



Pathogénie de *Dickeya dianthicola* et *Dickeya solani* chez *Solanum tuberosum*, développement et évaluation de stratégies de lutte biologique

Yannick Raoul Des Essarts

► To cite this version:

Yannick Raoul Des Essarts. Pathogénie de *Dickeya dianthicola* et *Dickeya solani* chez *Solanum tuberosum*, développement et évaluation de stratégies de lutte biologique. Chimie thérapeutique. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112099 . tel-01552181

HAL Id: tel-01552181

<https://theses.hal.science/tel-01552181>

Submitted on 1 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 145 : SCIENCES DU VÉGÉTAL : DU GÈNE À L'ÉCOSYSTÈME

Laboratoire : Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC)

THESE SUR TRAVAUX

Dans la discipline : **BIOLOGIE**

Présentée par :
Yannick RAOUL DES ESSARTS

Pathogénie de *Dickeya dianthicola* et *Dickeya solani*
chez *Solanum tuberosum*, développement et
évaluation de stratégies de lutte biologique

Date de soutenance le 30/06/2015, devant le jury d'examen composé de :

HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT Nicole	Directrice de recherche (CNRS-Lyon)	Rapporteur
PRIGENT-COMBARET Claire	Chargée de recherche (CNRS-Lyon)	Rapporteur
BEURY-CIROU Amélie	Responsable laboratoire recherche (SIPRE-Achicourt)	Examineur
DUBOW Michael	Professeur (Université-Paris XI)	Examineur
HELIAS Valérie	Ingénieur de recherche (RD3PT-Rennes)	Examineur (Co-Directrice de thèse)
SENG Jean marc	Maître de conférences (Université-Paris XI)	Examineur
FAURE Denis	Directeur de recherche (CNRS-Gif sur Yvette)	Directeur de thèse

*A Antonin RAOUL DES ESSARTS, notre petit ange,
A Léane RAOUL DES ESSARTS, notre petit bout de fée,
A Ma femme Stéphanie RAOUL DES ESSARTS,*

Ma famille...

Remerciements

« Toujours la même chose avec cette partie, on ne sait jamais comment commencer ni qui y mettre ! Le marathon de Paris 2015, tout juste terminé et cette thèse ressemblant étrangement à une compétition de course à pieds interminable me donnent une idée soudaine... »

Tout d'abord, le sas Elite (record 2h05'), me permet de remercier mon directeur de thèse, le Dr. Denis Faure et ma co-directrice de thèse, le Dr. Valérie Hélias pour votre soutien, votre motivation et votre disponibilité tout au long de ma thèse. Merci pour votre gentillesse, vos idées et de m'avoir toujours aiguillé dans mes travaux. Merci aussi pour m'avoir donné, grâce à ce sujet d'étude collaboratif, la chance d'atteindre un tel niveau.

Un grand merci à Bernard Quere directeurs de la FN3PT et surtout Yves Le Hingrat, directeur R&D de la RD3PT pour avoir été présents dans ce parcours et m'avoir fait découvrir cette filière plant de pommes de terre. Merci d'avoir toujours répondu à mes questions, à mes attentes et de m'avoir soutenu lorsque j'en avais besoin. Merci aussi pour votre disponibilité, votre compréhension et votre soutien dans mon travail. Yves, je te remercie infiniment pour avoir bien voulu relire et apporter tes suggestions à mes différents articles et à ce manuscrit.

Je remercie également le Dr. Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat et le Dr. Claire Prigent-Combaret pour avoir accepté, en tant que rapporteurs, de participer à l'évaluation de ce travail.

Ensuite, le sas Préférentiel (2h15' - 2h45'), mes remerciements vont bien évidemment au reste des membres du jury : Dr. Virginie Deveaux, Pr. Michael Dubow et Dr. Jean-Marc Seng pour leur contribution dans l'évaluation de ce travail ainsi que pour avoir accepté d'intégrer le jury de ma thèse.

Mes remerciements vont également vers la présidence de cette très belle filière qui est le plant de pomme de terre. Merci à Mr Eric Fallou notre président de la FN3PT. Un grand merci à cette filière qui a permis par l'intermédiaire de cette CIFRE et des quelques mois qui ont suivi, le financement de mes projets. J'ai vraiment apprécié de travailler durant ces 3,5 ans de thèse au sein d'une filière dynamique et productive.

Mes remerciements se tournent aussi vers l'équipe administrative de la FN3PT autant que l'équipe R&D de cette sympathique filière. Merci pour m'avoir intégré parmi vous. Florence, Angélique, Anne-Claire, Laurent, Sylvie, Fred, Emilie, Laure, Amandine et Maryse, merci pour votre sympathie et votre aide dans mon travail. Florence et Elise, merci pour avoir été des *potato-babysitters* pendant une partie de ma thèse.

Puis, le sas Rouge (3h-3h15'), je tiens à remercier les scientifiques de la RD3PT et de la SIPRE, Angélique Quêtu-Laurent, Aline Caron et Euphrasie Munier pour leur participation scientifique, leur dynamisme et leurs remarques constructives au cours de ce projet.

J'aimerais aussi remercier Yves Dessaux, Amélie Beury-Cirou, Catherine Grandclement, Julien Lang et Edith Versari pour leurs relectures intensives et leurs corrections constructives de mes travaux publiés mais aussi de ce manuscrit.

Je remercie vivement toute l'équipe actuelle du 313 : Jeremy, Slimane, Almu, PauPau, Claudie, Julien, Nadia ; et les membres passés : Anthony (pour ta joie de vivre, les parties de pétanque au printemps, ton soutien et aide dans ces travaux de thèse et bien-sûre ton amitié), Sam (pour tes idées, ton aide en bioinformatique et ta bonne humeur), Mélanie, Sara, Nico, Sami et Fabienne. Merci à tous pour avoir fait de la vie au labo un vrai moment de plaisir.

Le sas Bleu (3h30') me donne l'opportunité de remercier les membres du GT : Plantes & Microbes qui se reconnaîtront, pour leurs conseils, critiques, aides et discussions avisés autour de mon sujet de thèse. Merci à Lamia, Patricia et Delphine pour leur aide au niveau du service laverie de l'institut qui nous a dépanné bien des fois. Merci aux différents services communs de l'institut pour leur aide notamment Célestin et Philippe pour l'informatique, Karine, Artur, François, Jocelyne et Christine pour le côté administratif.

Je tiens à remercier Frédérique Van Gijsegem et Alain Sarniguet pour avoir accepté de juger mes travaux et m'avoir aiguillé lors de mes différents comités de thèse.

Le sas Violet (3h45'), ce sas étant celui de notre marathon, cher ami, il est normal que je te remercie ici... Merci à toi coach, meneur d'allure et réinventeur de protocole ! Je tiens à te remercier pour ta sympathie, ta joie de vivre, ton soutien et votre affection à toi et à Delphine. Merci pour nos sorties trails et sessions fractionnées à répétition lors de nos entraînements pour les compét'. Merci pour ces 2 ans de partage de bureau, de manips, de complicité mais surtout d'amitié...

Ces sas me donne également l'occasion de remercier mes acolytes de bureau avec lesquels j'ai passé 3 ans ; Catherine (numéro de dossard 318) notre seconde maman au laboratoire toujours « aux petits soins », merci pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces trois ans. Évidemment, merci à mon ami « Mr Tromboskiny » pour cette alliance franco-marocaine et pour nous avoir fait vivre des moments de fou-rires interminables avec son incalculable invention de mots de la langue française. Merci pour ta disponibilité, tes conseils, ton soutien, ta bonne humeur et ton aide dans les manips de bioinfo.

Le sas Jaune (4h), je remercie les scientifiques et personnels de la SIPRE et du CNPPT d'Achicourt qui se reconnaîtront. En particulier, Sébastien Vast, Pauline Dewaegeneire, Euphrasie Munier et Amélie Beury-Cirou pour leur aide, leurs conseils avisés et leur gentillesse. Amélie, ou devrais-je dire « *madame le Dr Amélie Cirou* » (dixit un étudiant en master 2), merci pour tout ! Pour m'avoir épaulé à chaque nouvelle expérience de mon master à cette thèse, pour ton aide face aux difficultés rencontrées, ta gentillesse et ta joie de vivre. Seb, merci pour l'entraînement de course à pieds en centre-ville de Lyon à 6h du mat' lors d'un CS-CNPPT. Ce dernier m'a sans doute fait gagner quelques centièmes de seconde sur mon premier semi-marathon...

Il me semble important de remercier l'ensemble du personnel de la FN3PT et de ses 3 OP qui m'ont apporté beaucoup de connaissance sur la pomme de terre lors des visites de contrôle annuelles dans les champs. Particulièrement merci à Philippe Dollo et Philippe Laty pour m'avoir fourni les prélèvements de terrain, point de départ de ces travaux de thèse.

Pour finir, le sas Vert (4h15') pour ne pas oublier de remercier les différents étudiants étrangers que j'ai pu côtoyer au sein du labo pour leur sympathie, leurs repas « *découverte du monde* » et de leur aide en anglais, Teik-Min, Karwai, Elisa et Matt. Merci également pour le soutien des membres des équipes voisines Laurie, Seb, Viviane et Emeline. Et aussi merci aux membres de la plateforme de séquençage à haut débit d'Imagif qui se sont réellement impliqués dans mon projet de recherche sur les transcriptomes des *Dickeya*, qui n'a pas été facile d'achever... Yan, Erwin, et Delphine, un grand merci pour vos aides, vos conseils et votre disponibilité.

Le sas Rose (4h30') est réservé aux miens. Je remercie mes parents et ma famille qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans les bons comme dans les mauvais moments. Je dois dédier cette thèse à mes deux amours, ma fille et ma femme sans qui je n'aurai pas pu tenir la distance. Même si vous ne compreniez pas toujours mes actes, que mes humeurs n'ont pas toujours été évidentes à supporter ; merci pour votre patience, votre soutien et bien plus encore.

Après 3,5 ans de course effrénée entre mauvais et bons moments, satisfaction et désespérance, certitudes et doutes, travail de jour et surtout de nuit, réussites et défaites, prise de conscience ... Chers tous, MERCI !

Liste des Abréviations

3-oxo-C6-HSL : N-3-oxo-hexanoyl-L-Homoserine-Lactone
3-oxo-C8-HSL : N-3-oxo-octanoyl-L-HomoSerine-Lactone
A : Certifiée classe A
AC₅₀ ou CA₅₀: Activation Concentration 50 ou Concentration Activatrice 50
ACVNPT : Association de Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre
AFLP : *Amplified Fragment Length Polymorphism*
AI-1 : Auto-Inducteur de type 1
AI-2 : Auto-Inducteur de type 2
Anti-QS : Anti-*Quorum-Sensing*
ARNm : Acide RiboNucléique messagé
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique
AS : Acide Salicylique
AUDCPr : *relative Area Under the DPC* (Aire sous la courbe de progression de la maladie relative)
BP : Bretagne Plants
BPE : Bonne Pratiques d'Expérimentations
CCC : Commission de Contrôle et de Certification
CCS : Comité Centre et Sud
CIFRE : Conventions Industrielles de Formation par la REcherche
CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CNIPT : Comité National Interprofessionnel de la Pomme de Terre
CNPPT : Comité Nord Plants de Pomme de Terre
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
COFRAC : COmité FRançais d'Accréditation
CVP : Crystal Violet Pectate
D.diRNS09.4: *D. dianthicola* RNS04.9
Ddi : *D. dianthicola*
DdiRNS04.9 ou Ddi04.9 : souche de *D. dianthicola* RNS04.9
DGAL : Direction Générale de l'Alimentation
DKI : 5-keto-4-deoxyuronate
DKII : 2,5-diketo-3-deoxygluconate
DMSO : DiMethyl SulfOxyde
DPC : *Disease Progress Curve* ou courbe de progression de la maladie
Dsol : *D. solani*
Dsol3337 : souche de *D. solani* PRI3337 (= RNS08.23.3.1A)
E : Elite
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPR : Etablissements Producteurs Régionaux (voir OP depuis 2012)
FAME : *Fatty Acid Methyl Ester*
FAO : *Food and agriculture organization*, (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
FN3PT ou FNPPPT : Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pommes de Terre
GNIS : Groupement National Interprofessionnel des Semences et Plants
GROCEP : Groupement du Centre des producteurs de plants de pommes de terre
ha : hectares
I2BC : Institut de Biologie Intégrative de la Cellule
IC₅₀ ou CI₅₀ : Inhibiting Concentration 50 ou Concentration Inhibitrice 50
ICBMS : Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires
IF : Immunofluorescence
IGEPP : Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes
INPI : Institut National de la Protection Industrielle

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
 ITA : Institut Technique Agricole
 JN : Jambe Noire
 PM : Pourriture Molle
 KDG : 2-keto-3-deoxygluconate
 LPS : LipoPoly-Saccharides
 MBC ou CMB : Maximal Bactericidal Concentration (Concentration Minimale Bactéricide)
 MIC ou CMI : Minimal Inhibiting Concentration ou Concentration Minimale Inhibitrice
 NAHL : N-AcylHomoserine Lactone
 OGM : Organisme Génétiquement Modifié
 ONPV : Organisation Nationale de la Protection des Végétaux
 ONQ : Organismes Nuisibles de Quarantaine
 ONR : Organismes Nuisibles Réglementés
 OP : Organisations de Producteurs
 Pa : *Pectobacterium atrosepticum*
 Pa CFBP6276 : *Pectobacterium atrosepticum* CFBP6276
 PAC : Politique Agricole Commune
 PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern* (motifs moléculaires associés aux pathogènes)
 pbs : paires de bases
 Pcc : *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*
 PCR : Polymérase Chaîne Reaction
 PCWDE : *Plant Cell Wall Degrading Enzymes* (Enzymes de dégradation des parois cellulaire de la plante)
 PEH : Polygalacturonases
 PEL : PEctates Lyases
 PGPR : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (Rhizobactéries favorable dans la croissance des plante)
 PGM : Plante Génétiquement Modifiée
 pH : potentiel Hydroélectrique
 PME : Pectines Méthyles Estérases
 PNL : PectiNes Lyases
 qPCR : quantitative PCR
 QQ : *Quorum-quenching*
 QS : *Quorum-Sensing*
 QSI : *Quorum-sensing inhibitor* (Inhibiteur du QS)
 R&D : Recherche et Développement
 RAPD : *Random Amplified Polymorphism DNA*
 RAST : *Rapid Annotation using Subsystem Technology*
 RD3PT : Recherches, Développement, Promotion du Plant de Pomme de Terre
 Rep-PCR : *Repetitive Sequence-Based PCR*
 RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*
 RsmA : *Regulator of secondary metabolites*
 SE : Super Elite
 SIPRE : Semences, Innovation, Protection, Recherche et Environnement
 SOC : Service Officiel de Contrôle et de Certification
 TY : *Trypton Yeast extract* (milieu de culture riche)
 UE : Union Européenne
 UFC/mL : Unité Formant Colonie/millilitre
 UMR : Unité Mixte de Recherche
 UMT : Unité Mixte Technologique
 UNPT : Union Nationale des Producteurs de Pommes de Terre
 USEPA : *United States Environmental Protection Agency* (Agence de protection de l'environnement Américaine)
 UV : Ultra-Violets
 ΔDO : Différence de Densité Optique
 Δt : Différence de temps (retard de la maladie)

Table des matières

Remarque : La numérotation des figures et des tableaux de chaque chapitre du manuscrit est réalisée de manière indépendante.

Remerciements	ii
Liste des abréviations	v
Table des matières	vii

Avant-propos

1

Chapitre I : Introduction Générale

Partie 1. La filière du plant de pomme de terre en France	6
1.1 Organisation de la filière plant de pomme de terre en France	6
1.2 Production du plant de pomme de terre.....	7
1.2.1 La filière plant en quelques chiffres.....	7
1.2.2 Un contrôle qualité à toutes les étapes du schéma généalogique de production	8
1.3 Importance de la recherche dans la filière plant en France	9
1.4 Evolution de l'agriculture	10
Partie 2. Introduction Bibliographique	11
2.1 Connaissances générales sur les agents de la jambe noire et de la pourriture molle sur pomme de terre	11
2.1.1 Taxonomie	11
2.1.2 Caractérisation des bactéries pectinolytiques.....	12
2.1.3 Symptomatologie	15
2.1.3.1 Au champ.....	15
2.1.3.2 En stockage.....	16
2.1.4 Répartition géographique des pathogènes.....	17
2.1.5 Incidence de la maladie de jambe noire et de pourriture molle sur plant.....	18
2.2 Epidémiologie des maladies causées par <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i>	19
2.2.1 Cycle des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle.....	19
2.2.2 Sources d'inoculum.....	20
2.2.3 Facteurs de dissémination et de développement	21
2.2.3.1 Conditions environnementales favorables	21
2.2.3.2 Le tubercule mère	23
2.2.3.3 Le sol et la rhizosphère des plantes	23
2.2.3.4 L'eau et les aérosols	23
2.2.3.5 Insectes et autres facteurs biotiques.....	24
2.2.3.6 Les pratiques agricoles comme facteurs de contamination.....	25
2.2.4 Pathogénicité des bactéries pectinolytiques	26
2.3 De la prophylaxie aux stratégies nouvelles de lutte biologique contre les bactéries responsables de la jambe noire et de pourriture molle.....	30
2.3.1 La prophylaxie	31
2.3.2 Traitements physico-chimiques	32

2.3.2.1	Les traitements physiques.....	32
2.3.2.2	Les traitements chimiques	34
2.3.2.3	Fertilisation des plantes et résistance à la maladie.....	36
2.3.3	La résistance végétale	37
2.3.3.1	Sélection variétale.....	37
2.3.3.2	L'utilisation des Plantes Génétiquement Modifiées (PGM).....	39
2.3.4	Stratégies de lutte biologique	41
2.3.4.1	Stimulateurs de défenses des plantes	42
2.3.4.2	Compétiteurs bactériens.....	43
2.3.4.3	Bactéries ciblant le quorum-sensing et molécules d'anti-virulence.....	45
2.3.4.4	Prédateurs naturels des phytopathogènes pectinolytiques	47
2.3.4.5	Huiles minérales ou végétales.....	48
2.3.5	Produits commerciaux à base d'agents bactériens	48
2.3.5.1	Généralités sur la commercialisation des agents de lutte biologique.....	48
2.3.5.2	Produits commerciaux à base de <i>Pseudomonas</i> et <i>Bacillus</i>	49

Chapitre II : Pouvoir pathogène et études : génomique, métabolique et transcriptomique de deux phytopathogènes de la pomme de terre

1.1	Introduction.....	51
1.2	Matériel et Méthodes	52
1.2.1	Souches bactériennes et conditions de culture	52
1.2.2	Etude de la virulence de <i>D. dianthicola</i> RNS04.9 et <i>D. solani</i> 3337.....	52
1.2.2.1	Pathosystème tubercules hors sol	52
1.2.2.2	Pathosystème plante entière en serre	53
1.2.3	Analyse génomique des pathogènes.....	54
1.2.4	Etude métabolique.....	55
1.2.5	Etude Transcriptomique de <i>D. dianthicola</i> RNS04.9 et <i>D. solani</i> 3337	56
1.2.5.1	Phase exponentielle de croissance	56
1.2.5.2	Phase de début d'apparition des symptômes de macération.....	57
1.2.5.3	Extraction des ARN totaux bactériens.....	58
1.2.5.4	Séquençage des ARN (RNAseq ou RNA-sequencing)	58
1.3	Résultats.....	59
1.3.1	Virulence comparée de <i>D. dianthicola</i> RNS04.9 et <i>D. solani</i> 3337	59
1.3.2	Génome des pathogènes (Article 1)	60
1.3.3	Etude métabolique.....	64
1.3.4	Etude transcriptomique	65
1.4	Conclusions du chapitre II	66
1.5	Annexe du chapitre II.....	68

Chapitre III : Stratégie de lutte biologique ciblant les pathogènes responsables de jambe noire et de pourriture molle sur *S. tuberosum*

1.1	Situation des travaux.....	69
1.2	Contributions aux travaux	70
1.3	Mise au point de pathosystèmes en serre (pathogène-plante-sol)	71
1.3.1	Matériel et méthodes	71

1.3.1.1	Bactéries et conditions de culture	71
1.3.1.2	Pathosystèmes en serre	72
1.3.1.3	Détection de l'agent pathogène dans les tubercules de semence utilisés et dans les symptômes observés	73
1.3.2	Résultats	73
1.3.2.1	Modalité d'infection par trempage des tubercules :	73
1.3.2.2	Modalités d'infection par arrosage de la rhizosphère (direct ou après blessure des racines)	74
1.3.3	Bilan de la mise au point	74
1.4	Article 2 : Biocontrol of the potato blackleg and soft-rot disease caused by <i>Dickeya dianthicola</i>	75
1.4.1	Introduction	76
1.4.2	Material and Methods	80
1.4.2.1	Bacterial strains and growth conditions	80
1.4.2.2	Isolation of bacterial strains from environmental samples	80
1.4.2.3	Screening for antagonistic activity against <i>Dickeya</i> and <i>Pectobacterium</i> pathogens	81
1.4.2.4	Screening for bioprotection on potato tubers	81
1.4.2.5	Calculation of the absolute fitness value (W) in competition assays	82
1.4.2.6	Genus identification of the antagonist strains by rrs-sequencing	82
1.4.2.7	Multi-locus sequence analysis of the biocontrol agents	83
1.4.2.8	Strain-specific qPCR primers for detecting pathogenic and biocontrol strains	83
1.4.2.9	Greenhouse assays	84
1.4.2.10	Survey and analysis of the blackleg symptoms in greenhouse assays	85
1.4.2.11	Detection of pathogenic populations in the tuber progeny in greenhouse assay	86
1.4.2.12	Monitoring of the pathogenic and biocontrol soil populations in greenhouse assays	86
1.4.2.13	Conversion of results from qPCR biocontrol or pathogenic populations monitoring of the greenhouse assays	87
1.4.3	Results	88
1.4.3.1	Identification of the <i>Dickeya</i> - and <i>Pectobacterium</i> -growth inhibiting bacteria	88
1.4.3.2	Bacterial isolates reduced the soft-rot symptoms on potato tubers	88
1.4.3.3	Fitness decrease of the phytopathogens in co-culture assay	89
1.4.3.4	MLSA-characterization of the biocontrol agents	90
1.4.3.5	Blackleg-symptom reduction by the biocontrol agents PA3G8, PA14H7 and PA4C2	90
1.4.3.6	Limitation of the dissemination of the pathogen to tuber progeny	91
1.4.3.7	Dynamics of the pathogenic and biocontrol agents in greenhouse assays	91
1.4.4	Discussion	91
1.5	Conclusion et Bilan du chapitre III	98

Chapitre IV : Recherche de nouvelles molécules chimiques perturbant la signalisation *quorum-sensing*

1.1	Situation des travaux.....	101
1.2	Contributions à ce travail.....	103
1.3	Article 3 : N, N'-alkylated Imidazolium-Derivatives Act as Quorum-Sensing Inhibitors Targeting the <i>Pectobacterium atrosepticum</i> -Induced Symptoms on Potato Tubers	103
1.3.1	Introduction.....	104
1.3.2	Results and Discussion.....	105
1.3.2.1	Construction of the <i>Pectobacterium</i> AHL-Biosensor	105
1.3.2.2	QSIs Identification.....	106
1.3.2.3	Biological Effects of the Identified QSIs on <i>Pectobacterium</i> Cells.....	107
1.3.2.4	QSIs Could Moderate the <i>P. atrosepticum</i> -Induced Symptoms in Potato Tubers	108
1.3.3	Experimental Section.....	109
1.3.3.1	Bacterial Strains and Growth Conditions	109
1.3.3.2	Chemical Library	109
1.3.3.3	Screening for QSIs.....	110
1.3.3.4	Measurement of AC ₅₀ , GIAC ₅₀ , MIC and MBC Values of the QSIs	110
1.3.3.5	Virulence Assays on Potato Tubers	111
1.3.4	Conclusions.....	111
1.4	Etudes complémentaires à l'article 3	114
1.4.1	Etudes complémentaires avec la souche bio-indicatrice d' <i>A. tumefaciens</i> NT1(pZNLR4)	114
1.4.1.1	Matériel et méthodes.....	114
1.4.1.2	Résultats.....	115
1.4.1.2.1	Identification des QSI d' <i>Agrobacterium</i>	115
1.4.1.2.2	Valeurs des IC ₅₀ et évaluation de la toxicité bactérienne (paramètres CMI/CMB) des QSI chez <i>Agrobacterium</i>	115
1.4.2	Molécules de la chimiothèque agonistes au signal QS chez <i>Pectobacterium</i> et <i>Agrobacterium</i>	116
1.5	Conclusions et bilan du chapitre IV	116

Chapitre V : Discussion générale et Travaux futurs

1.1	Discussion générale	120
1.1.1	Pouvoir pathogène de <i>D. dianthicola</i> et <i>D. solani</i>	120
1.1.2	Stratégies de biocontrôle.....	124
1.1.2.1	Les agents bactériens ciblant l'inhibition de la croissance des pathogènes	124
1.1.2.2	Stratégie ciblant l'expression des gènes régulés par QS.....	128
1.1.3	Lutte biologique intégrée.....	129
1.2	Perspectives.....	131
1.2.1	Perspectives sur l'étude des pathogènes.....	131
1.2.2	Perspectives des stratégies de biocontrôle.....	134

Références Bibliographiques	137
------------------------------------	------------

Résumé	153
---------------	------------

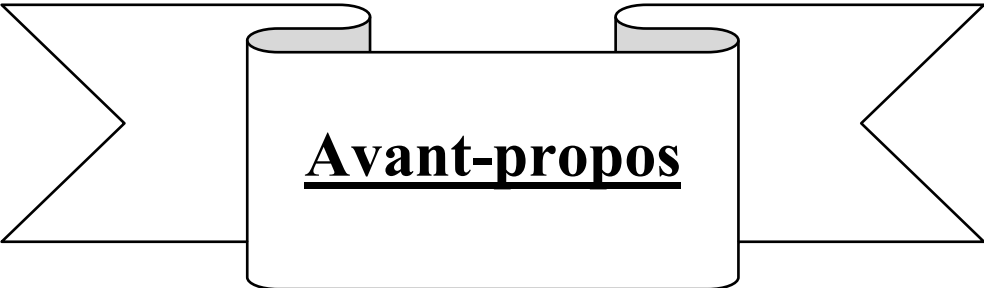
Annexes

Valorisation des travaux

- 1 *Pectobacterium* et *Dickeya* : Des stratégies de lutte biologique
 - 1.1 Contexte
 - 1.2 Référence
- 2 Antibiosis-mediated biocontrol against the potato pathogens *Pectobacterium* and *Dickeya*
 - 2.1 Contexte
 - 1.1 Référence

Travaux collaboratifs en lien avec le doctorat

- 1 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
- 2 Genomic overview of the phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* strain RNS 08.42.1A highlights horizontal acquisition of quorum-sensing genes
- 3 Séquençage des souches de phytoprotection
 - 3.1 Draft genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strains PA4C2 and PA3G8 and *Pseudomonas putida* PA14H7, three biocontrol bacteria against *Dickeya* phytopathogens
 - 3.2 Draft genome sequences of the three *Pectobacterium*-antagonistic bacteria *Pseudomonas brassicacearum* PP1-210F and PA1G7 and *Bacillus simplex* BA2H3



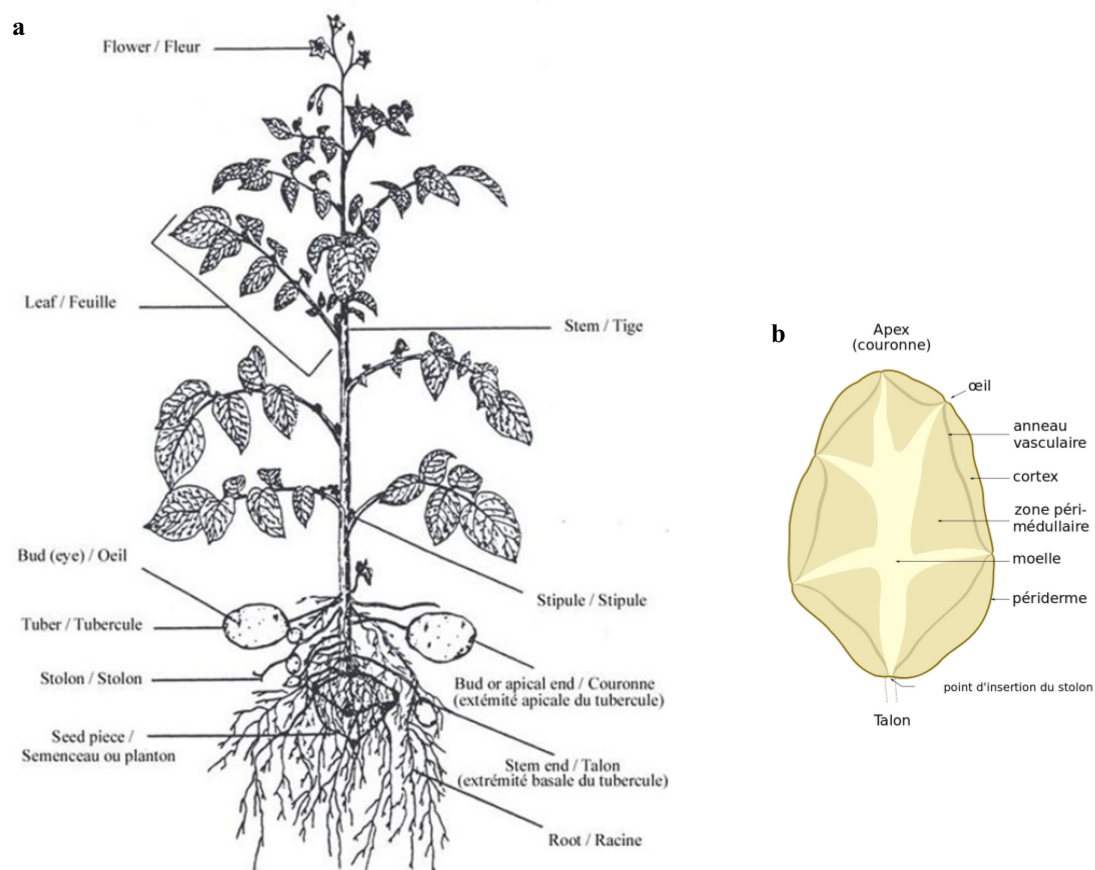


Figure 1 : Description d'une plante entière de pomme de terre (a) et l'aspect interne d'un tubercule (b).
Source : (a) extrait de l'agence canadienne d'inspection des aliments (<http://www.inspection.gc.ca>) et (b) Coupe longitudinale d'un tubercule (internet, wikipedia).

Avant-propos

Originnaire d'Amérique du sud, la pomme de terre cultivée est issue d'espèces de Solanacées présentes à l'état sauvage sur les hauts plateaux de la Cordillère des Andes où elle prend essor il y a environ 8000 ans. Introduite en Europe au XVI^{ème} siècle via l'Espagne, elle se diffuse vers l'Italie, puis le sud de la France et l'Allemagne ; il faudra attendre le milieu du siècle pour une propagation en Angleterre. En France avant le XVIII^{ème} siècle, elle est réservée à l'alimentation des animaux. Au cours de ce siècle, les efforts de promotion de Parmentier et le travail des sélectionneurs ont permis le développement de sa culture.

Le genre *Solanum* regroupe environ 1000 espèces dont plus de 200 sont tubéreuses (Rousselle *et al.*, 1996). L'espèce cultivée, *Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum*, serait une sous-espèce dérivant de *S. tuberosum* L. subsp. *andigenum* (Le Larousse agricole, *ed.* 2002). L'immense famille des Solanacées compte plusieurs espèces cultivées comme le tabac (*Nicotiana tabacum*) et des espèces alimentaires telles que la tomate (*Lycopersicon esculentum*), l'aubergine (*Solanum melongena*) ou les piments (*Capsicum*). Les cultivars de pomme de terre sont autotétraploïdes et hétérozygotes (48 chromosomes = $2n = 4x$). La séquence de son génome a été publiée en 2011 dans le cadre d'un projet international, le *Potato Genome Sequencing Consortium*. Sa taille est de 844 Mpb (Xu *et al.*, 2011).

La pomme de terre comprend deux appareils bien distincts (figure 1), le système aérien et le système souterrain (Larousse agricole, *ed.* 2002). L'appareil souterrain, comprend le tubercule mère, le système racinaire et des tiges souterraines, ou stolons. La zone sub-apicale de ces derniers se développe pour former les tubercules fils (descendance). L'extrémité du point d'insertion sur le stolon est qualifiée de talon. A l'opposé, se trouve un bourgeon terminal appelé couronne. De petites dépressions en coup d'ongle sont disposées le long du tubercule ce sont les yeux. Ils correspondent à l'emplacement de bourgeons axillaires.

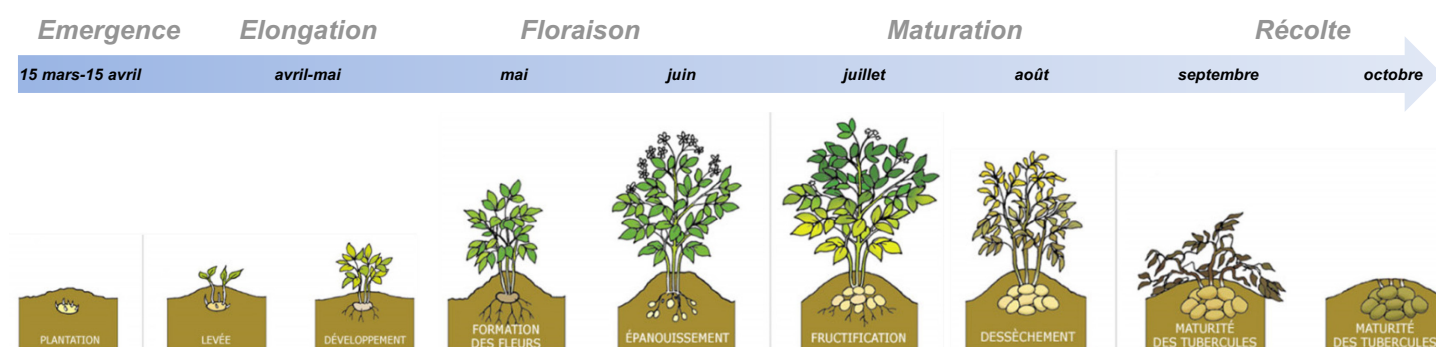


Figure 2 : Cycle annuel de la pomme de terre (itinéraire cultural). *Source :* extrait du site internet de la FN3PT/RD3PT (<http://plantdepommedeterre.org>).

Le tubercule est un organe qui sert à la reproduction végétative. À la récolte, les tubercules sont dormants puis, une évolution interne conduit à la levée de la dormance et à la production de germes à partir des yeux. Une fois le tubercule mis en terre, les germes se transforment en tiges herbacées pourvues de feuilles. C'est l'appareil aérien. Les feuilles sont alternes et disposées en spirale. Chacune est composée de 3 à 5 paires de folioles et d'une foliole terminale. Chez certaines variétés peut apparaître, à l'aisselle d'une feuille du bourgeon apical de la tige, une inflorescence, qui peut comporter de 8 à 10 fleurs. Elles sont autogames. Le fruit est une baie sphérique contenant plusieurs dizaines de graines. Les graines sont essentiellement un outil de sélection (Larousse agricole, *ed.* 2002).

Le cycle annuel de la pomme de terre se déroule en 3 phases principales (figure 2) : (i) une phase de croissance au cours de laquelle un tubercule planté va donner, à partir des germes, des tiges feuillées et des rameaux, ainsi que des stolons dans le sol ; (ii) une phase de tubérisation qui débute avec l'arrêt de l'élongation des stolons. Une fois différenciées, les ébauches des tubercules grossissent emmagasinant des substances de réserve formées à partir des métabolites synthétisés par la plante au niveau du feuillage. Les tubercules sont matures lorsque le feuillage de la plante jaunit puis se dessèche, (iii) un repos végétatif (après la récolte), phase durant laquelle les bourgeons des tubercules sont incapables de croître.

On estime aujourd'hui la consommation moyenne annuelle dans le monde à 32 kg/habitant ; les Européens font figure de numéro un des consommateurs avec 87,8 kg/habitant (FAOstat ou *Food and agriculture organization*, 2012). Avec une consommation de 95 kg/habitant/an dans les années 1960 et 62 kg/habitant/an dans les années 1980, les français sont les 3^{èmes} plus gros consommateurs d'Europe avec une consommation actuelle de 50-55 kg/habitant/an (CNIPT ou Comité National Interprofessionnel de la Pomme de Terre, 2011).

S. tuberosum est cultivée dans plus de 150 pays et arrive au 3^{ème} rang des cultures les plus consommées par l'homme, après le riz et le blé, elle est la première culture vivrière non

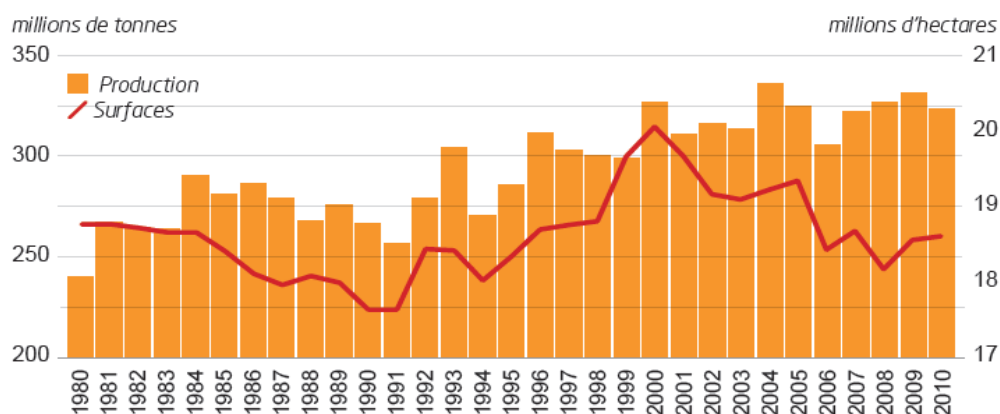


Figure 3 : Production et superficie mondiale de pommes de terre (toutes destinations confondues : frais + transformation + fécule + plant) de 1980 à 2010. *Source : Barat et al., 2012 et FAOstat.*



Figure 4 : Production de pommes de terre (toutes destinations confondues) en France de 1993 à 2013. Mots clés : M : Millions. *Source : FAOstat.*

céréalière produite au niveau mondial. Depuis le début des années 2000, plus de 300 millions de tonnes de pomme de terre sont produites dans le monde par an (FAO). Les surfaces mondiales de cultures de pomme de terre se situent autour de 18,5 millions d'hectares en 2010 (figure 3). La France, avec une production qui oscille autour des 7 millions de tonnes sur plus de 150000 ha (figure 4), était en 2010 le 11^{ème} pays producteur de pomme de terre après la Chine, la Russie, l'Inde, les Etats-Unis, l'Ukraine, l'Allemagne, la Pologne, le Bangladesh, la Biélorussie et les Pays-Bas et en 2011, le 3^{ème} principal producteur de pommes de terre de la zone Union Européenne (U.E) + Turquie après l'Allemagne et la Pologne, ex-æquo avec les Pays-Bas (figure 5).

En France, la production de tubercules de pommes de terre est organisée en 3 principales filières interdépendantes (figure 6) : (i) la filière du plant (ou semence) de pommes de terre destinée à de nouvelles plantations représentant environ 10% de la production annuelle ; (ii) la production de pommes de terre de consommation (marché du frais, conservation, primeur et transformation pour l'alimentation humaine) et (iii) la pomme de terre féculière, destinée à la transformation industrielle en fécule et aux utilisations multiples (chimie, pharmacie, papeterie, biocarburants, agro-alimentaire). Les pommes de terre de consommation et féculière représentent respectivement 75 et 15% de la production annuelle et sont produites à partir de tubercules de plants sains, contrôlés et certifiés. La production de plants certifiés en France était d'environ 340000 tonnes en 2013.

La production intensive de la pomme de terre augmente le risque de propagation des maladies. On estime à 160 le nombre de maladies affectant la production de pommes de terre, dont une cinquantaine dues à des champignons, une quarantaine à des virus et une dizaine à des bactéries. Ces maladies affectent la pomme de terre à toutes les étapes, de la croissance de la plante au stockage des tubercules (Arora et Khurana, 2004). Parmi tous les pathogènes affectant la production de plants de pomme de terre, les bactéries sont reconnues parmi les

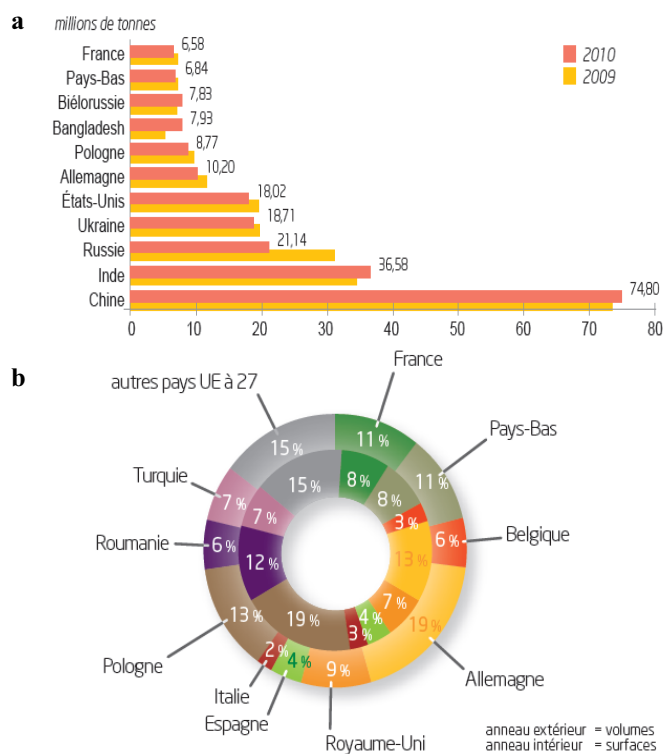


Figure 5 : Production de pommes de terre (toutes destinations confondues : frais + transformation + fécula + plant) pour les 11 premiers pays producteurs au niveau mondial en 2009-2010 (a) et dans l’U.E à 27 + la Turquie en 2011 (b). La répartition des surfaces de production au niveau européen est présentée en b. *Source:* Barat et al., 2012 et FAOstat.

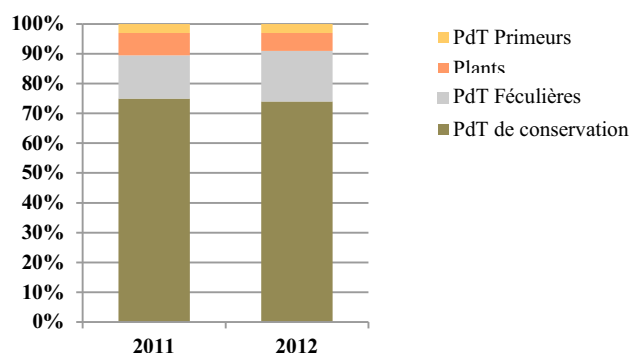


Figure 6 : Répartition de la production française dans chaque filière de pomme de terre (PdT) en 2011 (7,3 M de tonnes total) et 2012 (6,2 M de tonnes total). *Source :* Barat et al., 2012, UNPT-CNIPT et Agreste.

principales causes de problèmes (refus à la certification, litiges à destination ou déclassement).

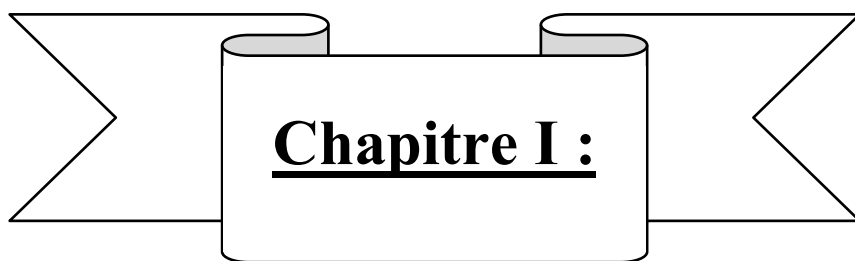
Pour mieux connaître les pathogènes qui s'attaquent à la pomme de terre et développer de nouvelles techniques de lutte, la Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre (FN3PT) et ses 3 Organisations de Producteurs (OP) participent au financement de programmes de recherche en collaboration avec des laboratoires de recherche. Parmi eux, l'INRA de Rennes-Le Rheu pour l'épidémiologie, l'université d'Amiens pour les techniques de lutte contre les pucerons vecteurs de virus, l'université de Dijon, contre le mildiou et le CNRS de Gif-sur-Yvette en collaboration avec l'IUT d'Evreux pour le développement de techniques de lutte contre *Pectobacterium* et/ou *Dickeya*. Ce travail de doctorat sous convention CIFRE (n°1282-2011) fait partie intégrante de ces programmes de recherche que développe cette filière et s'est effectué à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC-CNRS à Gif sur Yvette) au sein de l'équipe Interactions Plantes-Bactéries.

Ce travail a été codirigé par le CNRS et la FN3PT/RD3PT. Il fait suite au projet développé par le CNRS et la SIPRE/CNPPT (Thèse CIFRE d'A. Cirou, 2007-2010) portant sur le développement de stratégies d'anti-virulence ciblant la régulation *quorum-sensing* de bactéries macergènes de la pomme de terre (Cirou *et al.*, 2007). Ce projet a pour objectifs la comparaison fonctionnelle de deux pathogènes émergents sur *S. tuberosum* *D. dianthicola* et *D. solani* ainsi que le développement et l'évaluation de stratégies de biocontrôle contre les phytopathogènes responsables des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle, *Pectobacterium* et *Dickeya*.

Le chapitre I du manuscrit présentera dans une première partie la filière du plant de pomme de terre en France et dans une seconde partie, une introduction bibliographique développera les connaissances récentes sur les pathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya* ; les connaissances sur

les conditions de développement des maladies de jambe noire et de pourriture molle ; et les avancées sur les méthodes de lutte proposées actuellement.

Les trois chapitres suivants relateront les résultats expérimentaux originaux obtenus au cours de ce doctorat. Le chapitre II mettra l'accent sur deux pathogènes issus de symptômes de jambe noire en champ appartenant au genre *Dickeya*, la souche *D. dianthicola* RNS04.9 et la souche *D. solani* 3337. Des études approfondies sur ces deux souches seront développées. Le chapitre III exposera les différentes étapes qui ont permis la sélection et d'évaluation plusieurs souches bactériennes isolées de l'environnement montrant des capacités à diminuer les symptômes de jambe noire et de pourriture molle causés par les pathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya*. Enfin, le chapitre IV, développera un sujet intéressant à intégrer aux recherches de stratégies de lutte biologique si une méthode de lutte intégrée contre *Pectobacterium* et *Dickeya* veut être développée. Il s'agit de la recherche de nouvelles biomolécules affectant la signalisation *quorum-sensing*. Un dernier chapitre sera réservé à la discussion et conclusion de l'ensemble des travaux en proposant des perspectives de recherches futures. Une partie annexe est présentée en fin de ce manuscrit pour intégrer des articles reflétant ma participation à d'autres travaux au sein du laboratoire et permettant de montrer la valorisation de ce travail de thèse.



Introduction Générale

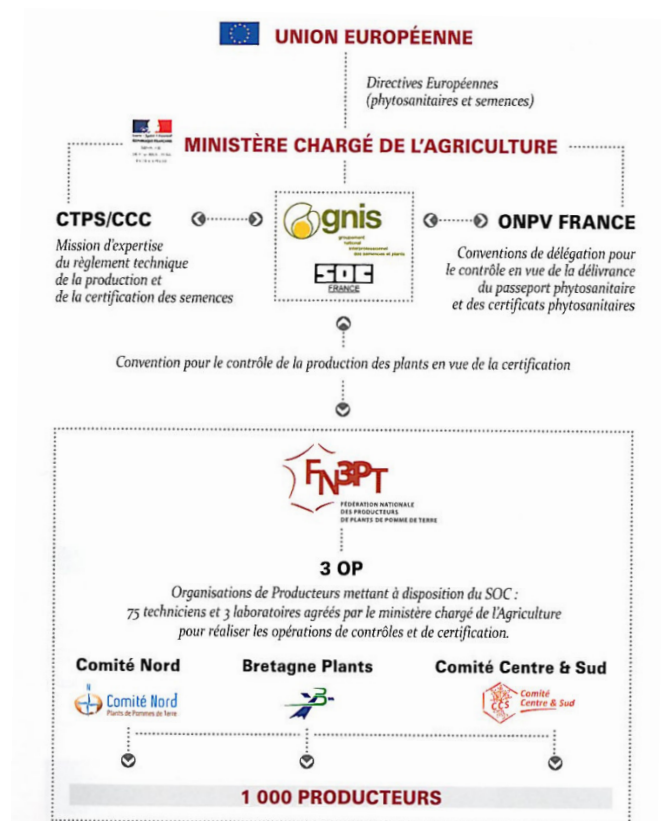


Figure 1 : Organisation de la production de plants de pomme de terre au sein de la FN3PT en fonction des directives de l'U.E. Mots clés : CCC : Commission de Contrôle et de Certification ; CTPS : Comité Technique Permanent de la Sélection ; OP : Organisation de Producteurs ; FN3PT ou FNPPPT : Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pommes de Terre ; GNIS : Groupement National Interprofessionnel des Semences et Plantes ; ONPV : Organisation Nationale de la Protection des Végétaux ; SOC : Service Officiel de Contrôle et de Certification. *Source :* Catalogue des variétés de pomme de terre produites en France, 2015.

