dominates *D. solani* when both populations coexist. In a second part, artificial populations of *D. dianthicola* and *D. solani* isolates have allowed to assessed their aggressiveness and competitiveness in a greenhouse experiment. While the *D. dianthicola* population confirms its strongest aggressiveness and competitiveness when whole plants of *S. tuberosum* are infected, *D. solani* population is more aggressive and competitive when infecting *Hyacinthus orientalis*, as well as in rich and minimal liquid mediums.

The individual analysis of the isolates of *D. dianthicola* and *D. solani* shows that different aggressiveness in the host *S. tuberosum* is a distinctive trait of these pathogenic species; which reinforces the hypothesis of a recent host transfer (bulb plants to potato plants) of *D. solani*. Remarkably, in infected tissues of *S. tuberosum* (stem and tubers), the virulence genes *pelD* and *pelE* are highly expressed and more heterogeneously among *D. solani* isolates than those of *D. dianthicola*. A transcriptomic analysis confirms the variability of the expression of virulence functions between 3 isolates of *D. solani*. All this work reveals that *D. solani* is still in adaptation phase to the host *S. tuberosum*, with less competitiveness against *D. dianthicola* during co-infection but an expression of the virulence functions in maceration condition greater than *D. dianthicola*. Thus, under the condition of selection of favorable genetic variations to its establishment on *S. tuberosum* host plant and the improvement of its competitiveness against *D. dianthicola*, *D. solani* represents a medium-term major risk for potato cultivation.