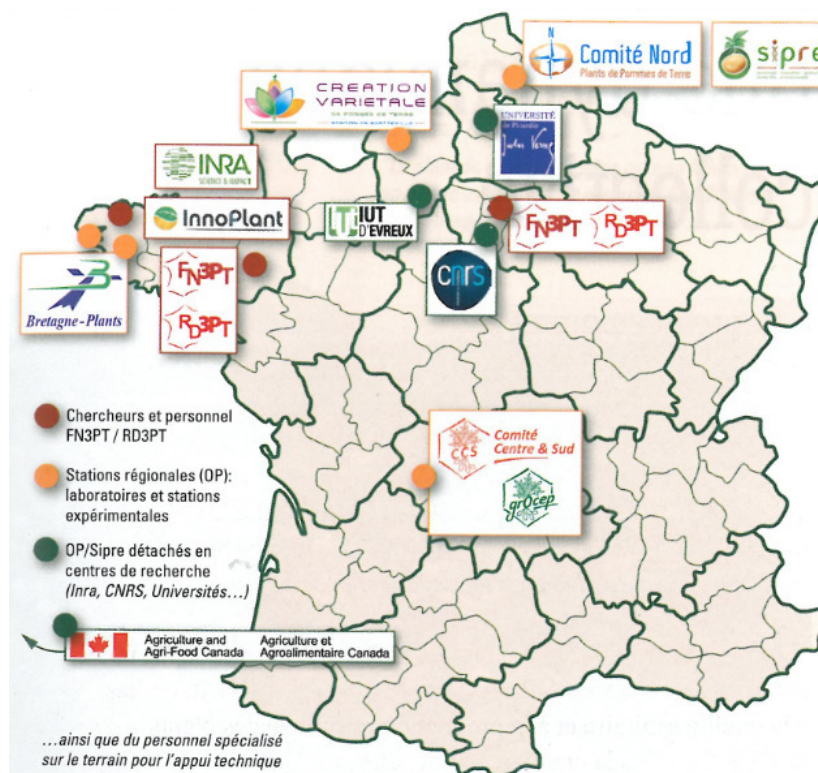


Figure 2 : Localisation des structures de producteurs et dispositif R&D de la filière plants de pomme de terre en France. *Source :* Gillet, 2015.

Introduction Générale

Partie 1. La filière du plant de pomme de terre en France

La France est un terroir reconnu pour la production de plants de qualité. Elle bénéficie de sols, d'un climat favorable et diversifié ainsi que d'un réseau de compétences à tous les niveaux de la filière, de la création variétale jusqu'à la commercialisation des plants. Par ailleurs, les acteurs de la filière ont défini et partagent des règles de production rigoureuses pour obtenir un niveau élevé de qualité sanitaire des plants. Pour conserver son rang de deuxième exportateur mondial de plants certifiés, la France doit préserver l'état sanitaire de ses productions et innover en investissant dans la recherche et le développement tout en tenant compte des nouvelles contraintes économiques, environnementales et réglementaires (Gillet, 2015).

1.1 Organisation de la filière plant de pomme de terre en France

Créée en 1932, la FN3PT regroupe depuis l'origine les syndicats de producteurs de plants de pommes de terre admis au contrôle officiel. Depuis 1994, elle coordonne au niveau national ses 3 OP, le CNPPT (Comité Nord Plants de Pomme de Terre créé en 1980), BP (Bretagne Plants créé en 1970) et le CCS (Comité Centre et Sud créé en 1978). Leurs missions sont nombreuses : le contrôle et la certification des plants par délégation du Ministère de l'Agriculture (figure 1), la production de matériel de départ (boutures, mini-tubercules), l'amélioration des techniques de production et l'appui technique aux producteurs de plants français, la création variétale, l'organisation économique du secteur et la promotion générique du savoir-faire français. Les 3 OP disposent d'importants moyens techniques (figure 2) :

- Centres techniques (Achicourt dans le Pas-de-Calais, Hanvec dans le Finistère et Lavergne en Haute-Vienne) équipés de laboratoires modernes de contrôle qualité et de pathologie ainsi que d'installations expérimentales (en partie agréées B.P.E. (Bonnes Pratiques d'Expérimentation) pour réaliser des essais reconnus officiellement pour l'homologation de produits phytosanitaires) ; les 3 laboratoires sont agréés par les services officiels (GNIS-SOC et DGAL) et bénéficient d'accréditations par le COFRAC en bactériologie, virologie et nématologie (norme 17025).

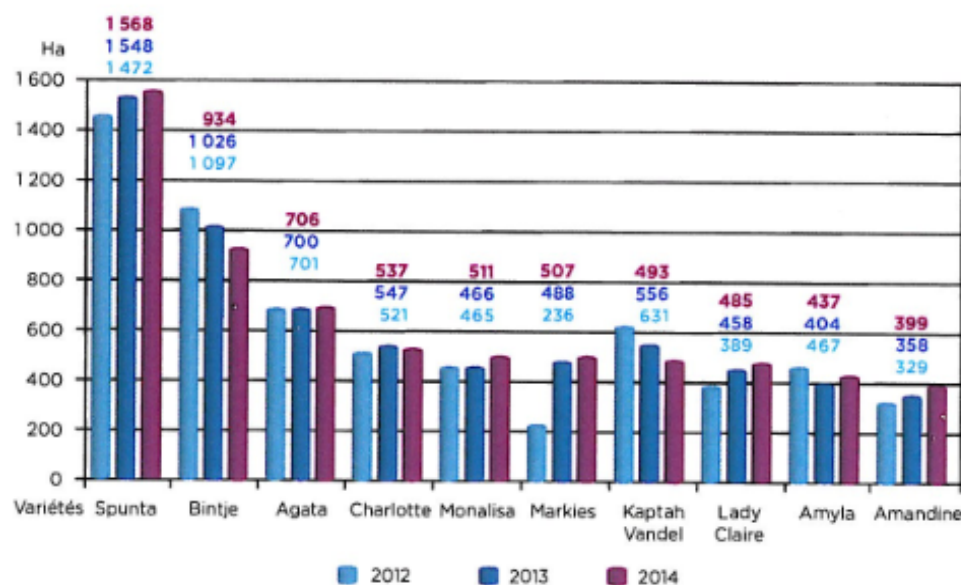


Figure 3 : Principales variétés multipliées en France sur les 3 dernières années. *Source :* Rapport annuel de la FN3PT, 2014.

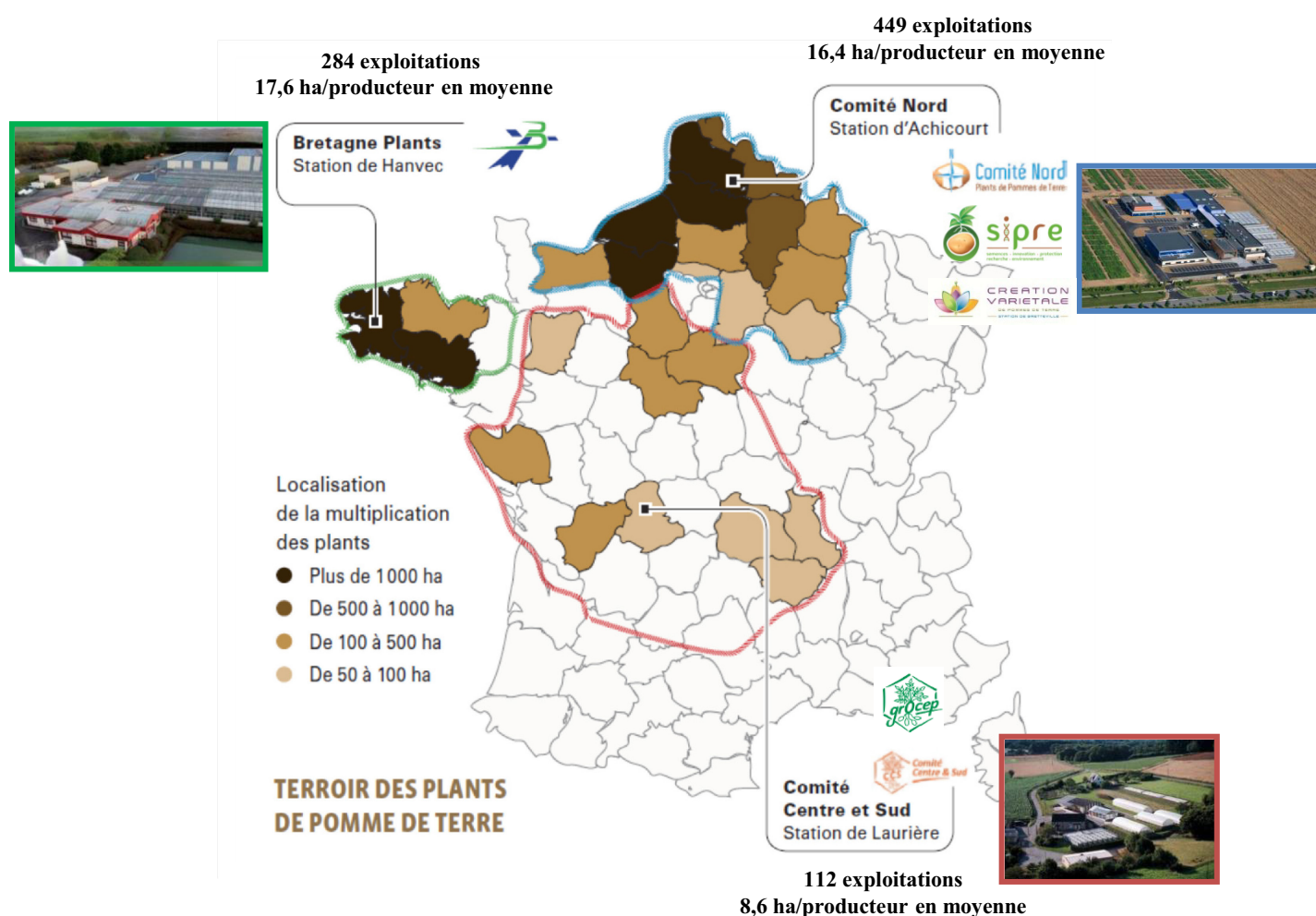


Figure 4 : Stations et production de plants de pomme de terre par région. Production de plants en 2014 en fonction des OP. *Source :* Catalogue des variétés de pomme de terre produites en France, 2015.

- 3 stations de création variétale : Bretteville-du-Grand-Caux (76), Kerloï (29) et Lavergne (87).
- 1 réseau de techniciens spécialisés chargés du contrôle en culture par délégation du ministère mais impliqués aussi dans des actions de développement et de conseil techniques auprès des producteurs.

1.2 Production du plant de pomme de terre en France

1.2.1 La filière plant en quelques chiffres

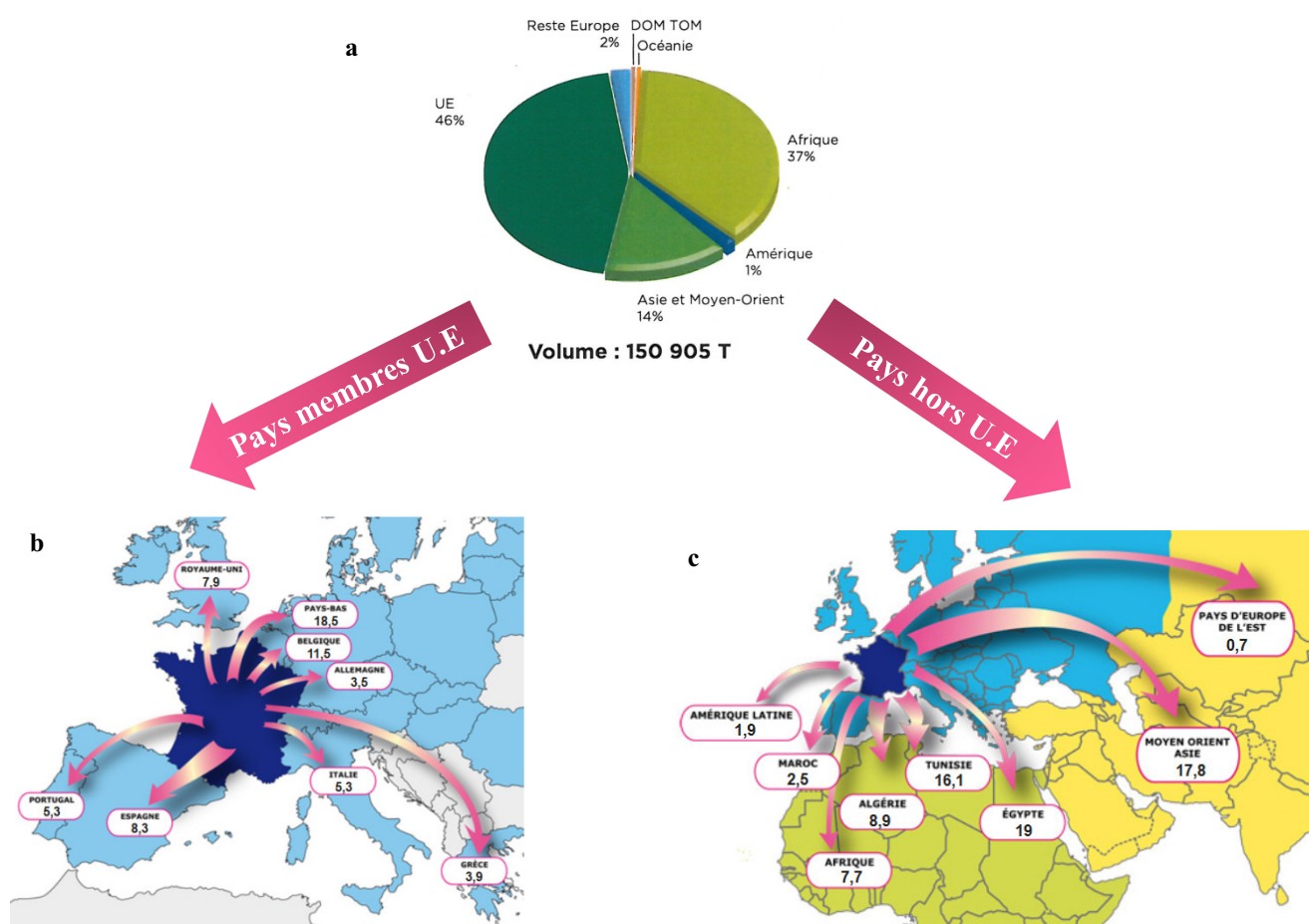
En 2014, plus de 400 variétés étaient multipliées sur le sol français dont les principales sont Spunta, Bintje, Agata et Charlotte (figure 3). Les surfaces présentées au contrôle sont de 18746 hectares en 2014/2015 et se répartissent entre les trois grandes régions de production (figure 4) :

- 12334 ha dans la région Nord (449 exploitations et une moyenne de 16,4 ha/producteur),
- 5358 ha en Bretagne (284 exploitations et 17,6 ha/producteur en moyenne),
- 1054 ha en région Centre et Sud (112 exploitations et 8.6 ha/producteur en moyenne).

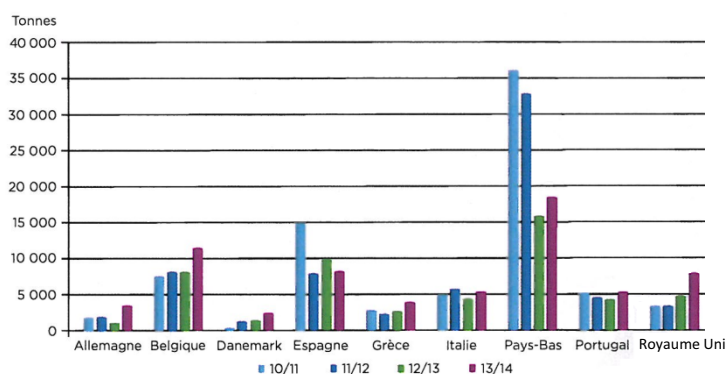
Les ventes de plant français à l'étranger se situent depuis 2010 à plus de 160 000 tonnes. Les achats de plants à l'extérieur se situent autour de 20 000 t, et proviennent essentiellement des Pays-Bas. La tendance est à la baisse du fait de l'augmentation de la production française. Les exportations françaises se font à plus de 45 % vers les pays de l'UE, principalement les Pays-Bas qui réalisent traditionnellement une partie de leurs exportations à partir de marchandises françaises. Viennent ensuite la Belgique, l'Espagne, le Royaume-Uni, l'Italie et le Portugal. Les autres destinations du plant français sont les pays d'Afrique du Nord (Egypte, Tunisie, Algérie, Maroc) et du Moyen Orient, destinations en forte progression ces dernières années (figure 5).

La création variétale qui constitue l'un des enjeux prioritaires de la filière plant bénéficie d'une importante part des financements de recherche et développement. La création variétale est réalisée au niveau national par trois obtenteurs dépendant des OP et un quatrième privé, Germicopa. Ils travaillent en lien avec de nombreux partenaires (producteurs, coopératives, négociants). Les stations de création sélectionnent les variétés sur des qualités culinaires et technologiques, ainsi que sur les résistances aux maladies. Elles s'appuient sur un réseau d'essais en France et à l'étranger pour évaluer leur comportement agronomique. Chaque année,

Exportations du plant Français



Evolution des exportations françaises de plants par pays dans l'U.E



Evolution des exportations françaises de plants par pays hors U.E

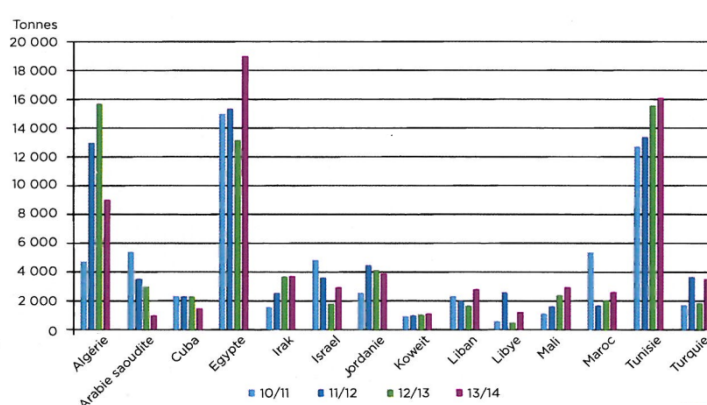


Figure 5 : Exportations des plants produits en France (a). Les chiffres sont indiqués en milliers de tonnes pour la campagne 2013/2014 d'exportation à travers l'Union Européenne (U.E) (b) ou le monde (c). *Source :* Adaptation du site internet de la FN3PT (www.plantdepommeeterre.org), le rapport annuel de la FN3PT de 2014, des chiffres du GNIS et des Douanes.

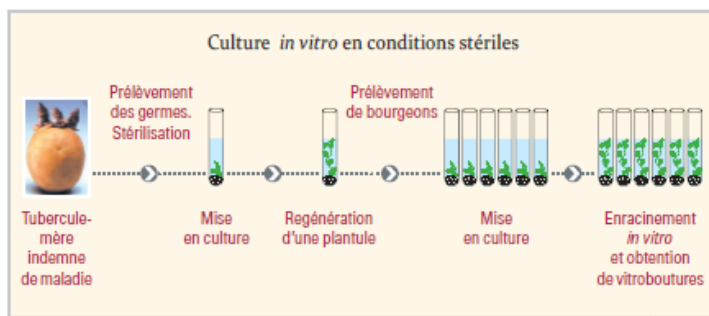
elles inscrivent en moyenne une dizaine de nouvelles variétés dans tous les créneaux d'utilisation (consommation en frais, conservation, exportation, transformation).

1.2.2 Un contrôle qualité à toutes les étapes du schéma généalogique de production

Pour obtenir un haut niveau de qualité, les professionnels ont mis en place un schéma strict de production de plants de pomme de terre. A l'intérieur de l'U.E, diverses réglementations décrivent les exigences de production et de commercialisation transposées par les états membres dans des règlements techniques nationaux qui doivent inclure les règles définies au niveau communautaire et dont l'application est réalisée sous la responsabilité des autorités compétentes (le Service Officiel de Contrôle ou SOC, en France et par exemple le NAK aux Pays-Bas).

Il est important d'initier la multiplication du plant à partir de tubercules exempts de ces agents pathogènes. La production de matériel de départ à l'origine du schéma généalogique (figure 6) de production de plants est ainsi issue de boutures de pommes de terre *in-vitro* qui sont ensuite multipliées en condition axénique (la première année de multiplication est réalisée à l'abri de toute contamination, sous tunnel « *insect-proof* » et sur substrat désinfecté ou en culture hors sol (cultures hydroponiques) pour produire des mini-tubercules qui sont ensuite répartis pour être cultivés dans un environnement contrôlé et favorable à la production de tubercules sains. Ce schéma généalogique de production rigoureux conduit à un nombre limité de générations au champ pour l'obtention des classes Super Elite (SE), Elite (E) et de la catégorie certifiée (A) (Quéré et Ponserre, 2015). Les OP, disposant au total d'une équipe de 60 inspecteurs et de 3 laboratoires agréés, placés sous l'autorité du SOC (figure 1), réalisent des contrôles intensifs à tous les niveaux de la production des plants. La France s'impose certaines normes de certification plus sévères que les directives européennes, résultat d'une véritable volonté de la filière d'obtenir une qualité élevée et supérieure aux normes réglementaires (tableau 1).

Les normes de qualité pour la certification des plants ont pour base le règlement technique général et le règlement technique annexe de production, du contrôle et de la certification des



Culture sous tunnel insectproof et sur substrat désinfecté



Génération (max. 9 au champ)	Catégorie	Classe
	G0	PBTC
	G1	PB
	G2	PB
	G3	PB
	G4	PB
	G5	S
	G6	SE
	G7	E
	G8	A ou B
	G9	A ou B

Figure 6: Le plant de pomme de terre : Schéma généalogique de production. Mots clés : E : Elite ; A ou B : Certifiée classe A ou B ; SE : Super Elite ; S : Super ; G : Génération ; PB : Pré-Base. *Source : FN3PT, 2015 et Quéré et Ponserre, 2015.*

a

**NORMES MINIMALES EN POURCENTAGE
DE PIEDS ATTEINTS**

Catégorie	Classe	Pieds non levés ou chétifs	Jambe noire	Pureté variétale	Virus	Rhizoctone
Pré-base	PBTC	0	0	0	0	0
	PB	7	0	0,01	0,1	5
Base	S	7	0 (0,1)	0,1	0,2	5
	SE	7	0 (0,5)	0,1	0,33 (0,5)	5
	E	7	0,5 (1)	0,1	0,5 (0,8)	5
Certifiée	A	7	1	0,2	1	10
	B	10	1	0,2	3	10

b

NORMES SUR LOT EN POURCENTAGE DE POIDS DE TUBERCULES

Catégorie	Classe	① Terre et corps étrangers	② Défauts extérieurs	③ Tub. flétris (y compris symptômes gale argentée)	④ Pourritures sèches + humides	⑤ Gale commune	⑥ Gale poudreuse	⑦ Rhizoctone	⑧ Taupins	⑨ Nécroses superficielles tuberculaire	⑩ Dommages températures basses (hors gel)
Pré-base	PBTC	1	0	0	Avant* : 0 Après* : 0	0	0	0	0	0	0
	PB	1	3	0,5	Avant : 1 Après : 0,2	5	0,2	1	5	0,1	2
Base	S	1	3	1	Avant : 1 Après : 0,2	5	0,2	5	5	0,1	2
	SE	1	3	1	Avant : 1 Après : 0,2	5	0,2	5	5	0,1	2
	E	1	3	1	Avant : 1 Après : 0,2	5	0,2	5	5	0,1	2
Certifiée	A	1	3	1	Avant : 1 Après : 0,2	5	0,2	5	5	0,1	2
	B	1	3	1	Avant : 1 Après : 0,2	5	0,2	5	5	0,1	2

* Avant et après conditionnement.

Tableau 1 : Tableaux des normes françaises de qualité du plant de pomme de terre. (a) Contrôles en culture, les cultures de plants de base font l'objet de 3 visites au minimum et les cultures de plants certifiés font l'objet de 2 visites au minimum par les inspecteurs agréés (les normes entre parenthèses sont les normes des classes de l'Union Européenne). (b) Contrôle sur lot, chaque lot fait l'objet de contrôles visuels par les inspecteurs et d'analyses par les 3 laboratoires agréés mis à disposition du SOC. *Source : FN3PT, 2015.*

semences. Des règles sont définies, en particulier, pour la multiplication des cultures (établissements admis au contrôle, schéma généalogique,...), la conservation des plants (conditions de stockage), la notation des cultures (normes en végétation ; tableau 1 a) et des lots (normes sur lots ; tableau 1 b) pour lesquels l'identité, la pureté variétale et l'état sanitaire sont les principaux paramètres (Quéré et Ponserre, 2015).

Les organismes nuisibles sont classés en deux catégories, les organismes nuisibles de qualité pour lesquels une tolérance est admise ; et les organismes nuisibles de quarantaine ou réglementés (ONQ ou ONR) pour lesquels aucune tolérance n'est admise (tableau 2). Des contrôles sont appliqués aux différentes étapes du schéma de production de plants. Par exemple, pour les cultures de plants de base et celles de plants certifiés, les inspecteurs font respectivement 3 et 2 visites minimum au cours de la phase de culture au champ. Pour le contrôle sur lot, chaque lot fait l'objet de contrôles visuels par les inspecteurs et d'analyses par les 3 laboratoires agréés. Dans le cas de la maladie de la jambe noire, organisme de qualité, les normes pour une semence certifiée de classe A sont : en culture, 1% maximum de pieds atteints de jambe noire et sur lots 0,2% maximum de poids de tubercules atteints de pourriture molle, après conditionnement (tableau 1 a et b).

1.3 Importance de la recherche dans la filière plant en France

La filière plant conduit depuis de nombreuses années, en collaboration avec la recherche publique, d'importantes actions de recherche et développement ayant pour buts de :

- Conforter la qualité sanitaire et technologique des plants certifiés,
- Préserver l'état sanitaire des exploitations et territoires de production,
- Sélectionner de nouvelles variétés de pomme de terre adaptées aux différents secteurs du marché et répondant aux nouvelles normes environnementales, grâce aux travaux sur la résistance aux bio-agresseurs (bactéries, virus, champignons et, nématodes),
- Développer des stratégies de production de plant innovantes et raisonnées, limitant le recours aux intrants phytosanitaires (Plan Ecophyto 2018 et loi d'avenir),
- Renforcer la compétitivité de la production française dans un secteur concurrentiel dans lequel les exigences sanitaires constituent un critère décisif.

Cet important dispositif de recherche et développement de la filière plant s'organise autour :

- Des programmes de recherche «finalisée» conduits en partenariat avec la recherche publique, et en particulier de l'INRA, mais aussi du CNRS ou d'Universités,

Origine des symptômes	Maladie, Ravageur et désordre	Organisme responsable
<u>Organisme nuisible de qualité :</u>		
En Végétation	Jambe noire	<i>Pectobacterium</i> spp. et <i>Dickeya</i> spp. (ex. <i>Erwinia</i>)
	Virus provoquant des déformations légères ou graves des feuilles	PVY
	Verticilliose	<i>Verticillium</i> sp.
	Rhizoctone	<i>Rhizoctonia solani</i>
Sur lot*	Les organismes non nommés : Pourriture sèche : Gangrène, Fusariose, Mildiou Pourriture humide	<i>Phoma foveata</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora infestans</i> <i>Pectobacterium</i> spp. et <i>Dickeya</i> spp. (ex. <i>Erwinia</i>)
	Nécrose superficielle d'origine virale	Virus Y ^{NTN} ou PVY ^{NTN}
	Les organismes responsables d'affections superficielles : Gale commune	<i>Streptomyces scabies</i> et <i>Streptomyces</i> sp.
	Rhizoctone	<i>Rhizoctonia solani</i>
	Gale poudreuse	<i>Spongospora subterranea</i>
	Taupins	<i>Agriotes</i> sp.
<u>Organisme nuisible réglementé (ONR) :</u>		
En végétation et/ou sur lot* :	Gale verruqueuse	<i>Synchytrium endobioticum</i>
	Pourriture brune	<i>Ralstonia solanacearum</i>
	Stolbur	Mycoplasme
	Maladie bronzée de la tomate	Virus du TSWV (ou <i>Tomato spotted wilt virus</i>)
En végétation :	Nématodes à kyste	<i>Globodera pallida</i> et <i>Globodera rostochiensis</i>
	Flétrissement bactérien	<i>Clavibacter michiganensis</i> sp. <i>sepedonicus</i>
	Maladie vermiculaire de la pomme de terre	<i>Ditylenchus destructor</i>
	Pourriture annulaire	<i>Clavibacter michiganensis</i> sp. <i>sepedonicus</i>
Sur lot* :	Nématode à galle	<i>Meloidogyne chitwoodi</i> et <i>fallax</i>
	Doryphore	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
	Teigne	<i>Phthorimaea operculella</i>

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des deux catégories d'organismes nuisibles pour lesquels une tolérance en végétation et/ou sur lot de plants de pomme de terre est admise (qualité) ou non-admise (ONR) lors du contrôle réglementaire officiel (conformément à l'application du règlement technique annexe de production, contrôle et certification). *Source : Adaptation du site internet de la FN3PT (www.plantdepommedeterre.org).*

* Dans les cas de symptômes douteux correspondants à ceux provoqués par les organismes nuisibles cités en végétation, des prélèvements sont effectués pour analyse et identification en laboratoire.

- Des programmes de création de nouvelles variétés conduits dans les stations d'obtention,
- Des programmes régionaux d'expérimentation conduits dans les stations plants dans le but d'améliorer les techniques de production de plants,
- Un réseau de laboratoires diffusant les résultats auprès des acteurs de la filière.

Ces recherches s'appuient sur une organisation régionale reconnue par le Ministère de l'Agriculture comme Institut Technique Agricole (ITA) représentant un effectif de 56 chercheurs, ingénieurs et techniciens FN3PT-OP (figure 2) et un budget recherche de 4,6 millions d'euros en 2014/2015, dont 80 % sont autofinancés par les producteurs de plants.

Le partenariat de recherche de la filière plant a été récemment renforcé par la création de l'Unité Mixte Technologique (UMT) InnoPlant, créée en 2012. Portée par la FN3PT/RD3PT et l'INRA, l'UMT Innoplant associe pour certaines actions le GNIS et l'Association de Créateurs de Variétés Nouvelles de Pomme de Terre (ACVNPT) autour d'un programme de travail sur la qualité sanitaire des plants et la résistance variétale aux bio-agresseurs, en lien avec la compétitivité de la filière. Ces activités de R&D forment un ensemble cohérent allant de la recherche amont jusqu'au transfert auprès des professionnels de la filière, le tout étant inséré dans un réseau de partenariats nationaux et internationaux.

1.4 Evolution de l'agriculture

La demande des pouvoirs publics et de la société est de réduire l'utilisation des intrants en agriculture et de renforcer le recours aux méthodes alternatives. En 2012, le Ministre de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt propose un modèle de production basé sur l'agro-écologie qui serait « plus économe en intrants et en énergie, tout en assurant la compétitivité » (Dupraz, 2006). A la suite du Grenelle de l'environnement de 2008, un projet de loi sur l'avenir et la modernisation de l'agriculture a été annoncé et a été adopté en septembre 2014 (Gross et Charbonnier, 2014). Le plan Ecophyto2018 vise à réduire de moitié l'utilisation des produits phytosanitaires en France tout en maintenant une agriculture économiquement performante. Pour répondre à ces demandes, la FN3PT et ses OP ont souhaité mener des programmes de recherche en ce sens. Ce projet de thèse, comme les travaux antérieurs au

laboratoire sur le sujet s'intègrent totalement dans ces recherches de solutions agro-écologiques du secteur plant de pomme de terre puisque leur principal objectif est de mettre au point de nouvelles stratégies de lutte biologique contre les agents pathogènes responsables des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle.

Partie 2. Introduction Bibliographique

2.1 Connaissances générales sur les agents de la jambe noire et de la pourriture molle sur pomme de terre

2.1.1 Taxonomie

La maladie de la jambe noire et de la pourriture molle sur pomme de terre est provoquée par des bactéries appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya*, qui étaient autrefois regroupés dans le genre bactérien *Erwinia* (respectivement *E. carotovora* et *E. chrysanthemi*). Appartenant à la famille des Entérobactéries, il s'agit de bactéries à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatives, ayant une forme de bâtonnet (bacilles de $0.5-1 \times 1-3 \mu\text{m}$) et munies d'une ciliature flagellaire pérित्रiche (Perombelon et Kelman, 1980 ; Hauben *et al.*, 2005 ; Charkowski, 2007). Depuis sa création, de nombreux nouveaux genres et espèces bactériennes ont été définis à partir du genre *Erwinia*, aboutissant à des propositions de remaniement dans la taxonomie des souches au sein du genre qui apparaissent déjà dans la bibliographie des années 1990-2000 (Costa *et al.*, 2006 ; Paulin *et al.*, 2001). Un important arsenal de méthodes taxonomiques était disponible pour classer les souches responsables de pourriture molle au sein des espèces d'*Erwinia* (voir ci-après). Waldee proposa en 1945 de définir d'un côté le genre *Erwinia* pour les pathogènes occasionnant des nécroses sèches ou des flétrissements des plantes (telle qu'*E. amylovora*) et de l'autre le genre qu'il nomma, *Pectobacterium* intégrant les bactéries phytopathogènes pectinolytiques (*E. carotovora* et *E. chrysanthemi*) responsables de pourriture molle. Alors non unanimement reconnus par la communauté scientifique, ce n'est que par les études des séquences 16S de l'ADN ribosomique (rrs ou 16S rDNA) pour l'étude de

Soft rot *Erwinia* spp. (Burkholder et al. 1957) Soft rot *Pectobacterium* spp. (Gardan et al. 2003)

- *E. carotovora* subsp. *carotovora* → • *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (**Pcc**)
- *E. carotovora* subsp. *atroseptica* → • *P. atrosepticum* (**Pba**)
- *E. carotovora* subsp. *wasabiae* → • *P. wasabiae* (**Pwa**)
- *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (**Pcb**) (Duarte et al. 2004)

Soft rot *Dickeya* spp. (Samson et al. 2005)

- *E. chrysanthemi* → • *P. chrysanthemi* → • *Dickeya* species
 - *E. chrysanthemi* pv. *dianthicola* • *P. chrysanthemi* pv. *dianthicola* • *D. dianthicola*
 - *E. chrysanthemi* pv. *dadantii* • *P. chrysanthemi* pv. *dadantii* • *D. dadantii*
 - *E. chrysanthemi* pv. *zeae* • *P. chrysanthemi* pv. *zeae* • *D. zeae*
 - *E. chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* • *P. chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* • *D. chrysanthemi*
 - *E. chrysanthemi* pv. *dieffenbachiae* • *P. chrysanthemi* pv. *dieffenbachiae* • *D. dieffenbachiae*
 - *E. chrysanthemi* pv. *paradisiaca* • *P. chrysanthemi* pv. *paradisiaca* • *D. paradisiaca*
 - *D. solani* (van der Wolf et al. 2013)

Figure 7 : Classification taxonomique des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. associés aux maladies de la jambe noire et pourriture molle sur pomme de terre (*S. tuberosum* L.). *Source :* extrait de Czajkowski et al., 2015a.

la phylogénie des agents responsable de la pourriture molle au sein des *Erwinia* que ces genres ont été finalement acceptés (Hauben *et al.*, 1998 ; Kwon *et al.*, 1997). Hauben *et al.* (2005) dans la seconde édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ainsi que les travaux récents de taxonomie de Gardan *et al.* (2003) et Samson *et al.* (2005) se basant sur des techniques moléculaires, phénotypiques, sérologiques et des analyses phylogénétiques ont proposé une nomenclature pour les pectinobactéries dont celles associées à la pomme de terre : *Pectobacterium atrosepticum* (Pa) et *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) alors qu'*Erwinia chrysanthemi* est devenu *Dickeya* spp., regroupant différentes espèces comme *Dickeya dadantii*, *D. zeae*, *D. paradisiaca*, *D. dianthicola* (Ddi) (Samson *et al.*, 2005 ; Tsrer *et al.*, 2009, Toth *et al.*, 2011) et l'espèce *D. solani* (Dsol) plus récemment décrite (Van der Wolf *et al.*, 2014). Par ailleurs, récemment de nouvelles sous-espèces de *Pectobacterium* telles que *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* et *P. wasabiae* ont été associées aux symptômes de pourriture molle sur tubercule ou de jambe noire sur pomme de terre au Brésil (Duarte *et al.*, 2004), Afrique du Sud (Van der Merwe *et al.*, 2010 ; Moleleki *et al.*, 2013), Finlande (Nykyri *et al.*, 2012), Pays-Bas (Nunes Leite *et al.*, 2014) ou France (Hélias *et al.*, 2014 ; Khayi *et al.*, 2015a). La figure 7 reprend les *Pectobacterium* et *Dickeya* associées aux symptômes de jambe noire et de pourriture molle sur la culture selon Czajkowski *et al.* (2015a).

2.1.2 Caractérisation des bactéries pectinolytiques

L'isolement, la détection et la caractérisation des bactéries *Pectobacterium* et *Dickeya* infectant la pomme de terre, s'appuient principalement sur les capacités de croissance des bactéries et/ou sur leurs spécificités génétiques révélées par des techniques moléculaires comme la PCR (Polymerase Chain Reaction). La PCR appliquée directement sur des extraits de végétaux contaminés peut présenter une sensibilité limitée du fait de la présence d'inhibiteurs (Bain *et al.*, 1990) contenus dans l'extrait (composés phénoliques, carbohydrates ou d'acides humiques). Pour augmenter la sensibilité de détection de la méthode PCR, une étape préliminaire d'enrichissement utilisant un milieu spécifique se révèle efficace (Hélias *et al.*, 1998 ; Hélias,

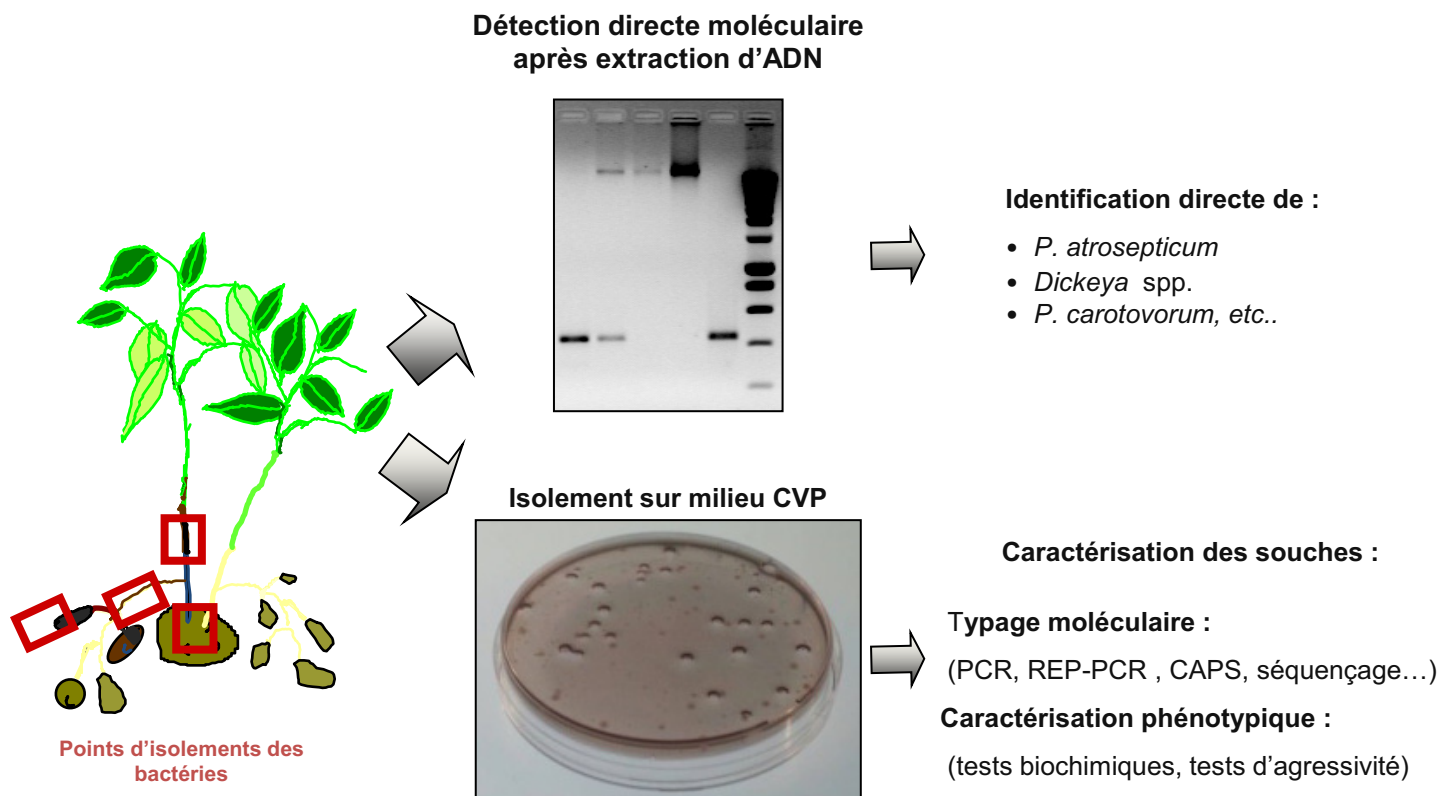


Figure 8 : Schéma du protocole proposé pour la détection et/ou la caractérisation des entérobactéries responsables de jambe noire ou pourriture molle. Procédure d'analyse développée à Rennes par V. Hélias. Mots clefs : CVP : Crystal Violet Pectate, DNA : DesoxyriboNucleic acid, PCR : Polymerase Chain Reaction, REP-PCR : Repetitive Sequence-Based PCR. *Source :* Valérie Hélias, FN3PT/RD3PT.

2012 ; Toth *et al.*, 1999a ; Czajkowski *et al.*, 2015a). Un protocole de détection et caractérisation des entérobactéries responsables de pourriture molle sur tissus végétaux contaminés a ainsi été proposé par V. Hélias (FN3PT/RD3PT ; figure 8).

La propriété pectinolytique des bactéries a conduit à la mise au point de différents milieux semi-sélectifs principalement à base de pectine ou de polypectate de sodium adaptés à la détection directe ou indirecte des bactéries dans du matériel végétal symptomatique ou asymptomatique (Hélias *et al.*, 2012). La formulation solide du milieu permet la mise en évidence des bactéries par leur isolement sur boîte alors que la formulation liquide est utilisée dans le cas d'un bio-enrichissement. Le milieu semi-sélectif solide intègre un inhibiteur des bactéries Gram positif, le cristal violet d'où la nomination de milieu CVP (*Crystal Violet Pectate*). Outre leur caractère semi-sélectif permettant d'éliminer un nombre important de bactéries saprophytes pouvant être présentes dans l'environnement, ces milieux permettent l'identification des bactéries pectinolytiques (*Pectobacterium*, *Dickeya*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* ou *Bacillus*), grâce aux cavités distinctives qu'elles y forment suite à la production importante d'enzymes pectinolytiques (Pérombelon et Burnett, 1991 ; Hélias *et al.*, 2012 ; Charkowski *et al.*, 2007 ; Fraaije *et al.*, 1997).

La PCR ou ses dérivés, sont les principales méthodes moléculaires utilisées pour la détection ou la caractérisation des *Pectobacterium* et *Dickeya* infectant la pomme de terre. Les stratégies utilisées pour détecter et identifier l'ensemble de ces bactéries pectinolytiques utilisent pour la plupart des amorces dessinées dans les régions conservées des pathogènes c'est-à-dire dans les gènes 16S et 23S de l'ARNr, c'est le cas des 119 pbs amplifiées avec les amorces SR3f/SR1cR (Toth *et al.*, 1999b) pour détecter l'ensemble des *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. pectinolytiques ou celles codant pour les pectates lyases ou gène *pel* (Hélias *et al.*, 1998 ; Tsrer *et al.*, 2012). Par exemple, le couple d'amorces Y₁/Y₂ pour détecter les *Pectobacterium* spp. par amplification de 434 pbs (Darrasse *et al.*, 1994), de celui de Y₄₅/Y₄₆ pour amplifier les 439 pbs spécifiques à *P. atrosepticum* (Fréchon *et al.*, 1998) ou du couple d'amorces

ADE₁/ADE₂ qui amplifie 420 pbs de tous les *Dickeya* spp. (Nassar *et al.*, 1996). Les techniques moléculaires comme l'AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Avrova *et al.*, 2002), la RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Nassar *et al.*, 1996 ; Toth *et al.*, 2001; Fessehaie *et al.*, 2002), la RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) (Maki-Valkama et Karjalainen, 1994 ; Parent *et al.*, 1996; Toth *et al.*, 1999a), la REP-PCR (Tsrör *et al.*, 2009) et la CAPS (Hélias *et al.*, 2000a et b) ont été développées pour différencier les isolats de Pa, Pcc et *Dickeya* spp..

Outre pour de la détection, les méthodes utilisant la PCR peuvent être employées à des fins de caractérisation des isolats de bactéries pectinolytiques directement en utilisant un jeu d'amorces spécifiques à un pathogène unique (Charkowski *et al.*, 2007; Laurila *et al.*, 2008) ou, par PCR multiplexe pour la détection simultanée de plusieurs pathogènes, comme par exemple Pa et *Dickeya* spp. en associant deux couples d'amorces différents mais spécifiques à chacune des deux bactéries (Diallo *et al.*, 2009 et 2011). De manière peu coûteuse, rapide, simple, spécifique et assez sensible, la présence et l'identification des phytopathogènes responsables de pourriture molle sur lot de tubercules ou de jambe noire sur plantes en plein champ peuvent être directement révélées (Alvarez, 2004 ; Narayanasamy, 2008).

D'autres méthodes de détection comme les méthodes sérologiques, se basant sur la reconnaissance d'un épitope présent sur les phytopathogènes par un anticorps spécifique couplé ou non à un fluorochrome, comme les méthodes ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou d'immunofluorescence existent. D'autres encore, permettent la caractérisation des phytopathogènes grâce à la production différente d'acide gras (FAME ou *Fatty Acid Methyl Ester*) (Persson et Sletten, 1995), de composés volatiles produit quand les pathogènes infectent les tissus de la plante ou encore des méthodes basées sur la reconnaissance des LipoPoly-Saccharides (LPS) spécifiques des phytopathogènes par des phages. Toutes les méthodes permettant l'identification ou la détection des *Pectobacterium* et *Dickeya* sont reprises dans une revue bibliographique publiée par Czajkowski *et al.*, en 2015. Cependant, en raison d'études

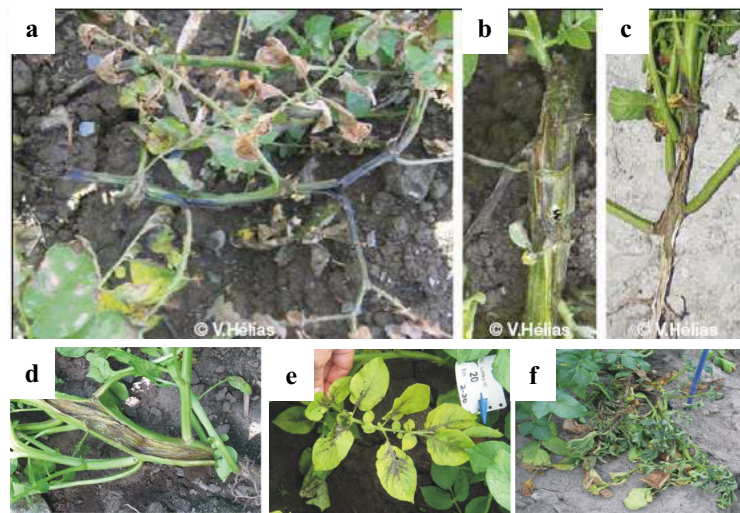


Figure 9 : Symptômes de jambe noire, variant de pourritures humides brune foncées à noire de la base des tiges (a) à des nécroses plus ou moins sèches et/ou tiges creuses (b, c et d). Les symptômes associés à la maladie de la jambe noire sont le jaunissement des feuilles et le flétrissement des tiges ou seulement des feuilles présentés en e et f. *Source:* extrait de Hélias, 2008 et Laurila et al., 2010.

insuffisantes ou de leur faible sensibilité, certaines méthodes ne sont que très peu utilisées vis-à-vis de ces pathogènes (Charkowski *et al.*, 2007). Ainsi, bien que robuste, l'ELISA, peu chère, simple d'application et utilisable pour traiter un grand nombre d'échantillons en même temps, est en pratique peu fiable de par la spécificité limitée des anticorps et des réactions croisées observées avec d'autres bactéries tels les *Pseudomonas* (Peters *et al.*, 2007).

2.1.3 Symptomatologie

2.1.3.1 Au champ

La jambe noire est la dénomination de la maladie provoquée par *Pectobacterium* et *Dickeya* sur la plante de pomme de terre en cours de végétation. Des études récentes ont montré que les *Dickeya* colonisent dans un premier temps le xylème de la plante pour se propager ensuite dans l'ensemble de la plante (Czajkowski *et al.*, 2009, 2010a et b). La sécrétion de facteurs de virulence, tels que les enzymes pectinolytiques, entraîne la dégradation de la paroi des cellules végétales provoquant ainsi la macération des tissus. Ces phénomènes provoquent alors l'interruption du transport de l'eau et des éléments minéraux, vers le sommet de la plante, conduisant à des symptômes de flétrissement et de jaunissement du feuillage (Hélias *et al.*, 2000b, Laurila *et al.*, 2010). L'infection induit une pourriture molle de la tige qui prend une coloration brune foncée à noire. Le symptôme de jambe noire associé au pourrissement du tubercule, se situe généralement à la base des tiges mais peut aussi atteindre des parties supérieures de la plante s'étendre au point d'attache des feuilles sur la tige, et être associé à des nécroses foliaires plus ou moins sèches (figure 9 a, b, c et d). Les symptômes de flétrissement (et parfois de jaunissement) peuvent ressembler à ceux provoqués par la bactérie *Ralstonia solanacearum* (figure 9, e et f). Certains symptômes de jambe noire, secs et limités à la partie souterraine de la tige peuvent être confondus avec les nécroses causées par *Rhizoctonia solani*. Certains auteurs ont décrit des différences entre les symptômes provoqués par les bactéries pectinolytiques, des genres *Dickeya* et *Pectobacterium*. Ainsi, Laurila *et al.* (2010) rapporte dans son étude des différences de symptômes sur tiges et tubercules entre *D. dianthicola* et *P.*

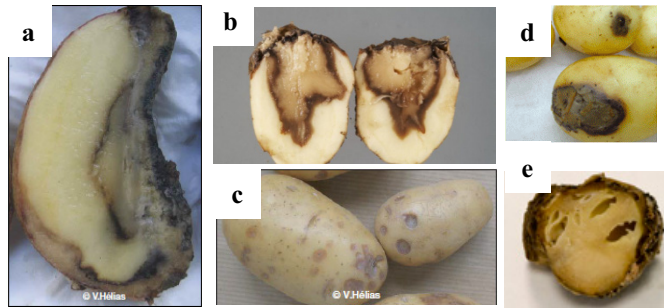


Figure 10 : Tubercules de pommes de terre infectées par *Pectobacterium* spp. ou *Dickeya* spp. après la récolte (a) ou lors du stockage (b, c et d). La pourriture molle, de couleur claire, brunit jusqu'au noir après oxydation des tissus macérés (a, b, d et e). L'autre symptômes qui caractérise cette maladie sont les petites taches diffuses d'aspect graisseux autour des lenticelles (c), une zone de macération autour du talon (point d'attache entre la racine de l'hôte et la descendance) peut se voir si l'infection est faite par l'intermédiaire de la plante hôte (d) et les lésions peuvent devenir creuses, dures et sèches (e). *Source: extrait de Hélias, 2008 et Toth et al., 2011.*

atrosepticum. Les plantes touchées par *Dickeya* sont décrites comme jaunissant rarement et des lésions sur tiges que provoquent *Dickeya* sont décrites comme étant « aqueuses » alors que des pourritures brunes foncées sur les parties inférieures à la base de la tige sont des signes typiques des symptômes de jambe noire déclarées par *Pectobacterium*. Les auteurs remarquent également le dégagement d'odeur nauséabonde des plantes ou tubercules atteints moindres dans le cas de *Dickeya* comparativement à *Pectobacterium* (Laurila *et al.*, 2010). Toutefois, à ce jour, les données scientifiques recueillies en France (inventaires annuels, V. Hélias-RD3PT) ou à l'étranger s'accordent sur le fait que le diagnostic visuel à partir de l'observation de symptôme n'est pas fiable. En pratique, les diagnostics réalisés depuis 2003 chaque année à partir de plantes présentant des symptômes de jambe noire montrent que les différentes typologies de symptômes de jambe noire ne peuvent être reliées à un genre ni une espèce en particulier.

2.1.3.2 En stockage

Lors du stockage, Pa, Pcc et *Dickeya* peuvent être présents séparément ou simultanément (Pérombelon, 2002 ; Toth *et al.*, 2003 ; Van der Wolf et De Boer 2007 ; Hélias, communication personnelle) au sein des symptômes de pourriture molle et humide sur tubercules (figure 10). Les infections bactériennes peuvent débuter au niveau des lenticelles, se produire à la faveur des blessures ou suite à la colonisation des tubercules via le talon (point de départ de la transmission à la descendance). En conditions favorables d'humidité, la bactérie dégrade les tissus du tubercule provoquant une macération du parenchyme. La pourriture molle, d'aspect granuleux et de couleur claire, peut brunir jusqu'au noir (figure 10). La production de poches gazeuses au sein des tissus pourris est à l'origine d'une odeur nauséabonde très prononcée (Pérombelon et Kelman, 1980). En stockage, lorsque les conditions sont humides, la pourriture peut s'étendre à tout le lot causant ainsi des dégâts très importants. Un seul tubercule pourri est ainsi capable de contaminer 100 kg de tubercules alentours (Elphinstone et Pérombelon *et al.*, 1986 ; Pérombelon *et al.*, 1987). D'autres bactéries pectinolytiques (*Clostridium*, *Bacillus* et

Pseudomonas) peuvent être associées à la pourriture des tubercules en conservation, particulièrement lorsque les températures sont élevées (Campos *et al.*, 1982 ; Pérombelon et Kelman, 1987).

2.1.4 Répartition géographique des pathogènes

Parmi les espèces bactériennes responsables de la pourriture molle et la jambe noire sur pomme de terre, Pa, Pcc, Ddi et Dsol ont été étudiées dans ce travail. La répartition géographique de ces bactéries est principalement conditionnée par leurs exigences thermiques de croissance. L'espèce *P. atrosepticum*, répandue dans les régions tempérées, infecte presque exclusivement la pomme de terre (Toth *et al.*, 2003 ; Gardan *et al.*, 2003) sans doute parce que la plupart des souches de Pa, forment un groupe homogène et sont plus sensibles aux températures élevées que Pcc et *Dickeya* spp. (Pérombelon et Kelman, 1980). Néanmoins, certaines souches de Pa ont été occasionnellement isolées à partir de tomate (Gardan *et al.*, 2003 ; Hélias *et al.*, 2008), de chou chinois (De Boer *et al.*, 1987) et de poivron (Stommel *et al.*, 1996). Aujourd'hui, en France, selon les derniers relevés d'épidémiologie réalisés au sein de la FN3PT-RD3PT il apparaît comme l'agent principal responsable de la maladie de la jambe noire, ce qui peut être mis en lien avec la concordance entre les exigences écologiques de la bactérie et celles de la culture de pomme de terre (Pérombelon, 1992). Son développement préférentiel de croissance est obtenu pour des températures comprises entre 15 et 25 °C (Pérombelon et Kelman, 1987).

Pcc quant à lui, est distribué sur une aire géographique plus vaste aussi bien dans les zones tempérées que tropicales et sur une gamme d'hôtes très large sur lesquels il est responsable de la pourriture molle (pomme de terre, choux, poivrons, carotte, maïs...) (Pérombelon *et al.*, 1987). Cette bactérie se développe à des températures plus élevées que *P. atrosepticum*, allant de 20 à 30 °C et peut également être isolée à partir de plantes cultivées à des températures plus élevées allant jusqu'à 40 °C. Pa et *Dickeya* ont été pendant longtemps identifiés comme des agents préférentiellement associés à la maladie de jambe noire (Pérombelon, 2002 ; Hélias *et*

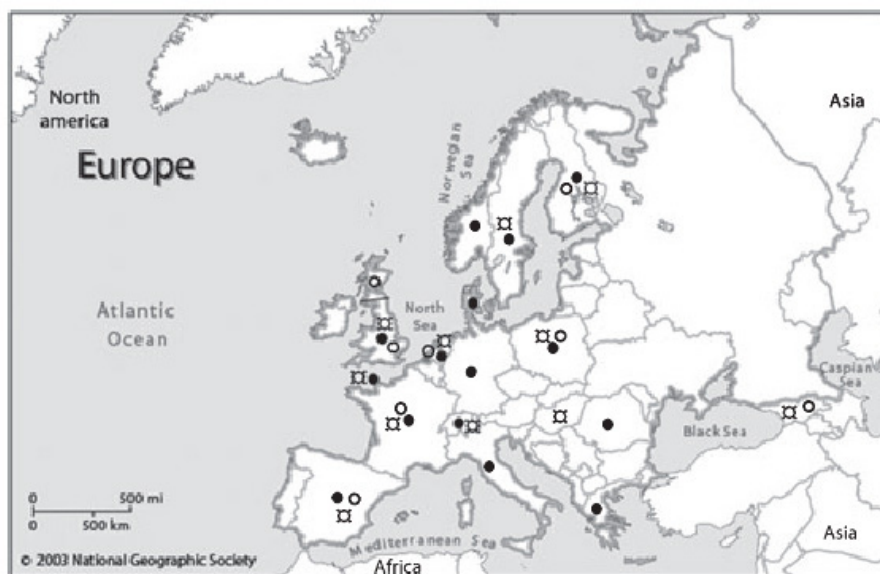
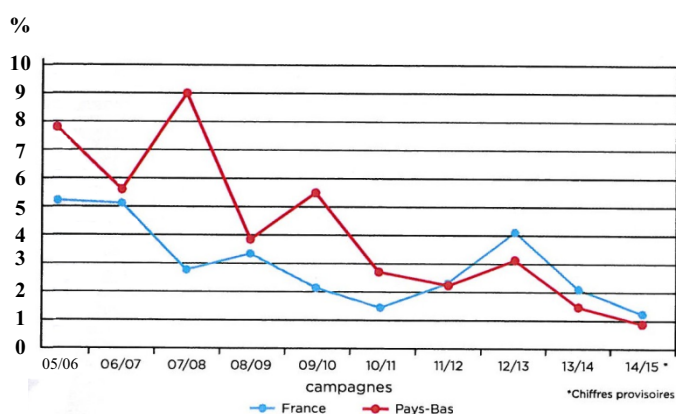


Figure 11 : Répartition connue des *D. dianthicola* sur tous les hôtes en Europe, ainsi que la distribution de *D. solani* et d'autres espèces de *Dickeya* sur pomme de terre en Europe. Distribution de *D. dianthicola* sur tous les hôtes (mis à jour de CAB International, 2005) (•); *Dickeya* spp. sur pomme de terre (□); *D. solani* sur pomme de terre (○). *Source :* extrait de Toth et al., 2011

A Evolution du taux de refus (en %) France/Pays-Bas



B Evolution des motifs de refus (en %) France/Pays-Bas

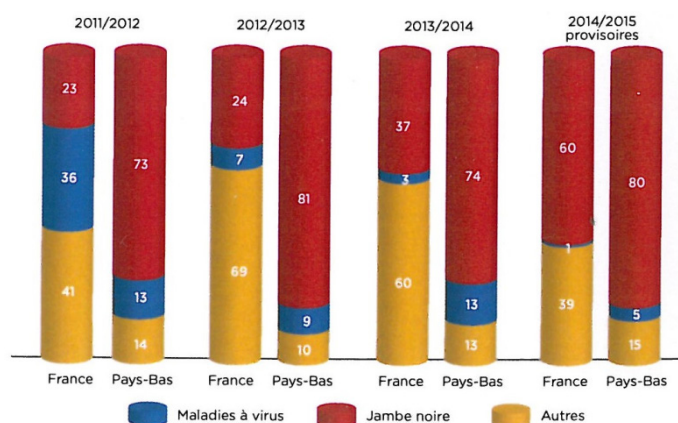


Figure 12 : Evolution du taux (a) et des motifs (b) de refus à la certification du plant français et néerlandais. *Source :* Rapport annuel de la FN3PT, 2014.

al., 2000 ; Toth *et al.*, 2003). Certains scientifiques ont montré dans leurs travaux que Pcc était également capable de provoquer la jambe noire sur pomme de terre dans les zones tempérées du globe (Molina & Harrison 1977 ; De Haan *et al.*, 2008, Hélias *et al.*, 2008).

Enfin, les *Dickeya* sévissent principalement en zone tropicale et subtropicale sur de nombreuses cultures d'intérêt agronomique telles que la pomme de terre, la banane, l'artichaut ou le maïs mais aussi sur des plantes ornementales comme le chrysanthème, le saintpaulia ou l'œillet (Pérombelon, 2002 ; Gardan *et al.*, 2003 ; Charkowski, 2007). Toutefois, le genre *Dickeya* est depuis une dizaine d'années retrouvé dans les régions tempérées (Europe de l'Ouest et du Nord) notamment en Allemagne, France, Pays-Bas, Pologne, Israël (figure 11). Les dommages sur culture de pommes de terre en Europe sont uniquement dus à *D. dianthicola* et *D. solani*. Dans ces zones, les espèces sont également décrites sur d'autres plantes-hôtes comme la tomate, le chou ou l'endive (Tsrer *et al.*, 2009 ; Toth *et al.*, 2011, Reverchon et Nasser, 2013) pour *D. dianthicola* et plantes ornementales pour *D. solani*.

2.1.5 Incidence de la maladie de jambe noire et de pourriture molle sur plant

Bien que les taux de refus en France aient tendance à diminuer depuis les années 2005/2006, en 2013/2014 un peu plus de 2 % de la production de plants ont été refusés. Le principal motif de refus à la certification est la maladie de la jambe noire en végétation et pourriture molle et humide en stockage. Depuis 10 ans, elle explique à elle seule 1/3 (entre 20 et 40 % chaque année) des motifs de refus à la certification du plant en France et entre 60 et 80 % de ces motifs au Pays-Bas (figure 12).

Ces bactérioses provoquées par les bactéries des genres *Pectobacterium* et *Dickeya*, largement répandues dans toutes les zones de production et responsables de pourritures molles de tiges, tubercules ou racines sur diverses cultures comme la pomme de terre ou l'endive, provoquent d'importantes pertes de rendement et de pourritures de lots. Aux Pays-Bas, les pertes dues à ces bactéries ont été multipliées par 5 entre 2002 et 2007 pour passer à près de 30 millions d'euros pour la pomme de terre et 15 millions d'euros pour les fleurs à bulbe (Prins et Breukers, 2008 lu

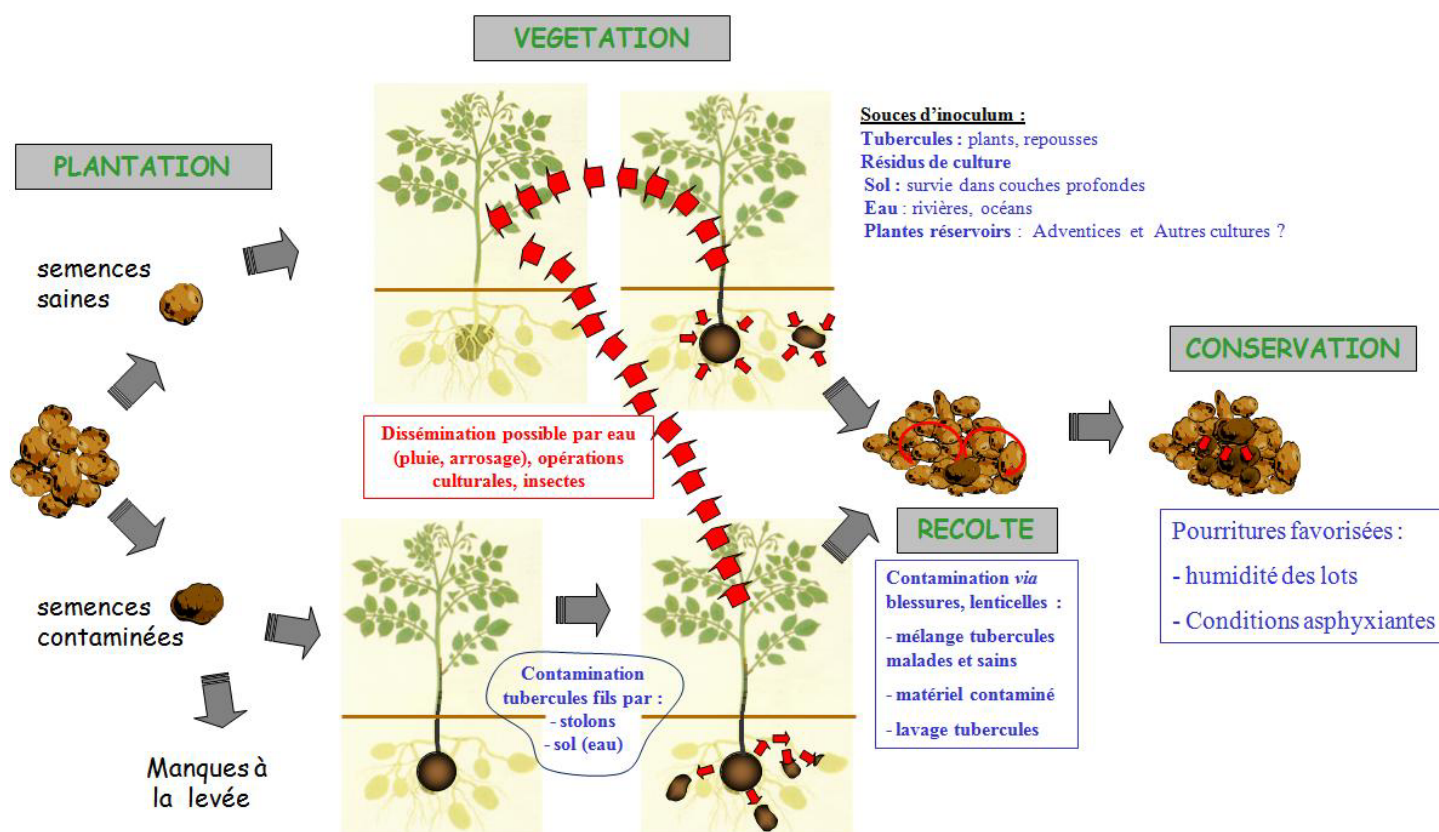


Figure 13 : Cycle de contamination en culture de pommes de terre par *Pectobacterium* et/ou *Dickeya*. Cycle des bactéries pectinolytiques, agents de la maladie de la jambe noire et pourriture molle. *Source :* V. Hélias, FN3PT/RD3PT.

dans Toth *et al.*, 2011). En France, entre 50 et 400 ha de plants sont refusés chaque année pour jambe noire, sans compter les autres pertes causées par les *Pectobacterium* et *Dickeya* sur plants (déclassements, litiges à destination, renouvellement de plant, incidence variétale,...), mais aussi les pertes dans le secteur consommation ou transformation. Pour d'autres cultures légumières ou ornementales sensibles à ces bactérioses, l'incidence est significative et peut atteindre dans certaines conditions 50% de pertes et 90% de racines infectées pour des cultures telle l'endive (Le Hingrat *et al.*, 2012).

2.2 Epidémiologie des maladies causées par *Pectobacterium* et *Dickeya*

La contamination des plantes et des tubercules de pomme de terre s'opère à partir de sources d'inoculum variées et sous l'effet de différents facteurs biotiques ou abiotiques. Certains constituent des facteurs de contamination « primaires » (tubercule mère, sol infecté) d'autres constituent plutôt des sources de contamination « secondaires » (contamination par contact avec des plantes ou tubercules infectés, eau, les aérosols, les insectes ou blessures) et apparaissent comme des facteurs de dissémination ou de développement des maladies.

2.2.1 Cycle des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle

La qualité sanitaire des plants certifiés est importante pour limiter les risques de maladie. Néanmoins, les tubercules peuvent parfois s'avérer asymptomatiques mais être porteurs des bactéries et engendrer l'initiation du cycle d'infection des bactéries pectinolytiques (figure 13) en présence de facteurs favorables (conditions pédoclimatiques, pratiques culturales à risque, conditions de stockage...). D'autres sources d'inoculum existent et sont décrites : les résidus de culture (pomme de terre ou autres cultures), les repousses de tubercules, le sol de champ, l'eau d'irrigation (rivière ou nappes souterraines contaminées) mais aussi adventices et/ou précédents culturels pouvant jouer un rôle de réservoir pour les bactéries. La dissémination des pathogènes de plantes contaminées à plantes saines peut se produire par le biais de nombreux facteurs de dissémination : eau de pluie ou d'arrosage, aérosols provoqués par ces dernières ou

les diverses opérations culturales (et les opérations mécanisées). D'autres facteurs comme une humidité saturante et des conditions asphyxiantes favorisent le développement des pathogènes. Lors de la récolte puis du stockage, les blessures et les lenticelles, le contact entre tubercules sains et malades, l'utilisation d'une eau de lavage non désinfectée/renouvelée favorisent la dissémination des bactéries. Trois principales étapes/mécanismes d'infection par les *Dickeya* décrites par Reverchon et Nasser en 2013 sont : (i) l'adhérence à la surface de la plante et la pénétration dans les tissus de la plante, que ce soit *via* des blessures ou à travers des ouvertures naturelles ; (ii) l'invasion de apoplastes ; et (iii) la dégradation de la paroi cellulaire végétale.

2.2.2 Sources d'inoculum

Les sources d'inoculum sont nombreuses et doivent autant que possible être maîtrisées pour garantir une bonne qualité sanitaire des plantes (plant certifié). Parmi ces sources, le tubercule mère a été décrit dans plusieurs études comme jouant un rôle important dans la conservation et/ou la transmission/dissémination de *Pectobacterium* et *Dickeya* (Pérombelon et Kelman, 1980 ; Hélias *et al.*, 2000b ; Czajkowski *et al.*, 2009 ; 2010b et 2011). Les bactéries y sont localisées dans le système vasculaire, les lenticelles ou en surface des tubercules (Elphinstone et Pérombelon, 1986 ; Pérombelon, 2000).

Outre le tubercule mère, le sol constitue une autre source d'inoculum important. Les bactéries responsables de la pourriture molle et de la jambe noire auraient une très faible capacité à survivre seules dans le sol (Armon *et al.*, 1995). La population de *Pectobacterium* augmente fortement en présence d'exsudats racinaires de plantes (repousses, présence de résidus de culture laissé en champ, adventices ou autres cultures) (McCarter Zorner *et al.* 1984 et 1985). A l'opposé, en cas d'absence ou de quantités moindres de nutriments liées à la récolte ou la maturité des plantes, la population bactérienne diminue jusqu'à un niveau non détectable par les techniques de détection utilisées de nos jours. La présence d'antagonistes peut également expliquer ce déclin. Pérombelon *et al.* (1989) estiment que la longévité des bactéries Pa et Pcc est réduite dans le sol du fait de réserves nutritives limitées en comparaison de celles présentes

dans les tissus de plantes au sein desquels les bactéries se développent habituellement. Les études menées par Van der Wolf *et al.* (2007 et 2012) montrent que les *Dickeya* ne survivent pas plus de trois semaines dans un sol nu mais peuvent survivre plus longtemps sur un sol pourvu de fragments végétaux.

Des résultats rapportés par De Mendonça et Stanghellini (1979) montrent la survie plus longue de *Pectobacterium* dans les couches inférieures (profondes) du sol (15-30 cm) où les conditions environnementales sont plus stables. Pcc décrite comme ayant une plus grande capacité de survie que Pa, est également plus fréquemment mise en évidence dans la rhizosphère (Pérombelon *et al.*, 1989). Cependant, peu d'informations existent concernant le potentiel de survie des *Dickeya*. Mais, tout comme *Pectobacterium*, ce pathogène ne résisterait pas aux conditions hivernales dans le sol. Leur survie est limitée entre 1 semaine et 6 mois, selon les conditions environnementales (température du sol, taux d'humidité et pH). Ces bactéries ne devraient pas survivre dans le sol si une rotation des cultures correcte est réalisée, environs tous les 3 à 5 ans (Czajkowski *et al.*, 2011).

Enfin, l'eau constitue une autre source d'inoculum connue. La présence de *Pectobacterium* et *Dickeya* a été mise en évidence dans les eaux de rivières (Pérombelon *et al.*, 1987 ; Van Vuurde *et al.*, 1994 ; Laurila *et al.*, 2008). Ces eaux sont de potentielles sources d'inoculum *via* l'irrigation (Laurila *et al.*, 2008; Kapsa, 2008).

2.2.3 Facteurs de dissémination et de développement

2.2.3.1 Conditions environnementales favorables

La jambe noire est favorisée par des conditions humides et des températures relativement fraîches bien que ceci dépende en grande partie des pathogènes responsables (température optimale de développement variant de quelques degrés entre *Pectobacterium* et *Dickeya*). La plupart des travaux d'épidémiologie ont été réalisés sur Pcc ou Pa. Le nombre d'études plus restreint sur *Dickeya* est lié à leur plus récente description en climats tempérés (Charkowski, 2007).

Un environnement humide à la plantation et des conditions fraîches au moment de la levée peuvent provoquer des manques à la levée et favorisent le développement de jambe noire. Le manque de maturité, les gelées, la salinité excessive, la nature du sol, les dégâts causés par d'autres pathogènes sont également favorables au développement des symptômes de pourriture molle (Tweddell *et al.*, 2003).

Les phytopathogènes provoquent des dégâts au champ mais également après récolte, lors du stockage des tubercules. Dans ce cas, les zones situées à l'intérieur des tas /pallox de pomme de terre où la ventilation peut être déficiente et la condensation fréquente sont favorables au développement bactérien qui peut entraîner la perte rapide d'une bonne partie du stock. Outre l'anaérobiose et la condensation, les conditions favorables à l'initiation des pourritures molles en conservation sont le potentiel hydrique élevé des cellules du tubercule (Pérombelon et Kelman, 1980, Reverchon et Nasser, 2013) et un seuil minimum de bactéries estimé à 10^3 bactéries viables par tubercule (Bain *et al.*, 1990). Les conditions d'anaérobiose rencontrées en cours de culture ou de stockage affaiblissent la résistance de l'hôte, notamment en diminuant la synthèse de composés phénoliques et radicaux libres (Bolwell et Wojtaszek, 1997) ou augmentant la perméabilité membranaire (Pérombelon, 2002). De même, l'eau libre entraîne le maintien des conditions d'anaérobiose aux alentours des tubercules (Moh *et al.*, 2011). Elle favorise également le déplacement des *Pectobacterium* et *Dickeya* vers les tissus de l'hôte notamment les lenticelles qui peuvent s'ouvrir en condition d'humidité saturante (Toth *et al.*, 2003 ; Scott *et al.*, 1996), ou les blessures. La température influence au champ le développement de l'une ou l'autre des espèces bactériennes selon leur optimum de croissance (Pérombelon, 2002 ; Moh *et al.*, 2011 et 2012). La température du sol semble avoir quant à elle un effet sur la survie des bactéries. Ainsi, Pérombelon *et al.*, en 1989 ont montré que Pa et Pcc meurent rapidement dans un sol dépassant les 25°C, alors qu'elles peuvent survivre plusieurs semaines, voire plusieurs mois, à des températures avoisinant 10 à 20°C.

2.2.3.2 *Le tubercule mère*

Au champ, un tubercule mère infecté peut, suite à sa décomposition, contaminer les plantes voisines *via* le sol. La propagation des agents phytopathogènes peut également s'effectuer verticalement à partir des tubercules vers la tige, en provoquant le symptôme de jambe noire (Pérombelon 2002 ; Czajkowski *et al.*, 2010a et b). Outre une contamination *via* le sol, la contamination des tubercules fils peut également se produire à partir du tubercule mère infecté *via* les stolons, à travers le système vasculaire (Hélias *et al.*, 2000b ; Czajkowski *et al.*, 2009).

Plusieurs études ont visé à définir le seuil minimum d'infection bactérienne nécessaire au développement des symptômes de pourriture molle ou de jambe noire. Stead en 1999 l'a évalué aux environs de 10^3 bactéries viables par tubercule pour Pa. Il a été montré que ce seuil pouvait varier en fonction des conditions (10^2 bactéries en anaérobiose à 10^4 bactéries en aérobiose) selon Brain *et al.* (1990).

2.2.3.3 *Le sol et la rhizosphère des plantes*

Les propriétés physico-chimiques du sol peuvent également influencer l'expression de la maladie, favoriser la contamination des tubercules ou plantes mais aussi modifier les équilibres microbiologiques. Les sols ayant une capacité élevée de rétention d'eau (argilo-humiques) favorisent les conditions humides nécessaires au développement bactérien. D'autre part, en créant une atmosphère asphyxiante, les sols compacts favorisant l'humidité sont propices au développement des bactéries pectinolytiques aux alentours des racines (rhizosphère) et augmentent les risques d'infection (Bain *et al.*, 1990).

2.2.3.4 *L'eau et les aérosols*

La présence de *Pectobacterium* et *Dickeya* a été mise en évidence dans les eaux de rivière. Pa et Pcc ont été isolées d'eaux de rivières aux États-Unis et en Europe (Powelson, 1985 ; Jorge et Harrison, 1986 ; Pérombelon et Hyman, 1987), et la présence de *Dickeya* dans ce type d'eaux a été mise en évidence aux Pays-Bas (Van Vuurde et Vries, 1994), en Australie (Cother *et al.*,

1992), en Finlande (Laurila *et al.*, 2008) et en Ecosse (Cahill *et al.*, 2012). Les homologues observées entre des souches isolées de pomme de terre et celles d'eau de rivière confortent le fait que ces dernières constituent des sources potentielles de contamination *via* l'irrigation (Coother *et al.*, 1992 ; Laurila *et al.*, 2008 ; Kapsa, 2008). D'autre part, ces bactéries ont aussi été retrouvées dans des eaux de nappes phréatiques ou des eaux de drainage (McCarter-Zorner *et al.*, 1984 ; Pérombelon *et al.*, 1987), les eaux de pluies et les aérosols provoqués par ces dernières. La survie des bactéries dans les aérosols est de courte durée, car seulement 50% des bactéries survivent après 5 à 10 minutes (Pérombelon, 1992).

2.2.3.5 Insectes et autres facteurs biotiques

Les insectes sont également cités comme sources de contamination suite à leur passage d'une plante infectée à une plante saine (Grenier *et al.*, 2006). Les bactéries pourraient également être disséminées par la microfaune du sol et larves de certains insectes comme *Thymemyia cilicrura*, ravageur du maïs, par des nématodes, des mouches (Muniz *et al.*, 2007) ou des vers. Il a été décrit que le nématode modèle *Caenorhabditis elegans* et ceux appartenant au genre *Pristionchus* pourraient héberger dans leur estomac mais aussi à leur surface les bactéries responsables de la jambe noire et de pourriture molle, telles que Pa, Pcc, *P. wasabiae* et *Dickeya*. Ces nématodes pourraient être des vecteurs potentiels de dissémination de ces pathogènes sur pomme de terre (Nykyri *et al.*, 2014). Ces phytopathogènes ont été trouvés en association avec d'autres invertébrés, allant de mouches des fruits (*Parascaptomyza* et *Drosophila*) aux escargots (Harrison *et al.*, 1977 ; Molina *et al.*, 1974 ; Phillips et Kelman, 1982 ; Charkowski, 2007). Ces ravageurs pourraient jouer un rôle dans la propagation des bactéries pectinolytiques entre les hôtes. Notamment, Basset *et al.* (2000) ont montré que les mouches des fruits induisent une réponse immunitaire lorsqu'elles sont inoculées avec Pcc et Grenier *et al.* (2006) ont démontré que *D. dadantii* 3937 est un pathogène du puceron du pois (*Acyrtosiphon pisum*). Ces deux études confirment la potentialité de ces vecteurs à propager les phytopathogènes. D'autre part, dans les génomes de Pcc et *Dickeya* spp. ont été trouvés des

gènes homologues aux gènes utilisés par les entérobactéries pour leur colonisation des nématodes. En parallèle, le génome de *D. dadantii* 3937 possède quatre gènes homologues de la famille des toxines insecticides *Cyt* de *B. thuringiensis* (connu pour sa toxine Bt) qui ne sont pas retrouvés dans Pa (Charkowski, 2007 ; Grenier *et al.*, 2006).

2.2.3.6 Les pratiques agricoles comme facteurs de contamination

Le passage de machines agricoles dans les parcelles en cours de culture constitue un facteur de dissémination des bactéries. La plantation, le défanage, la récolte puis le conditionnement mécanique des tubercules sont autant de facteurs de propagation des pathogènes sur pommes de terre. Ils peuvent être le point initial de contamination au sein des stocks de plants qui serviront de semences l'année suivante. Cette contamination a lieu lors du contact de tubercules sains avec des tubercules, portions de végétaux ou des matériaux infectés (Van Vuurde et de Vries, 1994). Un défaut de désinfection du matériel et les blessures occasionnées lors de la manipulation mécanique favorisent les contaminations (Elphinstone et Pérombelon, 1986).

L'effet des précédents culturels semble avoir un rôle dans la contamination des cultures de pommes de terre. McCarter-Zorner *et al.* (1985) ont observé la présence de Pa et Pcc au sein de la rhizosphère de différentes cultures (laitues, carottes et betteraves à sucre). Les cultures de *Brassicaceae* (brocoli, colza, rutabaga, navet et chou) sont reconnues comme hébergeant fréquemment les Pa et Pcc et à des niveaux relativement élevés (McCarter-Zorner *et al.*, 1985; Pérombelon *et al.*, 1989). Ces bactéries sont également isolées à partir de rhizosphères d'adventices (laiteron, mouron, pâturin, amarante, chénopode blanc et renouée) (McCarter-Zorner *et al.*, 1985). L'importante gamme d'hôtes de ces pathogènes laisse supposer que d'autres adventices pourraient permettre leur maintien dans l'environnement. D'autre part, certaines cultures seraient plus à même de jouer un rôle de plantes réservoirs pour certains *Pectobacterium* ou *Dickeya* plutôt que d'autres (non publié, source FN3PT/RD3PT).

Enfin, les pratiques agricoles comme l'arrosage par aspersion sur des tiges malades peuvent également disperser Pa et Pcc sur plusieurs mètres (Graham & Harrison, 1975). En outre, le

lavage des tubercules avant leur commercialisation peut disséminer la bactérie dans les lots de pomme de terre lorsque l'eau servant au lavage n'est pas renouvelée ou décontaminée (Pérombelon & Kelman, 1980).

2.2.4 Pathogénicité des bactéries pectinolytiques

Pectobacterium et *Dickeya* produisent des enzymes pectiques extracellulaires variés capables de dégrader les parois cellulaires de l'hôte, les *Plant Cell Wall Degrading Enzymes* (PCWDE) (Barras *et al.*, 1994 ; Pérombelon, 2002 ; Terta *et al.*, 2010 ; Reverchon et Nasser, 2013). Les PCWDE comprennent des pectinases, des cellulases, des protéases, des phospholipases et des xylanases (Barras *et al.*, 1994). Parmi ces enzymes les pectinases jouent un rôle prépondérant dans le développement de la maladie. Quatre types de pectinases sont connues, les PECTates Lyases (PEL), qui clivent des liaisons glycosidiques par β -élimination, produisant des produits insaturés (Collmer et Keen, 1986) ; les PectiNes Lyases (PNL) et les Pectines Méthyles Estérases (PME) dont l'optimum de pH est élevé (pH=8) et qui agissent sur la chaîne latérale substituée de pectine ; et les Polygalacturonases (PEH) avec un pH optimum faible (pH=6) et qui clivent par hydrolyse, produisant des produits saturés (Barras *et al.*, 1994 ; Toth *et al.*, 2003). Les PEL chez Pa et Pcc semblent les enzymes les plus importantes dans le développement de la maladie (Smadja *et al.*, 2004). D'autre part, la température à laquelle se trouve la bactérie au moment d'activer la synthèse de ses enzymes de virulence semble avoir une réelle importance et permettrait d'expliquer l'incidence variable des espèces bactériennes selon le climat. Bien que les protéases de Pa et Pcc semblent activées sous les mêmes contraintes de température, les PEL quant à elles semblent activées avec des optima de température différents (Smadja *et al.*, 2004). La température optimale de pathogénicité de Pa et Pcc est liée à la température optimum de l'activité des PEL et non à leur température optimum de croissance. Des études ont montré que des extraits purifiés de PEL provoquent la macération et la mort cellulaire (Liao, 1989). Les *Dickeya* dont le gène codant pour les PEL a été inactivé par délétion sont devenues moins virulentes ce qui prouve leur réelle implication dans la

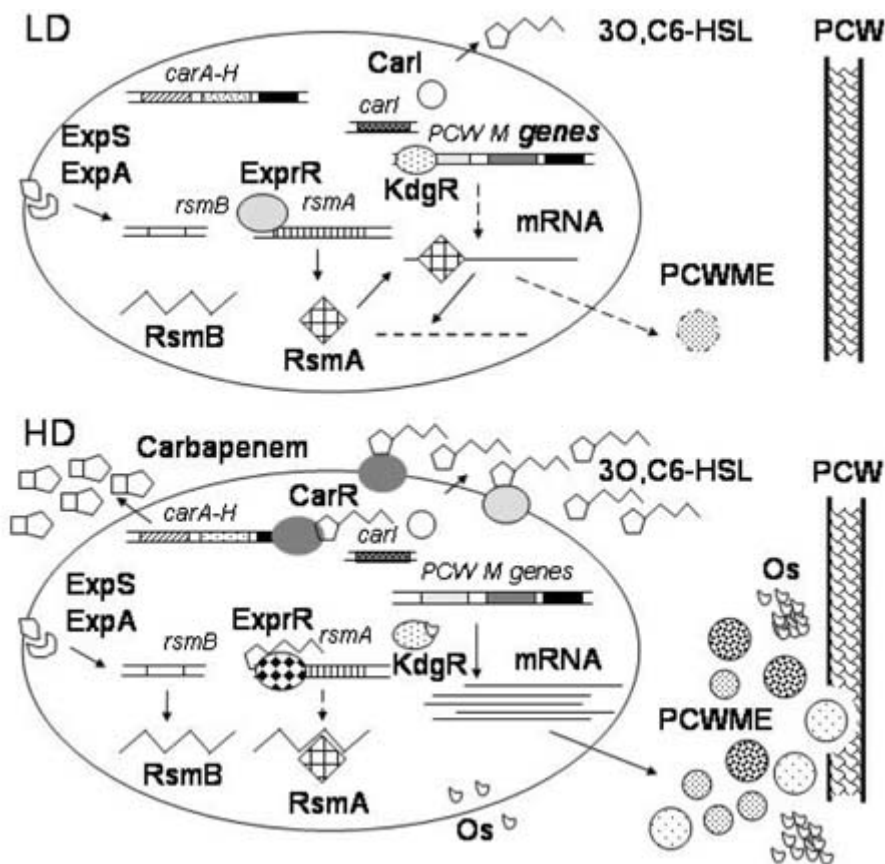


Figure 14 : régulation de la production de PCWDE ou PCWME (pour plant-cell-wallmaceration enzymes) et de l'antibiotique carbapenème chez *Pectobacterium*. À faible densité cellulaire (panneau LD pour *Low Density*, en haut), une quantité limitée de NAHL est créée via le synthase CarI. La transcription des gènes PCWME est bloquée à la fois par le répresseur KdgR et par la protéine de liaison à l'ARNm codant ces derniers, RsmA. Ainsi les PCWME ne sont pas produites.

À haute densité cellulaire (panneau HD pour *High Density*, en bas), de grandes quantités de NAHL sont produites, empêchant la synthèse de RsmA via le complexe ExpR-NAHL. La présence dans la cellule de RsmA est complexée à l'ARNm de RsmB, dont la production dépend des ExpS/A. Les activités enzymatiques des PCWME génèrent des oligosides (OS) à partir de la paroi cellulaire (PCW). Les Os ainsi libérés se lient au répresseur KdgR activant la synthèse des PCWME et active les gènes *rsmB* par activation de ExpS/A. Les signaux de QS permettent également l'activation du régulateur CarR qui contrôle l'expression des gènes *carA-H* impliqués dans la synthèse des antibiotiques type carbapénèmes. *Source: extrait de Faure et Desseaux, 2007.*

virulence de ces souches (Beaulieu *et al.*, 1993 ; Jafra *et al.*, 1999). On distingue trois principaux types de PEL chez Pa (*PelA*, B et C), quatre types chez Pcc (*PelA*, B, C et D) et cinq types chez *Dickeya* repartis en deux groupes (*PelA*, D, E et *PelB*, C) et quatre formes secondaires (*PelI*, L, Z et X) (Beaulieu *et al.*, 1993; Thomson *et al.*, 1999).

La production de ces enzymes de pathogénicité est dépendante de la densité bactérienne de *Pectobacterium* et est régulée par un système de *quorum-sensing* (QS) (Whitehead *et al.*, 2002 ; et 2002 ; Smadja *et al.*, 2004 ; Jafra *et al.*, 2006). Ce système de communication bactérien reposant sur l'émission et la perception de signaux diffusibles, a été décrit par Fuqua *et al.* dans une étude de 1994 basée sur la compréhension de la luminescence chez une bactérie marine, *Vibrio fischeri*. Ce système implique deux protéines essentielles, LuxR (le récepteur du signal) et LuxI (l'enzyme responsable de la synthèse du signal) pour la communication intercellulaire. Celle-ci permet l'expression des gènes de virulence seulement lorsqu'un quorum bactérien est atteint. Afin d'évaluer leur densité et de percevoir ce quorum, les *Pectobacterium* et certains *Dickeya* pectinolytiques synthétisent des molécules signal de la famille des N-AcylHomoserine-Lactones (NAHL), qui diffusent au travers de la membrane cellulaire (Crepin *et al.*, 2012a et b). Lorsque la multiplication bactérienne atteint un certain seuil (quorum), la concentration des signaux moléculaires NAHL dans le milieu devient suffisamment élevée pour être perçue par les bactéries comme un signal d'activation de la synthèse des PCWDE (Waters et Bassler, 2005 ; Ferluga *et al.*, 2008 ; Charkowski, 2009 ; Barnard *et al.*, 2007).

Dans *Pectobacterium*, au moins deux systèmes QS existent et sont définies par la nature des signaux chimiques impliqués, les NAHL (signaux Auto-Inducteur de type 1), synthétisés par la famille de protéines homologues à LuxI et le signal Auto-Inducteur de type 2 qui est synthétisé par un homologue à LuxS (Barnard *et al.*, 2007 ; Galloway *et al.*, 2011). La façon dont le système AI-2 peut agir chez les *Pectobacterium* reste à élucider. En effet, la production des PCWDE de Pcc est réduite lorsqu'un mutant dans la protéine homologue à LuxS est réalisé. La virulence de Pcc sur tubercules de pomme de terre est diminuée avec ce mutant. En revanche, la

virulence de Pa ne semble pas être affectée lorsque sa protéine homologue à LuxS est modifiée, ce qui suggère que le rôle précis de LuxS peut varier d'une souche responsable de jambe noire ou de pourriture molle à une autre (Barnard *et al.*, 2007).

Il est décrit dans les études scientifiques sur ces pathogènes que les signaux QS jouant un rôle prédominant dans le contrôle de l'expression génique et de plusieurs fonctions bactériennes (mobilité ou synthèse de métabolites secondaires) sont les NAHL et plus particulièrement les 3-OC6-HSL (N-3-oxo-hexanoyl-L-Homoserine-Lactone) et 3-OC8-HSL (N-3-oxo-octanoyl-L-HomoSerine-Lactone) (Crépin *et al.*, 2012a et b ; Barnard *et al.*, 2007).

Au niveau moléculaire, le pouvoir pathogène de *Pectobacterium* s'exprime en réponse à au moins trois facteurs : (i) la présence de molécules provenant de la paroi cellulaire des plantes, (ii) le système général GacA/S, et (iii) le *quorum-sensing* (QS). Nous nous attarderons uniquement sur le système QS qui est détaillé dans la figure 14. Pour résumer, dans *Pectobacterium*, quand la densité cellulaire est faible, la quantité de NAHL synthétisée par la synthase CarI-NAHL est limitée (Jones *et al.*, 1993). Dans ces conditions, l'expression des gènes codant pour les PCWDE est bloquée et par conséquent, leur production est faible voire nulle. Au niveau transcriptionnel le répresseur KdgR se lie à la séquence d'ADN utile pour l'expression des PCWDE (Nasser *et al.*, 1994) et au niveau post-transcriptionnel, la protéine RsmA (*Regulator of secondary metabolites*) se lie à l'ARNm des PCWDE puis accélère leur dégradation et l'extinction des PCWDE (Cui *et al.*, 1995). A haute densité cellulaire, la présence d'une concentration élevée de 3-oxo-C8-HSL est détectée par la protéine régulatrice ExpR qui, sous forme de complexe ExpR/NAHL, empêche la transcription de *rsmA*, qui était activée en l'absence des NAHL (Cui *et al.*, 1995). Les protéines RsmA existantes sont alors complexées par RsmB, un petit ARNm se liant à RsmA, codé par le gène du même nom (Liu *et al.*, 1998), dont la transcription est contrôlée par le système de régulation ExpA/S (analogue à GacA/S) (Cui *et al.*, 2001; Hyytiainen *et al.*, 2001). Les PCWDE sont donc synthétisées, ce qui conduit à la dégradation de la pectine de la plante.

D'autre part, la régulation de la synthèse des enzymes engagées dans le pouvoir pathogène des *Pectobacterium* implique également l'accumulation au niveau du site d'infection des produits issus de la dégradation de la paroi cellulaire de l'hôte tel que le galacturonate, 5-keto-4-deoxyuronate (DKI), 2,5-diketo-3-deoxygluconate (DKII) et 2-keto-3-deoxygluconate (KDG) (Toth *et al.*, 2003 ; Barnard *et al.*, 2007 ; Faure et Desseaux, 2007). Chez *D. dadantii* 3937, il a également été décrit que la présence de produits de dégradation de la pectine ou de dérivés phénoliques de plantes joue un rôle sur la synthèse des PCWDE (Reverchon et Nasser, 2013 ; Yang *et al.*, 2008 ; Rodionov, 2004). Notamment, ces oligomères et les produits de dégradation de la paroi végétale générés par les PCWDE, provoquent l'expression à la fois de RsmB et la désinhibition de la production des PCWDE par complexification avec le répresseur KdgR, conduisant à une production très ample des PCWDE (Rodionov, 2004 ; Reverchon *et al.*, 2013 ; Nasser *et al.*, 1994).

Outre l'utilisation du QS médié par les molécules signal de type NAHL, des études plus récentes ont montré l'implication d'un nouveau système de communication intercellulaire de QS permettant de contrôler la virulence de *D. dadantii* 3937 (Nasser *et al.*, 2013). En effet, bien que *D. dadantii* possède un système de QS de type ExpI-ExpR, les gènes *expI* et *expR* n'affectent pas toujours significativement la production des PCWDE *in-vitro* ou *in-planta* (Nasser *et al.*, 1998). De plus, certaines souches de *Dickeya* ne semblent pas produire de NAHL (Cha *et al.*, 1998) et sont des pathogènes responsables des jambe noire et pourriture molle. Elles n'utilisent donc pas ce type de signal QS pour activer leur PCWDE. Ainsi, l'hypothèse impliquant l'auxine comme signal de communication intercellulaire chez ce genre bactérien a d'abord été émise ; mais l'accumulation stable pendant la croissance de *Dickeya* de ce composé permet de réfuter cette hypothèse ; car l'une des caractéristiques communes aux molécules de QS est leur accumulation transitoire pendant la croissance et leur déclin pendant la phase stationnaire (Crepin *et al.*, 2012a et b). C'est ainsi que récemment, un groupe de gènes de 25 kbs, nommé *vfm*, codant pour un nouveau système de QS a été décrit dans *D. dadantii* 3937, lié

au contrôle de la production de PCWDE et la pathogénie (Nasser *et al.*, 2013). Les gènes de la région *vfm* dirigeraient la production et l'exportation d'une molécule de signalisation composée de fragments d'acides aminés et d'acides gras. La structure exacte de ce signal n'est pas encore élucidée. Une fois produit, le signal est perçu par un système à deux composants, VfmH-VfmI, qui activent l'expression du gène codant pour *vfmE*. VfmE active alors à la fois la transcription des gènes de PCWDE et l'expression des opérons d'optimisation des ressources. Ce locus *vfm* n'est pas répandu parmi les autres espèces bactériennes pathogènes, mais il paraît très conservé dans d'autres espèces de *Dickeya* (Reverchon et Nasser, 2013 ; Nasser *et al.*, 2013)

2.3 De la prophylaxie aux stratégies nouvelles de lutte biologique contre les bactéries responsables de la jambe noire et de pourriture molle

Les pertes économiques causées par *Pectobacterium* et *Dickeya* ainsi que l'implication de nombreuses équipes de recherche sur ces modèles, en font l'une des 10 bactéries phytopathogènes les plus étudiées au monde après *Agrobacterium* et certains *Pseudomonas* (Mansfield *et al.*, 2012). Les pertes ont été estimées en 2008 à 30M€/an au Pays-Bas (Prins et Breukers, 2008 lu dans Toth *et al.*, 2011) et plusieurs dizaines de millions d'euros en Europe (Hélias, 2008, Toth *et al.*, 2011 ; Czajkowski *et al.*, 2011). Ces bactéries pectinolytiques engendrent pour la filière du plant, des refus, déclassements de lots de semences ainsi que des refus ou litiges à destination (Le Hingrat *et al.*, 2012). Dans les pays européens, il est observé depuis ces 15 dernières années, une recrudescence des maladies de la pourriture molle en conservation et de la jambe noire en végétation (Dupuis *et al.*, 2005 ; Palacio-Bielsa *et al.*, 2006 ; Laurila *et al.*, 2010, Toth *et al.*, 2011).

Cette section du manuscrit présente les méthodes de lutte basées sur la prévention de la contamination des plantes (prophylaxie), en particulier l'application des procédures d'hygiène lors de la production de semences qui est la première barrière limitant l'infection par ces pathogènes ; la recherche de sources de résistance vis-à-vis de ces bactéries ; l'application de

traitements physiques et/ou chimiques pour réduire la charge d'inoculum sur les tubercules de semence et l'utilisation de la lutte biologique.

2.3.1 La prophylaxie

Les méthodes basées sur la prophylaxie sont utilisées en particulier pour la production et la certification de semences. Aujourd'hui ces méthodes permettent de limiter les dommages, en évitant la contamination des lots et en améliorant les conditions de production et de stockage de pommes de terre.

Comme décrit plus haut la contamination des cultures peut provenir du plant lui-même. Par conséquent, la maîtrise de la maladie nécessite l'utilisation de semences saines, issues d'un schéma rigoureux de certification couplée à la mise en place d'itinéraires de culture pour diminuer l'incidence de la maladie (Hélias *et al.*, 2008 ; Pérombelon et Van der Wolf, 2002).

L'utilisation de sols filtrants, de champs bien drainés et/ou ayant fait l'objet d'un travail du sol permettant leur assèchement est une mesure bénéfique pour réduire une humidité excessive autour des tubercules plantés, favorable à leur détérioration précoce (Scott *et al.*, 1996 ; Hélias *et al.*, 2008 ; Pérombelon, 1992).

Ensuite, le nettoyage et désinfection des machines utilisées lors de la plantation, la pulvérisation, le défanage, la récolte et le calibrage, contribuent sans aucun doute à réduire les risques d'introduction de bactéries au sein des cultures et en stockage (Pérombelon, 2002).

L'utilisation de désinfectant est recommandée pour la décontamination des outils ou locaux (Rousselle *et al.*, 1996). Un bon réglage des machines agricoles lors de la récolte et du calibrage des tubercules permet aussi de réduire les risques de blessures de ces derniers (Pérombelon, 1992 ; van Vuurde & de Vries, 1994). De bonnes conditions de stockage sont également importantes, non seulement pour prévenir la pourriture des tubercules, mais aussi pour éviter d'accroître la charge bactérienne potentielle autour des tubercules qui présenterait ainsi un risque accru de développement ultérieur de maladies.

L'épuration à un stade précoce de plantes atteintes par la maladie de la jambe noire et les tubercules fils associés contribue à réduire la source de l'agent pathogène, limiter les contaminations bactériennes aux plantes adjacentes et limiter lors de la récolte la contamination des outils agricoles post-récoltes et le brassage des tubercules sains avec ceux malades, facteurs de contamination des tubercules à destination du stockage (Fiers *et al.*, 2012). Le stockage s'effectue le plus souvent en caisses (palox), à basse température (de 2 à 4°C) et dans des lieux de stockage bien ventilés pour éviter la condensation à la surface des tubercules. Il est essentiel de sécher les tubercules rapidement après la récolte parfois à l'aide d'une ventilation forcée d'air chaud.

2.3.2 Traitements physico-chimiques

Les méthodes prophylactiques ne permettent pas de garantir à coup sûr des tubercules de semence exempts de bactéries phytopathogènes. La maladie de pourriture molle peut se développer avant le stockage ou lors du transport. Ainsi, des traitements physico-chimiques « spécifiques » peuvent devenir utiles (Czajkowski *et al.*, 2011) et ont fait l'objet d'études.

2.3.2.1 Les traitements physiques

Les traitements physiques comme la chaleur, sont reconnus pour être efficace contre un large éventail d'agents pathogènes. Les méthodes de traitement physiques appliquées dans le contrôle de l'infection des tubercules de la pourriture molle incluent celles utilisant de l'eau chaude ou la vapeur d'eau (Shirsat *et al.*, 1991), l'air chaud et sec (Bartz & Kelman, 1985) et les rayonnements ultra-violets (Ranganna *et al.*, 1997 ; Bdliya & Haruna, 2007). Le traitement par l'eau chaude des tubercules de pommes de terre pour contrôler la contamination de bactéries de la pourriture molle a été appliqué pour la première fois en 1983 (Mackay et Shipton, 1983). Dans ces conditions, Pcc et Pa ne pouvaient pas être détectés dans des tubercules pelés après l'immersion de tubercules infectés naturellement pendant 10 min dans de l'eau à 55°C. Des expériences en champ ont montré une diminution de l'impact de la jambe noire sur culture à

partir de semences traitées (Shirsat *et al.*, 1991). Ce contrôle de la jambe noire a été obtenu dans des expériences en champ avec des tubercules artificiellement ou naturellement contaminés. La vapeur d'eau a également été testée comme une alternative au traitement de l'eau chaude pour éliminer les bactéries Pcc et Pa présentes superficiellement sur le périderme ou dans les lenticelles du tubercule. L'utilisation de traitement à la vapeur réduit les niveaux de contamination du tubercule (Afek et Orenstein, 2002). Bartz & Kelman (1985) ont rapporté que les *Pectobacterium* superficiellement présents sur tubercules pouvaient être éliminés par application d'air chaud et sec à 50°C. De plus, cette étude a montré que l'air chaud et sec assèche les tubercules et stimule la cicatrisation des plaies. Toutefois, les traitements utilisant la chaleur affectent non seulement les agents pathogènes localisés superficiellement mais aussi les micro-organismes bénéfiques et surtout, peut influencer négativement la germination des tubercules et leur vigueur. En outre, les études sur ce type de traitements concernent *Pectobacterium*, aucune étude n'a été publiée pour *Dickeya*.

Ranganna *et al.* (1997) ont testé l'efficacité de rayonnement UV pour contrôler Pcc dans les tubercules de pommes de terre. Lorsque les tubercules ont été inoculés artificiellement (infiltration sous vide 6h) avant irradiation, les bactéries ont été totalement éliminées par une dose faible d'UV. De manière équivalente, les tubercules infectés artificiellement par Pcc puis exposés au soleil (pendant au moins 180 min) n'ont pas développé les symptômes de la pourriture molle.

Ces pratiques de contrôle physique, comme le traitement de l'eau chaude en particulier, sont respectueuses de l'environnement et permettent un certain contrôle des *Pectobacterium* et peut être aussi des *Dickeya* ainsi que de plusieurs autres agents pathogènes. Cependant leurs limites restent l'incapacité à tuer les bactéries phytopathogènes situées profondément dans les tubercules et les risques de phytotoxicité.

2.3.2.2 Les traitements chimiques

Les stratégies de lutte chimique utilisées contre les maladies bactériennes sont plutôt à visées curatives que préventives. Par conséquent, elles reposent principalement sur l'éradication de l'agent pathogène bien que quelques une d'entre elles reposent sur la création d'un environnement défavorable (modulation du pH) pour le développement des bactéries. Une fois que la maladie est déclarée, sa maîtrise est limitée voire impossible en raison de la multiplication rapide des bactéries et l'incapacité des produits chimiques à pénétrer au sein des tissus internes (Bartz & Kelman, 1985). Ainsi, la maîtrise de la maladie ne peut être réalisable que lors de la phase d'infection bactérienne latente des tubercules plutôt que dans la phase symptomatique de la maladie. Une large gamme de composés chimiques a été testée pour réduire/éradiquer l'infection superficielle des tubercules par *Pectobacterium* et *Dickeya*.

Dans le passé, les composés utilisés contenaient des dérivés de molécules antibiotiques (streptomycine et ses dérivés), les sels inorganiques et organiques ou des combinaisons de ces composés. Pendant longtemps, la streptomycine a été considérée comme un agent de lutte prometteur contre les maladies de la jambe noire et de pourriture molle de la pomme de terre. Notamment l'immersion des tubercules de semence dans un mélange de streptomycine et d'hypochlorite d'oxytétracycline ou de mercure avant la plantation. Ces mélanges réduisaient l'incidence de la jambe noire en champ et la détérioration des tubercules lors du stockage (Bonde & de Souza, 1954). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque la kasugamycine ou virginiamycine se substitue à la streptomycine (Bartz, 1999). Les traitements à base d'antibiotiques ne sont à présent plus autorisés en raison des risques de développement de multi-résistances chez les phytopathogènes.

D'autre part, une large gamme de molécules bactéricides a été testée contre *Pectobacterium* et *Dickeya*. Ainsi, les composés organiques tels que l'hydroxyquinoléine et le 5-nitro-8-hydroxyquinoléine se sont avérés efficaces pour le contrôle de la pourriture molle dans les tubercules de pommes de terre blessés de même que des composés à base de chlore comme le

bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) et le bactéricide de synthèse, 7-chloro-1-méthyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4 acide carboxylique -oxo-3-quinolinique (Harris, 1979 ; Bartz & Kelman, 1985). L'immersion de tubercules de pommes de terre dans l'acide citrique, acétique, ascorbique ou malonique réduit le pourrissement par le Pcc (apporté artificiellement) sur tubercules de pommes de terre. Mills *et al.* (2006) ont montré que certains sels inorganiques et organiques, comme l'acétate d'aluminium, le métabisulfite de sodium, parabène de propyle, le benzoate de sodium, le sorbate de potassium, le propionate de calcium, l'hypochlorite de sodium, le bicarbonate de sodium, le chlorure d'aluminium et le sulfate de cuivre, pouvaient inhiber la croissance de Pcc et Pa *in-vitro*. L'activité des sels peut être attribuée à la présence de cations qui inhibent les fonctions des protéines membranaires des bactéries et par modulation du pH par le fragment anionique largué (Mills *et al.*, 2006). Il est à remarquer qu'un petit nombre de ces sels sont approuvés comme conservateurs alimentaires. Néanmoins, toutes ces molécules bactéricides ont été testées le plus souvent dans des expériences à petite échelle ou en conditions *in-vitro* ce qui ne permet pas d'envisager les mêmes conclusions en conditions naturelles. Dans ces dernières, la quantité de molécule utilisée serait conséquente et rendrait ces produits à risque pour les plantes ou l'environnement voire les utilisateurs.

D'autre part, des peptides antimicrobiens de synthèse ont été évalués pour leur interaction avec la membrane cellulaire bactérienne augmentant ainsi sa perméabilité. Kamysz *et al.* (2005) ont rapporté que le peptide synthétique CAMEL (KWKLFFKKIGAVLKVL), un peptide hybride issu de deux peptides antibactériens naturels, la cécropine A et mélittine confère une bonne protection des tubercules de pommes de terre vis-à-vis de Pa et *Dickeya* spp. (Oh *et al.*, 2000).

L'utilisation de gaz bactéricides pourrait éradiquer des bactéries présentes en surface ou concentrées à l'intérieur des lenticelles des tubercules mais la pénétration dans les tubercules est limitée et peut être phytotoxique voire toxique pour les utilisateurs (Eckert & Ogawa, 1988). Cette (phyto)toxicité ; c'est là le point limitant de ces méthodes, qui se combine à la difficulté

d'atteindre les bactéries, qui sont bien protégées dans les lenticelles, les blessures ou concentrées dans le système vasculaire (Czajkowski *et al.*, 2011).

2.3.2.3 Fertilisation des plantes et résistance à la maladie

La nutrition des plantes est considérée comme un élément important vis-à-vis de la résistance naturelle de la plante aux maladies bactériennes ou autres. La nutrition affecte la croissance des plantes mais aussi leur interaction avec les micro-organismes de la rhizosphère. Elle constitue aussi un facteur important pour le bon fonctionnement physiologique de la plante. En effet, l'insuffisance d'éléments essentiels se traduit par un stress biologique du végétal et engendre souvent une sensibilité accrue aux phytopathogènes.

Le Calcium (Ca) joue un rôle important dans la résistance des plantes contre les agents pathogènes bactériens (Berry *et al.*, 1988). Une teneur élevée en calcium dans les tissus végétaux est souvent positivement liée à une résistance contre les maladies bactériennes, y compris la jambe noire de la pomme de terre (McGuire, 1984 ; Berry *et al.*, 1988). Il est reconnu que les ions calcium améliorent la structure et l'intégrité des composants de la paroi cellulaire de la plante contre les PEL des *Pectobacterium* et *Dickeya* (Perombellon et Salmond, 1995 ; Charkowski *et al.*, 2007). La fertilisation à base de calcium réduit la pourriture molle causée par *Pectobacterium* du chou chinois et le haricot (Platero et Tejerina, 1976). Dans d'autres études, la résistance à la jambe noire et pourriture molle semble être liée à la concentration de calcium dans les tubercules de semence. Cependant, les résultats varient en fonction des cultivars utilisés (Pagel & Heitefuss, 1989). Les sols naturellement pauvres en Ca peuvent être amendés en ajoutant du CaSO₄ (gypse) pour augmenter la résistance des plantes à la jambe noire mais aussi la pourriture molle des tubercules fils (Bain *et al.*, 1996).

D'autre part, le niveau d'azote (N) semble être un autre facteur qui peut affecter la sensibilité à des agents pathogènes dont ceux initiateurs de la pourriture molle. En outre, une fertilisation azotée raisonnée du sol est souhaitable (Olivier, 2004). Des niveaux élevés d'azote réduiraient de façon significative la bactériose causée par *Dickeya* (sur plantes ornementales). Cependant

l'effet des niveaux d'azote sur la jambe noire et la pourriture molle sur pommes de terre donnent des conclusions contradictoires selon les études.

2.3.3 La résistance végétale

Aucun cultivar de pomme de terre ne semble totalement résistant à la jambe noire et à la pourriture molle causées par les *Dickeya* ou *Pectobacterium* (del Pilar Marquez-Villavicencio *et al.*, 2011 ; Rasche *et al.*, 2006 ; Czajkowski *et al.*, 2011 ; Pasco *et al.*, 2007, Rouffiange *et al.*, 2013 et 2014 ; Gerardin *et al.*, 2013 ; Gill *et al.*, 2014). La sélection pour la résistance vis-à-vis de ces maladies est un enjeu important et fait l'objet de plusieurs programmes de recherches nationaux (travaux de collaboration entre la RD3PT/FN3PT, l'INRA UMR IGEPP et les sélectionneurs dans le cadre de l'UMT Innoplant et la SIPRE/CNPPT) alors que la transgénèse présente, dans le cadre actuel, peu de perspectives de développement.

2.3.3.1 Sélection variétale

Dans un contexte de restriction croissante du recours aux intrants phytosanitaires (Ecophyto 2018, Directive Utilisation durable des pesticides) et de la nécessité du développement des méthodes de lutte alternatives ou complémentaires, il est important de développer des leviers de gestions "non chimiques" comme la résistance variétale. Aucun cultivar commercial actuel n'apparaît complètement résistant aux espèces de *Dickeya* et de *Pectobacterium*, même si certains d'entre eux montrent néanmoins une résistance partielle (Lyon *et al.*, 1989 ; Rouffiange *et al.*, 2013 et 2014 ; Gerardin *et al.*, 2013 ; Gill *et al.*, 2014).

Les collections européennes contiennent un grand réservoir de matériel génétique, dont plus de 200 espèces de *Solanum* sauvages, utilisable pour la sélection de résistance aux bactéries responsables de ces maladies (Hijmans et Spooner, 2001). L'importante collection de ressources génétiques conservée au Centre de Ressources Biologiques de l'INRA de Ploudaniel BrACySol (http://www6.rennes.inra.fr/igepp_eng/ABOUT-IGEPP/Platforms/BrACySol) constitue un atout précieux pour les programmes d'amélioration et de sélection sur la pomme

de terre. Ainsi, à la fin des années 1990, du matériel génétique présentant des niveaux élevés de résistance à Pa, avait été identifié par l'INRA à destination des obtenteurs (Andrivon *et al.*, 2003), et ces résistances, introduites par croisement dans divers matériels (variétés ou hybrides en cours de sélection) (Pasco *et al.*, 2007). *S. tuberosum* subsp. *andigena*, considéré comme l'ancêtre direct de la pomme de terre commune a montré des résistances à la fois contre *Pectobacterium* et *Dickeya* (Hidalgo et Echandi, 1982). Certaines études présentent le croisement entre espèces de *Solanum* spp. permettant d'introduire des sources de résistance dans de nouvelles variétés. C'est le cas du croisement avec *S. commersonnii*, connu pour sa résistance au gel, aux nématodes et aux champignons ; qui a été croisé avec *S. tuberosum*. Les hybrides obtenus ont montré une résistance à la fois vis-à-vis de *Pectobacterium* et *Dickeya* lors d'essais de sensibilité sur tranches de pommes de terre et d'expériences en serre et au champ (Laferrière *et al.*, 1999). De la même façon, des variétés commerciales hybridées avec *S. stenotomum* présentent une plus grande résistance à la jambe noire et la pourriture molle (Fock *et al.*, 2001).

La sélection variétale est un long processus, qui nécessite plus de 10 ans entre la sélection et les évaluations de sensibilité. Les hybrides sont évalués pour un panel de critères : incluant propriétés gustatives, rendement, sensibilité vis-à-vis d'une gamme de pathogènes. Ainsi une étude a montré qu'un hybride obtenu après croisement, bien qu'ayant une plus grande résistance à la jambe noire, présentait par ailleurs une teneur élevée en glycoalcaloïdes, représentant une toxicité pour les humains et les animaux Carputo *et al.*, (1997). Les travaux d'évaluations variétales doivent tenir compte du fait que la résistance des variétés à la pourriture molle n'est pas obligatoirement corrélée celle de la jambe noire (Pérombelon & Salmond, 1995 ; Rouffiangue *et al.*, 2014 ; Hélias *et al.*, 2014 ; Gerardin *et al.*, 2014).

Le développement d'une méthodologie de phénotypage est une étape clé dans les travaux d'évaluation variétale. Les paramètres comme la méthode d'inoculation, la charge d'inoculum ou l'espèce de bactérie utilisée, la présence ou l'absence d'oxygène et selon que ces expériences

aient été réalisées *in-vitro* ou en conditions réelles sont à prendre en compte (Łojkowska & Kelman, 1994, Rouffiange *et al.*, 2013 et 2014). Certaines études ont par ailleurs montré que le classement de résistance/sensibilité des cultivars pouvait varier d'une saison ou d'une année à l'autre (Pérombelon & Salmond, 1995 ; Rouffiange *et al.*, 2014 ; Gill *et al.*, 2014).

2.3.3.2 L'utilisation des Plantes Génétiquement Modifiées (PGM)

La manipulation génétique est une alternative aux méthodes de sélection variétale classiques. Le principe consiste à modifier un cultivar donné pour augmenter sa résistance aux maladies de la jambe noire et la pourriture molle tout en évitant d'altérer d'autres traits importants à ce dernier. Cependant, en Europe, l'introduction de gènes par transgénèse dans des plantes cultivées, est loin d'être acceptée par la société. Compte tenu de ces réticences, seul un nombre limité de travaux ont été réalisés pour augmenter, par transgénèse, la résistance de la pomme de terre face aux bactéries pectinolytiques. À l'heure actuelle, les gènes utilisés pour améliorer la résistance vis-à-vis de ces bactéries sont ceux codant pour des protéines qui ont un effet bactéricide, dans le but d'empêcher la multiplication des agents pathogènes au sein de l'hôte. Par exemple, la famille des lysozymes (dégradateur de la paroi bactérienne) notamment, le lysozyme T4 ou le lysozyme du poulet sont décrits comme montrant une large activité bactéricide. Des pommes de terre modifiées pour produire ces protéines ont montré une résistance plus élevée à Pa lors d'essais en serre (Serrano *et al.*, 2000). Cependant, l'introduction de ces gènes dans les plantes peut être nocif pour les populations bactériennes naturellement présentes dans la rhizosphère de pomme de terre et bénéfiques à cette dernière. Il a été observé que dans des plants de pomme de terre transgéniques, le lysozyme T4 est libéré autour des racines et est capable de tuer le *Bacillus subtilis* mais aussi d'autres bactéries présentes à la surface des racines (Ahrenholtz *et al.*, 2000).

La cécropine et leurs analogues de synthèse ont montré une activité antibactérienne dans des tests *in-vitro*. Des plants de pomme de terre transformés avec des gènes codant pour la

cécropine et attracine sont davantage résistants à la jambe noire causée par Pa que les plantes témoins non OGM (Arce *et al.*, 1999).

La dégradation de la paroi cellulaire végétale génère des produits tel que le polygalacturonate qui est utilisé par les bactéries comme substrat énergétique et la biosynthèse et agit en tant que signal pour la poursuite de la production des enzymes pectinolytiques responsables de dégâts de la paroi végétale (Lyon, 1989). Ainsi, Weber *et al.* (1996) ont proposé d'exprimer des enzymes telles que les pectates lyases pour dégrader ces signaux. Les tissus d'une variété de pomme de terre transgénique, seraient en mesure d'inhiber la poursuite de la synthèse d'enzymes bactériens responsables de la macération des tissus végétaux. Les pommes de terre transgéniques modifiées pour produire l'une de ces enzymes se sont révélées être résistantes à l'infection de Pcc dans les expériences *in-vitro* et *in-planta* (Wegener *et al.*, 1996 ; Wegener, 2001). D'autre part, la production de plantes transgéniques avec une sur-expression d'une glucosyl-transférase montre sur tubercules de pommes de terre une résistance contre *P. carotovorum*. Ces dernières sont deux fois plus résistantes que les tubercules témoins non transformés (Lorenc-Kukula *et al.*, 2005).

Comme évoqué ci-dessus, le *quorum-sensing* contrôle divers processus biologiques en fonction de leur densité bactérienne chez les bactéries pathogènes humaines, animales et végétales, dont la virulence (Reverchon *et al.*, 1998; Andersson *et al.*, 2000). Ce mécanisme médié par les NAHL (Fuqua *et al.*, 2001) est majeur pour l'expression de ces facteurs chez *Pectobacterium* et certains *Dickeya* (Crépin *et al.*, 2012 a et b). Les bactéries du genre *Bacillus* possèdent un gène codant pour l'enzyme AiiA, une NAHL lactonase, qui bloque l'expression du pouvoir pathogène *via* la dégradation enzymatique des molécules signal. Lorsque ce gène est cloné dans des cultivars de pomme de terre, les plantes transgéniques présentent un degré de résistance élevé face à *P. carotovorum* (Dong *et al.*, 2001).

Cette méfiance vis-à-vis de la transformation génétique pourrait être éventuellement modulée en utilisant un processus de cisgénèse, plutôt que transgénèse. La cisgénèse à la différence de la

transgénèse permet d'insérer un gène d'intérêt issu de la même espèce que celle bénéficiant de la nouvelle propriété. Cependant, à ce jour, cette approche ne semble pas avoir été appliquée pour les maladies de la jambe noire ou de pourriture molle de la pomme de terre.

2.3.4 Stratégies de lutte biologique

En Europe, l'agro-écologie est progressivement encouragée par la PAC (Politique Agricole Commune) qui a évolué vers une « éco-conditionnalité » (aides versées sous réserve du respect de bonnes conditions agricoles et environnementales). En France, à partir des années 1970, les politiques publiques visent à renforcer la préservation de l'environnement, tout en intégrant les dimensions économiques et politiques d'une agriculture mieux intégrée dans la société et recourant aux principes de « l'agro-écologie ». Ces pratiques reposent par exemple sur : un accroissement de la biodiversité en évitant les monocultures qui ont besoin d'intrants en énergie, pesticides et engrais ; le travail du sol qui respecte sa structure, son ordre naturel et ne bouleverse pas le siège des divers micro-organismes (couvert végétal quasi permanent, fertilisation par engrais verts et compost, l'agro-foresterie) ; des traitements phytosanitaires naturels limités en nombre et dans leur persistance dans l'environnement ; la recherche d'équilibres écologiques à l'aide de cultures associées ; l'économie et optimisation de la consommation d'eau et de l'irrigation.

L'absence de moyens de luttés physico-chimique efficaces et agréés contre la pourriture molle et la jambe noire conduit à renforcer et étudier de nouvelles méthodes de lutte efficaces et respectueuses de notre environnement, pour réduire les niveaux d'inoculum et ralentir la multiplication et la transmission de la maladie (Latour *et al.*, 2008; Czajkowski *et al.*, 2011). En lien avec ces échecs de lutte contre ces pathogènes et en complément des méthodes prophylactiques, il devient utile de considérer l'intérêt de nouveaux moyens de lutte contre les pathogènes responsables de la jambe noire et de pourriture molle basés sur les stratégies de biocontrôle. Ces stratégies de lutte biologique reposent sur un principe simple : maintenir les bio-agresseurs sous un seuil jugé acceptable sans chercher à l'éradiquer. Elles comprennent

l'utilisation d'antagonistes qui affectent les populations de pathogènes via l'antibiose, la compétition pour les nutriments ou l'induction de résistance chez l'hôte (Howarth, 1991).

2.3.4.1 Stimulateurs de défenses des plantes

La stimulation des réponses de défense des plantes contre les bactéries pectinolytiques a été étudiée sur le tabac, la plante ornementale *Calla Lily*, la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et les pommes de terre. Différents composés naturels ou synthétiques, tels que l'acide salicylique (AS), des alpha-élicitines, des polysaccharides complexés à base de galactane (polymère de galactose), des constituants de la paroi de certaines bactéries (PAMP ou Pathogen-Associated Molecular Pattern) ont été étudiés pour leurs effets sur l'activation des défenses des plantes face aux phytopathogènes responsables de la maladie de la jambe noire et de pourriture molle (Song *et al.*, 2013 ; Palva *et al.*, 1994 ; Czajkowski *et al.*, 2014 ; Saubeau *et al.*, 2014 ; Luzzatto *et al.*, 2007). L'AS est connu pour diminuer les symptômes de la pourriture molle induits par *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ainsi que la prolifération bactérienne dans *N. tabacum* et *A. thaliana* (Song *et al.*, 2013 ; Palva, 1994). Il est à noter qu'une protection similaire à celle obtenue par l'AS a été obtenue avec des composés non encore caractérisés qui dérivent d'une espèce de plantes indigènes coréennes (Song *et al.*, 2013). Une étude traitant de l'effet de l'AS sur la réduction des symptômes de jambe noire et la prolifération de *D. solani* au sein de plantes de pomme de terre cultivées *in-vitro* a été menée. Dans cette étude, trois jours après l'inoculation du pathogène, la colonisation des racines des plantules cultivées *in-vitro* par *D. solani* a été observée dans toutes les plantes témoins cultivées sur un milieu sans AS, alors que les plantes cultivées sur un milieu supplémenté avec 50 μ M d'AS ne présentaient de colonisation par le pathogène. Après 14 jours, toutes les plantes témoins présentaient des symptômes graves de la maladie et les bactéries étaient retrouvées à l'intérieur de 100% des tiges des plantes, alors que les plantes cultivées sur un milieu supplémenté avec 50 μ M d'AS n'exprimaient aucun symptôme, et que la présence du pathogène n'était détectée que dans 10 à 15% des tiges analysées (Czajkowski *et al.*, 2015b).

D'autre part, trois protéines de la famille des élicitines, combinées à un polysaccharide complexé à base de galactane, induisent des réponses de défense de la plante et permettent une diminution des symptômes de la pourriture molle provoqués par *P. atrosepticum* dans des tests sur tubercules de pomme de terre. Ces composés sont issus d'extraits concentrés de filtrat d'une culture d'un autre agent pathogène de la pomme de terre, *Phytophthora infestans* (Saubeau *et al.*, 2014). En outre, l'induction de réponses immunitaires générales de la plante par des PAMP constitue ainsi une stratégie efficace de protection des cultures par l'augmentation de la résistance des plantes aux agents pathogènes. D'autres études suggèrent que les LPS, principaux constituants de la paroi des bactéries Gram négatif, semblent jouer un rôle direct dans le mécanisme de reconnaissance de la plante par le pathogène et dans l'induction de la résistance chez l'hôte (Erbs et Newman, 2003). Val *et al.* (2006) ont testé les effets de protection des LPS de Pa et Pcc sur des tubercules de pomme de terre (variété Bintje) contre la bactérie Pa. Les résultats de ces auteurs ont montré que ces LPS provoquaient une protection contre la pourriture molle si le traitement intervient au moins 24 heures avant l'inoculation. Quelques bactéries utilisées en lutte biologique sont capables de synthétiser des activateurs de défenses des plantes (Kloepper *et al.*, 2004). A titre d'exemple, la souche de *Bacillus* sp. BS107 produit de l'acide 2-aminobenzoïque molécule activatrice de défenses chez le tabac montrant des effets dans la protection de cette plante hôte contre Pcc (Yang *et al.*, 2011).

2.3.4.2 Compétiteurs bactériens

L'activité d'antibiose contre les bactéries pectinolytiques responsables de la jambe noire ou de la pourriture molle sur pommes de terre a été étudiée dans plusieurs travaux sur des bactéries de divers genres et espèces montrant des capacités de compétition face aux nutriments ou la production de molécules affectant la viabilité des pathogènes. Parmi ces genres bactériens, il est retrouvé les *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia* et *Lactobacillus* ou *Lactococcus*. Les propriétés antagonistes des bactéries lactiques telles que *Lactobacillus lactis*, *Lactococcus mesenteroides* et *Weissella cibaria* ont été testés *in-vitro* et lors d'essais menés pendant le stockage des

tubercules ; sur la croissance du pathogène Pcc. L'inhibition de croissance de ce dernier a été attribuée à la production de peroxyde d'hydrogène par ces organismes (Trias *et al.*, 2010 ; Rahman *et al.*, 2012 ; Shrestha *et al.*, 2009).

D'autres souches utilisées en lutte biologique ont été testées soit lors d'essais sur tubercules de pommes de terre, en condition semi-contrôlée sous serre ; ou directement en condition réelle au champ. Lors des toutes premières expérimentations en plein champ, l'application de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) a permis de limiter le niveau des populations pathogènes présentes à l'intérieur des racines de pomme de terre, ainsi que le pourcentage de tubercules fils infestés par *P. carotovorum* (Kloepper, 1983). Certaines souches de *Pseudomonas* et *Bacillus* sont capables de réduire la croissance et la virulence de *Pectobacterium* et *Dickeya* dans des essais sur tubercules de pommes de terre en produisant des sidérophores et des antibiotiques (Cronin *et al.*, 2006 ; Sharga et Lyon, 1998). Il a été montré que 38% des *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* présentent une activité antagoniste contre Pa et Pcc lors d'essais d'inhibition sur boîtes de pétri et sur tubercules de pomme de terre (Reiter *et al.*, 2002). L'effet antagoniste de ces deux bactéries réside dans la production d'enzymes, de sidérophores (Xu et Gross, 1986), d'antibiotiques comme le 2,4-diacétylphloroglucinol (2,4 DAPG) (Keel *et al.*, 1992; Cronin *et al.*, 2006).

L'activité antibactérienne de *Streptomyces cinereoruber* contre *D. dadantii* 3937 observée par certains auteurs souligne l'importance de souches d'actinomycètes comme candidats potentiels pour le contrôle biologique des bactéries phytopathogènes des tubercules de pomme de terre (El Karkouri *et al.*, 2010). Par ailleurs, Baz *et al.* (2012) ont observé une efficacité de 65 à 94% dans la réduction de la sévérité des symptômes de pourriture molle causés par Pa et Pcc sur des tranches de tubercules de pomme de terre en utilisant des actinobactéries (*Streptomyces* sp. OE7) comme agent de lutte biologique (Baz *et al.*, 2012).

Plus récemment, la souche endophyte *Serratia plymuthica* A30, isolée de tubercules de pomme de terre pourris, a montré une inhibition de la macération des tissus de pomme de terre causés

par *D. solani* lors d'essais sur tranches. Cette souche réduit l'incidence de la jambe noire et permet une diminution de la densité de la population de *D. solani* dans les tissus végétaux lors d'essais d'évaluation du contrôle en serre (Czajkowski *et al.*, 2011 et 2012).

Un autre type d'agent antibactérien ciblant l'antibiose des pathogènes est étudié contre les bactéries responsables d'imperfections à la surface de la pomme de terre après la récolte. Ces composés permettent de contrôler *in-vitro* la croissance de *P. atrosepticum* : ce sont des composés volatils naturels de plantes tel que le 2E-hexénal (Wood *et al.*, 2013). D'autre part, un composé dérivé de la chitine, le chitosan (Helander *et al.*, 2001) a montré un effet antimicrobien contre la croissance de *Pcc in-vitro* et lors d'essais en conditions de stockage lorsque 5% de ce composé est combiné avec l'un des trois agents de lutte biologique, *B. subtilis*, *P. fluorescens* ou *Trichoderma viridi* (Makhlouf et Abdeen 2014).

2.3.4.3 Bactéries ciblant le quorum-sensing et molécules d'anti-virulence

Comme indiqué plus haut, les politiques agricoles de nombreux pays mettent aujourd'hui l'accent sur l'évaluation de l'efficacité des traitements *versus* leur coût environnemental (Epstein et Bassein, 2003). C'est pourquoi la recherche de nouvelles molécules à faible impact environnemental est actuellement encouragée, notamment celle de molécules ciblant la virulence du pathogène (anti-virulents) plutôt que sa viabilité (bactéricide) (Latour *et al.*, 2008). L'existence du QS chez *Pectobacterium* et *Dickeya* et son rôle majeur dans la maladie (Smadja *et al.*, 2004 ; Crépin *et al.*, 2012a et b ; Reverchon *et al.*, 2013) désignent cette communication cellulaire comme une cible privilégiée pour le développement des outils de lutte contre la virulence (Latour *et al.*, 2008 ; Crépin *et al.*, 2012c). Ces stratégies d'anti-virulence ont toutes pour but d'interrompre ou affaiblir (*Quench* en anglais, d'où leur nom de stratégies de *Quorum-quenching* ou QQ) la signalisation *quorum-sensing* de *Pectobacterium* et de *Dickeya* nécessaire à l'induction des gènes de virulence, par le biais d'apport exogène de composés chimiques (molécules modulatrices ou inhibitrices de la signalisation de QS ou QSI pour *QS-inhibitor*), de toxines, ou d'enzymes (Lin *et al.*, 2003 ; Park *et al.*, 2006 ; Truchado *et al.*, 2012).

Certaines bactéries de la rhizosphère ont été sélectionnées sur la base de leur capacité à dégrader les signaux du *quorum-sensing* de types NAHL des *Pectobacterium* infectant la pomme de terre (Jafra *et al.*, 2006 ; Faure et Dessaux 2007). Il s'agit de *Bacillus*, *Delftia*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, et *Ochrobactrum* qui ont montré une efficacité *in-vitro* contre *Pectobacterium* (Dong *et al.*, 2004 ; Uroz *et al.*, 2003 ; Jafra *et al.*, 2006). De plus, les travaux de Cirou *et al.* (2007) ont montré que certains composés chimiques biodégradables (gamma-caprolactone, 6-caprolactone ou la gamma-heptalactone) sont capables de stimuler la croissance des bactéries dégradant les NAHL et de leur colonisation racinaire. C'est le cas de *Rhodococcus* et *Delftia*, naturellement présents ou additionnés dans la rhizosphère de plants de pomme de terre en culture hors sol (culture en hydroponie). Ainsi, la colonisation des racines par *R. erythropolis* R138 (bactérie capable de perturber la signalisation QS) peut être améliorée en utilisant des agents bio-stimulants de croissance (Cirou *et al.*, 2007, 2011 et 2012). Ces bactéries n'affectent pas (ou indirectement et de manière non significative) la croissance des *Pectobacterium* ni des *Dickeya*.

Comme alternative aux agents biologiques visant une stratégie de QQ, quelques composés chimiques de synthèse ou naturels présentant une activité d'inhibition du *quorum-sensing* ont été identifiés et testés contre *Pectobacterium* dans des tests *in-vitro* ou lors d'essais de virulence sur tubercules de pommes de terre ou sur tabac (Palmer *et al.*, 2011 a et b ; Manefield *et al.*, 2001 ; des Essarts *et al.*, 2013). Dans le travail de des Essarts *et al.* (2013), une chimiothèque de 240 composés chimiques, décrits comme QSI ou analogues de NAHL déjà reconnus a été criblée afin de trouver de nouveaux QSI ciblant la virulence de Pa. Quatre sels d'imidazolium N, N'-bisalkylés ont été identifiés comme QSI actifs à des concentrations de l'ordre du micromolaire. De plus, dans des essais de virulence sur tubercules de pommes de terre, deux d'entre eux ont réussi à réduire la gravité des symptômes provoqués par Pa (des Essarts *et al.*, 2013). Dans une autre étude, des furanones halogénés produits par l'algue marine *Delisea pulchra*, connus comme antagonistes de la signalisation faite par la 3-oxo-C6-HSL ; régulant

l'expression de facteurs de virulence et la production d'antibiotique de *Pectobacterium*, ont été testés sur *P. carotovora*. Il est montré qu'un métabolite de l'algue de cette famille de molécules inhibe la production de carbapénème et celle de cellulases et de protéases de Pcc *in-vitro* (Manefield *et al.*, 2001).

2.3.4.4 Prédateurs naturels des phytopathogènes pectinolytiques

La relation prédateur *versus* proie a été étudiée en utilisant des bactéries comme proie et des bactériophages comme prédateurs. *Bdellovibrio bacteriovorans* est une delta-protéobactérie mobile qui s'attaque aux autres bactéries Gram négatif (Rendulic *et al.*, 2004). Lorsque Pa et *B. bacteriovorans* sont co-inoculées, un faible contrôle de la pourriture molle est observé dans des essais sur tranches de tubercules de pommes de terre (de Epton *et al.*, 1990 lu dans Czajkowski *et al.*, 2011). Une des caractéristiques les plus notables de *Bdellovibrio* est qu'il parasite d'autres bactéries Gram négatif en entrant dans leur espace périplasmique, où il s'alimente des biopolymères de cet hôte (protéines et acides nucléiques). Après être entré dans le périplasme, *Bdellovibrio* peut rester dormant, sans affecter la viabilité de l'hôte ou dégrader sa proie, et se déplacer.

D'autres études ont analysé l'activité lytique des bactériophages contre *Pectobacterium* et *Dickeya*. Le bactériophage PP1 appartenant à la famille des *Podoviridae* a été testé *in-vitro* contre quelques souches de Pcc par Lim *et al.* (2013). Il est montré que le bactériophage PP1 abaisse l'incidence de la maladie de la pourriture molle causée par *P.carotovorum* subsp. *carotovorum* sur des plantes de laitue (Lim *et al.*, 2013). Certains bactériophages de la famille des *Myoviridae* (nommé Φ D1 à Φ D11) sont capables de lyser plusieurs souches bactériennes appartenant au genre *Dickeya* et de limiter la macération des tissus des tubercules de pommes de terre (Czajkowski *et al.*, 2013). Il est notable qu'aucune des souches de *Pectobacterium* testées n'apparaisse sensible leur effet. Les bactériophages LIMestone1 et LIMestone2 appartenant cette même famille de bactériophages réduisent l'incidence et la gravité de la maladie sur les tubercules de pommes de terre dans des essais au laboratoire. D'autre part, dans

cette même étude, des essais au champ montrent que le traitement par ces phages sur tubercules préalablement infectés par *D. solani* diminue l'incidence de la maladie tout en augmentant le rendement de la descendance récoltée (Adriaenssens, 2012).

2.3.4.5 Huiles minérales ou végétales

De récentes études traitent de l'effet d'huiles végétales ou minérales pour lutter contre des pathogènes des cultures, dont la pomme de terre, soit dans le but de réduire leur impact soit pour contrôler une de leurs propriétés. Ainsi, Vokou *et al.*, en 1993 ont montré que des huiles végétales ou essentielles (*Coridothymus capitatus*, *Origanum dictanus* et *Satureja thymbra*) avaient une action anti-microbiennes contre Pa et Pcc. D'autres huiles issues de *Cinnamomum zeylanicum*, *Corydothymus capitatus* et *Origanum heracleoticum* ont inhibé à plus de 80% la croissance *in-vitro* de Pa (Dabiré, 2009). Cependant aucun produit efficace de lutte biologique contre les *Pectobacterium* ni les *Dickeya* n'est disponible commercialement (Charkowski *et al.*, 2006 ; Czajkowski *et al.*, 2012). L'ensemble des techniques décrites ne sont pas exclusives et pourraient être associées dans une pratique de lutte intégrée contre *Pectobacterium* et *Dickeya*. L'impact environnemental et l'efficacité de ces nouvelles stratégies de lutte doivent être évalués avant leur commercialisation.

2.3.5 Produits commerciaux à base d'agents bactériens

2.3.5.1 Généralités sur la commercialisation des agents de lutte biologique

Contrairement à la lutte biologique contre les insectes, la lutte biologique contre les maladies des plantes est relativement nouvelle. La première bactérie utilisée en agent de lutte biologique la souche d'*Agrobacterium radiobacter* K84, a été enregistrée auprès de l'agence américaine de protection de l'environnement (USEPA ou EPA pour *United States Environmental Protection Agency*) pour le contrôle de la galle du collet en 1979. Dix ans plus tard, le premier champignon, *Trichoderma harzianum* ATCC20476, a été enregistré auprès de l'EPA pour le contrôle des maladies des plantes. En 2005, un total de 14 bactéries et 12 champignons ont été

Tableau 3 : Micro-organismes enregistrés auprès de l'Agence américaine de protection de l'environnement comme biopesticides . *Source: extrait de Fravel, 2005.*

Biocontrol agent	EPA registration number	Year registered	Target organism or disease	Crops or use	Product	Manufacturer or distributor
<i>Agrobacterium radiobacter</i> strain K84	11,4201	1979	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ornamentals, fruits, nuts	Galltrol	AgBioChem, USA
<i>Agrobacterium radiobacter</i> strain K1026	00,6474	1999	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> and <i>A. rhizogenes</i>	Ornamentals, fruits, nuts	Nogall	Bio-Care Technology, Australia
<i>Ampelomyces quisqualis</i> isolate M-10	02,1007	1994	Powdery mildew	Fruit, vegetable, and ornamental crops	AQ10 BioFungicide	Ecogen, USA
<i>Aspergillus flavus</i> strain AF36	00,6456	2003	<i>Aspergillus flavus</i>	Cotton	<i>Aspergillus flavus</i> AF36	Arizona Cotton Research and Protection Council, USA
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 21,882	00,6500	2004	<i>Aspergillus flavus</i>	Peanut	Afla-guard	Circle One Global, USA
<i>Bacillus licheniformis</i> strain SB3086	00,6492	2003	Foliar pathogens and blights	Ornamental plants and ornamental turf	Ecoguard; Novozymes Biofungicide Green Relief	Novozymes Biologicals, USA
<i>Bacillus pumilus</i> strain GB 34	00,6493	2002	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i>	Soybean	GB34 Concentrate Biological Fungicide	Gustafson, USA
<i>Bacillus subtilis</i> GBO3	12,9068	1992	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , and others	Crop seeds, including seeds for cotton, peanuts, soybeans, wheat, barley, peas, and beans	Kodiak; Companion	Gustafson, USA; Growth Products, USA
<i>Bacillus subtilis</i> MBI 600	12,9082	1994	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Alternaria</i> , and <i>Aspergillus</i>	Cotton, beans, barley, wheat, corn, peas, peanuts and soybeans	Subtilex; Histick N/T	Becker Underwood; Premier Horticulture, USA
<i>Bacillus subtilis</i> strain QST 713	00,6479	2000	Foliar pathogens, rots, and blights	Cherries, cucurbits, grapes, leafy vegetables, peppers, potatoes, tomatoes, and walnuts	Serenade; Rhapsody	AgraQuest, USA
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>amyloliquefaciens</i> strain FZB24	00,6480	2000	<i>Rhizoctonia</i> and <i>Fusarium</i>	Shade and forest tree seedlings, ornamentals, and shrubs	Taegro	Earth BioSciences, USA
<i>Candida oleophila</i> isolate I-182	02,1008		Postharvest diseases	Various fruits, vegetables, flowers, ornamentals, other plants	Aspire	Ecogen, USA
<i>Coniothyrium minitans</i> CON/M/91-08	02,8836	2001	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> and <i>Sclerotinia minor</i>	Agricultural soil	Contans WG; Intercept	PROPHYTA Biologischer Pflanzenschutz GmbH, Germany; Technology Sciences Group, USA
<i>Gliocladium catenulatum</i> strain J1446	02,1009	1998	Soilborne pathogens	Vegetables, herbs and spices, turf, ornamentals, tree, and shrub seedlings	Primastop	Kemira Agro OY, Finland; RegWest Co., USA
<i>Gliocladium virens</i> GL-21	12,9000	1990	Soilborne pathogens	Ornamentals, vegetables, cotton	Soilgard	Thermo Trilogy Corporation, USA
Killed <i>Myrothecium verrucaria</i> : fermentation solids and solubles	11,9204	1996	Plant parasitic nematodes	All food, fiber, and ornamental crops	DiTera	Abbott Laboratories, USA

enregistrés par l'EPA pour le contrôle des maladies des plantes (Fravel, 2005 ; Junaid *et al.*, 2013). Soixante-cinq pourcent des organismes enregistrés par l'EPA ont été enregistrés au cours des 10 dernières années, tandis que les 35% restants au cours des 5 dernières années. La plupart de ces produits sont vendus dans le commerce sous une ou plusieurs formulations. Certains des produits de biocontrôle disponibles sur le marché sont présentés dans le tableau 3 (Fravel, 2005). Bien que le nombre de produits de lutte biologique dans la gestion des maladies des plantes augmente, ces produits ne représenteraient que 1% des mesures de lutte dans le milieu agricole, tandis que les fongicides chimiques représentent 15% des substances totales utilisées dans l'agriculture (Fravel 2005 ; Junaid *et al.*, 2013).

La sélection et commercialisation de produits de biocontrôle reste de toutes façons un processus long, qui nécessite plusieurs étapes et implique un large éventail d'activités (Fravel, 2005) :

- a) Isolement de micro-organisme de l'écosystème naturel.
- b) Evaluation de l'agent biologique à la fois *in-vitro* et en conditions de serre
- c) Essais du ou des meilleurs isolats dans les conditions réelles, au champ
- d) La production de masse
- e) Formulation
- f) Livraison
- g) Compatibilité
- h) Enregistrement et libération

2.3.5.2 Produits commerciaux à base de *Pseudomonas* et *Bacillus*

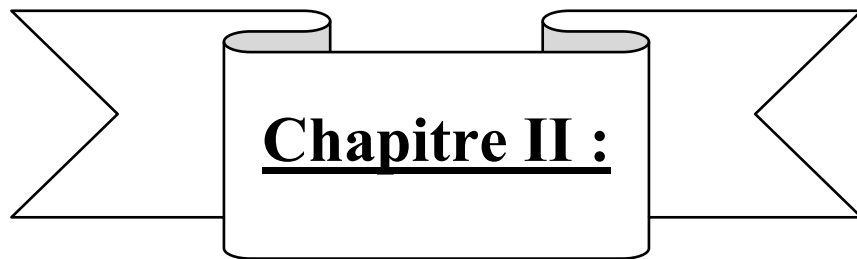
L'étude des souches de *Pseudomonas* a grandement contribué à la compréhension des mécanismes qui sont impliqués dans la suppression des maladies de la jambe noire et de pourriture molle. Toutefois, ces souches présentent un inconvénient majeur au niveau de leur application ; généralement leur viabilité est limitée lorsqu'elles sont stockées pendant une période de plusieurs semaines. Les souches de *Bacillus*, qui ont la capacité de sporuler semblent une meilleure alternative pour l'utilisation de stratégies de biocontrôle. En effet, ce stade cellulaire « latent » permet une bien meilleure durée de vie au sein d'une solution de traitement ou dans la conception de granulés, ce qui facilite le développement de produits commerciaux (Haas et Défago, 2005). Des souches de *Bacillus* sont décrites pour fournir une protection végétale par antibiose et/ou induire la résistance systémique de l'hôte (Kloepper *et al.*, 2004).

Tableau 3 (suite) : Micro-organismes enregistrés auprès de l'Agence américaine de protection de l'environnement comme biopesticides . *Source: extrait de Fravel, 2005.*

Biocontrol agent	EPA registration number	Year registered	Target organism or disease	Crops or use	Product	Manufacturer or distributor
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain 63-28	00,6478	2001	<i>Pythium, Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum</i>	Vegetables and ornamentals in greenhouses	AtEze	EcoSoil Systems, USA
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> strain Tx-1	00,6473	1999	<i>Sclerotinia homeocarpa, Colletotrichum graminicola, Pythium aphanadermatum, Microdochium nivale</i>	Golf course turf	Bio-Ject Spot-Less	EcoSoil Systems, USA
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	00,6438	1992	Frost damage, fire blight, bunch rot	Fruit crops, as well as almond, potato, and tomato crops	BlighBan A506; Frostban	Frost Technology Corporation, USA; Plant Health Technologies, USA
<i>Pseudomonas syringae</i> strain ESC-10	00,6441	1995	Postharvest diseases	Apples, pears, lemons, oranges, or grapefruit after the fruit is harvested	Bio-Save 10LP	EcoScience Produce Systems Division, USA
<i>Pseudozyma flocculosa</i> strain PF-A22 UL	11,9196	2002	Powdery mildew	Roses and cucumbers in greenhouses	Sporodex L	Plant Products Co., Canada; Technology Sciences Group, USA
<i>Streptomyces griseoviridis</i> strain K61	12,9069	1993	Soilborne pathogens	Food crops, ornamentals, and tree seedlings	Mycostop	Kemira Oy, Finland
<i>Trichoderma harzianum</i> ATCC 20,476	12,8903	1989	Tree wound pathogens	Wounds in ornamental, shade, and forest trees	Binab T	BINAB Bio-Innovation AB, Sweden
<i>Trichoderma harzianum</i> strain T-22	11,9202	1990	Soilborne pathogens	Greenhouses, nurseries, turf, home gardens, planting boxes, and outdoor soil	Root Shield; Plant Shield	Bioworks, USA
<i>Trichoderma harzianum</i> strain T-39	11,9200	1996	<i>Botrytis cinerea</i>	Most food crops	Trichodex	Makhteshim Agan of North America, USA

Des produits sont commercialisés pour la lutte biologique à base de rhizobactéries, par exemple les souches de *B. subtilis* GB03 (Kodiak; Gustafson), MBI600 (Subtilex; Becker Underwood) et QST713 (Serenade; AgraQuest), la souche de *B. pumilus* GB34 (YieldShield; Gustafson), la souche de *B. licheniformis* SB3086 (EcoGuard; Novozymes) et un mélange contenant la souche *B. subtilis* GB122 et la souche *B. amyloliquefaciens* GB99 (BioYield; Gustafson). D'autre part, quelques souches de *Pseudomonas* figurent dans des produits de lutte biologique commercialisés, par exemple, les *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* et *P. chlororaphis* (Cedomon; BioAgri) (Paulitz et Bélanger, 2001) ou la souche *Pseudomonas* sp. DSMZ13134 (Proradix, Sourcon-Padena) (Buddrus-Schiemann *et al.*, 2010).

Les bactéries utilisées en lutte biologique peuvent être appliquées sous forme de produits secs (poudres ou granulés), de suspensions de cellules (avec ou sans micro-encapsulation) ou enrobages de semences concernant les petites graines (Schisler *et al.*, 2004 ; Haas et Défago, 2005). Cette liste d'agents de biocontrôle n'est sans doute pas exhaustive, car depuis les années 2000, de nombreuses petites et grandes entreprises dans le monde entier ont développé des solutions de lutte biologique à base d'agents bactériens, ce qui a conduit à une conséquente recrudescence de divers produits de biocontrôle sur le marché mondial. En l'état des connaissances, seuls les produits commerciaux : Serenade Max (Bayer ; <http://www.bayer-agri.fr/produits/fiche/serenade-max/>) et Proradix (Sourcon-Padena ; <http://www.sourcon-padena.com/produkte/proradix/>) utilisant respectivement les souches de micro-organismes, *B. subtilis* QST713 (Serrano *et al.*, 2011) et *Pseudomonas* sp. DSMZ13134 (Buddrus-Schiemann *et al.*, 2010), sont décrits par leur fournisseur comme utilisables pour protéger de manière préventive les cultures de pommes de terre contre les pathogènes responsables des maladies de la jambe noire et de pourriture molle.



**Pouvoir pathogène et études : génomique,
métabolique et transcriptomique de deux
phytopathogènes de la pomme de terre**

Pouvoir pathogène et études : génomique, métabolique et transcriptomique de deux phytopathogènes de la pomme de terre

1.1 Introduction

Depuis quelques décades a été observé en Europe l'émergence de deux nouveaux agents pathogènes de la pomme de terre (*S. tuberosum*) appartenant au genre *Dickeya*, *D. solani* et *D. dianthicola*, auparavant inféodés aux zones tropicales et aux culture en serre (Toth *et al.*, 2011). Ces agents pathogènes sont responsables à la fois des symptômes de jambe noire au champ et de pourriture molle sur tubercules lors du stockage. Afin de mieux cerner les mécanismes d'émergence et de virulence de ces agents pathogènes, nous avons engagé la comparaison des souches de *Dickeya dianthicola* RNS04.9 (Ddi04.9) et de la souche *D. solani* 3337 (Dsol3337). Ces dernières ont été isolées d'échantillons de symptômes de jambe noire au champ lors de suivi d'épidémiovigilance par V. Hélias (FN3PT/RD3PT). Ces comparaisons couplent des approches de génomique avec des approches fonctionnelles. Dans un premier temps, nous avons déterminé la séquence génomique de Ddi04.9 et de Dsol3337. Ces génomes ont été comparés entre eux et avec le génome d'une souche modèle, *D. dadantii* 3937. Ces trois génomes sont très proches tant au niveau du nombre de gènes que de leur synténie. Cette étape de génomique comparative s'est faite en collaboration avec F. van Gijsegem et J. Pédrón (IEES, Paris).

Chez Dsol3337, la majorité des régions génomiques spécifiques regroupent des gènes prédits comme codant des systèmes de transport et des voies métaboliques. Pour corréler la présence de ces régions à un phénotype, nous avons entrepris une comparaison des capacités métaboliques des 3 espèces de *Dickeya* à l'aide de plaques Biolog. Par ailleurs, nous avons entrepris, par une technique de RNAseq (RNA sequencing), la comparaison des profils d'expression de Dsol3337 et Ddi04.9 au cours de deux états physiologiques : en phase

exponentielle de croissance en milieu de culture riche et en début d'apparition des symptômes de macération sur tranches de tubercules. Cette démarche s'inscrit dans la recherche des traits génétiques qui pourraient expliquer l'adaptation à l'hôte, la meilleure virulence ou certains traits particuliers de telles ou telles souches pectinolytiques. De plus, des tests de virulence sur tubercules entier et sur plantes entière (sous serre) ont été menés pour compléter cette étude.

1.2 Matériel et Méthodes

1.2.1 Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches de *Dickeya* utilisées dans cette étude, *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 (= RNS08.23.3.1A) ont été isolées de symptômes de jambe noire en 2004 et 2008 (Hélias, 2008 ; Crépin *et al.*, 2012a ; Khayi *et al.*, 2014 ; des Essarts *et al.*, 2015). Ces bactéries sont cultivées en routine au laboratoire dans un milieu TY (tryptone 5 g/L et yeast extract 3g/L) additionné ou non de 1,5 % d'agar, à une température de 30°C. Les cultures liquides sont placées sous agitation à 200 rpm.

1.2.2 Etude de la virulence de *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337

1.2.2.1 Pathosystème tubercules hors sol

Les tubercules de pommes de terre de variété Bintje (*S. tuberosum*, de calibre 28/35 mm ou 35/45 cm) ont été fournis par le CNPPT/SIPRE (Achicourt, France). Avant les tests de virulence, la surface des tubercules est stérilisée grâce à une solution d'eau de javel diluée (1,3 % de chlore actif). Les tubercules sont laissés en contact de cette dernière pendant 10 min avant d'être rincés deux fois avec de l'eau stérilisée. Les tubercules sont par la suite laissés à température ambiante sur un papier absorbant afin d'améliorer leur séchage pendant une nuit. En parallèle, les cultures de Ddi04.9 et Dsol3337 sont réalisées dans un milieu TY (30 °C, 200rpm). Les bactéries sont collectées par centrifugation (4000 rpm, 15 min), lavées deux fois et ajustées à 10^8 UFC/ml en utilisant une solution d'eau isotonique (8 g/l NaCl). Chaque tubercule est infecté avec 10^4 UFC (concentration faible) ou 10^6 UFC (concentration forte) de

Ddi04.9 ou Dsol3337 ou de l'eau isotonique (tubercules témoins sans infection). Chacune des conditions testées se compose de 10 tubercules inoculés et 3 répétitions de l'expérience ont été réalisées. Après 5 jours à 25°C dans une atmosphère saturée en humidité, les tubercules sont coupés en leur milieu, photographiés et les symptômes de pourriture molle développés sont classés.

Quatre catégories dépendantes du diamètre (D) de macération autour de la zone d'inoculation sont utilisées pour catégoriser les symptômes. Catégorie 1 : $D=0$ mm, pas de macération visible ; catégorie 2 : $D < 5$ mm, faible macération ; catégorie 3 : $5 \leq D < 15$ mm ; macération modérée et catégorie 4 : $D \geq 15$ mm, forte macération. Pour l'analyse des données un test de Kruskal et Wallis à $\alpha=5\%$ est effectué.

1.2.2.2 Pathosystème plante entière en serre

Le chapitre III exposera l'évaluation de l'efficacité d'agents de lutte biologique contre *D. dianthicola* RNS04.9 grâce à un pathosystème sur plante entière en serre. Le pathosystème utilisé ici, est le même que dans le chapitre III. Ainsi, sa mise au point sera exposée dans le chapitre suivant. Ici, ne sera développée que la mise en place du pathosystème.

Les essais de comparaison de virulence des souches Ddi0.9 et Dsol3337 sur plantes entières, ont été réalisés sur le site de l'INRA du Rheu. Le matériel végétal (tubercules de variété Bintje, de qualité SE et de calibre 28-35 mm) a été fourni par la SIPRE/CNPPT. Les conditions en serre étaient une photopériode de 16h avec une température de 25°C le jour et 20°C la nuit. Un tubercule est planté par pot (diamètre 16 cm ; 1 kg de sol/pot) et 20 plantes sont nécessaires pour la réalisation d'une modalité. Cinq pots appartenant à la même condition sont contenus dans 1 plateau et chaque plateau est placé aléatoirement au sein de la serre. Afin de se prémunir des insuffisances du sol, une solution d'engrais, l'Hakaphos (Compo Expert, 1 dose de poudre diluée dans 5 L d'eau, 500 mL par plateau) est apportée une fois toutes les 2 semaines, à partir de 20 jours après la levée des plantes.

Dans chaque essai, trois conditions sont comparées, la condition témoin sans infection et les conditions infectées soit par Ddi04.9, soit par Dsol3337. Les pathogènes sont inoculés 3 semaines après plantation à deux concentrations différentes, 10^7 UFC/pot ou 10^9 UFC/pot. L'inoculation est réalisée par arrosage avec 100 mL d'une suspension bactérienne préalablement ajustée. Les cultures de *Dickeya* en milieu TY liquide sont collectées par centrifugation (4000 rpm pendant 15 min) et lavées une à deux fois avant d'être ajustées à la DO (Densité Optique) désirée grâce à une solution phosphate (2.7 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0.4 g/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à pH à 7,2). Les plantes de la condition témoin sont arrosées avec 100 mL d'une solution phosphate.

Les symptômes associés à la maladie de la jambe noire sont notés par relevé visuel au cours de l'essai, deux fois par semaine après l'inoculation des pathogènes. Une courbe de progression de la maladie (DPC pour *Disease Progress Curve*) est tracée (Andrivon *et al.*, 2006 et Rouffiangue *et al.*, 2013). Cette courbe fait apparaître l'intensité des symptômes de jambe noire (en pourcentage) sur les plantes au cours du temps. Pour chacune des DPC est mesuré l'aire relative sous les courbes (AUDPCr pour *Aera Under DPC relative*) et est évalué le retard d'apparition du premier symptôme de jambe noire (Δt) entre chaque condition pour une même concentration en pathogène. Le test statistique utilisé pour comparer le pouvoir pathogène de Ddi04.9 et Dsol3337 dans chaque condition est une analyse de Kaplan-Meier ($p.value < 0,05$). Ce test statistique est réalisé avec le logiciel Excel complété de XLSTAT. Ce test s'appuie sur une analyse de survie des plantes dans chaque condition.

1.2.3 Analyse génomique des pathogènes

L'extraction d'ADN génomique de *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 est réalisée à partir d'une culture de 100 mL dans un milieu TY dont la croissance est stoppée à 0,6 Unité d'Absorbance (UA) à DO600 nm. Les bactéries sont d'abord culottées par centrifugation (15 min ; 4000 rpm) avant d'être suspendues avec 1 mL de Tris-HCL 0,5 M (pH=8). Une

deuxième centrifugation est réalisée (10 min ; 15000 g) avant de resuspendre les bactéries dans une solution de lysozyme à 1 mg/mL (10 mM de Tris HCl pH=8 ; 1 mM d'EDTA ; 150 mM de NaCl ; 1 mg/mL de RNase et 1 mg/mL de lysozyme). Après 20 min à 37°C, le protocole décrit par Wilson (2001) est suivi. Ce dernier repose sur des étapes de purification successives utilisant le phenol, le chloroforme et l'alcool isoamilique suivies de deux étapes de précipitation, une à l'isopropanol et l'autre à l'éthanol 80%. Une ultime étape consiste à vérifier la qualité et quantité d'ADN génomique extrait grâce à l'outil NanoDrop (ND 1000) et à une migration de 1 µg d'ADN sur un gel d'agarose à 1 %.

Le génome de *D. dianthicola* RNS04.9 et de *D. solani* 3337 ont été séquencés par la technologie Next-Generation Illumina HiSeq 2000 v3. Le séquençage Illumina a été réalisé par la société MWG (Allemagne) en utilisant 2 x 100 pb paired-end read par le module Eurofins Genomics. L'assemblage a été réalisé par le logiciel de bioinformatique, CLC genomic v5.5.

1.2.4 Etude métabolique

La capacité de Ddi04.9 et Dsol3337 à métaboliser 384 substrats différents et à résister à des conditions extrêmes de croissance a été étudié en utilisant les microplaques de technologie Biolog (www.biolog.com). Au total, 6 microplaques ont été utilisées : les microplaques PM1 et PM2A pour tester le métabolisme des substrats carbonés ; la PM3B pour tester les substrats azotés ; la PM4A pour tester les substrats phosphorés ou sulfurés et les plaques PM9 et PM10 pour tester la croissance dans des conditions difficiles, pressions osmotiques variées (PM9) ou pH variés (PM10). Dans les plaques PM3B et PM4A, une source de carbone a été ajoutée dans chaque puits des microplaques afin d'apprécier l'assimilation de la source d'azote, phosphate ou sulfate correspondante. La source de carbone préconisée par le fournisseur pour les *Dickeya* est le Sodium Pyruvate (2 mM). Chaque plaque est réalisée en duplicat pour l'analyse. Selon les recommandations du fournisseur, une lecture de DO590 nm est effectuée

au moment de l'inoculation des microplaques (ti), puis après 24 h et 48 h (tf) d'incubation à 30°C. L'analyse métabolique d'une ou plusieurs sources nutritive(s) ou la croissance en condition extrême est révélée par colorimétrie. La variation d'absorbance qu'il existe entre la DO mesurée à tf et celle mesurée à ti est notée ΔDO . La ΔDO est calculée pour toutes les conditions de PM1, PM2A, PM3B et PM4A. Si la valeur de $\Delta DO < 0,25$ UA alors la bactérie ne métabolise pas la source de substrat testée, noté (-) ; si $0,25 \text{ UA} \leq \Delta DO < 1 \text{ UA}$ cela révèle une faible activité métabolique pour le substrat en question, noté (+) et si $\Delta DO \geq 1 \text{ UA}$ cela indique une très forte activité métabolique pour le substrat (++). En ce qui concerne les plaques PM9 et PM10, l'absorbance est positive ou nulle respectivement lorsqu'il y a croissance (+) ou non (-).

1.2.5 Etude Transcriptomique de *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337

L'analyse fonctionnelle des *Dickeya* responsables de jambe noire est réalisée par comparaison des gènes exprimés ou réprimés au cours de deux états physiologiques de la bactérie : en phase exponentielle de croissance en culture pure et au début de l'apparition des symptômes de macération sur tubercules de pomme de terre. Les séquençages RNAseq sont réalisés par la plateforme d'Imagif (CNRS à Gif sur Yvette).

1.2.5.1 Phase exponentielle de croissance

Une pré-culture d'une nuit en milieu TY de *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 est centrifugée (12000 rpm ; 5 min) et une lecture spectrophotométrique permet l'ajustement à 10^8 UFC/mL (0,5 UA à DO600 nm). Dans un Erlen Meyer de 50 mL, une suspension bactérienne de 0,05 UA DO 600 nm est ajustée dans 5 mL de TY pour chaque souche étudiée. Après 2h30 de croissance à 30°C, sous agitation (200 rpm), la phase exponentielle de croissance est obtenue pour DdiRNS04.9 et Dsol3337. Une lecture de la DO600 nm permet de vérifier cette phase physiologique (0,3 UA à DO600 nm). Quatre millilitres de culture sont mélangés avec 2 mL de RNA protect (RNAprotect Cell Reagent, Qiagen) puis centrifugés

(4000 rpm, 15 min, 4°C). Le culot bactérien obtenu est suspendu dans une solution de RNA protect 50% (diluant : eau isotonique 0,8%) et laissé en contact 5 min à température ambiante. Les bactéries sont immédiatement récupérées par centrifugation (10000 rpm, 3 min, 4°C) et plongées dans un bain d'azote liquide (5 sec). Ces échantillons sont conservés à -80°C en attendant l'extraction d'ARN.

1.2.5.2 Phase de début d'apparition des symptômes de macération

Une culture de *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 en milieu TY liquide (25 mL) incubée à 30°C pendant 16h et sous agitation (200 rpm) est réalisée. Les bactéries sont culotées par centrifugation (4000 rpm, 15 min) puis lavées 1 fois grâce à 10 mL d'eau isotonique. Chaque culture est ajustée dans 1 mL de NaCl 0,8% à 0,5 UA par lecture de DO600 nm. En parallèle, des pommes de terre (variété Bintje, calibre 35/45, catégorie SE) sont désinfectées 10 min dans une solution diluée d'eau de javel (chlore actif 1,3%) puis rincées par 2 bains successifs d'eau stérile. Ces dernières sont laissées à température ambiante sur papier absorbant pendant une nuit. Des tranches de pomme de terre de 1cm d'épaisseur sont coupées et une membrane stérile Supor 450 (Pall, diamètre 25 mm, porosité 0,45 µm) est déposée au centre de chaque tranche. Les tranches de tubercules de chaque condition sont placées sur papier absorbant humide dans des boîtes de pétri (12 x 12 x 1,7 cm). Sur chaque membrane, 200µL de suspension ajustée de Ddi04.9 ou Dsol3337 ou du NaCl 0,8% (témoin sans infection). Les boîtes de pétri garnies des tranches de pommes de terre inoculées sont réparties dans une enceinte à atmosphère saturée en humidité et laissées pendant 24h à 27°C. Dans un tube (Eppendorf, 2 mL) rempli de 500 µL de RNA protect 50%, les membranes contenant Ddi04.9 ou Dsol3337 sont lavées (1 tube = 2 membranes) par agitation à l'aide d'un vortex (2 x 5 sec). Après 5 min, les bactéries sont centrifugées (11000 rpm, 5 min, 4°C) et le surnageant retiré. Le culot est congelé en plongeant le tube dans un bain d'azote liquide (5 sec). Ces échantillons sont conservés à -80°C en attendant l'extraction d'ARN.

1.2.5.3 Extraction des ARN totaux bactériens

Dans une première étape, les culots bactériens conservés à -80°C sont resuspendus dans 600µL de tampon acide (20 mM d'acétate de sodium pH=5,5 ; 1 mM d'EDTA). Rapidement, 40 µL de SDS 10% et 600 µL d'un mélange tampon acide/phénol (aqua-phénol : tampon acide ; 50 : 50), extemporanément chauffé à 65°C et préparé la veille, sont ajoutés à la suspension. Le tube est mélangé pendant 30 sec à l'aide d'un vortex à vitesse maximale, les échantillons sont placés 8 min à 65°C en agitant toutes les 30 sec (5 sec à l'aide d'un vortex). Les tubes sont centrifugés (10 min, 13000 rpm) et l'épiphase transvasée dans un tube propre (Eppendorf, 2 mL). Six cents microlitres d'un mélange phénol/chloroforme (aqua-phénol : chloroforme ; 50 : 50) sont mélangés à l'épiphase avant une nouvelle centrifugation (5 min, 13000 rpm). Deux extractions des épiphases sont réalisées grâce à 500 µL de chloroforme (5 min, 13000 rpm, 4°C) avant de précipiter la dernière épiphase à l'éthanol 96% (0,1 Volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 V d'éthanol 96%). Plusieurs mélanges par retournement sont réalisés avant de placer les tubes à -20°C pendant 1 nuit. Les échantillons sont centrifugés (1h30, 15000 rpm, 4°C) pour récupérer l'ensemble des acides nucléiques de la bactérie. Le culot est lavé avec 500 µL d'éthanol 80% froid (5 min, 15000 rpm, 4°C) avant d'être solubilisé dans 50 µL d'eau nuclease-free froide (Ambion). Un traitement DNase est réalisé avec le kit Turbo-DNase selon les recommandations du fournisseur (Ambion-Life Technologies). Enfin, une mesure grâce à l'outil Nanodrop et une migration sur gel d'agarose 1% sont réalisées afin d'apprécier la quantité et la qualité des ARN.

1.2.5.4 Séquençage des ARN (RNAseq ou RNA-sequencing)

Ce travail a été réalisé par la plateforme d'Imagif (www.imagif.cnrs.fr). Trois replicats biologiques ont été fournis à cette plateforme, chacun comprenait de 2 à 5 µg d'ARN total. Le séquençage des ARN a été réalisé par la plateforme selon les protocoles utilisés en routine. Notamment, il a été validé le respect des critères de quantité d'ARN total ainsi que leur

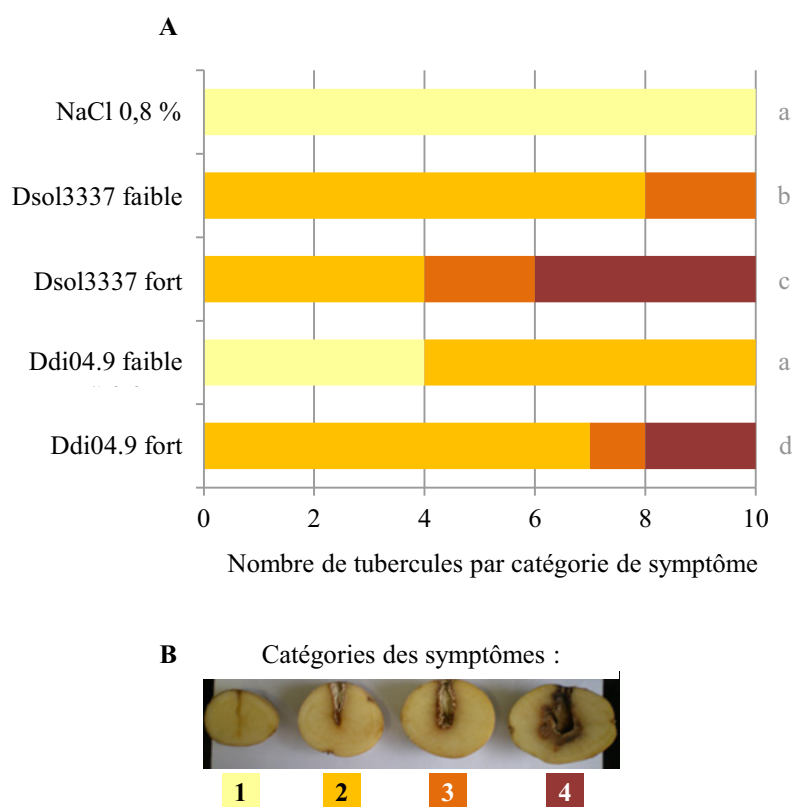


Figure 1 : Essais de virulence sur tubercules de pomme de terre. (A) Les tubercules de *S. tuberosum* (variété Bintje et calibre 28/35mm) sont inoculés avec une concentration faible (10^6 UFC/mL) ou forte (10^8 UFC/mL) de *D. dianthicola* RNS04.9 (Ddi04.9) ou *D. solani* 3337 (Dsol3337). Le témoin sans infection est inoculé avec du NaCl 0,8%. (B) Les symptômes de macération sont classés en 4 catégories selon le diamètre de macération autour du point d'infection. Un test statistique de Kruskal et Wallis suivi d'un test de Mann et Whitney ($\alpha=5\%$) sont réalisés à la suite de l'expérience. Les différences statistiques entre les conditions sont indiquées par les lettres (écriture minuscule) en bout de colonne.

qualité (Agilent 2100 Bioanalyzer et système Qubit kit d'Invitrogen). Après une déplétion des ARN ribosomiaux (kits «Ribominus» d'Invitrogen) et vérification de son efficacité, la préparation d'une banque « transcriptome directionnel » (protocole "directional mRNA-seq library preparation" d'Illumina) est réalisée. Une étape de validation de la banque (Bioanalyzer Agilent) est nécessaire avant le séquençage (HiSeq, Sequencing kit: TruSeq SBS Kit v3 -50 cycles single read, Illumina). Au final, entre 15 et 21 millions de séquences sont obtenues pour chaque échantillon. Enfin, une analyse bioinformatique est réalisée par la plateforme pour aboutir à une liste de gènes différemment exprimés.

1.3 Résultats

1.3.1 Virulence comparée de *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337

En pathosystème tubercules entiers, la souche de Dsol3337 apparaît plus virulente que la souche Ddi04.9 pour les deux concentrations bactériennes testées (figure 1). Dsol3337 permet le développement de symptômes de pourriture molle sur tubercule de plus forte intensité et permet de les exprimer à partir d'une plus faible concentration bactérienne que Ddi04.9.

En serre, les conclusions sont inversées, la souche *D. solani* 3337 apparaît moins virulente que *D. dianthicola* RNS04.9 (figure 2). En effet, pour les deux concentrations d'infection testées, Dsol3337 développe moins de symptômes de jambe noire sur plante que Ddi04.9 (AUDCPr trois fois moins importantes pour les conditions inoculées avec *D. solani* 3337). De plus, que ce soit en présence d'une concentration faible ou forte, les symptômes de jambe noire sur plante apportés par le pathogène Dsol3337 ont respectivement un retard d'apparition de 16 et 14 jours. Les tests de virulence effectués sur les pathosystèmes tubercules hors sol et sur plantes entières en serre ne corrèlent donc pas. Ces résultats rejoignent les observations déjà faites par Rouffiange *et al.* (2014) et Laurila *et al.* (2010) décrivant que des souches montrant une forte virulence sur tubercules de pomme de terre ne permettaient pas toujours de retrouver une forte virulence de ces mêmes souches sur plantes entières.

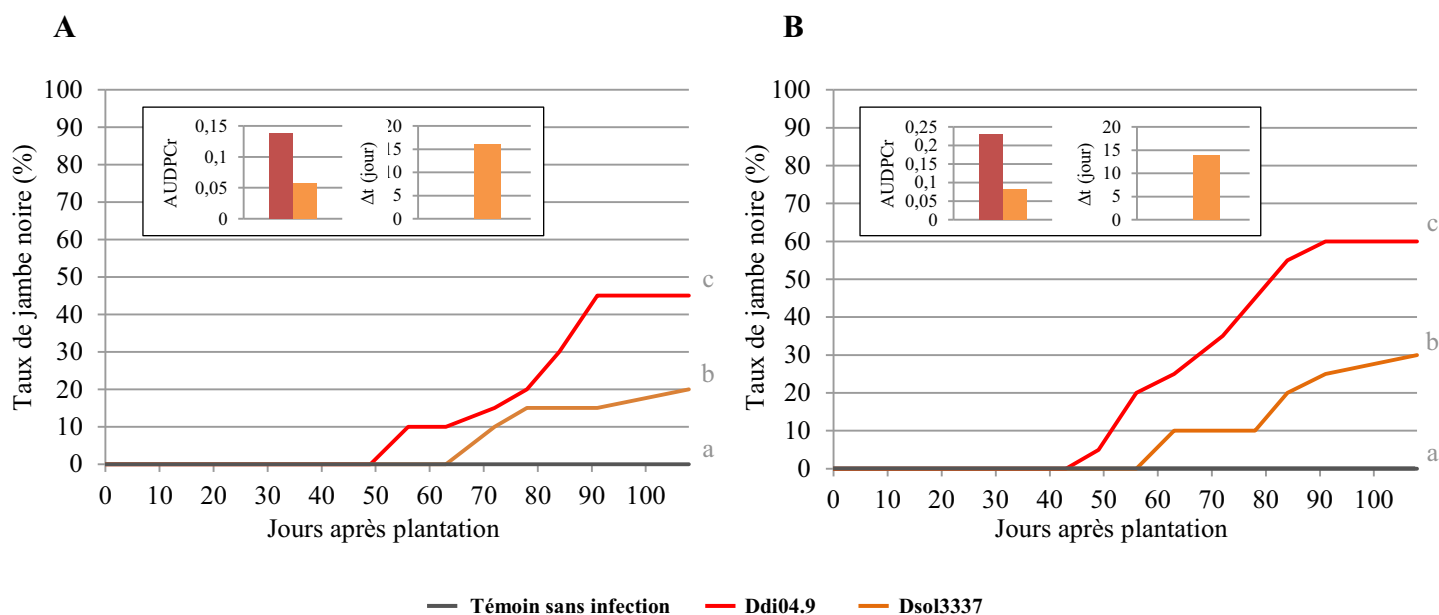


Figure 2 : Courbes de progression de la maladie (DPC) de la jambe noire en serre représentées pour deux concentrations en pathogène, 10⁷ UFC/pot (A) ou 10⁹ UFC/pot (B). Ces expérimentations sont conduites sur le site de l'INRA du Rheu avec un sol synthétique (caractéristiques données dans le matériels et méthode de l'article 2 ; des Essarts *et al.*, 2013). Dans ces deux essais, 20 plantes ont été analysées par condition : témoins sans infection (arrosage avec solution phosphatée), plantes infectées par *D. dianthicola* RNS04.9 (Ddi04.9) et plantes infectées par *D.solani* 3337 (Dsol3337). Une analyse statistique de Kaplan-Meier a permis de comparer les différents traitements pour chaque concentration conditions (analyse relative à la survie des plantes). Les différences statistiques sont indiqués par l'utilisation de lettres (écriture minuscule) à côté des DPC.

1.3.2 Génome des pathogènes ([Article 1](#))

Le génome de *D. solani* 3337 (=RNS08.23.3.1A), accessible sous le numéro d'accèsion no. AMYI000000000, a été publié dans *Genome Announcement* (Khayati *et al.*, 2014) et est présenté en annexe de ce chapitre II. Son génome se compose d'un chromosome circulaire, contenant 4923734 pb. La teneur en G+C est de 56%. La prédiction de gènes RAST révèle la présence de 4337 cadres de lecture.

Le génome de *D. dianthicola* RNS04.9 (numéro d'accèsion no. APVF000000000) est présenté dans l'article *Genome Announcement* ci-dessous. Cet article, accepté en avril 2015, a bénéficié des relectures critiques d'Yves Le Hingrat et Yves Dessaux (des Essarts *et al.*, 2015).

[*Article 1 : Genome sequence of the potato plant pathogen Dickeya dianthicola strain RNS04.9*](#)

Yannick Raoul des Essarts^{a,b}, Samuel Mondy^a, Valérie Hélias^{b,*}, Denis Faure^{a,*}

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS CEA University Paris-Sud, Saclay Plant Sciences, Gif-sur-Yvette, France^a; Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre–Recherche, Développement, Promotion du Plant de Pommes de Terre (FN3PT-RD3PT), Paris, France^b

Dickeya dianthicola is one of the causative agents of soft rot and blackleg diseases, which are currently identified in European countries in a wide range of crops. Here, we report the draft genome sequence of *D. dianthicola* strain RNS04.9, which was isolated from a potato plant with blackleg symptoms in 2004.

Pectinolytic bacteria of the genera *Pectobacterium* and *Dickeya* are causative agents of soft rot and blackleg diseases that affect a wide range of field crops and ornamental plants (1–5). In Europe, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya dianthicola*, and *Dickeya solani* are the main pectinolytic pathogens of potato in the field stage or during storage (6–8). Two *Dickeya* species emerged recently: *D. dianthicola* in the 1970s and *D. solani* in the 2000s (9). The pathogens may propagate from tubers to stems or leaves and reciprocally from aerial parts to progeny tubers (10–13).

Our team has already reported the genome sequences of other blackleg and soft rot diseases agents, *P. atrosepticum* strain CFBP6276 (14) and *D. solani* strain PRI3337 (15, 16). *D. dianthicola* strain RNS04.9 was isolated and characterized in 2004 from a potato plant with blackleg symptom sampled in a French field during the epidemiological annual survey monitored by the FN3PT/RD3PT. This strain has been investigated in several former studies (17–19) and used to develop a valuable greenhouse pathosystem, which allowed the assessment of a biocontrol strategy (20).

Genomic DNA of *D. dianthicola* RNS04.9 was subjected to next-generation Illumina HiSeq 2000 version 3 technology. Two libraries were constructed: a paired-end library with a fragment size of 150 to 500 bp and a shotgun long-jumping-distance mate pair library with an insert size of 8,000 bp. Sequencing of the libraries was carried out using a 2 x 100 bp paired-end read module by Eurofins Genomics. Assembly was performed by CLC Genomics Workbench version 5.5 (from CLCbio). Sequence reads were trimmed based on quality (threshold 0.05), and minimum size (above 60 nucleotides). Scaffolding of the contig was processed using SSPACE basic version 2.0 (21). A total of 46 contigs were generated by de novo assembly and clustered in 2 scaffolds. The first scaffold (3,366,760 bp) comprised 35 contigs, the 11 remaining ones being included in the second scaffold (1,343,990 bp). The *in silico* closure of some gaps was carried out by mapping (read length of 0.9 and similarity of 0.95) the mate pair reads on each of the 5-kbp contig ends. Following this treatment, 36 gaps were elucidated. Then, the collected reads were used for de novo local assembling (read length of 0.5 and similarity of 0.8). This allowed the generation of one scaffold with 10 gaps, from 28 bp to 3,271 bp in size. Some gaps were resolved by Sanger sequencing of PCR amplicons.

At the end, the genome sequence of *D. dianthicola* strain RNS04.9 revealed a circular chromosome consisting of 4,721,506 bp and comprised 7 contigs. No plasmid was detected.

The G+C content was ~56%. Gene prediction using the RAST version 4.0 automated pipeline (22, 23) revealed the presence of 4,351 coding sequences and 97 RNA-assimilated regions. These features are in accordance with other data of the *Dickeya* spp. genomes and draft genomes that are available in public databases.

Nucleotide sequence accession numbers. This draft genome sequence has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. APVF00000000. The version described in this paper is the first version, APVF01000000.

Acknowledgements

We thank the Centre national de la recherche scientifique (CNRS, France), Saclay Plant Sciences LABEX (ANR-10-LABX-0040-SPS and ANR-11-IDEX-0003-02), the Fédération Nationale des Producteurs de Plantes de Pomme de Terre (FN3PT/RD3PT), and the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT-CIFRE no. 1282/2011) for their financial support.

Y.R.D.E. also thanks Yves Le Hingrat (FN3PT) and Yves Dessaux (CNRS) for editing.

References

1. Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol **53**:381–391. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02423-0>.
2. Ma B, Hibbing ME, Kim H-S, Reedy RM, Yedidia I, Breuer J, Breuer J, Glasner JD, Perna NT, Kelman A, Charkowski AO. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. Phytopathology **97**:1150–1163. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-97-9-1150>.
3. Perombelon MCM, Kelman A. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. Annu Rev Phytopathol **18**:361–387. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.18.090180.002045>.
4. Pérombelon MCM. 1992. Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction and control. Neth J Plant Pathol **98**:135–146. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01974480>.
5. Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, 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, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol **55**:1415–1427. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0>.
6. Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, Swings J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Syst Appl Microbiol **21**:384–397. [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80048-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9).
7. Van der Wolf JM, Nijhuis EH, Kowalewska MJ, Saddler GS, Parkinson N, Elphinstone JG, Pritchard L, Toth IK, Lojkowska E, Potrykus M, Waleron M, de Vos P, Cleenwerck I, Pirhonen M, Garland L, Hélias V, Pothier JF, Pflüger V, Duffy B, Tsror L, Manulis S. 2014. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). Int J Syst Evol Microbiol **64**:768–774. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.052944-0>.
8. Van der Wolf M, J, De Boer H, S. 2007. Bacterial pathogens of potato, p 595–617. In Vreugdenhil D, Bradshaw J, Gebhardt C, Govers F, Mackerron DKL, Taylor MA, Ross HA (ed), Potato biology and biotechnology. Elsevier, Amsterdam.

9. Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, Tsrer Lahkim L, Elphinstone JG. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe: *Dickeya* spp. on potato in Europe. Plant Pathol **60**:385–399. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x>.
10. Czajkowski R, Pérombelon MCM, van Veen JA, van der Wolf JM. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. Plant Pathol **60**:999–1013. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>.
11. Czajkowski R, Grabe GJ, van der Wolf JM. 2009. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. Eur J Plant Pathol **125**:263–275. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-009-9480-9>.
12. Czajkowski R, de Boer WJ, van Veen JA, van der Wolf JM. 2010. Downward vascular translocation of a green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp.(biovar 3) from stem and leaf inoculation sites on potato. Phytopathology **100**:1128–1137. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-03-10-0093>.
13. Czajkowski R, de Boer WJ, Velvis H, van der Wolf JM. 2010. Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent proteintagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. Phytopathology **100**:134–142. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-100-2-0134>.
14. Kwasiborski A, Mondy S, Beury-Cirou A, Faure D. 2013. Genome sequence of the *Pectobacterium atrosepticum* strain cfbp6276, causing blackleg and soft rot diseases on potato plants and tubers. Genome Announc **1**(3):e00374-13. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00374-13>.
15. Khayi S, Mondy S, Beury-Cirou A, Moumni M, Helias V, Faure D. 2014. Genome sequence of the emerging plant pathogen *Dickeya solani* strain RNS 08.23.3.1A. Genome Announc **2**(1):e01270-13. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.01270-13>.
16. Pédrón J, Mondy S, des Essarts YR, Van Gijsegem F, 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. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-283>.
17. Hélias V, Hamon P, Huchet E, Wolf JVD, Andrivon D. 2012. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. Plant Pathol **61**:339–345. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02508.x>.
18. Crépin A, Barbey C, Beury-Cirou A, Hélias V, Taupin L, Reverchon S, Nasser W, Faure D, Dufour A, Orange N, Feuilloley M, Heurlier K, Burini J-F, Latour X. 2012. Quorum sensing signaling molecules produced by reference and emerging soft-rot bacteria (*Dickeya* and *Pectobacterium* spp.). PLoS One **7**:e35176. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035176>.
19. Crépin A, Beury-Cirou A, Barbey C, Farmer C, Hélias V, Burini J-F, Faure D, Latour X. 2012. *N*-Acyl homoserine lactones in diverse *Pectobacterium* and *Dickeya* plant pathogens: diversity, abundance, and involvement in virulence. Sensors **12**:3484–3497. <http://dx.doi.org/10.3390/s120303484>.
20. Cigna J, Raoul des Essarts Y, Mondy S, Hélias V, Beury-Cirou A, Faure D. 2015. Draft genome sequences of *Pseudomonas fluorescens* strains PA4C2 and PA3G8 and *Pseudomonas putida* PA14H7, three biocontrol bacteria against *Dickeya* phytopathogens. Genome Announc **3**(1): e01503–14. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.01503-14>.
21. Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W. 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. Bioinformatics **27**: 578–579. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq683>.
22. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. BMC Genomics **9**:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
23. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). Nucleic Acids Res **42**: D206–D214. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.

Microplaques Biolog	Puits	Substrat	Dsol3337	Ddi04.9
PM1 MicroPlate™ Carbon Sources	B10	Formic Acid	- ^a	+
	B12	L-Glutamic Acid	-	+
	C6	α -L-Rhamnose	-	++
	C12	Thymidine	-	+
	D6	α -Keto-Glutaric Acid	-	+
	D12	Uridine	-	+
	F2	Citric Acid	+	++
	G9	Mono Methyl Succinate	+	++
	G11	D-Malic Acid	+	++
PM2A MicroPlate™ Carbon Sources	A12	Pectin	++	+
	B5	D-Arabinose	++	-
	C7	β -Methyl-D-Galactoside	-	+
	F2	Malonic Acid	-	+
	F11	D-Tartaric Acid	-	++
PM3B MicroPlate™ Nitrogen Sources ^b	A5	Urea	++	-
	C3	D-Alanine	++	+
	D12	Agmatine	++	-
	E2	β -Phenylethyl- amine	+	-
	E3	Tyramine	++	-
	E11	N-Acetyl-D-Glucosamine	++	+
	F7	Guanosine	-	++
	G1	Xanthine	+	-
	G6	Parabanic Acid	-	++
	H6	Ala-Leu	++	+
	H7	Ala-Thr	++	-
	H12	Met-Ala	+	-
PM4A MicroPlate™ Phosphorus and Sulfur Sources ^b	A3	Pyrophosphate	++	-
	C5	2-Deoxy-D-Glucose 6-Phosphate	++	-
	C12	Cytidine- 3',5'-cyclic monophosphate	++	+
	E6	Phosphono Acetic Acid	-	++
	E8	Methylene Diphosphonic Acid	++	+
	E12	Thymidine 3',5'- cyclic monophosphate	-	+
	F2	Sulfate	++	-
	F3	Thiosulfate	+	-
	F4	Tetrathionate	+	-
	F5	Thiophosphate	++	-
	F6	Dithiophosphate	+	-
	G1	N-Acetyl-L-Cysteine	-	+
	G3	Cystathionine	+	-
	G4	Lanthionine	+	-
	G7	L-Methionine	+	-
	G9	Glycyl-L-Methionine	+	-
	G10	N-Acetyl-D,L-Methionine	+	-
	G11	L- Methionine Sulfoxide	-	+
	H3	1-Thio- β -D-Glucose	+	-
	H9	Butane Sulfonic Acid	+	-
PM9 MicroPlate™ Osmolytes	A3	NaCl 3%	++	-
PM10 MicroPlate™ pH	A11	pH 9.5	++	+
	A12	pH 10	++	-

Tableau 1 : Présentation des différences de capacités métaboliques entre *D. solani* 3337 et *D. dianthicola* RNS04-9. ^a : (-) substrat non métabolisé ; (+) faible capacité métabolique et (++) une capacité métabolique élevé (voir matériels et méthode pour plus de détails dans les mesures). ^b : pour tester les sources d'azote, de phosphore et de soufre il a été ajouté 20 mM de pyruvate de sodium comme source de carbone.

1.3.3 Etude métabolique

Les capacités métaboliques de *D. dianthicola* RNS04.9 et de *D. solani* 3337 ont été testées avec 190 composés carbonés (PM1 et PM2A), 95 composés azotés (PM3B), 60 composés phosphorés et 35 composés sulfatés (PM4A). Il ressort de ces expériences une différence de métabolisme entre Ddi04.9 et Dsol3337 pour 14 sources de carbone, 12 sources d'azote et 20 sources de phosphore et/ou soufre. Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau 1. Il est à remarquer que certains substrats tels que les osides, sont utilisés dans le criblage des sources de carbone. Ils sont métabolisés différemment d'une souche de *Dickeya* à l'autre. Par exemple, la souche Ddi04.9 métabolise très bien le L-rhamnose, ce qui n'est pas le cas pour la souche Dsol3337. Quant à Dsol3337, elle métabolise très bien la pectine ou encore le D-arabinose. Ces différences sont visibles également dans le métabolisme des sources azotées. L'urée est très bien métabolisée par la souche Dsol3337 alors que la guanosine est métabolisée par la souche Ddi04.9.

En plus, les croissances des deux souches de *Dickeya* ont été évaluées dans 96 conditions de pression osmotique (PM9) et dans 96 conditions de pH (PM10). En ce qui concerne la pression osmotique, *D. solani* 3337 résiste davantage que *D. dianthicola* RNS04.9 puisque ce dernier stoppe sa croissance quand le NaCl est supérieur à 3%. De la même manière, Dsol3337 possède la capacité de pousser dans une plus large gamme de pH que Ddi04.9, jusqu'à pH=9,5. Le pH acide critique pour les deux souches est évalué à pH=4,5 ; pH à partir duquel aucune des deux souches ne peut croître (non montré).

La collaboration avec F. Van Gijsegem et J. Pédrón a permis de réaliser une comparaison génomique des souches de *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 ; mais aussi de la souche modèle *D. dadantii* 3937 (Dda3937). La comparaison génomique a permis de corréler la présence ou l'absence de certaines régions génomiques avec certaines fonctions métaboliques propres à chacune des trois souches de *Dickeya*. La figure 3 (a) résume la

a	Région Génomique	Dda 3937	Dsol 3337	Ddi 04.09
	Transport et métabolisme de l'Urée	-	+	-
	Transport et métabolisme du Galactonate	-	+	+
	Transport et métabolisme du Rhamnose	-	-	+
	Transport et métabolisme de l'Arabinose	+	+	-

b	Source de Carbone ou Nitrogène	Dda 3937	Dsol 3337	Ddi 04.09
	Urée	-	++	-
	Galactonate	-	++	++
	Rhamnose	-	-	++
	Arabinose	++	++	-

Figure 3 : Confrontation des résultats obtenus dans l'étude génomique comparative (a) et l'étude métabolique menée grâce aux microplaques Biolog (b). La présence (+) ou l'absence (-) des régions génomiques propres à l'un ou l'autre des pathogènes, est montrée dans la partie « a » de la figure. Le tableau des capacités métaboliques (cf. tableau 1 du chapitre II) obtenu est résumé dans la partie « b » de la figure en fonction des régions génomique présentée dans la partie « a ». L'étude porte sur les différences entre *D. dianthicola* RNS04.9 (Ddi04.9) et *D. solani* 3337 (Dsol3337) et un *Dickeya* modèle étudié, *D. dadantii* 3937 (Dda3937).

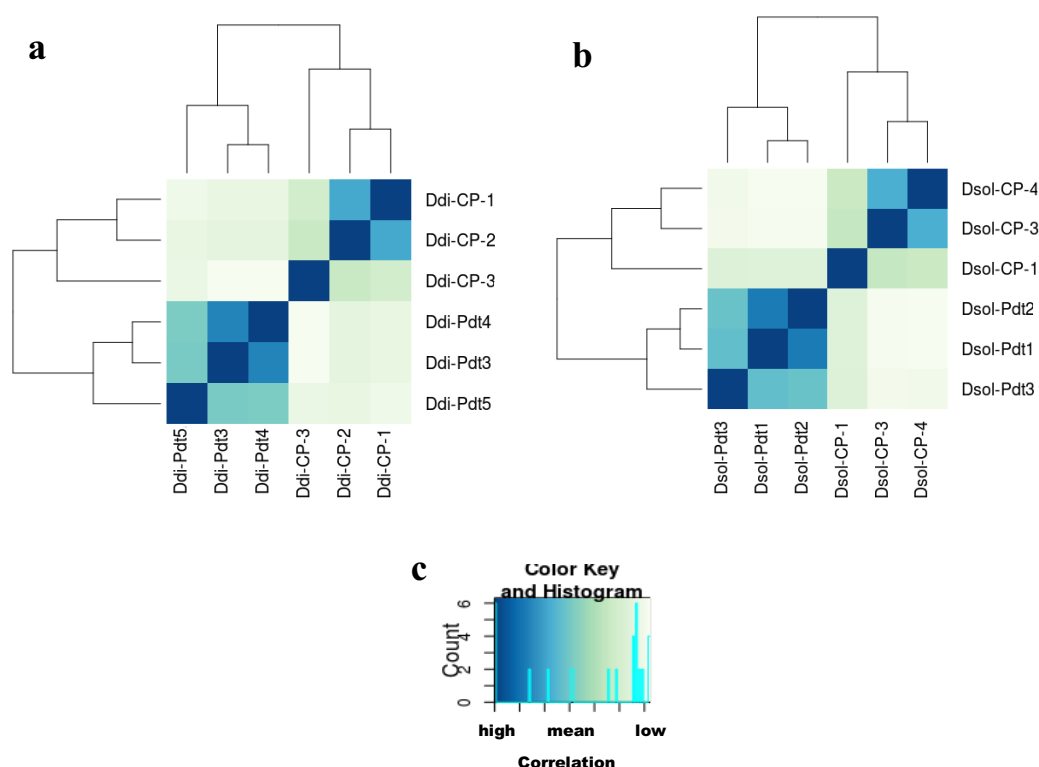


Figure 4 : Corrélation entre les 3 replicats biologiques pour chacune des deux conditions comparées (phase d'infection (Pdt) *versus* phase exponentielle de croissance (CP)) pour chacun des pathogènes, (a) *D.dianthicola* RNS04.9 (Ddi) et (b) *D. solani* 3337 (Dsol). Pour chaque bactérie, le numéro à côté de l'acronyme (identifiant de la bactérie et la condition) correspond au numéro donné au replicat biologique. Pour apprécier la corrélation entre chaque échantillon une valeur qualitative (dégradé de couleurs bleu à blanc) est apposée en fonction d'une échelle de corrélation (c).

comparaison génomique en ne faisant qu'apparaître les quatre régions génomiques les plus pertinentes pour l'étude. Notamment, la présence de gènes utiles au transport ou au métabolisme de l'urée, a été retrouvée uniquement chez Dsol3337 et la présence de gènes utiles au transport ou au métabolisme du rhamnose, n'a été retrouvée que chez Ddi04.9. De plus, des régions génomiques utiles au transport ou au métabolisme de l'arabinose sont présentes dans les souches de Dda3937 et de Dsol3337 tandis que celles nécessaires au transport ou au métabolisme du galactonate sont trouvées dans les souches de Dsol3337 et Ddi04.9. Ces observations sont corrélées avec les résultats de criblage métabolique obtenus pour chacune des souches grâce aux micro-plaques Biolog (montrés dans la figure 3 b).

1.3.4 Etude transcriptomique

Afin d'identifier quels gènes sont préférentiellement activés, lorsque *D. dianthicola* ou *D. solani* entrent dans un état de virulence (macération du tubercule), une étude transcriptomique a été menée en collaboration avec la plateforme de séquençage à haut débit d'Imagif. Il s'agit de comparer les gènes exprimés différemment dans deux états physiologiques chez Ddi04.9 et Dsol3337 ; en phase d'infection sur tubercules de pomme de terre *versus* en phase exponentielle de croissance d'une culture pure. Les analyses bioinformatiques réalisées par la plateforme révèlent d'abord une homogénéité des replicats biologiques entre eux dans chaque condition (figure 4). Ainsi, les ARN des replicats biologiques de Ddi04.9 en phase exponentielle de croissance en culture pure (Ddi-CP1, 2 et 3) sont homogènes et corrélables entre eux et n'interfèrent pas avec les ARN des replicats biologique de Ddi04.9 en phase de macération (Ddi-Pdt3, 4 et 5) ; et *vis-versa* (figure 4 a). Ces mêmes observations sont faites pour la souche Dsol3337 (Dsol-CP-1,3 et 4 et Dsol-Pdt1, 2 et 3) (figure 4 b). Le mélange des données obtenues pour chacun des trois replicats biologiques d'une condition peut être réalisé afin d'analyser les gènes différemment exprimés entre chaque condition pour chaque souche de *Dickeya* étudiée.

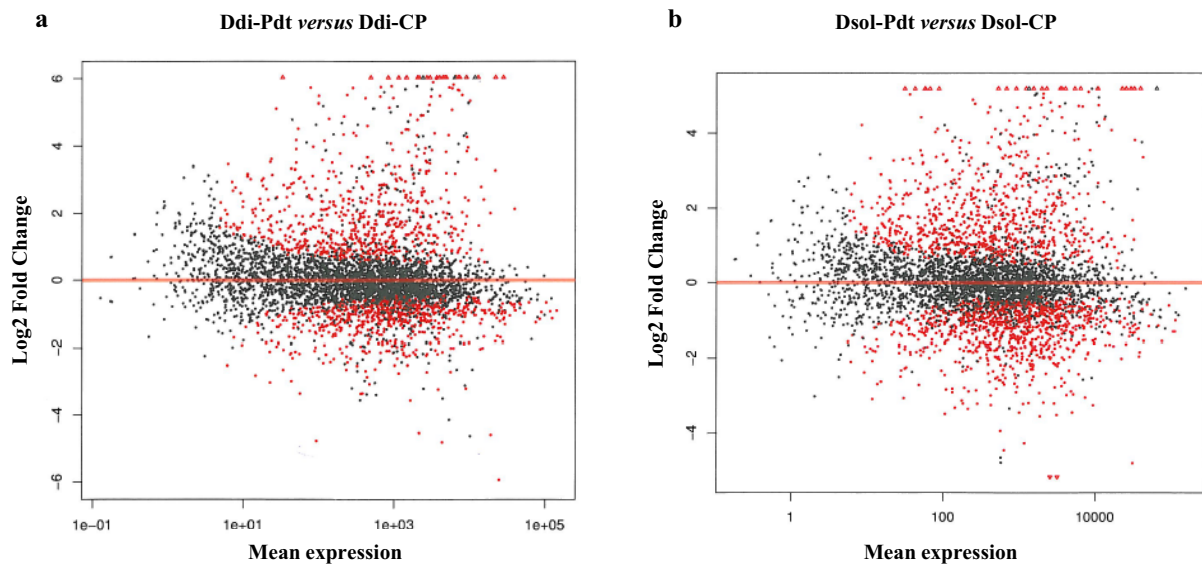


Figure 5: Profils des comparaisons d'expression de gènes sur- ou sous-exprimés entre (a) la condition *D. dianthicola* RNS04.9 en phase de virulence (D.di-Pdt) versus *D. dianthicola* RNS04.9 en phase exponentielle de croissance (D.di-CP) et (b) des mêmes conditions pour *D. solani* 3337 (Dsol-Pdt versus Dsol-CP). Un gène est représenté par un point ; un point rouge dans la partie de Log2 Fold Change positif pour la surexpression des gènes dans la conditions Pdt versus CP, un point rouge dans la partie de Log2 Fold Change négatif pour la sous-expression des gènes dans ces conditions ; enfin, les points noirs pour les gènes non différemment exprimés entre ces deux conditions.

Les résultats montrent ensuite que 299 et 456 gènes sont respectivement sous- et surexprimés chez Ddi04.9 en phase d'infection *versus* en phase exponentielle de croissance. De la même manière, 545 et 588 gènes sont respectivement sous- et surexprimés chez Dsol3337 en phase d'infection *versus* en phase exponentielle de croissance. Ces gènes sont identifiés grâce à un seuil de *p.value* fixé par la plateforme, *p.value* < 0,01. La figure 5, représente la comparaison d'expression des gènes, soit surexprimés (points de couleur rouge avec des Log2 *FoldChange* positifs) ou sous-exprimés (points rouges avec Log2 *Fold Change* négatifs) dans la condition en phase d'infection *versus* la condition en phase exponentielle de croissance, d'abord pour *D. dianthicola* RNS04.9 (figure 5 a) puis pour *D. solani* 3337 (figure 5 b).

Les 30 gènes sous-exprimés et les 30 surexprimés présentant les valeurs de *p.value* les plus faibles sont respectivement indiqués dans les tableaux 2 et 3 pour Ddi04.9 et respectivement dans les tableaux 4 et 5 pour la souche de Dsol3337. En particulier, les gènes codant pour les enzymes pectinolytiques (pectate lyase, pectinase, pectine lyase, hydrolase ou xylanase) sont surexprimées dans les deux bactéries en conditions d'infection. Ces enzymes sont d'ailleurs bien décrites dans la littérature pour jouer le rôle de facteurs de virulence chez les pathogènes responsables de pourriture molle. D'autre part, parmi les gènes sous-exprimés dans ces mêmes conditions, il apparaît surtout des gènes de transport ou utile au métabolisme de certains substrats. Il est à remarquer qu'une part de protéines hypothétiques sur- ou sous-exprimés est relevée dans chaque comparaison.

1.4 Conclusions du chapitre II

Ce chapitre II a permis de comparer la virulence de deux souches, *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337. Ces souches sont responsables de symptômes de pourriture molle sur tubercules (figure 1) et de jambe noire sur plantes (figure 2). Nous avons mis en évidence que Ddi04.9 est plus virulent sur plantes entières que Dsol3337 alors que sur tubercules, Dsol3337 apparaît comme plus virulent que Ddi04.9. Ces résultats confirment que les mêmes souches

peuvent avoir des effets de virulence différents en fonction des tissus de l'hôte affectés, ce que certaines études avaient déjà décrit (Hélias *et al.*, 2014 ; Gill *et al.*, 2014 ; Rouffange *et al.*, 2013 ; Laurila *et al.*, 2007).

Le séquençage de génomes a montré que Ddi04.9 est composé d'un chromosome circulaire de 4721506 bp, constitué de 7 contigs avec un G+C% de 56% et l'annotation par le logiciel RAST a permis de prédire 4351 ORF (des Essarts *et al.*, 2015). Quant à Dsol3337, son génome est un chromosome circulaire d'une taille de 4923734 pb, composé de 2 scaffolds partageant 11 contigs avec un G+C % = 56% et dont l'annotation du logiciel RAST révèle 4337 ORF (Khayl *et al.*, 2014). Ces deux *Dickeya* ne possèdent pas de plasmide.

La multiplicité des études sur Ddi04.9 et Dsol3337 (Crépin *et al.*, 2012a et b) permettent de bien connaître ces micro-organismes, et ainsi de les prendre comme des bactéries de références au sein du laboratoire. Le séquençage et l'annotation (par RAST) de leur génome, nous ont permis de réaliser une étude de génomique comparative, avec la collaboration de F. van Gijsegem et J. Pédon. La présence ou l'absence de 4 régions génomiques dans l'une ou l'autre des souches ont permis d'expliquer le métabolisme de l'urée, le galactonate, le rhamnose ou l'arabinose pour les souches étudiées. Des traits génétiques distinctifs entre Ddi04.9 et Dsol3337 ont été associés à des traits fonctionnels. Ceux distinguant Dsol3337 de *D. dadantii* 3937 ont été publiés dans l'article de Pédon *et al.* (2014).

Pour pousser plus loin le raisonnement et ainsi confirmer que la présence de régions génomiques permet bien d'expliquer les traits fonctionnels pris comme exemple dans la figure 3 entre Dsol3337 et Ddi04.9. Il serait judicieux de créer des mutants dans ces régions génomiques d'intérêt pour espérer modifier le phénotype associé. Selon les études de génomique comparative, la métabolisation de l'urée et l'arabinose par *D. solani* 3337 et celle du rhamnose par *D. dianthicola* RNS04.9 seraient des traits génétiques des espèces *D. solani* ou *D. dianthicola*. Ces sources de carbone et d'azote, peu coûteuses, ajoutées à un milieu de

culture minimum liquide ou gélosé peuvent alors permettre de distinguer spécifiquement les *D. dianthicola* des *D. solani*. Ces sources pourraient être à la base de milieu semi-selectif pour ces espèces de *Dickeya*. Au laboratoire, cette éventualité a été testée pour les 10 souches de *D. dianthicola* et les 10 souches de *D. solani* que nous possédons. Les résultats, non présentés ici, montrent que toutes les souches de *D. dianthicola* sont capables de pousser sur milieu minimum additionné de L-rhamnose (2 %). Ils montrent également que toutes les souches de *D. solani* sont capables de croître sur milieu minimum additionné de D-arabinose (2 %) comme source de carbone et d'urée (1 %) comme source d'azote.

Le début d'analyse des transcriptomes, réalisées sur les 30 premiers gènes différemment exprimés dans la condition de macération *versus* la condition de phase exponentielle de culture pure, révèle la surexpression de certaines enzymes de macération connues chez ces bactéries pour leur rôle dans leur phase de virulence (tel que la pectate lyase). Cette étude doit se poursuivre avec une confirmation par RT-PCR de la dérégulation de l'expression génique et par une analyse fonctionnelle plus poussée. Notamment, il serait envisageable de créer des bactéries mutantes dans les gènes identifiés comme activés en phase de macération. Ces mutants montreraient sans doute une diminution des symptômes de pourriture molle sur tubercules de pomme de terre, par rapport à ceux développés par une bactérie non mutée.

1.5 Annexe du chapitre II

Genome Sequence of the Emerging Plant Pathogen *Dickeya solani* Strain RNS 08.23.3.1A

Slimane Khayi,^{a,b} Samuel Mondy,^a Amélie Beury-Cirou,^c Mohieddine Moumni,^b Valérie Hélias,^d Denis Faure^a

Institut des Sciences du Végétal, CNRS, Gif-sur-Yvette, France^a; Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Meknès, Morocco^b; Comité Nord Plant de Pomme de Terre (CNPPT), Semences, Innovation, Protection Recherche et Environnement (SIPRE), Achicourt, France^c; Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre (FN3PT-RD3PT), UMT Innoplant (FN3PT-INRA), Le Rheu, France^d

S. K. and S. M. contributed equally to this work.

Here we present the genome sequence of *Dickeya solani* strain RNS 08.23.3.1A (PRI3337), isolated from *Solanum tuberosum*. *Dickeya solani*, recently described on potato cultures in Europe, is a proposed new taxon closely related to the *Dickeya dianthicola* and *Dickeya dadantii* species.

Received 30 December 2013 Accepted 6 January 2014 Published 30 January 2014

Citation Khayi S, Mondy S, Beury-Cirou A, Moumni M, Hélias V, Faure D. 2014. Genome sequence of the emerging plant pathogen *Dickeya solani* strain RNS 08.23.3.1A. *Genome Announc.* 2(1):e01270-13. doi:10.1128/genomeA.01270-13.

Copyright © 2014 Khayi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Denis Faure, faure@isv.cnrs-gif.fr.

Bacteria belonging to the *Dickeya* genus cause soft rot disease on a wide range of plants (1, 2), particularly on ornamentals (*Dianthus*, *Dahlia*, *Kalanchoe*, *Pelargonium*, *Chrysanthemum*, *Parthenium*, *Dieffenbachiae*, and *Stenotaphrum*) and crops (chicory, banana, sunflower, rice, artichoke, pineapple, tomato, banana, maize, and potato). Infection is characterized by the maceration of plant tissues due to degradation of pectin, the major component of primary cell walls in plants (3). The resulting symptoms on potato stems are named blackleg and soft rot on tubers. On this plant host, disease symptoms caused by *Dickeya* spp. are similar to those caused by *Pectobacterium atrosepticum*. Three main *Dickeya* species, *D. dadantii*, *D. zeae* and *D. dianthicola*, were previously described on potato. A new taxon, tentatively named *D. solani*, has been recently identified largely in Europe and beyond (4). The *D. solani* strain RNS 08.23.3.1A (PRI3337) was isolated from potatoes in France in 2008 (5).

Here we report the *de novo* genome assembly of *D. solani* strain RNS 08.23.3.1A using Illumina HiSeq 2000 v3 technology. Two libraries were constructed using the TruSeq SBS v3 sequencing kit, a shotgun (SG) paired-end library with a fragment size of 150 to 500 bp and a long-jumping-distance (LJD) mate-pair library with an insert size of 6,000 bp. The two libraries were sequenced using the 2×100-bp paired-end read module by Eurofins Genomics (France). Assembly of the sequences was carried out by use of the software CLC Genomics Workbench (v5.1) from CLC bio. Sequence reads with low-quality (limit 0.05), ambiguous nucleotides ($n \leq 2$) and sequence lengths of <30 nucleotides were dropped for assembly. In total, 5,682,625 mate-pair and 52,496,166 paired-end reads were obtained, corresponding to 419,377,725 and 4,903,141,904 bases, respectively. The average length was 73.8 bp for the mate-pair reads and 93.4 bp for the paired-end reads. The *de novo* assembly (length fraction, 0.5; similarity, 0.8) generated 42 contigs (>2,000 bp) with an average coverage of 1,075-fold. The average length of the contigs was 121,605 bp, and the largest contig was 483,425 bp, with an N_{50}

contig size of 299,659 bp. Scaffolding of the contigs was processed using SSPACE basic v2.0 (6). Two scaffolds with gaps from 367 bp to 4,771 bp in size were obtained. For finishing, the gaps were closed by the mapping of mate pairs using as reference the 5 kbp from each of the contig ends (read length, 0.9; identity, 0.95). Then, using homemade script and fastqselect.tcl from the MIRA3 package, the mapped reads for both orientations (R1 and R2) were retrieved and *de novo* assembled (read length, 0.5; identity, 0.8). The remaining gaps were resolved by Sanger sequencing of PCR amplicons.

The assembled genome of *D. solani* strain RNS 08.23.3.1A is composed of one circular chromosome, containing 4,923,734 bp. The G+C content was 56.11%. Gene prediction using the RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) v4.0 automated pipeline (7) revealed the presence of 4,337 open reading frames.

Nucleotide sequence accession numbers. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number [AMY1000000000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AMY1000000000). The version described in this paper is version AMY101000000.

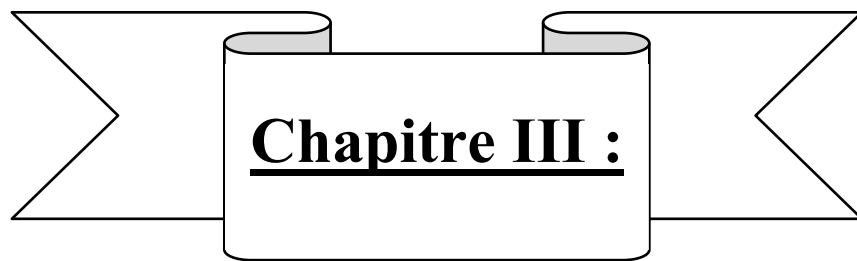
ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a cooperative project between France and Morocco (PRAD 14-02, Campus France no. 30229 ZK) and a collaborative project between CNRS, FN3PT, and CNPPT-SIPRE.

REFERENCES

- Burkholder WD, McFadden LA, Dimock AW. 1953. A bacterial blight of chrysanthemums. *Phytopathology* 43:522–526.
- Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, Gardan L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(Pt 4):1415–1427. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0>.

3. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Nasser W, Reverchon S. 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:213–257. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.213>.
4. Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Pirhonen M, Tsrer L, Elphinstone JG, Hélias V. 2011. *Dickey a* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Rev. Plants Pathol.* 60:385–399. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x>.
5. Hélias V. 2012. Jambe noire: evolution des souches et risques associés. *Pomme Terre Fr.* 580:48–49.
6. Boetzer M, Henkel CV, Jansen HJ, Butler D, Pirovano W. 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics* 27(4): 578–579. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq683>.
7. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.



**Stratégie de lutte biologique ciblant les
pathogènes responsables de jambe noire et de
pourriture molle sur *S. tuberosum***

Stratégie de lutte biologique ciblant les pathogènes responsables de jambe noire et de pourriture molle sur *S. tuberosum*

1.1 Situation des travaux

Comme rappelé dans la partie introductive, les bactéries pectinolytiques appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* induisent des symptômes de la jambe noire au champ et de pourriture molle sur tubercules lors du stockage des pommes de terre. A ce jour, seuls les moyens de prophylaxie permettent de limiter les pertes économiques (plusieurs millions d'euro ; Prins et Breukers, 2008 lu dans Toth *et al.*, 2011) qui affectent les producteurs de plants de pommes de terre. Depuis 2008, une réduction de l'utilisation d'intrants chimiques en agriculture a été entreprise. Elle devra atteindre 50% en 2025 pour la production de pommes de terre. Ces nécessaires changements des pratiques agricoles justifient l'importance de recherches actuelles de stratégies alternatives.

La FN3PT/RD3PT et ses organisations de producteurs (OP) ont ainsi lancé plusieurs projets de recherches afin de mettre en place des stratégies de bio-protection des cultures de plants de pomme de terre en France. Les relevés d'épidémio-vigilance (V. Hélias, FN3PT/RD3PT) révèlent 4 espèces prédominantes responsables des maladies de jambe noire ou pourriture molle au champ, *P. atrosepticum* (Pa), *P. carotovorum* subsp *carotovorum* (Pcc), *D. dianthicola* (Ddi) et depuis peu *D. solani* (Dsol) (Hélias *et al.*, 2008 ; Van der Wolf *et al.*, 2014).

En 2007, la SIPRE/CNPPT en collaboration avec le CNRS (laboratoire d'accueil) a choisi de développer une stratégie de bio-protection basée sur l'anti-virulence de Pa (Cirou *et al.*, 2007), alors agent pathogène responsable des principales pertes financières de la filière du plant français (thèse A. Cirou, 2007-2010). Cette stratégie de biocontrôle favorise la croissance des rhizobactéries capables de dégradant les NAHL produites par Pa, qu'elles

soient indigènes ou introduites (*R. erythropolis* R138) dans la rhizosphère de pommes de terre (Cirou *et al.*, (2007). Le travail de thèse présenté dans ce chapitre, s'intègre dans les projets de recherche menés au sein de la FN3PT/RD3PT sur *Pectobacterium* et *Dickeya* et fait suite au travail d'A. Beury-Cirou.

Son objectif est une nouvelle approche complémentaire reposant sur l'antibiose de tous les agents pectinolytiques associés aux maladies de jambe noire et de pourriture molle en France. Pour ce faire, quatre pathogènes récemment isolés de symptômes au champ par V. Hélias (recensement 1998 à 2008) ont été sélectionnés pour être étudiés. Les critères de sélection étaient : (i) souches isolées récemment de symptômes au champ, (ii) la pomme de terre comme hôte, (iii) implication du QS dans la virulence, (iv) espèces de pathogènes différentes. Ces pathogènes ont permis de cribler et d'évaluer l'efficacité d'isolats bactériens naturels (isolés du sol ou de tissus végétaux) contre les maladies de jambe noire et pourriture molle. Ces études de lutte biologique, ont permis de mettre au point des pathosystèmes *in-vitro* et en serre. Ces derniers permettent le criblage et l'évaluation de l'efficacité d'agents de lutte biologique contre les pathogènes étudiés.

1.2 Contributions aux travaux

Les différentes OP ont fourni le matériel végétal pour les expérimentations en serre (tubercules de *var.* Bintje, *cal.* 28/35, qualité : SE ou A). Les souches pathogènes (*Pectobacterium* et *Dickeya*) ont été fournies par V. Hélias (collection FN3PT/RD3PT) ou issues de la collection nationale CFBP (Angers). Les bactéries de lutte biologique sélectionnées et appartenant aux genres, *Pseudomonas* ou *Bacillus* sont décrites dans cette étude (*cf.* tableau 1, *Material and Methods* article 2, des Essarts *et al.*, *submitted*). L'ensemble des souches sont devenues disponibles au cours de ces travaux dans l'ensemble des 3 laboratoires partenaires du projet. Ces travaux ont fait l'objet d'une collaboration étroite entre 3 infrastructures nécessitant de travailler sur 3 lieux différents ; la RD3PT au sein de l'INRA

de Rennes (Le Rheu, France) et la SIPRE/CNPPT (Achicourt, France) possédaient les infrastructures et le matériel nécessaires à la réalisation des travaux sous serre (dont le terreau stérilisé et le sol naturel issu d'un champ). Tandis que le laboratoire d'accueil, était compétent dans les analyses moléculaires et le traitement des données bioinformatiques et l'analyse des résultats.

Au cours de ces travaux, j'ai eu la chance de co-encadrer Angélique Quêtu-Laurent (technicienne RD3PT) avec V. Hélias (RD3PT) et Aline Caron (stage master 2 SIPRE) puis Euphrasie Munier (stage d'école d'ingénieur SIPRE) avec A. Beury-Cirou (SIPRE-Achicourt).

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article soumis au journal « *Applied and Environmental Microbiology* (AEM) » dont le texte a bénéficié des relectures critiques d'Yves Le Hingrat et d'Yves Dessaux. Ce chapitre sur article est précédé de la mise au point du pathosystème utilisé pour étudier l'efficacité des agents de biocontrôle en serre.

1.3 Mise au point de pathosystèmes en serre (pathogène-plante-sol)

L'objectif de cette mise au point était double : (i) développer un ou des protocoles efficaces et reproductibles de contaminations artificielles, définis pour le pathogène modèle du laboratoire, *D. dianthicola* RNS04.9 ; (ii) utiliser le mode d'inoculation artificielle le plus adapté afin de mettre au point un pathosystème sur plante entière en serre (pathogènes, plante et sol) afin d'évaluer l'efficacité de stratégies de lutte biologique (présentes ou futures) contre *D. dianthicola*.

1.3.1 Matériel et méthodes

1.3.1.1 Bactéries et conditions de culture

La souche bactérienne utilisée pour cette mise au point est la souche *D. dianthicola* RNS04.9, dont les informations sur le génome ont été données dans le chapitre II précédent (des Essarts *et al.* 2015). Elle est cultivée sur milieu TY (bactotryptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L avec

ajout de 1,5 % d'agar ou non) à 30°C et sous agitation (200 rpm) quand il s'agit de la cultiver en milieu liquide. Le lavage des bactéries après culture se réalise par centrifugation (14000 rpm, 20 min) puis resuspension du culot bactérien dans une solution phosphatée 0,01X. L'ajustement à une concentration bactérienne souhaitée se réalise dans cette solution phosphatée à l'aide d'une lecture spectrophotométrique à DO600 nm (0,2 UA à DO 600nm = 10^8 UFC/mL).

1.3.1.2 Pathosystèmes en serre

Les expériences en serre ont été conduites sur le site de l'INRA du Rheu. Les conditions réglées en serre étaient : photopériode de 16h avec une température de 25°C le jour et de 20°C la nuit (variété de pomme de terre Bintje, de classe SE et de calibre 28/35 cm). Chaque tubercule a été planté dans des pots de 16 cm de diamètre contenant 1 kg de terreau. Le terreau reconstitué (60% de tourbe brune, 40 % sable et 40 kg/m³ d'argile) est stérilisé et le pH est neutre. Pour prévenir les déficiences physiologiques éventuelles de la plante en cours d'essai, une solution d'engrais (Hakaphos, Compo Expert) a été apportée selon les recommandations du fournisseur toutes les deux semaines.

Trois modes d'inoculation du pathogène ont été évalués pour cette étape. Chacun des modes d'inoculation a été réalisé avec deux concentrations différentes en pathogène. Ces modes d'inoculation ont été choisis en fonction d'études préliminaires menées au sein de la FN3PT/RD3PT et des articles disponibles dans la littérature scientifique au moment de la mise au point (Czajkowski *et al.*, 2010 a et b et 2011). Ces procédures d'inoculation sont les suivantes : (i) inoculation sur tubercules par trempage dans une suspension bactérienne préalablement ajustée à deux concentrations définies 10^4 et 10^6 UFC/mL (trempage 2 h, séchage 2 h) avant plantation des tubercules en pot. Pour les deux autres modes d'inoculation il a été choisi l'inoculation par arrosage du sol rhizosphérique 3 semaines après plantation grâce à des suspensions bactériennes, soit directement (ii) avec des concentrations de 10^7 ou

Modes d'inoculation (20 plantes/condition)	Concentration en pathogène	Pourcentage de symptômes au point final (Ddi RNS04.9)
(i) Trempage des tubercules	10 ⁴ UFC/ mL	Ø
	10 ⁶ UFC/ mL	Ø
(ii) Inoculation par arrosage du sol	10 ⁷ UFC/pot	JN (20%)
	10 ⁹ UFC/pot	JN (35%)
(iii) Inoculation par arrosage du sol après blessure des racines	10 ⁵ UFC/pot	JN (30%)
	10 ⁷ UFC/pot	JN (80%)

Tableau 1 : Résumé des résultats pour la mise au point des pathosystèmes avec *D. dianthicola* RNS04.9. L'objectif est de définir des conditions optimales d'inoculations permettant d'obtenir des taux de symptômes reproductibles et permettant d'évaluer des stratégies de biocontrôle contre ce pathogène. Mots clef : Ddi RNS04.9 : *Dickeya dianthicola* RNS04.9 ; JN (%) taux de symptômes de Jambe Noire observé en fin d'expérimentation ; Ø Aucun symptôme de Jambe Noire.

10^9 UFC/pot ; soit après avoir blessé les racines par scarification (iii) avec des concentrations de 10^5 ou 10^7 UFC/pot (tableau 1).

L'annotation visuelle des symptômes au cours du temps s'effectue 2 fois par semaine dès l'apparition des premiers symptômes.

1.3.1.3 Détection de l'agent pathogène dans les tubercules de semence utilisés et dans les symptômes observés

Avant la mise en place de l'essai en serre, il est habituel de tester la présence d'éventuelles pathogènes responsables de la jambe noire sur le lot des tubercules commandés. De la même manière, après l'essai en serre les symptômes de jambe noire et pourriture molle sont analysés pour corréler les symptômes à la présence du pathogène inoculé. Les détections par PCR sont effectuées à l'aide des couples d'amorces suivantes : ADE1/2 (Nassar *et al.*, 1996) pour la détection des *Dickeya*, Y1/2 pour la détection des *Pectobacterium* spp. (Darrasse *et al.*, 1994) et Y45/46 pour la détection des *P. atrosepticum* (Frechon *et al.*, 1998). La mise en œuvre de la PCR associée à chaque couple d'amorces est décrite dans l'article cité correspondant.

1.3.2 Résultats

Un résumé de l'ensemble des résultats obtenus pour chaque mode d'inoculation du pathogène et pour chacune des concentrations testées est présenté dans le tableau 1.

1.3.2.1 Modalité d'infection par trempage des tubercules :

Dans cette modalité, il a été relevé une fréquence élevée de non levée des tubercules plantés (75%). Cette observation est vraie pour toutes les modalités testées y compris les témoins. Les tubercules non levés étaient pourris mais les tests de détection des pathogènes par PCR, réalisés sur certains d'entre eux, ne révèlent pas de rapport entre la non levée et la présence des pathogènes. Les conditions en serre utilisées pour favoriser le développement de symptômes de jambe noire et de pourriture molle ont sans doute également favorisé une

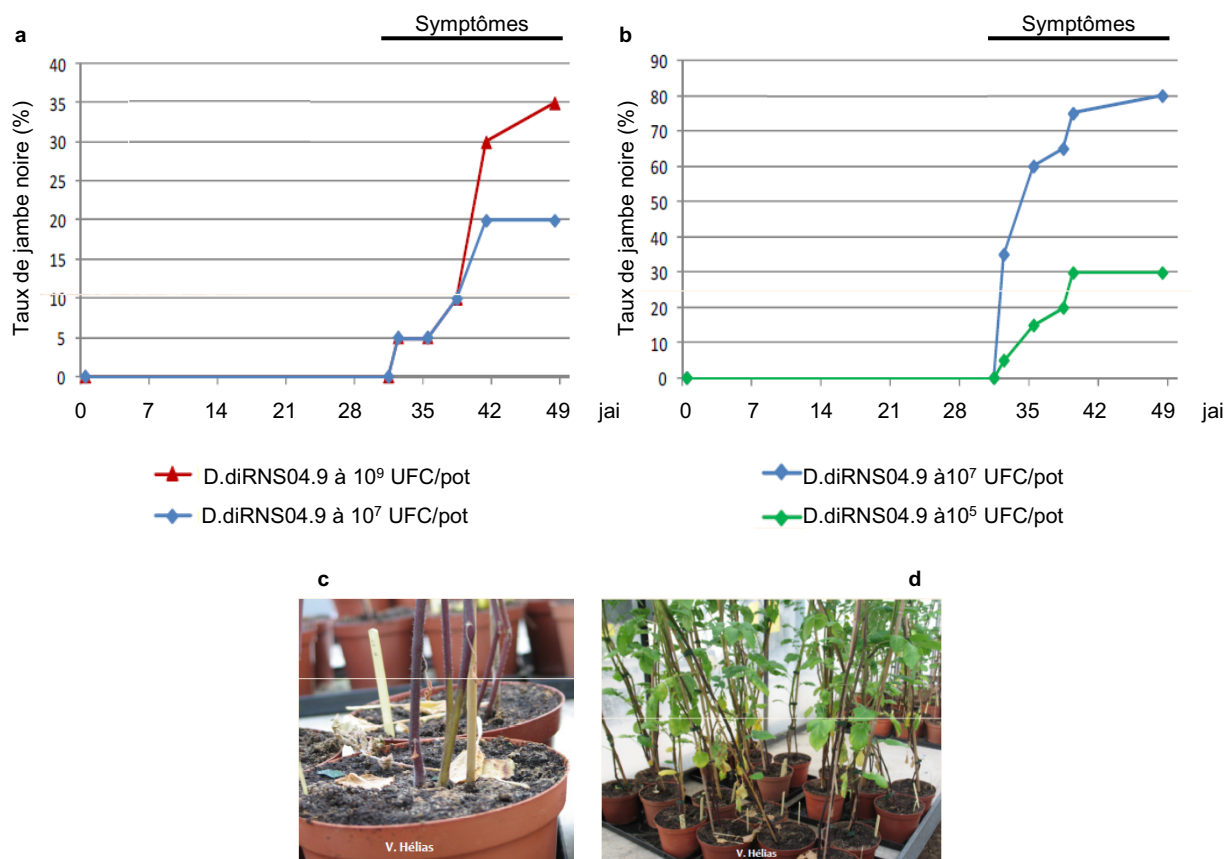


Figure 1 : Cinétique de relevés de symptômes de la maladie de la jambe noire ou associés (jaunissements et/ou flétrissements) sur plantes (a et b), pour la modalité d'inoculation par arrosage direct de la rhizosphère avec deux concentrations de *D. dianthicola* RNS04.9 (a) ou après avoir blessé les racines (b). Le symptôme de jambe noire caractéristique de la maladie, visuellement observé en serre, est présenté en (c), tandis que les symptômes associés à cette maladie sont présentés en (d). *Mots clef :* DdiRNS04.9 : *Dickeya dianthicola* RNS04.9 ; jai : jours après inoculation du pathogène.

atmosphère asphyxiante néfaste au développement physiologique des tubercules plantés (humidité élevée et terre argileuse).

1.3.2.2 Modalités d'infection par arrosage de la rhizosphère (direct ou après blessure des racines)

L'observation des symptômes au cours du temps, révèle l'apparition des premiers symptômes de jambe noire (base de tiges humides et décolorées ; figure 1 c) ou associés à cette maladie (jaunissement ou flétrissement des feuilles supérieures de la plante ; figure 1 d) 4 semaines après inoculation du pathogène. Cette observation est vraie quelque soit la concentration en pathogène inoculé. Les analyses de détection par PCR réalisées sur les plantes symptomatiques, tubercules mères ou fils, révèlent la présence du pathogène inoculé et corréler ainsi la maladie déclarée et la présence du pathogène. L'incidence de la maladie est variable selon la modalité étudiée, le maximum de symptômes (80% de jambe noire) est par exemple obtenu pour la plus forte concentration en *Dickeya* inoculé après avoir blessé les racines. Le minimum, est lui obtenu pour la modalité inoculation du sol par arrosage direct avec la plus faible concentration en pathogène, soit 20% de jambe noire. Il est montré que l'apparition des symptômes évolue de manière exponentielle dans le temps (figure 1 a et b) et qu'à concentration équivalente (10^5 UFC/pot), 4 fois plus de symptômes sont présents lorsque l'arrosage est apporté après avoir blessé les racines des plantes. D'autre part, l'évolution des symptômes de jambe noire causés par *D.dianthicola* RNS04.9 apparait comme dépendante de la concentration en pathogène inoculée.

1.3.3 Bilan de la mise au point

Après analyse des symptômes de jambe noire déclarés dans les trois modalités d'inoculation testées, il est à remarquer que seul un des pathosystèmes utilisant une inoculation avec le pathogène *D.dianthicola* RNS04.9 par un arrosage du sol avec 100 mL d'une suspension bactérienne peut être retenu. Parmi les deux solutions d'infection par *D.dianthicola* RNS04.9

testées, nous avons choisi de continuer notre étude avec un pathosystème permettant d'apporter le pathogène par une méthode proche des conditions naturelles d'infection et permettant un niveau final de symptômes acceptable pour mettre en place une analyse statistique. Le pathosystème retenu est celui qui permet d'apporter directement le pathogène par arrosage du sol avec une forte concentration (10^9 UFC/pot).

Le développement de symptômes de jambe noire dans les conditions utilisant la souche de *D. dianthicola* RNS04.9 confirme et valide l'agressivité de cette souche sur plantes de pomme de terre (souche issue de symptômes de jambe noire au champ en 2004 et déclaration de ces mêmes symptômes une première fois en serre ; cf. chapitre II).

1.4 Article 2 : Biocontrol of the potato blackleg and soft-rot disease caused by *Dickeya dianthicola*

Yannick Raoul des Essarts^{a,b}, Jeremy Cigna^{a,c}, Angélique Quêtu-Laurent^{b,d}, Aline Caron^c, Euphrasie Munier^c, Amélie Beury-Cirou^c, Valérie Hélias^{b,d,#}, Denis Faure^{a,*}

^aInstitut for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS CEA Université Paris-Sud, Saclay Plant Sciences, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

^bRecherche Développement Promotion du Plant de Pomme de Terre-Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre (RD3PT-FN3PT), Rue de Naples, 75008, Paris, France

^cSeeds Innovation Protection Research Environment/ Comité Nord Plants de Pomme de Terre (SIPRE/CNPPT), Rue des champs Potez, 62217 Achicourt, France

^dUMR 1349 IGEPP INRA - Agrocampus Ouest Rennes, 35653, Le Rheu, France

*Corresponding author E-mail: faure@isv.cnrs-gif.fr

Centre National de la Recherche Scientifique

Institut des Sciences du Végétal, UPR2355

1, Avenue de la Terrasse

91 198 Gif-sur-Yvette, France

Phone: +33 (0)1 69 82 35 77; Fax: +33 (0)1 69 82 36 95

#Corresponding author E-mail: valerie.helias@fnpppt.fr

FN3PT/RD3PT

UMR 1349 IGEPP INRA - Agrocampus Ouest Rennes

35653 Le Rheu France

Phone +33 (0)2 23 48 51 86; Fax +33 (0)2 23 48 51 80

Abstract

Development of protection tools targeting *Dickeya* species is an important issue for potato production. Here, we present a molecular microbial ecology approach for the identification and characterization of novel biocontrol agents. Successive screenings of 10 000 bacterial

isolates allowed us to retain 58 strains that exhibited growth inhibition properties against *Dickeya* and/or *Pectobacterium*. Most of them belonged to the *Pseudomonas* and *Bacillus* genera. *In-vitro* assays revealed a fitness decrease of the *Dickeya* and *Pectobacterium* pathogens in the presence of the tested biocontrol agents. In addition, four independent greenhouse assays showed that a mix of three biocontrol agents, *P. putida* strain PA14H7 and *P. fluorescens* PA3G8 and PA4C2 strains repeatedly decreased the severity of blackleg symptoms on potato plants as well as the transmission of *D. dianthicola* to tuber progeny. This work highlights the use of a combination of biocontrol strains as a potential tool for limiting the soft rot and blackleg diseases that are induced by *D. dianthicola* on potato plant and tuber.

Keywords: *Pectobacterium*; *Dickeya*; soft rot and blackleg diseases; greenhouse assessment; *Pseudomonas* and *Bacillus* protective agents.

1.4.1 Introduction

The *Pectobacterium* and *Dickeya* pectinolytic bacteria are phytopathogens responsible for several macerating diseases on a wide range of crops and ornamental plants (1–3). The damages caused by these pathogens remain an important issue in many countries worldwide. In Europe, the main pectinolytic pathogens on potato crops are *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *D. dianthicola* and *D. solani* (4–8). Recently, new subspecies of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* have been identified as causing blackleg and soft rot potato diseases, such as *P. wasabiae* et *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* which represented consequent damages in some european countries, these last 10 years (2, 9, 10). While *Pectobacterium* populations are qualified as endemic as their presence was observed since almost a century in Europe, the *Dickeya* species emerged more recently: *D. dianthicola* in the 1970's and *D. solani* in the 2000's (3).

Pectobacterium and *Dickeya* pathogens induce the blackleg and soft-rot diseases on the aerial part of the plant and in tuber, respectively (11, 12). The symptoms caused by these different

species cannot be distinguished by visual inspection. In addition, strains of different *Pectobacterium* and *Dickeya* species may be isolated from a same sample of symptomatic plant tissues because mix infections by *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Dickeya* spp. can occur (13). The pathogens may propagate vertically from tubers to stems or leaves and reciprocally from aerial parts of the plant to its progeny tubers. Pathogens penetrate in plant hosts through pores (lenticels or stomata), elongation zone of stolon and roots, mechanical wounds as well as wounds induced by insects and worms. Animals and insects act as vectors, surface water and aerosols may also contribute to the dissemination of the pathogens (12, 14–21).

While literature data on taxonomy, epidemiology and structural and functional genomics of the *Pectobacterium* and *Dickeya* potato pathogens are steadily increasing, the plant-protection toolbox remains undeveloped. No fully-resistant potato accession is available, although some of them appeared as less sensitive to the pathogens (22–24). A major preventive approach consists in planting healthy seed-potato tubers, and discarding contaminated lots. A few studies investigated some preventive and curative methods using physical or chemical treatments of tuber seeds, plant defense elicitors and biocontrol agents (14, 25, 26). Different biochemical and biological agents have been proposed for the control of pectinolytic bacteria on the potato host: plant defense elicitors (synthetic and natural chemicals), natural predators (bacteriophages and bacteria), bacterial competitors and quorum-quenching bacteria.

Elicitation of plant defence responses against the pectinolytic bacteria has been investigated on tobacco and potato plants, the ornamental plant Calla Lily as well as *Arabidopsis thaliana*. Different natural and synthetic compounds such as salicylic acid, alpha-elicitins and galactan polysaccharides have been tested (27–31). Salicylic acid decreased the soft rot symptoms induced by *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* as well as the bacterial proliferation in *N. tabacum* and *A. thaliana* (27, 28). A similar protection was obtained with uncharacterized

compounds derived from a native Korean plant species (27). Salicylic acid also reduced blackleg symptoms and proliferation of *D. solani* in potato plant host growing *in vitro* (29). Three elicitors and a galactan-based complex polysaccharide induced the plant defence response, as well as a decrease of the soft rot symptoms provoked by *P. atrosepticum* on potato tubers assay. These compounds were extracted from concentrated culture filtrate of another potato pathogen, *Phytophthora infestans* (30). However, biocontrol bacteria are also able to synthesize plant defense elicitors (32). As an example, the *Bacillus* sp. strain BS107 produces the plant defence elicitor 2-aminobenzoic acid (33).

The predator-prey paradigm was investigated using bacteria and bacteriophages as predators. *Bdellovibrio bacteriovorus* is a motile delta-proteobacterium that preys on other gram negative bacteria (34). When *P. atrosepticum* and *B. bacteriovorus* were co-inoculated, a weak control of the soft rot agent was observed in a potato tuber-slice assay (from Epton *et al.*, 1990 quoted in (14)). More studies analyzed the lytic activity of bacteriophages against *Pectobacterium* and *Dickeya*. The PP1 bacteriophage that belongs to the *Podoviridae* family was tested *in-vitro* against a few *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* strains. Bacteriophage PP1 decreased the incidence of the soft rot disease caused by *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* on lettuce plant (35). Some bacteriophages of the *Myoviridae* family (named as Φ D1 to Φ D11) were able to lyse several *Dickeya* strains (but none of the tested *Pectobacterium* strains) and to limit tissue maceration in a potato tuber assay (36). The bacteriophages LIMEstone1 and LIMEstone2 belonging to *Myoviridae* family also reduced the disease incidence and severity on potato tubers in laboratory assays. In a field tests, the use of a phage treatment on *D. solani*-infected tubers led to an observed increased yield of the harvested tuber progeny (37).

An antibiosis activity directed at the pectinolytic bacteria has been reported in several bacterial competitors belonging to the *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia* and *Lactobacillus* or

Lactococcus genera. Most of them were isolated with the aim at controlling the *Pectobacterium* endemic populations rather than the emerging *Dickeya* pathogens. The antagonistic properties of lactic acid bacteria such as *L. lactis*, *L. mesenteroides* and *Weissella cibaria* were tested only in pure culture and were attributed to the production of hydrogen peroxide (38). These same bacteria were also tested *in-vitro* and in storage conditions to growth control of the *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* pathogen (39, 40). The other biocontrol strains were tested either in potato tuber assays *in-vitro*, or in greenhouse assays or in field trials. In a pioneer field assay, the application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) permitted to limit the level of pathogenic populations on the potato roots as well as the percentage of daughter tubers that were infested by *P. carotovorum* (41). Some *Pseudomonas* and *Bacillus* strains are able to reduce *Pectobacterium* and *Dickeya* growth and virulence in potato tuber assays by producing siderophore and antibiotics (42, 43). The endophytic *Serratia plymuthica* strain A30 inhibited tissue maceration caused by *D. solani* in potato slice assay, reduced the blackleg incidence and decreased the density of *Dickeya* population in control greenhouse conditions (44). Other compounds directed at the potato postharvest blemish diseases were found to also control *P. atrosepticum* *in-vitro* such as the natural plant volatile compounds, 2E-hexenal (45) or the chitin derivative, chitosan (46). These compounds have antimicrobial properties that limit the growth of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* *in-vitro* and in storage combined with one of the three biocontrol agent, *B. subtilis*, *P. fluorescens* or *Trichoderma viridi* (47).

Last, some bacteria are able to inactivate the extracellular quorum-sensing signals *N*-acylhomoserine lactones that control or modulate the expression of virulence factors in *Pectobacterium* and *Dickeya* (48–50). These quorum-quenching bacteria do not antagonize the growth of *Pectobacterium* and *Dickeya*. They belong to the *Delftia*, *Ochrobactrum*, *Bacillus* and *Rhodococcus* genera. They exhibited potato tuber-protection *in-vitro* (51–53).

Table 2: Bacterial strains.

Name	Isolation year	Sources and References*
Plant pathogens:		
<i>D. dianthicola</i> RNS04.9	2004	V. Hélias/FN3PT' and RD3PT' collection; ((49)(50))
<i>D. solani</i> 3337	2008	V. Hélias/FN3PT' and RD3PT' collection; ((49)(50)(61)(62))
<i>P. atrosepticum</i> CFBP6276	1999	CFBP; ((63))
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> RNS98.1	1998	V. Hélias/FN3PT' and RD3PT' collection; ((49)(50)(62))
Biocontrol agents:		
<i>B. simplex</i> BA2H3	2011	
<i>P. brassicacearum</i> PA1G7	2011	
<i>P. brassicacearum</i> PP1-210F	2010	
<i>P. fluorescens</i> PA3G8	2011	In this study
<i>P. fluorescens</i> PA4C2	2011	
<i>P. putida</i> PA14H7	2010	

*CFBP: French collection of plant pathogenic bacteria (Angers, France); FN3PT and RD3PT: Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre and Recherche, Développement et Promotion du Plant de Pomme de Terre (France).

Colonization of the potato plant roots by quorum-quenching *R. erythropolis* isolates may be enhanced using the growth-stimulating agents that gamma-caprolactone and gamma-heptalactone (54–56). As an alternative to quorum-quenching biological agents, a few chemical and natural compounds that exhibited a quorum-sensing inhibition activity have been identified and tested mainly against *Pectobacterium* in *in-vitro* test or potato tuber assays (57–60).

In this study we combined microbiological and molecular and genomic tools to isolate novel biocontrol agents directed at members of the *Dickeya* and *Pectobacterium* species. We evaluated their protective effect against the *D. dianthicola*-induced soft rot and blackleg diseases as well as pathogen transmission to the tuber progeny in repeated greenhouse assays over a three year-period. This work led us to propose a combination of biocontrol *Pseudomonas* strains to increase the robustness and reproducibility of the plant protection effect.

1.4.2 Material and Methods

1.4.2.1 Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains are listed in Table 2. All of them were routinely cultivated in TY medium (bactotryptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L, agar 15 g/L) at 30°C for the *Dickeya* strains and at 25°C for the other bacteria. Tryptic soy agar (TSA) medium was used to isolate bacteria from environmental samples.

1.4.2.2 Isolation of bacterial strains from environmental samples

In 2010 and 2011, environmental samples (rhizospheric soils, asymptomatic plant tissues, and blackleg and soft rot infected tissues) were collected from several potato fields by the French regional associations of seed potato growers which are Bretagne-plant (Hanvec, 29-France), Comité Centre & Sud (CCS, Laurière 87-France) and Comité Nord Plants de Pomme de terre (CNPPT, Achicourt, 62-France). One gram (fresh soil or tissues) of each sample was mixed with 10 mL of isotonic saline solution (NaCl 8 g/L) and 100 µL of the appropriate dilutions

were spread onto TSA plates and incubated from 24 to 48h at 25°C. Around 10 000 bacterial isolates were picked from the TSA plates, inoculated in liquid TY in 96-microwells and then incubated at 25°C during 48h.

1.4.2.3 Screening for antagonistic activity against *Dickeya* and *Pectobacterium* pathogens

Two successive screenings were performed on agar plates. The first one was performed on the 10 000 isolates which were cultivated in 96-microwell-plates. One drop (10 µL) of the bacterial cultures was spotted on square Petri plates (120 x 120 mm) which were previously inoculated by 300 µL of the *P. atrosepticum* CFBP6276 or *D. dianthicola* RNS04.9 cell suspensions (3.10^5 CFU/mL). After incubation at 25°C during 24h and 48h, the bacterial growth inhibition zone was measured.

In the second screening, all bacterial isolates that exhibited growth inhibitory property on of one of the two tested pathogens were retested against *P. atrosepticum* CFBP6276 and *D. dianthicola* RNS04.9 and were also tested against two other pathogens *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* RNS98.1 and *D. solani* 3337 according a similar growth-inhibition assay. The bacterial isolates that exhibited growth inhibitory activity against *Pectobacterium* or *Dickeya* were individually stored in 25% glycerol solution at -80°C.

1.4.2.4 Screening for bioprotection on potato tubers

The isolates that exhibited growth inhibitory activity of *Pectobacterium* and *Dickeya*-in the agar plate assay were tested for bioprotection in a potato tuber maceration assay. Potato tubers were surface sterilized with a bleach solution (1,3 % of active chlorine) and cut into slices (1,0 cm in thickness). A well (4 mm diameter, 2 mm depth) was digged into the tuber slice. Each slice (4 replicates per condition) was inoculated with 20 µL from a isotonic saline solution washed-culture of each of the pathogens (*P. atrosepticum* CFBP6276, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* RNS98.1, *D. dianthicola* RNS04.9 and *D. solani* 3337) which had been grown alone or in the presence of the tested biocontrol agents (1/1 ratio) in

TY medium for 24h. The infected slices were incubated at 25°C during 36h. The measurement of the maceration-zone diameters allowed a determination of 3 qualitative symptom categories: no maceration, medium maceration, strong maceration of the tuber tissues.

1.4.2.5 Calculation of the absolute fitness value (*W*) in competition assays

TY medium (5 mL) was inoculated with each of the rifampicin-resistant derivatives of the pathogens *P. atrosepticum* CFBP6276, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* RNS98.1, *D. dianthicola* RNS04.9 and *D. solani* 3337 at a final concentration of 10⁶ cfu/mL in the absence or presence of the biocontrol bacterial agents which were added at a 1/1 ratio. Experiments were performed in triplicate. Bacterial enumerations on TY agar plates supplemented with rifampicin (100 µg/mL) were performed at the inoculation time ($N_{t=0}$) and final time after 24h incubation at 25°C ($N_{t=24}$). Fitness value (*W*) of the pathogens was calculated according the formula $W = N_{t=24} / N_{t=0}$. For each of the pathogens, the *W* values were compared using Kruskal and Wallis's test ($\alpha = 0.05$). Then a pairwise comparison's test was performed ($\alpha = 0.05$) using the package Rcmdr (R software).

1.4.2.6 Genus identification of the antagonist strains by *rrs*-sequencing

The *rrs* gene of the antagonist isolates was amplified using the universal bacterial *rrs* primers (pA 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG and pH 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA previously reported in (64)). The amplicon was sequenced by GATC-Biotech company (Germany, <http://www.gatc-biotech.com/fr/index.html>) and the *rrs*-sequences were analyzed using the Ribosomal Database Project website (<http://rdp.cme.msu.edu/>) and Blastn program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

1.4.2.7 Multi-locus sequence analysis of the biocontrol agents

Draft genomes of the 6 characterized biocontrol agents *P. brassicacearum* strains PP1-210F (AYJR000000000) and PA1G7 (JBON000000000), *P. fluorescens* strains PA4C2

(AXDA000000000) and PA3G8 (JBOO000000000), *P. putida* strain PA14H7 (JBOP000000000) and *B. simplex* strain BA2H3 (AXBR000000000) have been previously published (65, 66). A Multi-locus sequence analysis (MLSA) of the four concatenated housekeeping genes *gyrB* (2418 pb), *recA* (1053 pb), *rpoB* (4074 pb) and *rrs* (1536 pb) was performed using ClustalW for sequence alignment, MEGA V6 for phylogeny, and the neighbor-joining method for tree construction (67). Sequences of the other bacteria were collected from the NCBI data base and the accession number of each of them was presented in the figure 3.

1.4.2.8 Strain-specific qPCR primers for detecting pathogenic and biocontrol strains

Strain-specific primers were developed for monitoring by qPCR the biocontrol *Pseudomonas* strains PA3G8, PA4C2 and PA14H7. Using CLC Genomics Workbench 5.5, Illumina reads (from 9 to 12 Millions of reads) of each of the *Pseudomonas* strains were mapped against the genomes of the other strains found in NCBI database (Length fraction=0,5 and Similarity=0,8). The unmapped reads were collected and assembled in contigs which represented the strain-specific regions. Several couples of primers were designed using Primer3web version 4.0.0 and their specificity was tested by PCR on bacterial strains. All strain-specific primers were designed to amplify a DNA-fragment of ca. 200 bp in length. Finally, promising candidates were evaluated for qPCR with a LightCycler 480 System (Roche Life Science) with total DNAs extracted from soils which were inoculated with known concentrations of the targeted bacterium. Primers generating a non-specific or a weak amplification were not retained. We finally selected primers 33aF, 5'-TTCGGAGCTTTGCCAGGAAT and 33aR, 5'-TGCCTCATCGAAACACTGCT for detecting PA4C2, 1bF, 5'-ACCAAGACAGCCCTACTCCT and 1bR, 5'-CCGACTCTTGACCCGTGATA for PA3G8, and 1cF, 5'-CTGAAAGCCCACTCATGTGCG and 1cR, 5'-CAACACAGGGAAACACAGCA for PA14H7. A similar procedure was developed for the identification of strain-specific primers of the pathogen *D. dianthicola*

RNS04.9 using the genomes of two *D. dianthicola* found in NCBI database: NCPBP 3534 (PRJNA202755) and GBBP 2039 (PRJNA202756), the *D. solani* 3337 strain (61) and the *P. atrosepticum* CFBP6276 strain (63) for the mapping step. We eventually selected primers Ddi5bF, 5'-GGGTCAGGAGATGTTTTTCGC and Ddi5bR, 5'-TGGGACTCATGTATACCGGC for the detection of *D. dianthicola* RNS04.9. The qPCR-detection thresholds were 610 for *D. dianthicola* RNS04.9, and 700, 820 and 390 DNA copy/g of dry soil for the *Pseudomonas* strains PA3G8, PA14H7, and PA4C2, respectively.

1.4.2.9 Greenhouse assays

During 3 years (2012-2014), four independent plant protection assays were performed in two different greenhouses: one located at the INRA-FN3PT experimental site (UMT Inno-plant, Le Rheu, Brittany) and the other at the SIPRE-CNPPT experimental site (Achicourt, Nord-Pas-de-Calais). The assays were named according their location and year: B1 and B2 (2012 and 2013 in Brittany, respectively) and N1 and N2 (2013 and 2014 in Nord-Pas-de-Calais, respectively). All assays were conducted under similar conditions, long day (16h) and day (25°C) and night (20°C) temperatures, using the same cultivar (i.e. Bintje) and class (Super Elite, length 28-35 cm) of *S. tuberosum* seed tubers (CNPPT, Achicourt). Each tuber was planted in a pot (16 cm in diameter) containing 1 kg of soil. In Brittany assays B1 and B2, we used a reconstituted heated soil (neutral pH) that was a mixture of brown peat (60%), sand (40%) and clay (40 kg/m³ of the total mass prepared), while in the Nord-Pas-de-Calais assays N1 and N2, a field soil (2/3) mixed with sterilized-sand (1/3) was used. For N1 and N2 experiments, the characteristics of the soil was clay-silt (70% of silt, 19% of clay and 11% of sand) and neutral pH (6.8). To prevent soil deficiencies, the fertilizer Hakaphos was added 20 days after the plant emergence, according to the recommendation of the solution provider (Compo Expert® ; 500 mL per tray of a diluted powder solution 1:5, w:v).

In each assay (B1, B2, N1 and N2), six conditions were compared: uninfected plants, plants infected with *D. dianthicola* RNS04.9 alone and in combination with each of the biocontrol strains PA3G8, PA14H7 and PA4C2, and a mixture of them at 1:1:1 ratio. In each condition, 20 plants were used. Three weeks after tuber plantation (100% of plants emergence), the pathogen *D. dianthicola* RNS04.9 was inoculated at 10^9 CFU/plant by watering the pots with 100 mL cell suspension adjusted at 10^7 CFU/mL by spectrophotometry.

The biocontrol agents were introduced three times. Before plantation, tubers were immersed in a cell suspension at 10^8 CFU/mL during two hours, then air dried at room temperature during two hours. Then two weeks after plantation and 4 days after pathogen infection, the biocontrol strains were inoculated at 10^{10} CFU/plant by watering with 100 mL cell suspension at 10^8 CFU/mL.

1.4.2.10 Survey and analysis of the blackleg symptoms in greenhouse assays

Twice a week, the blackleg symptoms were noted by visual observation and analyzed according to Andrivon *et al.* (68) and to Rouffiangue *et al.* (69). A disease progress curve (DPC) was plotted and used to measure the delay (Δt in days) between the emergence of the first symptoms in the presence vs. absence of the biocontrol agents. In addition, the DPC curves allowed calculation of the areas under the disease progress curve (AUDPC). AUDPC values were divided by experiment duration in days for calculating AUDPC relative values (or AUDPCr values). Then, a ratio between AUDPCr values in the presence vs. absence of the biocontrol agents was used for comparing the different conditions. We evaluated data homogeneity between B1 and B2 assays and between N1 and N2 assays using Levene's test (alpha, R). Then, each parameter (Δt and AUDPCr ratio) were analyzed by ANOVA's test ($\alpha = 0.05$) and pairwise comparison's test ($\alpha = 0.05$) using the R software.

1.4.2.11 Detection of pathogenic populations in the tuber progeny in greenhouse assay

At the end of the B2 and N2 greenhouse assays, all the asymptomatic tubers were collected from the asymptomatic plants. All the tuber samples of a same plant were pooled together and tested for the presence of the pathogen *D. dianthicola* RNS04.9 using the strain-specific primers Ddi5bF and Ddi5bR and the *Dickeya*-specific primers ADE1 and ADE2 (70). Data were analyzed using the Fisher's statistical test ($\alpha = 0.05$).

1.4.2.12 Monitoring of the pathogenic and biocontrol soil populations in greenhouse assays

In the course of the B2 and N2 greenhouse assays, soil samples (n=3) were collected before plantation, before pathogen inoculation (about 23 days), after the last introduction of the biocontrol agents (about 37 days), and after the last symptom-observation. One gram of the soil was weighted and placed in 2 mL-Eppendorf tube. 300 μ L of lysozyme (25mg/mL) was added and samples were incubated 30 minutes at 37°C in a water bath. A few ceramic beads were added in the tube and the sample was homogenized 5min thanks to the Bead Beater tool (Mixer Mill MM 400, Retschat) at a maximal speed. Then, the extraction kit (Macherey-Nagel® NucleoSpin Soil kit) was used following the supplier recommendations. Finally, the DNA was resuspended in 30 μ L of TE buffer pH 7,5 (Tris-HCL, 10mM; and EDTA, 1mM). Quantity and quality of the extracted DNA were analyzed using a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer and by migration in agarose gel (1%, w/v).

The strain-specific primers-couples (see above) for the detection of the biocontrol strains *Pseudomonas* PA4C2 (33aF-33aR), PA3G8 (1bF-1bR) and PA14H7 (1cF-1cR) and the pathogen *D. dianthicola* RNS04.9 (Ddi5bF-Ddi5bR) were used. A qPCR sample mix was prepared as follows: 8.5 μ L of Master Mix (Roche) were vortexed with 3 μ L of the specific forward primer (0.2 μ M) and 3 μ L of the specific reverse primer (0.2 μ M). Half a microliter of extracted DNA was added to the preparation of qPCR mix. The following qPCR program

was initiated with a denaturation step (10 min at 95 °C), followed by 40 cycles (15s at 95 ° C, 15s at 60 °C, 20s at 72 °C). A melting step was next performed for 15s at 95°C, 30s at 60°C and finally a fluorescence-read step continuously from 60s to 95 ° C was performed to assess the dissociation characteristics of double stranded DNA during heating. This last step determined the melting temperature (T_m). Analysis of the data was performed with qPCR-480 Lightcycler software (Roche). The population dynamics were plotted as copy number of DNA per gram of dry soil.

1.4.2.13 Conversion of results from qPCR biocontrol or pathogenic populations monitoring of the greenhouse assays

The raw results of qPCR were expressed in g/μL and corresponded to the DNA concentration of the amplified product, noted [P_{PCR}] in the formula below. Initially, it was necessary to convert [P_{PCR}] in number of DNA copies per μL of reaction medium (named as [DNA_c]), using the formula given below. Where *Na* is the Avogadro number value equal to 6,02.10²³; MM_{ADN} is the average molecular weight of a DNA base pair equal to 660 g/mol and T_{PCR} is the genome size corresponding in base pair unit. Genome sizes were 4 721 506 bp, 6 210 847 bp, 6 391 599 bp and 5 878 513 bp for *D.dianthicola* RNS04.9, *Pseudomonas* strain PA4C2, PA3G8, and PA14H7, respectively (done by RAST annotation-database tool).

$$[DNA_c] = \frac{Na \times [P_{PCR}]}{MM_{ADN} \times T_{PCR}}$$

Finally, a second conversion had to be done. [DNA_c] was converted into the number of DNA copies per gram of dry soil (noted as [DNA_{soil}]) according to the formula below where V_{ef} is the final volume after DNA extraction , i.e. 30 μl (see above) and W_{soil} is the weight of dry soil deduced for the experiment.

$$[DNA_{soil}] = [DNA_c] \times \left(\frac{V_{ef}}{W_{soil}} \right)$$

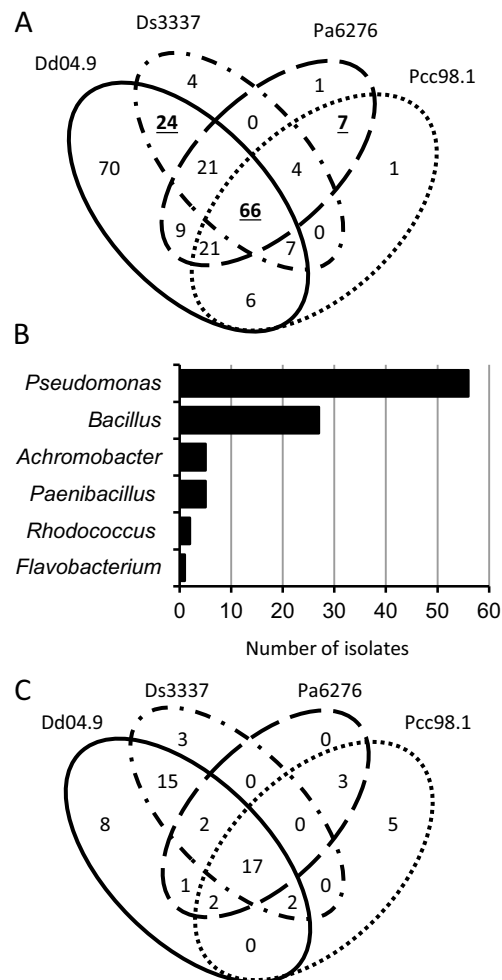


Figure 2 : Identification of the *Dickeya*- and *Pectobacterium*-antagonistic strains.

A. Distribution (Venn's diagram) of the 241 isolates according their capacity of growth-inhibition against *D. dianthicola* RNS04.9 (Dd04.9), *D. solani* 3337 (Ds3337), *P. atrosepticum* CFBP6276 (Pa6276) and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* RNS98.1 (Pcc98.1). The underlined numbers indicate the isolates which were characterized by *rrs*-sequencing. B. Distribution of the 96 isolates according their genus identification. C. Distribution (Venn's diagram) of the 58 isolates according their capacity of limiting symptoms induced by each pathogen in potato tuber assays.

To achieve a dry soil weight, the fresh soil weighed initially was dried 65 ° C during 48h and soil moisture was calculated. W_{soil} is expressed in gram of dry soil.

1.4.3 Results

1.4.3.1 Identification of the *Dickeya*- and *Pectobacterium*-growth inhibiting bacteria

Environmental samples (rhizospheric soil, and healthy or symptomatic plant tissues) were collected in the course of 11 different campaigns of sampling which were conducted by the regional potato seed associations (Bretagne Plant, CNPPT and CCS). Each sample were spread onto TSA medium and contained about 3.10^8 CFU/g of fresh plant tissues or rhizospheric soil. Ca. 10 000 of these environmental isolates have been screened for antagonistic activity against *P. atrosepticum* CFBP6276 and *D. dianthicola* RNS04.9. Among them, 241 isolates (2.4% of the screened isolates) exhibited the capacity to inhibit the growth of one or two of the tested pathogens.

In a second round of tests, antagonistic activity of these 241 isolates was confirmed using *P. atrosepticum* CFBP6276, *D. dianthicola* RNS04.9, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* RNS98.1 and *D. solani* 3337. Most of these growth-inhibiting isolates (93% of them) were active against *D. dianthicola* RNS04.9, whereas 46 to 54% of them were able to inhibit at least one of the three other pathogens (Figure 2A). Remarkably, 66 isolates (27%) exhibited growth-inhibitory properties against all the four pathogens.

From the 241-isolate collection, a sub-set of 96 bacterial isolates was retained according to their efficiency and capability to inhibit at least two phytopathogens (Figure 2A). All these 96 isolates were identified by *rrs*-sequencing. Most of them belonged to the *Pseudomonas* (59%) and *Bacillus* (28%) genera (Figure 2B).

1.4.3.2 Bacterial isolates reduced the soft-rot symptoms on potato tubers

Each of the 96 *rrs*-identified isolates was inoculated alone and in presence of each of the four pathogens *D. dianthicola* RNS04.9, *D. solani* 3337, *P. atrosepticum* CFBP6276 and *P.*

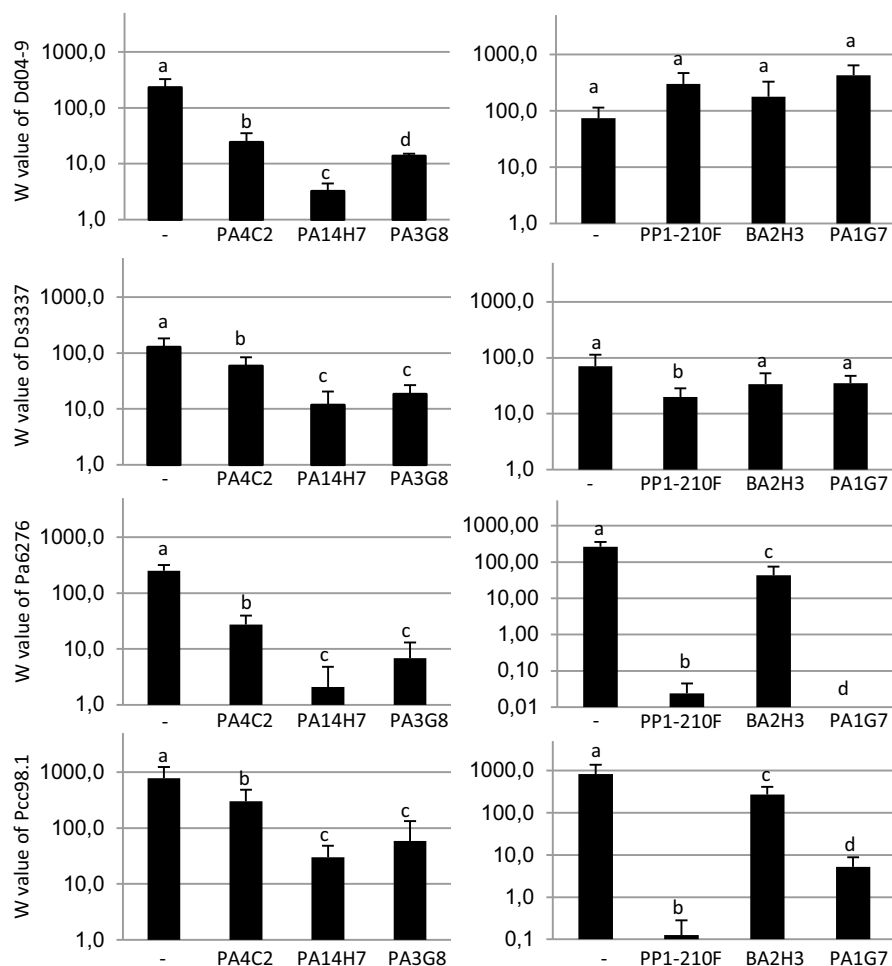


Figure 3: Pathogen fitness in the presence and absence of the growth-inhibiting strains.

The means of absolute fitness (W) of the pathogens (from the top, Dd04.9, Ds3337, Pa6276 and Pcc98.1) were calculated in the absence (-) or presence of the bacterial strains PA4C2, PA14H7 and PA3G8 (left panels) and PP1-210F, BA2H3 and PA1G7 (right panels). Significantly different W values (Kruskal & Wallis's test then pairwise comparison test $\alpha=0.05$) were indicated by distinctive letters.

carotovorum subsp. *carotovorum* RNS98.1 on tuber slices. When inoculated alone, 25% of the 96 tested strains induced an alteration of the plant tissues. Some others (15% of the 96 tested strains) were not able to reduce the pathogen-induced soft-rot symptoms. Hence, these bacterial isolates were not retained for further experiments.

In contrast, 58 isolates (60% of the 96 tested strains) reduced the soft-rot symptoms due to at least one of the four phytopathogens. The antagonistic range of these 58 isolates is shown in the Figure 2C. Among them, we selected three bacterial strains, namely PA3G8, PA14H7 and PA4C2 which reduced the *Dickeya*-induced symptoms (with *D. dianthicola* RNS04.9 and/or *D. solani* 3337). We also retained three other strains, BA2H3, PA1G7 and PP1-210F, which antagonized the *Pectobacterium*-induced symptoms (with *P. atrosepticum* CFBP6276 and/or *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* RNS98.1). It should be noticed that the strains PA3G8, PA14H7 and PA4C2 also reduced the *Pectobacterium*-induced symptoms.

1.4.3.3 Fitness decrease of the phytopathogens in co-culture assay

Absolute fitness value (W) of the four *Dickeya* and *Pectobacterium* phytopathogens was calculated in the absence and presence of each of the six bacterial isolates PA3G8, PA14H7, PA4C2, BA2H3, PA1G7 and PP1-210F (Figure 3). The antagonistic bacteria PA4C2 and especially PA3G8 and PA14H7 strongly reduced the fitness of all the tested *Dickeya* and *Pectobacterium* pathogens in liquid co-culture assays. In contrast, the antagonistic bacteria BA2H3, PA1G7 and PP1-210F affected the fitness of the *Pectobacterium* pathogens only. These results are consistent with the growth inhibition assays in agar plates and the symptom development evaluation in tuber assays (Figure 2).

1.4.3.4 MLSA-characterization of the biocontrol agents

Draft genomes of the *Pseudomonas* strains PA3G8, PA14H7, PA4C2, PA1G7 and PP1-210F and *Bacillus* strains BA2H3 (66) were used for MLSA-characterization with four housekeeping genes *gyrB*, *recA*, *rpoB* and *rrs*. The isolates BA2H3 is proposed to belong the

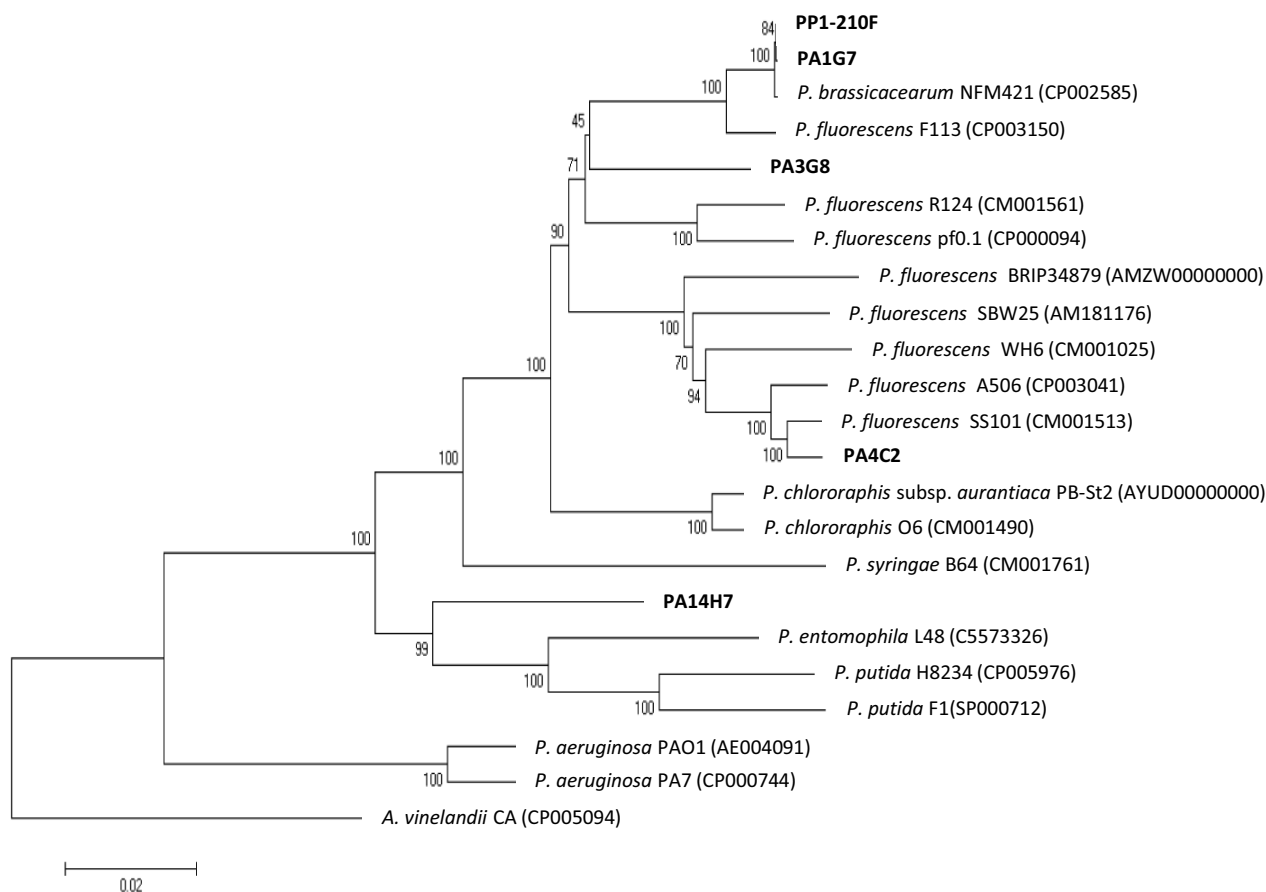


Figure 4 : MLSA-based relation tree of the *Pseudomonas* strains.

Concatenated *gyrB*, *recA*, *rpoB* and *rrs* genes were used to construct a relation tree of the *Pseudomonas* antagonistic strains PA3G8, PA14H7, PA4C2, PA1G7 and PP1-210F and several well-identified strains of the *Pseudomonas* genus. An *Azotobacter* strain is used to rooting the phylogenetic tree. The sequences were aligned with ClustalW, and then a Neighbour-joining tree was created. The accession numbers of the NCBI sequences are indicated in the brackets.

B. simplex species, while PA14H7 to *P. putida*, PA4C2 and PA3G8 to *P. fluorescens* and PP1-210F and PA1G7 to *P. brassicacearum* (Figure 4).

1.4.3.5 Blackleg-symptom reduction by the biocontrol agents PA3G8, PA14H7 and PA4C2

Over three years (2012-2014), four independent experiments (B1, B2, N1 and N2) were conducted in two greenhouses located in Brittany and Nord-Pas-de-Calais (Figure 5). In all these experiments, no symptom occurred in the control condition, i.e. when the plants were not infected by the pathogen (dark lines in the DPC, Figure 5). In contrast, *D. dianthicola* RNS04.9 induced symptoms among up to 80% of the plants in Brittany experiments B1 and B2 and up to 45% in the Nord-Pas-de-Calais experiments N1 and N2 (red lines in the DPC, Figure 5). It should be noticed that a reconstituted soil was used in Brittany assays, while a native field soil mixed with sand was used in the Nord-Pas-de-Calais assays. In the presence of the biocontrol strains, variations in DPC were analyzed using the Δt and AUDPCr ratio.

In the Brittany experiments B1 and B2, the Levene's test indicated that AUDPCr ratios were not homogeneous in the case of the strain PA14H7, and that the Δt values were also not homogeneous in the case of the strains PA3G8 and PA4C2. However, the values (<1) of the AUDPCr ratio indicated a decrease blackleg-symptom kinetics in the presence of a mixture of the 3 biocontrol agents PA3G8, PA14H7 and PA4C2 although when inoculated alone, these three strains did not reduce the blackleg-symptom kinetics. In addition, the Δt values were consistently higher when the PA14H7 was introduced alone and when all the three agents were simultaneously introduced.

In the Nord-Pas-de-Calais experiments N1 and N2, the Levene's test indicated that AUDPCr ratios were homogeneous under all compared conditions. Moreover, all the AUDPCr ratios (<1) revealed a decrease blackleg-symptom kinetics. However, the Levene's test indicated that none of the Δt values were homogeneous between the two experiments N1 and N2. The Δt values only increased in the experiment N2 in the cases of the introduction of the strains

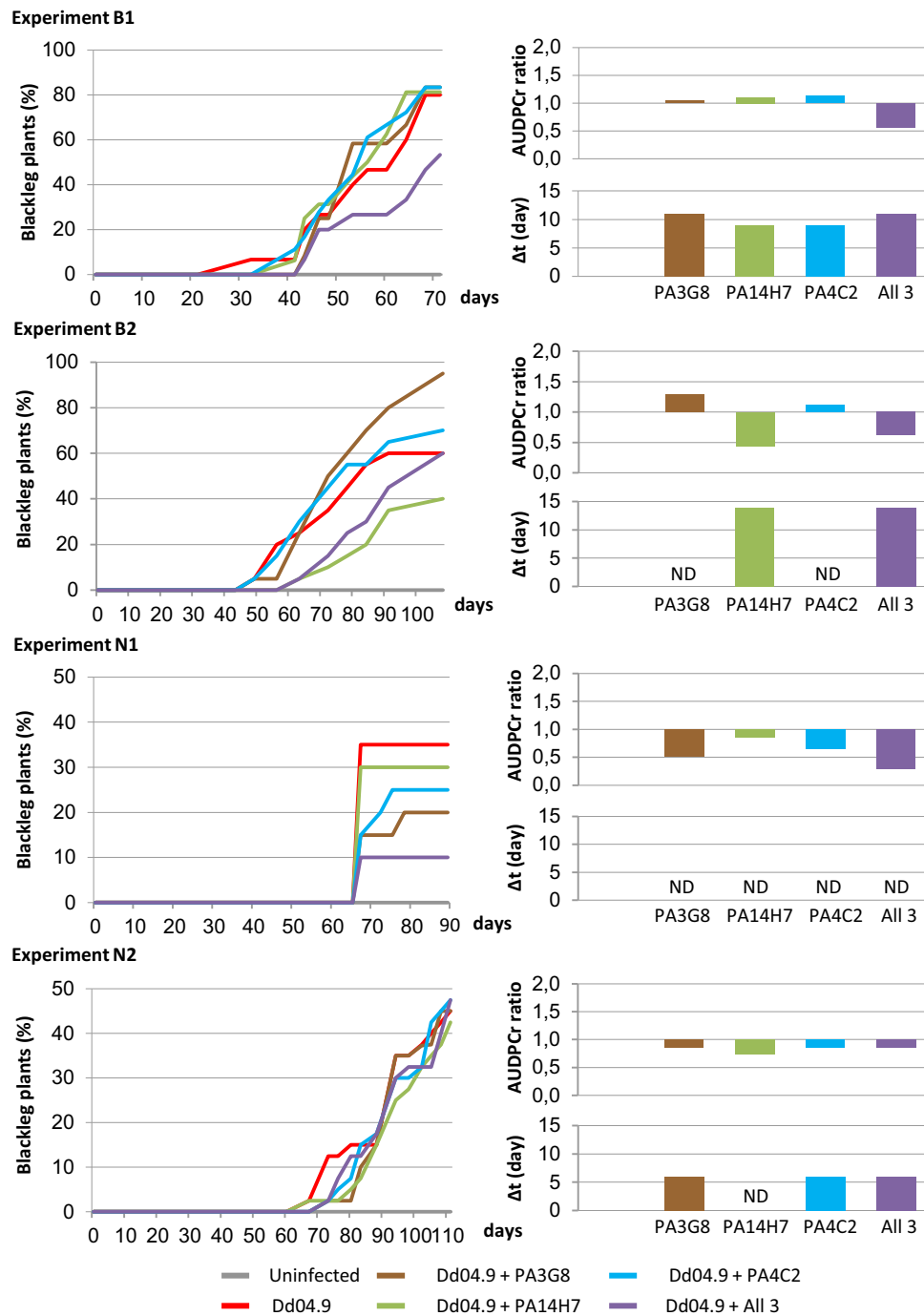


Figure 5 : Blackleg symptom dynamics in greenhouse assays.

Two independent assays B1 and B2 were conducted in Brittany and two others N1 and N2 in Nord-Pas-de-Calais. In the four assays, a set of 20 plants was used in each of the 6 compared conditions: uninfected plants, plants infected with *D. dianthicola* RNS04.9 alone (Dd04.9) and in combination with each of the biocontrol strains PA3G8, PA14H7 and PA4C2, and a mixture of them (All 3). In left panels, disease progression curves (DPC) are plotted; on the right panels the Δt values (in days) and AUDPCr ratios are indicated.

PA3G8 and PA4C2 and the mixture of all the three antagonistic strains PA3G8, PA14H7 and PA4C2.

1.4.3.6 Limitation of the dissemination of the pathogen to tuber progeny

At the end of the experiment B2 and experiment N2, asymptomatic tubers of the asymptomatic plants were collected and screened for presence of the pathogen *D. dianthicola* RNS04.9 by PCR (Figure 6). In the experiment N2, all the combinations of the biocontrol strains allowed a decrease of the pathogen propagation in tuber progeny. In addition, when the two experiments B2 and N2 were compared, a consistent decrease of the pathogen propagation was observed when the strain PA14H7 and all the three antagonistic strains were introduced.

1.4.3.7 Dynamics of the pathogenic and biocontrol agents in greenhouse assays

In the experiment B2 and experiment N2, antagonistic and pathogen populations were quantified in the rhizosphere using strain-specific qPCR primers which target *D. dianthicola* RNS04.9 and each of the biocontrol strains. While the level of the strain PA4C2 (Blue lines in Figure 7) decreased by 1 and 2 orders of magnitude after its introduction, the other biocontrol strains PA3G8 and PA14H7 were detected at a level which ranged between 10^5 and 10^6 DNA copy/g of dry soil (Figure 7). In all the tested conditions, the *D. dianthicola* RNS04.9 population (red lines in figure 7) maintained at a level which ranged between 10^4 and 10^6 DNA copy/g of dry soil. The presence of the biocontrol strains did not induce a consistent decrease of the pathogen level in the rhizosphere.

1.4.4 Discussion

Development of biocontrol tools targeting *Dickeya* species remains an important issue. In this work, we reported the identification and characterization of *Pseudomonas* isolates which control the virulence of *D. dianthicola* on potato plants and tubers. We focused on the *D.*

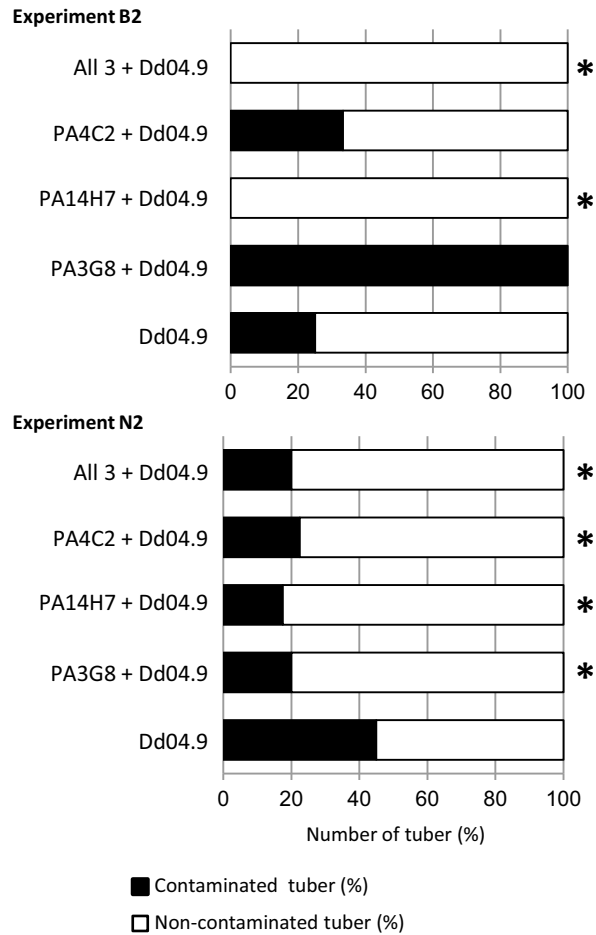


Figure 6 : Pathogen propagation in the potato tubers

In the experiments B2 in Brittany (upper graph) and N2 in Nord-Pas-de-Calais (lower graph), the PCR detection of *D. dianthicola* RNS04.9 (Dd04.9) was assayed on the asymptomatic tubers harvested from the asymptomatic plants which were cultivated in the presence and absence of the biocontrol strains (PA3G8, PA4C2 and PA14H7 and all the three). A statistical decrease (Fisher's test; $\alpha = 0.05$) of the Dd04.9 presence is indicated by the asterisks.

dianthicola pathogen because most of the published biocontrol assays were directed at the control of the *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and, to a lesser extent, *D. solani* pathogens (14, 27, 33, 35–37, 41, 44, 54, 71, 72). In addition, *D. dianthicola* remains the dominant *Dickeya* species recovered from the blackleg and soft rot symptoms under temperate climate in Europe (73, 74). *D. dianthicola* emerged 40 years ago, while *D. solani* recently in the 2000's. In the last 5 years, potato losses caused by *Dickeya* spp. have increased significantly in several European countries (3). Before the 1970's, the *P. atrosepticum* and *P. carotovorum* subsp *carotovorum* were the main causative agents of the soft rot and blackleg potato diseases under temperate climate.

Successive screenings allowed us to retain 58 isolates (mainly *Pseudomonas*) which represent 0.6% of the 10 000 tested isolates. This percentage is in line with the reported percentage (0.1–1%) of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments (75). From this collection of 58 isolates, six bacterial isolates were retained for their *in-vitro* activity against *Pectobacterium* and *Dickeya* strains. Three isolates preferentially antagonized the growth of the *Pectobacterium* strains, but did not exhibit any effect against *Dickeya* growth. In contrast, the three others antagonized the *Dickeya* and *Pectobacterium* strains. The biocontrol effect of these strains *P. putida* PA14H7 and *P. fluorescens* PA4C2 and PA3G8 was investigated using *in-vitro* and *in-planta* assays: growth inhibition assay in pure culture (fitness value calculation), soft rot assay on potato tuber, blackleg symptoms, transmission to tuber progeny and population dynamics in the course of four independent greenhouse assays. In the greenhouse assays, a repeated decrease of the blackleg symptoms and transmission to tuber progeny was observed when the three strains *P. putida* PA14H7 and *P. fluorescens* PA4C2 and PA3G8 were mixed together, suggesting that they act synergistically to control the *D. dianthicola*-induced diseases and pathogen transmission to daughter tubers. A protection was also observed with *P. putida* PA14H7 alone in some, but not all of the experiments.

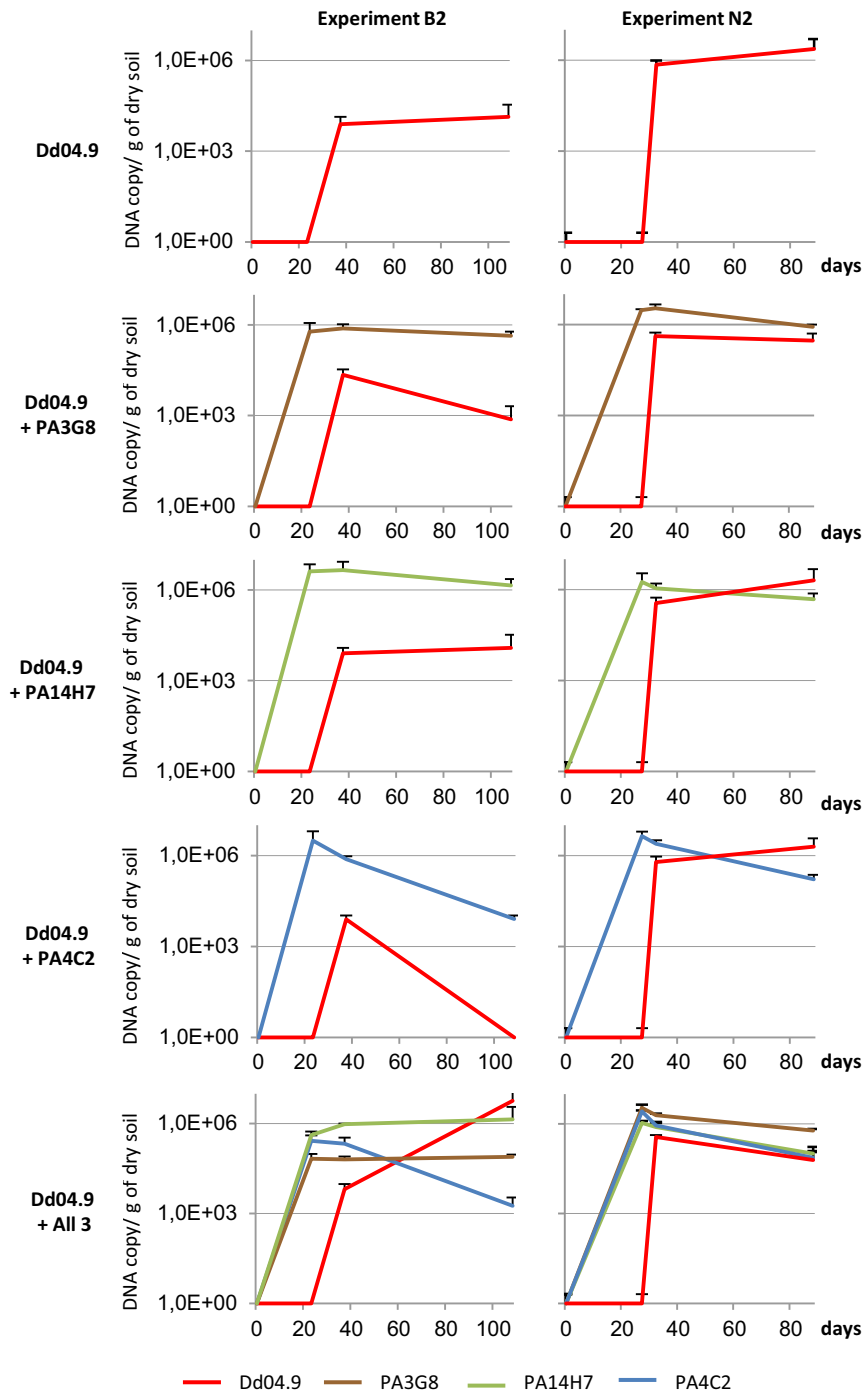


Figure 7 : Dynamics of the pathogenic and biocontrol populations.

In the experiments B2 (left graphs) and N2 (right graphs), the population level in soil was quantified by RT-qPCR when *D. dianthicola* RNS04.9 was inoculated alone (D.d04-9), and in combination with each of the biocontrol strains PA3G8, PA14H7 and PA4C2, and a mixture of all of them (All 3).

To our knowledge, a few experiments were conducted in a greenhouse for the evaluation of putative biocontrol agents directed at *D. solani* (29, 44, 72). Most of the other assays that targeted the pectinolytic enterobacteria were performed on potato tuber only or on other plant hosts for the greenhouse assessments (76). This work is a first report of a significant reduction of *D. dianthicola*-induced blackleg disease and transmission to the tuber progeny. Previously, combinations between one chemical (chitosan or antibiotic compound) and one biological agent (*Pseudomonas*, *Trichoderma viridi* or *Bacillus*) were tested against *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* during tuber storage (39, 47, 77). However, to our knowledge, no combination of bacterial biocontrol agents was used for protecting potato against both blackleg and soft rot diseases. Clearly, our results demonstrated that a mix of several *Pseudomonas* agents increased the reproducibility and efficiency of the biocontrol. The combination of several biocontrol agents would reinforce reproducibility of the plant protection, but also would potentially increase the range of the pathogens which are targeted.

In our greenhouse experiments, the biocontrol agents were not able to compete with the pathogen in the rhizosphere, even though a decrease of the blackleg symptoms and transmission to daughter tubers were observed. This may be explained by some environmental conditions which by-passed the anti-*Dickeya* activities in the rhizosphere compartments (repression of a putative antibiosis, spatial compartmentation, nutrients in non-limiting conditions...). This observation could also suggest that plant-protection is dependant of a tight contact between the plant and biocontrol agents. As a consequence, the biocontrol agents would directly act in preventing the penetration of the pathogens in the plant tissues. An alternative, but non-exclusive, hypothesis would be that the biocontrol agents would exert a plant-defence stimulating effect which limits the pathogen-induced symptoms. Further work will aim at investigating the potato protection in field assays, using a combination of the

identified biocontrol agents, as well as a combination of those agents with the *R. erythropolis* quorum-quenching bacterium (54–56).

Acknowledgements

Yannick Raoul des Essarts (YRDE) and all authors thanks Yvan Rahbe (INSA-Lyon), Brice Dupuis (Agroscope-Suisse) and Sylvie Marhadour (FN3PT) for advices in the statistical analyses. YRDE would like to thank more particularly Yves Le Hingrat and Yves Dessaux for their review and corrections of this paper. YRDE was supported by a PhD grant from Recherche, Développement, Promotion du Plant de Pomme de Terre-Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre (RD3PT/FN3PT) and Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT-CIFRE n°1282/2011). This work has benefited from a French governmental grant (reference ANR-10-LABX-0040-SPS) managed by the French National Research Agency under the Investments for the Future programs (reference n°ANR-11-IDEX-0003-02), as well as financial and technical supports from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), RD3PT-FN3PT and Seeds, Innovation, Protection, Research, Environment/ Comité Nord Plants de pomme de terre (SIPRE/CNPPT).

References

1. **Pérombelon MCM**. 1992. Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **98**:135–146.
2. **Ma B, Hibbing ME, Kim H-S, Reedy RM, Yedidia I, Breuer J, Breuer J, Glasner JD, Perna NT, Kelman A, others**. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* **97**:1150–1163.
3. **Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, Tsrör Lahkim L, Elphinstone JG**. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe: *Dickeya* spp. on potato in Europe. *Plant Pathology* **60**:385–399.
4. **Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, Swings J**. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst Appl Microbiol* **21**:384–397.
5. **Gardan L**. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* **53**:381–391.
6. **Samson R**. 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, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* **55**:1415–1427.
7. **M. van der Wolf J, H. De Boer S**. 2007. Bacterial pathogens of potato, p. 595–617. *In* *Potato Biology and Biotechnology*. Elsevier.
8. **Van der Wolf JM, Nijhuis EH, Kowalewska MJ, Saddler GS, Parkinson N, Elphinstone JG, Pritchard L, Toth IK, Lojkowska E, Potrykus M, Waleron M, de Vos P, Cleenwerck I, Pirhonen M, Garland L, Hélias V, Pothier JF, Pflüger V, Duffy B, Tsrör L, Manulis S**. 2014. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* **64**:768–774.
9. **Duarte V, De Boer SH, Ward LJ, Oliveira AMR**. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* **96**:535–545.
10. **Pitman AR, Harrow SA, Visnovsky SB**. 2010. Genetic characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* **126**:423–435.
11. **Perombelon MC, Kelman A**. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. *Annual review of phytopathology* **18**:361–387.
12. **Pérombelon MCM**. 2002. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology* **51**:1–12.

13. **Perombelon MCM**. 1972. The extent and survival of contamination of potato stocks in Scotland by *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *E. carotovora* var. *atroseptica**. *Annals of applied biology* **71**:111–117.
14. **Czajkowski R, Pérombelon MCM, van Veen JA, van der Wolf JM**. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review: Control of *Dickeya* and *Pectobacterium* species in potato. *Plant Pathology* **60**:999–1013.
15. **Czajkowski R, de Boer WJ, van Veen JA, van der Wolf JM**. 2010. Downward vascular translocation of a green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp.(biovar 3) from stem and leaf inoculation sites on potato. *Phytopathology* **100**:1128–1137.
16. **Czajkowski R, de Boer WJ, Velvis H, van der Wolf JM**. 2010. Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology* **100**:134–142.
17. **Pérombelon MCM, Fox RA, Lowe R**. 1979. Dispersion of *Erwinia carotovora* in Aerosols Produced by the Pulverization of Potato Haulm Prior to Harvest. *Journal of Phytopathology* **94**:249–260.
18. **Muniz CA, Jaillard D, Lemaitre B, Boccard F**. 2007. *Erwinia carotovora* Evf antagonizes the elimination of bacteria in the gut of *Drosophila* larvae. *Cellular Microbiology* **9**:106–119.
19. **Nykyri J, Fang X, Dorati F, Bakr R, Pasanen M, Niemi O, Palva ET, Jackson RW, Pirhonen M**. 2014. Evidence that nematodes may vector the soft rot-causing enterobacterial phytopathogens. *Plant Pathology* **63**:747–757.
20. **Moh AA, Massart S, Lahlali R, Jijakli MH, Lepoivre P, others**. 2011. Predictive modelling of the combined effect of temperature and water activity on the in vitro growth of *Erwinia* spp. infecting potato tubers in Belgium. *Biotechnol Agron Soc Environ* **15**:379–386.
21. **Reverchon S, Nasser W**. 2013. *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environmental Microbiology Reports* **5**:622–636.
22. **Lapwood DH, Read PJ, Spokes J**. 1984. Methods for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* and *carotovora*. *Plant pathology* **33**:13–20.
23. **Reeves AF, Olanya OM, Hunter JH, Wells JM**. 1999. Evaluation of potato varieties and selections for resistance to bacterial soft rot. *American Journal of Potato Research* **76**:183–189.
24. **Gill ED, Schaerer S, Dupuis B**. 2014. Factors impacting blackleg development caused by *Dickeya* spp. in the field. *European Journal of Plant Pathology* **140**:317–327.
25. **Haas D, Défago G**. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* **3**:307–319.
26. **Diallo S, Crépin A, Barbey C, Orange N, Burini J-F, Latour X**. 2011. Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere: Biological control mediated through the potato rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **75**:351–364.
27. **Song G, Ryu S, Kim Y, Lee J, Choi J, Ryu C-M**. 2013. Elicitation of Induced Resistance against *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae* by Specific Individual Compounds Derived from Native Korean Plant Species. *Molecules* **18**:12877–12895.
28. **Palva TK**. 1994. Salicylic Acid Induced Resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in Tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**:356–363.
29. **Czajkowski R, van der Wolf JM, Krollicka A, Ozymko Z, Narajczyk M, Kaczynska N, Lojkowska E**. 2015. Salicylic acid can reduce infection symptoms caused by *Dickeya solani* in tissue culture grown potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *European Journal of Plant Pathology* **141**:545–558.
30. **Saubeau G, Gaillard F, Legentil L, Nugier-Chauvin C, Ferrières V, Andrivon D, Val F**. 2014. Identification of Three Elicitins and a Galactan-Based Complex Polysaccharide from a Concentrated Culture Filtrate of *Phytophthora infestans* Efficient against *Pectobacterium atrosepticum*. *Molecules* **19**:15374–15390.
31. **Luzzatto T, Golan A, Yishay M, Bilkis I, Ben-Ari J, Yedidia I**. 2007. Priming of antimicrobial phenolics during induced resistance response towards *Pectobacterium carotovorum* in the ornamental monocot calla lily. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**:10315–10322.
32. **Kloepper JW, Ryu C-M, Zhang S**. 2004. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* **94**:1259–1266.
33. **Yang SY, Park MR, Kim IS, Kim YC, Yang JW, Ryu C-M**. 2011. 2-Aminobenzoic acid of *Bacillus* sp. BS107 as an ISR determinant against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* SCC1 in tobacco. *European Journal of Plant Pathology* **129**:371–378.

34. **Rendulic S.** 2004. A Predator Unmasked: Life Cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a Genomic Perspective. *Science* **303**:689–692.
35. **Lim J-A.** 2013. Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Using Bacteriophage PP1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**:1147–1153.
36. **Czajkowski R, Ozymko Z, Lojkowska E.** 2014. Isolation and characterization of novel soilborne lytic bacteriophages infecting *Dickeya* spp. biovar 3 (“*D. solani*”). *Plant Pathology* **63**:758–772.
37. **Adriaenssens EM, Van Vaerenbergh J, Vandenheuvel D, Dunon V, Ceyssens P-J, De Proft M, Kropinski AM, Noben J-P, Maes M, Lavigne R.** 2012. T4-Related Bacteriophage LIMeStone Isolates for the Control of Soft Rot on Potato Caused by “*Dickeya solani*.” *PLoS ONE* **7**:e33227.
38. **Trias R, Bañeras L, Montesinos E, Badosa E.** 2010. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology* **11**:231–236.
39. **Rahman MM, Ali ME, Khan AA, Akanda AM, Uddin MK, Hashim U, Abd Hamid SB.** 2012. Isolation, Characterization, and Identification of Biological Control Agent for Potato Soft Rot in Bangladesh. *The Scientific World Journal* **2012**:1–6.
40. **Shrestha A, Kim EC, Lim CK, Cho S, Hur JH, Park DH.** 2009. Biological control of soft rot on Chinese cabbage using beneficial bacterial agents in greenhouse and field. *The Korean Journal of Pesticide Science* **13**:325–331.
41. **Kloepper JW.** 1983. Effect of Seed Piece Inoculation with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Populations of *Erwinia carotovora* on Potato Roots and in Daughter Tubers. *Phytopathology* **73**:217–219.
42. **Cronin D, Moënné-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN, O’Gara F.** 2006. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiology Ecology* **23**:95–106.
43. **Sharga BM, Lyon GD.** 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. *Can J Microbiol* **44**:777–783.
44. **Czajkowski R, de Boer WJ, van Veen JA, van der Wolf JM.** 2012. Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. biovar 3 in vitro and in planta: *Dickeya* sp. antagonists from rotting potato tissue. *Plant Pathology* **61**:169–182.
45. **Wood EM, Miles TD, Wharton PS.** 2013. The use of natural plant volatile compounds for the control of the potato postharvest diseases, black dot, silver scurf and soft rot. *Biological Control* **64**:152–159.
46. **Helander IM, Nurmiäho-Lassila E-L, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S.** 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International journal of food microbiology* **71**:235–244.
47. **Makhlouf AH, others.** 2014. Investigation on the Effect of Chemical and Biological Control of Bacterial Soft Root Disease of Potato in Storage. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* **4**:31–44.
48. **Faure D, Dessaux Y.** 2007. Quorum sensing as a target for developing control strategies for the plant pathogen *Pectobacterium*. *European Journal of Plant Pathology* **119**:353–365.
49. **Crépin A, Beury-Cirou A, Barbey C, Farmer C, Hélias V, Burini J-F, Faure D, Latour X.** 2012. N-Acyl Homoserine Lactones in Diverse *Pectobacterium* and *Dickeya* Plant Pathogens: Diversity, Abundance, and Involvement in Virulence. *Sensors* **12**:3484–3497.
50. **Crépin A, Barbey C, Beury-Cirou A, Hélias V, Taupin L, Reverchon S, Nasser W, Faure D, Dufour A, Orange N, Feuilloley M, Heurlier K, Burini J-F, Latour X.** 2012. Quorum Sensing Signaling Molecules Produced by Reference and Emerging Soft-Rot Bacteria (*Dickeya* and *Pectobacterium* spp.). *PLoS ONE* **7**:e35176.
51. **Uroz S.** 2003. Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology* **149**:1981–1989.
52. **Dong Y-H, Zhang X-F, Xu J-L, Zhang L-H.** 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* Silences *Erwinia carotovora* Virulence by a New Form of Microbial Antagonism, Signal Interference. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:954–960.
53. **Jafra S, Przysowa J, Czajkowski R, Michta A, Garbeva P, Van der Wolf JM.** 2006. Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading *N*- acyl-homoserine lactone. *Canadian Journal of Microbiology* **52**:1006–1015.
54. **Cirou A, Diallo S, Kurt C, Latour X, Faure D.** 2007. Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environmental Microbiology* **9**:1511–1522.

55. **Cirou A, Raffoux A, Diallo S, Latour X, Dessaux Y, Faure D.** 2011. Gamma-caprolactone stimulates growth of quorum-quenching *Rhodococcus* populations in a large-scale hydroponic system for culturing *Solanum tuberosum*. *Research in Microbiology* **162**:945–950.
56. **Cirou A, Mondy S, An S, Charrier A, Sarrazin A, Thoison O, DuBow M, Faure D.** 2012. Efficient Biostimulation of Native and Introduced Quorum-Quenching *Rhodococcus erythropolis* Populations Is Revealed by a Combination of Analytical Chemistry, Microbiology, and Pyrosequencing. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:481–492.
57. **Palmer AG, Streng E, Blackwell HE.** 2011. Attenuation of Virulence in Pathogenic Bacteria Using Synthetic Quorum-Sensing Modulators under Native Conditions on Plant Hosts. *ACS Chemical Biology* **6**:1348–1356.
58. **Palmer AG, Streng E, Jewell KA, Blackwell HE.** 2011. Quorum Sensing in Bacterial Species that Use Degenerate Autoinducers Can Be Tuned by Using Structurally Identical Non-native Ligands. *ChemBioChem* **12**:138–147.
59. **Manefield M, Welch M, Givskov M, Salmond GPC, Kjelleberg S.** 2001. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiology Letters* **205**:131–138.
60. **Des Essarts Y, Sabbah M, Comte A, Soullère L, Queneau Y, Dessaux Y, Hélias V, Faure D.** 2013. N,N'-alkylated Imidazolium-Derivatives Act as Quorum-Sensing Inhibitors Targeting the *Pectobacterium atrosepticum*-Induced Symptoms on Potato Tubers. *International Journal of Molecular Sciences* **14**:19976–19986.
61. **Khayati S, Mondy S, Beury-Cirou A, Moumni M, Hélias V, Faure D.** 2014. Genome Sequence of the Emerging Plant Pathogen *Dickeya solani* Strain RNS 08.23.3.1A. *Genome Announcements* **2**:e01270–13–e01270–13.
62. **Hélias V, Hamon P, Huchet E, Wolf JVD, Andrivon D.** 2012. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*: Isolating pectolytic bacteria on CVP. *Plant Pathology* **61**:339–345.
63. **Kwasiborski A, Mondy S, Beury-Cirou A, Faure D.** 2013. Genome Sequence of the *Pectobacterium atrosepticum* Strain CFBP6276, Causing Blackleg and Soft Rot Diseases on Potato Plants and Tubers. *Genome Announcements* **1**:e00374–13–e00374–13.
64. **Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC.** 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **17**:7843–7853.
65. **Khayati S, Raoul des Essarts Y, Mondy S, Moumni M, Hélias V, Beury-Cirou A, Faure D.** 2015. Draft Genome Sequences of the Three *Pectobacterium*-Antagonistic Bacteria *Pseudomonas brassicacearum* PP1-210F and PA1G7 and *Bacillus simplex* BA2H3: TABLE 1. *Genome Announcements* **3**:e01497–14.
66. **Cigna J, Raoul des Essarts Y, Mondy S, Hélias V, Beury-Cirou A, Faure D.** 2015. Draft Genome Sequences of *Pseudomonas fluorescens* Strains PA4C2 and PA3G8 and *Pseudomonas putida* PA14H7, Three Biocontrol Bacteria against *Dickeya* Phytopathogens: Table 1. *Genome Announcements* **3**:e01503–14.
67. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**:2725–2729.
68. **Andrivon D, Pellé R, Ellissèche D.** 2006. Assessing resistance types and levels to epidemic diseases from the analysis of disease progress curves: Principles and application to potato late blight. *American Journal of Potato Research* **83**:455–461.
69. **Rouffiang J, Gerardin D, Kellenberger I, Schaerer S, Dupuis B.** 2013. Sensibilité de la pomme de terre aux pourritures de tiges provoquées par *Dickeya* spp. *Recherche Agronomique Suisse* **4**:424–431.
70. **Nassar A, Darrasse A, Lemattre M, Kotoujansky A, Dervin C, Vedel R, Bertheau Y.** 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:2228–2235.
71. **Kastelein P, Schepel EG, Mulder A, Turkensteen LJ, Van Vuurde JWL.** 1999. Preliminary selection of antagonists of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Van Hall) Dye for application during green crop lifting of seed potato tubers. *Potato research* **42**:161–171.
72. **Czajkowski R, de Boer WJ, van Veen JA, van der Wolf JM.** 2012. Studies on the interaction between the

biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A30, and blackleg-causing *Dickeya* sp. (biovar 3) in potato (*Solanum tuberosum*): Interaction between *Serratia* A30 and *Dickeya* sp. IPO2222. *Plant Pathology* **61**:677–688.

73. **Lumb VM, Perombelon MCM, Zutra D.** 1986. Studies of a wilt disease of the potato plant in Israel caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant pathology* **35**:196–202.

74. **Laurila J, Hannukkala A, Nykyri J, Pasanen M, Hélias V, Garland L, Pirhonen M.** 2010. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *European Journal of Plant Pathology* **126**:249–262.

75. **Raaijmakers JM, Vlami M, De Souza JT.** 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:537–547.

76. **Faquihi H, Mhand RA, Ennaji M, Benbouaza A, Achbani E.** 2014. *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud, a Biological Control against Soft Rot Disease in Potato Caused by *Pectobacterium carotovorum*. *International Journal of Science and Research* **3**:1779–1786.

77. **Abd-El-Khair H, Karima HEH.** 2007. Application of some bactericides and bioagents for controlling the soft rot disease in potato. *Research Journal Agricultural Biological Science* **3**:463–473.

1.5 Conclusion et Bilan du chapitre III

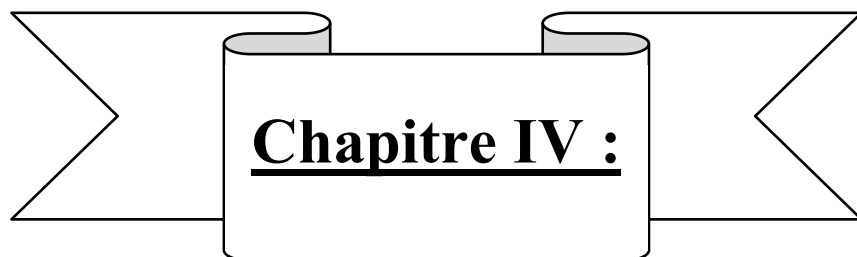
Lors de la mise au point des pathosystèmes, un résultat intrigant a été le fort taux d'absence de levée des plantes (75%), lorsque le pathogène est apporté par trempage des tubercules mères dans deux suspensions bactériennes (tableau 1). Les explications de cette non levée restent non élucidées, mais pourraient être associées à une température en serre trop élevée combinée à une forte humidité. Ces conditions auraient provoqué un environnement asphyxiant et/ou néfaste au développement des plantes. Dans ces conditions, il est à remarquer que les quelques plantes levées ne déclarent pas non plus de symptômes de jambe noire après 4 semaines d'expérimentation, pour les deux concentrations testées. Ce qui pourrait suggérer que les concentrations bactériennes utilisées dans ces modalités seraient trop faibles pour aboutir au développement de symptômes. Ces conditions d'inoculation sont utilisées lors d'essais d'épidémiologie en plein champs et permettent l'expression de symptômes (rapport FN3PT/RD3PT, non présenté). Ces conditions d'inoculation sont peut-être moins favorables pour des essais en serre, dans lesquels les conditions sont contrôlées. Il serait envisageable pour mettre au point un tel pathosystème d'utiliser des températures différentes et des conditions d'hygrométrie plus adaptées. Cette modalité d'inoculation n'a pas été retenue pour nos essais.

Le développement de symptômes à des taux attendus dans la condition utilisant la souche *D. dianthicola* RNS04.9 confirme l'agressivité de cette souche sur tubercules (cf. chapitre II) mais aussi sur plantes entières (Postulat de Koch). Parmi les deux modes d'inoculation avec *D. dianthicola* RNS04.9, il a été choisi d'évaluer notre stratégie de lutte biologique ciblant ce pathogène avec le pathosystème permettant d'apporter le pathogène par arrosage direct avec une forte concentration de pathogène. Ces expérimentations confirment également, le caractère invasif de *D. dianthicola* à travers les tissus vasculaires de la plante puisque, apporté par le sol, ce *Dickeya* est retrouvé dans les symptômes de jambe noire sur tige (corrélation par PCR entre symptôme et présence de bactéries). Ces résultats sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature sur la pénétrance et le déplacement de l'espèce *Dickeya* à travers les tissus vasculaires (Czajkowski *et al.*, 2010 a et b) mais ces résultats seraient à démontrer plus rigoureusement.

Il est à noter qu'une utilisation combinée de trois souches d'agent bio-protecteurs serait la meilleure des solutions de bio-protection à proposer pour se prémunir du développement des symptômes de jambe noire. Comme l'a montré l'article 2, il s'agit de la condition qui, montre une diminution des taux de jambe noire par rapport à une condition inoculée seulement avec le pathogène, et qui montre les résultats les plus reproductibles d'un essai à l'autre.

D'autre part, aucun pathosystème en serre avec *Pectobacterium* n'est disponible à ce jour. En parallèle de l'étude sur la mise au point de pathosystèmes pour *D. dianthicola* RNS04.9, il avait été testé les mêmes modes d'inoculation et les mêmes conditions (tableau 1) pour la souche *P. atrosepticum* CFBP6276. Malheureusement, quel que soit le mode d'inoculation testé pour la souche de *Pectobacterium*, les conditions n'ont pu permettre le développement de symptômes de jambe noire sur plantes. La souche de *P. atrosepticum* CFBP6276 sélectionnée pour l'ensemble de ces expérimentations et qui présentait une bonne pathogénicité sur tubercules de pomme de terre au laboratoire (Cirou *et al.*, 2007 ; des Essarts

et al., 2013 ; Crépin *et al.*, 2012a et b) ne montrerait pas de bonne aptitude à coloniser les plantes puisqu'aucun symptôme de jambe noire ou de pourriture molle n'a pu être obtenu. Ces résultats confirment les expériences passées à la RD3PT de Rennes et les données bibliographiques qui s'accordent pour dire qu'une souche pectinolytique présentant un pouvoir pathogène sur tubercules n'a pas forcément les capacités pathogènes nécessaires pour provoquer la maladie sur plante entière (Rouffiange *et al.*, 2013 et 2014).



**Recherche de nouvelles molécules chimiques
perturbant la signalisation *Quorum-sensing***

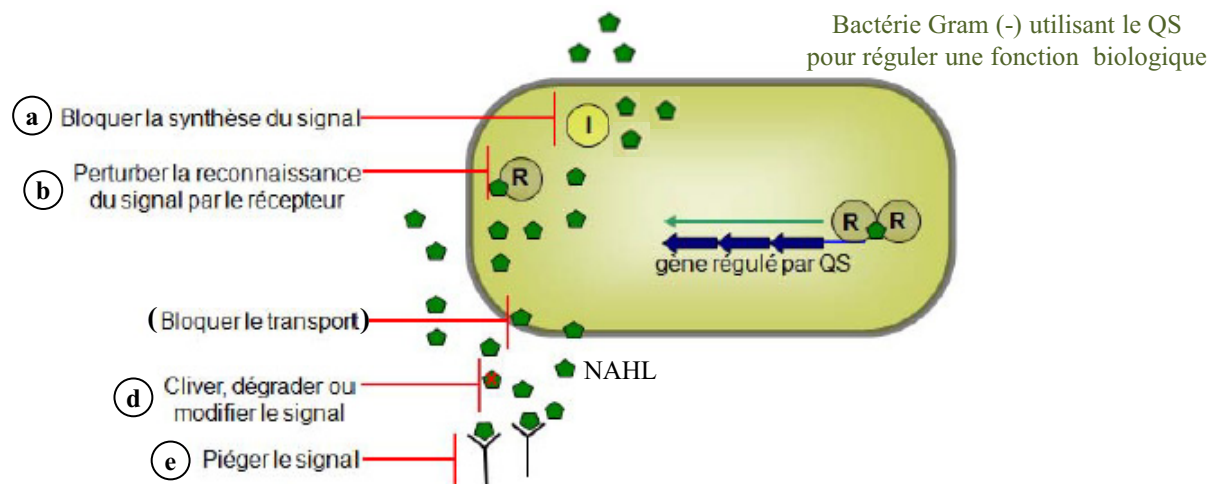


Figure 1 : Représentation schématique des différentes cibles du *Quorum-Quenching*, exemple pour une bactérie Gram (-).

(a) La première cible du QQ est la production du signal, notamment en modulant l'activité des enzymes nécessaires à la biosynthèse du signal. (b) Le second mécanisme de QQ est basé sur une approche pharmacologique qui consiste à utiliser des analogues structuraux des molécules signal à des fins de compétition au niveau du site de liaison du récepteur (type Lux R). Il est à noter que les NAHL, elles-mêmes, peuvent être des agonistes ou antagonistes en fonction des espèces bactériennes. (c) Le clivage, la dégradation ou la modification des signaux QS est réalisé principalement par des enzymes, les NAHL-lactonases (ouvrent le noyau lactone), les NAHL-acylases ou amido-hydrolases (clivent la chaîne acyle) et les NAHL-oxydases et réductases (modifient la chaîne acyle). (e) Les stratégies visant à piéger les molécules signal sont basées sur la production d'anticorps spécifiques des NAHL ou sur l'action de « mimer » le récepteur des NAHL.

*Remarque : Les NAHL diffusent passivement au travers les parois cellulaires. Cependant, un transport actif des NAHL à longues chaînes carbonées est suggéré par exemple chez *P. aeruginosa*.*

Mots clef : I : Enzyme permettant la synthèse du signal NAHL utile à la signalisation QS, il s'agit d'une NAHL synthase de type LuxI ; R : Récepteur des NAHL de type LuxR ; NAHL: molécule signal type N-Acyl-Homosérine Lactone pour nos souches bio-indicatrices, il s'agit principalement de la 3-OC8-HSL ; QS : *Quorum-sensing*. Source : adaptation de la thèse d'A. Cirou , soutenue le 7 mai 2010.

Recherche de nouvelles molécules chimiques perturbant la signalisation *quorum-sensing*

1.1 Situation des travaux

A l'échelle internationale, de nombreuses équipes de recherche en microbiologie médicale et environnementale cherchent à développer des stratégies efficaces et applicables contre les pathogènes. L'implication du *Quorum-Sensing* (QS) dans l'expression des facteurs de virulence de certaines bactéries offre une cible intéressante pour le développement de nouveaux traitements sanitaires. L'enjeu thérapeutique entourant l'identification de nouvelles molécules anti-QS est ainsi considérable. La plupart des criblages ont été réalisés à des fins thérapeutiques via l'utilisation de souches bio-indicatrices telles que des souches appartenant au genre *Pseudomonas*, notamment *P. aeruginosa* (Kalia *et al.*, 2013 ; Stevens *et al.*, 2011 ; Galloway *et al.*, 2011 ; Rasch *et al.*, 2007) mais aussi à des fins phytosanitaires via des souches de *P. syringae*, *A. tumefaciens* ou encore *Pectobacterium* (Crépin *et al.*, 2012 a et b ; Cirou *et al.*, 2013 et des Essarts *et al.*, 2014). A la différence des antibiotiques ayant une action bactéricide ou bactériostatique, qui sont interdits d'utilisation en plein champ sous peine d'induire le développement de résistances capables de se propager au sein du règne microbien, les méthodes de lutte ciblant la régulation QS pourraient être plus respectueuses de l'environnement.

Tous les phénomènes visant à perturber la communication QS sont appelés phénomènes de *Quorum-Quenching* (QQ), terme défini par Dong *et al.* (2001). Les différentes cibles de la perturbation du QS sont schématisées dans la figure 1 et apparaissent à différentes étapes de la signalisation : (a) la synthèse du signal QS (moduler l'activité des enzymes nécessaires à la biosynthèse du signal, par exemple les NAHL synthases ; Hoang et Schweizer, 1999 ; Singh *et al.*, 2006 ; Parsek *et al.*, 1999) ; (b) la reconnaissance du signal QS par son récepteur

(empêcher la reconnaissance du signal et/ou provoquer une dégradation accélérée du récepteur ; Smith *et al.*, 2003 ; Morohoshi *et al.*, 2007 ; Manefield *et al.*, 2001 ; Rasmussen *et al.*, 2005) ; (c) la dégradation des signaux QS (modification de la structure des NAHL ; Cirou *et al.*, 2012 ; MDowell *et al.*, 2001) et (d) le piégeage des molécules QS après sécrétion dans l'environnement (Telford *et al.*, 1998 ; Miyairi *et al.*, 2006 ; Kato *et al.* 2006). Les molécules jouant un rôle dans la modulation de la signalisation QS, et plus particulièrement, l'inhibition de la reconnaissance du signal QS, sont appelées des inhibiteurs du *quorum-sensing* (QSI).

Comme décrit dans le chapitre I, chez les bactéries responsables des maladies de la jambe noire et de pourriture molle, l'expression des gènes de virulence (les PCWDE, telles que les cellulases et les pectinases) est contrôlée par QS et ce système s'appuie sur une molécule signal de type NAHL, notamment la 3-oxo-octanoyl-L-homosérine lactone (3-OC8-HSL) (Jafra *et al.*, 2006, Cirou *et al.*, 2007, Crépin *et al.*, 2012 a et b).

De nombreux criblages ont été réalisés pour identifier de nouveaux QSI. Ces molécules peuvent-être d'origine naturelle comme les furanones (isolées de l'algue rouge, *Delisea pulchra* ; de Nys *et al.*, 1998) ou d'origine synthétique comme le 4-NPO (Rasmussen *et al.*, 2005) utilisé dans notre étude comme référence des QSI. Le but principal de cette étude est d'identifier de nouvelles molécules chimiques non toxiques ciblant l'étape de reconnaissance du signal QS et bloquant ainsi la signalisation QS de la souche *P. atrosepticum* CFBP6276. Pour ce faire, il a été criblé une banque de 240 molécules de la chimiothèque de l'ICBMS en collaboration avec l'équipe d'Yves Queneau de l'INSA (Lyon, France). Cette banque comprend des analogues de structure aux NAHL (carboxamides, les sulfamides, les sulfonylurées, les amides inversées, les triazoles ou tétrazoles) mais aussi des dérivés de QSI naturels (comme les imidazolium conçu comme analogues des calmidazoliums identifiés comme QSI par criblage virtuel).

1.2 Contributions à ce travail

Le CNPPT a fourni le matériel végétal de départ (tubercules *var.* Bintje, *cal.* 28/35 ou 35/45, catégorie de qualité : A ou SE), notamment utile pour évaluer l'efficacité des QSI sélectionnés à réduire les symptômes de pourriture molle causés par *P. atrosepticum* sur de pomme de terre. Les souches bio-indicatrices, *P. atrosepticum* CFBP6276-EI (pME6031-*rsmA::uidA*) (des Essarts *et al.*, 2013) et *A. tumefaciens* NT1(pZNLR4) (Cha *et al.*, 1998) ont permis l'évaluation des molécules de la chimiothèque pour leur rôle sur la modulation de la signalisation QS et ces souches étaient déjà disponibles au laboratoire. La chimiothèque de 240 composés, dérivés de NAHL ou de QSI identifiés, a été fournie par Yves Queneau et Laurent Soullère.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article, accepté dans la revue « *International Journal of Molecular Sciences* » (des Essarts *et al.*, 2013). Le texte a bénéficié des relectures critiques des auteurs et d'Yves Le Hingrat et Yves Dessaux. Ce chapitre sur article est suivi d'une étude similaire non publiée sur une souche d'*A. tumefaciens* que nous avons menée sur cette même banque de molécules chimiques.

1.3 Article 3 : N, N'-alkylated Imidazolium-Derivatives Act as Quorum-Sensing Inhibitors Targeting the *Pectobacterium atrosepticum*-Induced Symptoms on Potato Tubers

Yannick Raoul des Essarts^{1,2}, Mohamad Sabbah³, Arnaud Comte⁴, Laurent Soullère³,
Yves Queneau³, Yves Dessaux¹, Valérie Hélias^{2,5} and Denis Faure^{1,*}

¹ Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Sciences du Végétal, UPR 2355, Gif-sur-Yvette 91198, France; E-Mails: yannick.desessarts@isv.cnrs-gif.fr (Y.R.E.); yves.Dessaux@isv.cnrs-gif.fr (Y.D.)

² FN3PT/RD3PT, Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de terre, 43-45 Rue de Naples, Paris F-75008, France; E-Mail: valerie.helias@fnpppt.fr

³ INSA Lyon, ICBMS, UMR 5246, CNRS, Université Lyon 1, INSA-Lyon, CPE-Lyon, Bât J. Verne, 20 av A. Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France ; E-Mails: mohamadsabbah7@hotmail.com (M.S.); laurent.soullere@insa-lyon.fr (L.S.); yves.queneau@insa-lyon.fr (Y.Q.)

⁴ Service de Chimiothèque, ICBMS, UMR 5246, CNRS, Université Lyon 1, INSA-Lyon, CPE-Lyon, Bât Curien, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France; E-Mail: arnaud.comte@univ-lyon1.fr

⁵ Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1349IGEPP, Le Rheu F-35653, France

* Author to whom correspondence should be addressed ; E-Mail: faure@isv.cnrs-gif.fr; Tel.: +33-1-69-82-35-77; Fax: +33-1-69-82-36-95.

Abstract: Bacteria belonging to the *Pectobacterium* genus are the causative agents of the blackleg and soft-rot diseases that affect potato plants and tubers worldwide. In *Pectobacterium*, the expression of the virulence genes is controlled by quorum-sensing (QS) and *N*-acylhomoserine lactones (AHLs). In this work, we screened a chemical library of QS-inhibitors (QSIs) and AHL-analogs to find novel QSIs targeting the virulence of *Pectobacterium*. Four *N,N'*-bisalkylated imidazolium salts were identified as QSIs; they were active at the μM range. In potato tuber assays, two of them were able to decrease the severity of the symptoms provoked by *P. atrosepticum*. This work extends the range of the QSIs acting on the *Pectobacterium*-induced soft-rot disease.

Keywords: *N*-acylhomoserine lactone; quorum-sensing; quorum-sensing inhibitor; *Pectobacterium*; soft-rot; potato tuber

Abbreviations: 3-OC8-HSL, 3-oxo-octanoyl-L-homoserine lactone; 4-NPO, 4-nitropyridine-*N*-oxide; AC₅₀, half maximal activity concentration; AHL, *N*-acyl homoserine lactone; DMSO, dimethylsulfoxide; GIAC₅₀, growth index at the AC₅₀ concentration; MBC, minimal bactericidal concentration; MIC, minimal inhibitory concentration; OD₆₀₀, optical density at a wavelength of 600 nm; Pa6276, *P. atrosepticum* CFBP6276; QS, quorum-sensing; QSI, quorum sensing-inhibitor.

1.3.1 Introduction

Causative agents of the blackleg and soft-rot diseases of potato belong to the *Pectobacterium* and *Dickeya* genera [1]. These soft-rot enterobacteria produce *N*-acyl homoserine lactones (AHLs), mainly 3-oxo-octanoyl-L-homoserine lactone (3-OC8-HSL) [2, 3]. In *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and *P. atrosepticum* populations, AHLs are involved in the expression of virulence factors, including plant cell-wall degrading enzymes, such as cellulases and pectinases [4, 5]. This cell-to-cell communication that involves the production, exchange and perception of AHL signals is termed quorum sensing (QS) [6].

Several quorum-quenching strategies have been proposed to interfere with the QS-regulated expression of the virulence factors in *Pectobacterium*. They encompass the construction of transgenic plants that express bacterial AHL-degrading enzymes, such as lactonases [7],

the identification and biostimulation of soil AHL-degrading bacteria that could act as biocontrol agents, such as *Bacillus thuringiensis* and *Rhodococcus erythropolis* [8–10], and the identification and synthesis of natural and synthetic compounds acting as quorum-sensing inhibitors (QSIs) [11–13]. In contrast with the abundant literature on QSIs targeting the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* [14–16], only a few QSIs that efficiently reduce the *Pectobacterium*-induced symptoms have been described. Noticeably, some archetypical QSIs active on *Pseudomonas* or other pathogens do not diminish the severity of the *Pectobacterium*-induced symptoms [17], a feature that stresses the importance of the identification of dedicated QSIs targeting this plant pathogen.

In this work, we constructed and used a *Pectobacterium* AHL-biosensor to screen a collection of synthetic AHL and QSI derivatives and identifying QSIs of which the protective activity against the *Pectobacterium*-induced symptoms was evaluated in potato-tuber maceration assays.

1.3.2 Results and Discussion

1.3.2.1 Construction of the *Pectobacterium* AHL-Biosensor

We constructed a *Pectobacterium* AHL-biosensor that exhibited the two typical characteristics of the current QS signals biosensor, *i.e.*, (i) it was defective for the synthesis of its own AHL signal; (ii) it was able to produce a measurable reporting activity that correlated with the concentrations of the added AHLs in the culture medium. In *P. atrosepticum* CFBP6276, the genome sequence of which has been published [18], the *expI* gene encodes the synthase responsible for the biosynthesis of the AHL-signals that are required for the expression of the virulence factors and induction of the plant symptoms on potato tubers [5]. In the *expI* mutant CFBP6276-EI [19], we introduced the plasmid pME6031-*rsmA::uidA* that was generated by cloning the *rsmA::uidA* reporting fusion in the broad range vector pME6031. In *P. atrosepticum*, the *rsmA*-promoter is down-regulated

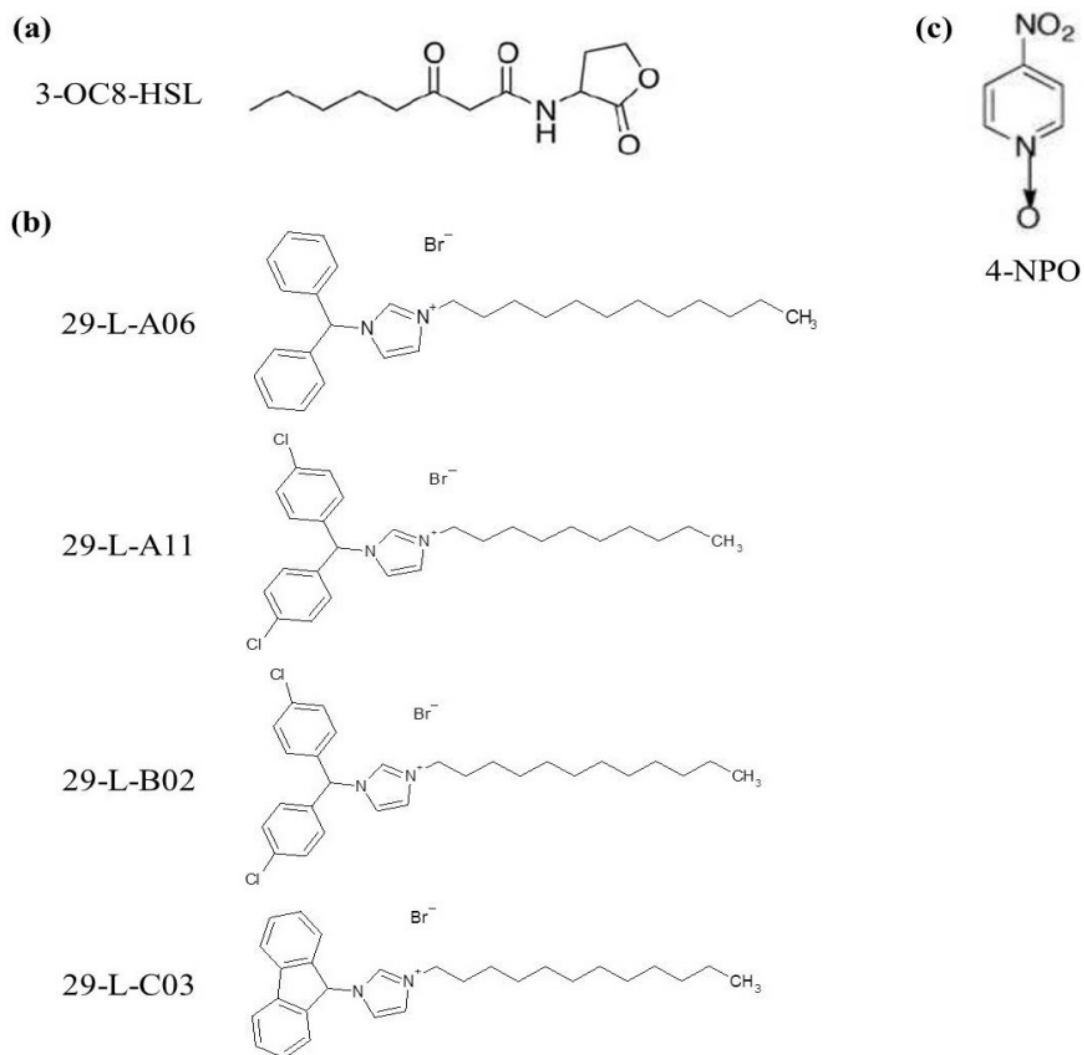


Figure 2 : Structure of the used quorum sensing (QS)-molecule and identified quorum sensing-inhibitors (QSIs). (a) The 3-OC8-HSL is the *N*-acyl homoserine lactone (AHL) used as the QS-signal. (b) Structure of the identified QSIs. (c) 4-NPO, used as a QSI reference.

in the presence of AHLs [20]. Hence, in the resulting *Pectobacterium* AHL-biosensor, the *uidA*-encoded glucuronidase activity was expressed at a high level in the absence of AHLs, and decreased after addition of AHLs in the culture medium. QSI molecules should therefore increase the expression of glucuronidase in the presence of AHLs.

1.3.2.2 QSIs Identification

A chemical library of 240 molecules was generated based on AHLs and known QSI structures; it consisted in carboxamides, sulfonamides, sulfonylurea, reverse amides, triazoles, tetrazoles, bromoenamines, bromofuranones and imidazolium derivatives (see experimental section). This library was screened with the above described QS signal-biosensor *P. atrosepticum* CFBP6276-EI (pME6031-*rsmA::uidA*) in the presence of 3-OC8-HSL at 1.5 μ M. Using the compounds of the library at 100 μ M, 67 putative QSIs were found to restore glucuronidase activity in the *Pectobacterium* QS-biosensor in the presence of AHLs. In the course of this screening, 4-nitropyridine-*N*-oxide (4-NPO) was used as a control QSI (Figure 2) [17]. The identified compounds were thereafter tested at lower concentrations (50, 10, 2.5, and 0.1 μ M). At 10, 2.5, and 0.1 μ M, none variations of the reporting activity were observed. At 50 μ M, the higher glucuronidase activities were measured in the presence of the compounds 29-L-A06, 29-L-A11, 29-L-B02 and 29-L-C03. All of these compounds were imidazolium-derivatives which exhibit bis-*N*-substitution with a polyaromatic group and an aliphatic chain (Figure 2). These compounds were designed by analogy to calmidazolium previously identified as QSI by virtual screening [21]. Their synthesis involved two successive *N*-alkylation of imidazole, with variations in the aromatic moiety (halogenations, fluorenyl) on one nitrogen atom, and variations in the alkyl chain length on the other nitrogen atom. Both substitutions were found to influence the QSI activity when tested in a modified *E. coli* strain which expresses the *Vibrio fischeri* QS-system. Indeed, a stronger QSI-activity was found for shorter chains when the aromatic

<i>Pectobacterium</i> cells				
Name	AC ₅₀ ^a	GI _{AC50} ^b	MIC ^a	MBC ^a
4-NPO	>100 (12%) ^c	1.00	50	>100
29-L-A06	18	0.94	25	25
29-L-A11	14	0.93	10	25
29-L-B02	16	0.99	<2.5	2.5
29-L-C03	20	0.93	25	25

Table 1 : Biological characteristics of the four identified QSIs.

^a Values are expressed in μM ; ^b Growth index (GI_{AC50}) is the ratio of cell densities of bacterial cultures performed in the presence of QSIs at the AC₅₀ concentrations to those obtained without QSI; ^c In brackets, inhibition (%) at 100 μM , which is the maximal concentration tested in this study.

residue was larger (highly halogenated), or for longer chains when the aromatic residue was smaller (unsubstituted or sterically constrained) [22].

1.3.2.3 Biological Effects of the Identified QSIs on *Pectobacterium* Cells

For the calculation of the half maximal activity concentration (AC_{50}), the activity of the reporter gene *uidA* was measured in the presence of different concentrations of QSIs (0.1 to 100 μ M). In addition, cell density (OD_{600}) of the cultures was measured in the absence and presence of the QSIs at the AC_{50} concentrations. These values were used to calculate a growth index ($GI_{AC_{50}}$) and evaluate growth inhibition of the QSIs; a ratio value of 1 indicates that the growth of the bacteria is not affected by the presence of the QSI added at the AC_{50} concentration. The AC_{50} values of the four imidazolium-compounds ranged between 14 and 20 μ M (Table1). The $GI_{AC_{50}}$ values (from 0.93 to 0.99) were not statistically different (Kruskal Wallis test $\alpha = 5\%$) from those of the control cultures without QSIs ($GI_{control} = 1.00$), suggesting that the cell growth was not affected near the AC_{50} concentrations. As a reminder, the AHL concentration in this assay was strictly controlled by the addition of pure 3-OC8-HSL at 1.5 μ M in the culture medium, hence the reporting activity of the *Pectobacterium* AHL-biosensor could not be altered by a variation of the AHL level. Moreover, an antibacterial activity should decrease glucuronidase activity by killing the cells; by contrast, imidazolium derivatives increase this reporting activity which is the opposite effect of potential antibacterial activity. All these observations allow us to suggest that the identified molecules could act as QSIs under our experimental conditions. We also observed that the already known QSI 4-NPO that was active in *P. aeruginosa* [23] was less efficient than were the identified imidazolium-derivatives against the QS-regulated gene *rsmA::uidA* of *Pectobacterium*.

The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were measured for all QSIs in *P. atrocepticum*. The QSI 29-L-B02 exhibited MIC and MBC

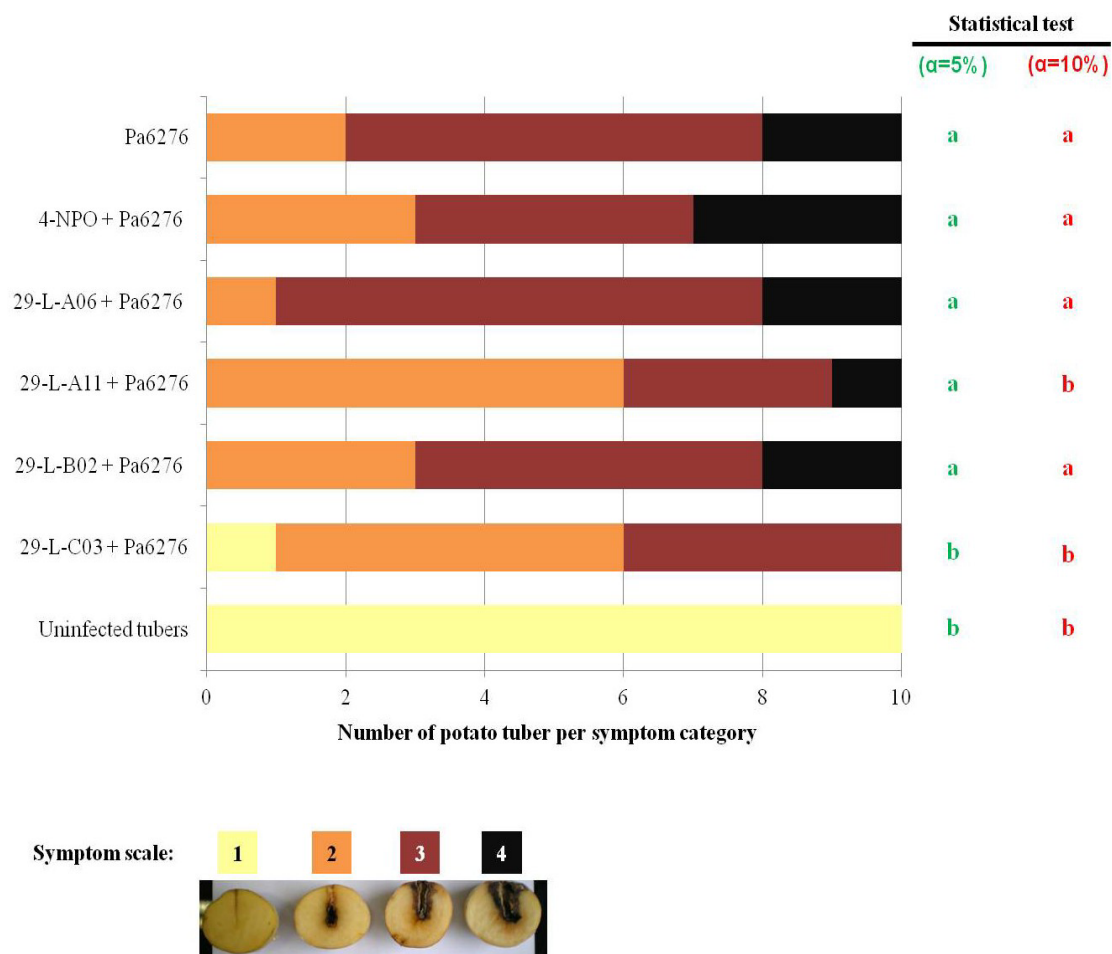


Figure 3 : QSIs and soft-rot tuber assay. Each tuber of *S.tuberosum* was inoculated with 10^7 cells of *P. atrosepticum* CFBP6276 (Pa6276) in the absence and presence of the QSIs at 20 μ M. The uninfected tubers were used a negative control. The virulence symptoms are categorized according a four-category scale. The different letters indicate the symptoms of QSI-treated conditions which were statistically different to those obtained in the presence of Pa6276 alone (Kruskal and Wallis test, $\alpha = 5\%$ or 10%).

values lower than the AC_{50} value, while the other QSIs exhibited MIC and MBC values higher than AC_{50} values, or comparable in the case of the MIC of 29-L-A11 (Table 1). It should be noticed that the MIC and MBC values were measured after 40-h of culture in the presence of QSIs, hence at the end of the growth cycle of the bacteria when nutrients became limiting. In contrast, GI_{AC50} and AC_{50} values were measured during exponential growth of the bacteria. The apparent higher sensitivity of the *Pectobacterium* cells when grown under MIC and MBC conditions as compared to GI_{AC50} and AC_{50} conditions could be explained by the physiological status of the cells.

1.3.2.4 QSIs Could Moderate the P. atrosepticum-Induced Symptoms in Potato Tubers

The four QSIs were tested for their capacity to limit the QS-associated symptoms induced by the plant pathogen *P. atrosepticum* CFBP6276 on potato tubers (Figure 3). The QSI 29-L-B02 that exhibited MIC and MBC values lower than AC_{50} did not protect the tubers against the plant pathogen, as the severity of the symptoms was similar to that observed in the absence of QSI (Figure 3). This observation suggested that under the tested conditions the introduced bacterial cells (10^7 cells at the infection site) were still able to multiply and express the QS-regulated virulence factors in the tuber assay, even in the presence of a potential bacteriostatic and bactericidal delivery of the inhibitory molecule at 20 μ M. By contrast, two other QSIs, 29-L-A11 and 29-L-C03 that exhibited a lower bacteriostatic and bactericidal activity than 29-L-B02, reduced (but did not abolish) the severity of the symptoms (Figure 3). The limitation of QS-dependent symptoms was therefore not correlated with the potential bacteriostatic and bactericidal activity of the identified compounds, and could reflect their QSI-activity.

These imidazolium-derivatives were also efficient at the μ M range to disrupt QS-signaling in the marine bacterium *Vibrio fischeri* that uses 3-oxo-hexanoyl-L-homoserine lactone as a

QS-signal [19]. This feature suggests that they may be used as a structural backbone for the generation of broad range QSIs. Polyaromatic compounds have been frequently described as QSIs. As natural compounds, they have been identified in many organisms, especially plants [14]. As synthetic compounds, they have been revealed by chemical library and virtual (*in silico*) screenings [14, 21].

This work extends the spectrum of QSIs targeting the QS-controlled virulence of the plant pathogen *Pectobacterium* [11–13]. Aside the *P. atrosepticum* and *P. carotovorum* species in which QS plays a key-role in virulence, QS has been also involved in a partial regulation of virulence in *D. dianthicola* and the emerging pathogen *Dickeya solani*, which are other causative agents of the soft-rot and blackleg diseases in potato cultures [3]. The QSI-treatment may be proposed as a complement of other QS-targeting approaches such as the use of biocontrol agents and transgenic plants which are able to degrade the QS-signals [7–10]. All the proposed anti-QS strategies remain to be evaluated under green house and field conditions.

1.3.3 Experimental Section

1.3.3.1 Bacterial Strains and Growth Conditions

P. atrosepticum CFBP6276 and its derivative CFBP6276-EI in which the *expI* gene was disrupted [19] were cultivated in TY medium (tryptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L). The *Pectobacterium* QS-biosensor was obtained by electroporating the constructed plasmid pME6031-*rsmA::uidA* in the *expI* mutant CFBP6276-EI. Antibiotics were used at the following concentrations: kanamycin, 50 µg/mL; tetracycline, 10 µg/mL.

1.3.3.2 Chemical Library

The chemical library of the ICBMS (Université de Lyon, INSA, Villeurbanne, France) contained 240 synthetic derivatives of AHLs or known QSIs. These chemicals were kept in DMSO stock solutions (10 mM) at –20 °C. The library includes various types of

QS agonists or antagonists, either structurally related to AHL (carboxamides, sulfonamides, urea, sulfonylurea, reverse amides, triazoles or tetrazoles), or bromoenamines and bromofuranones designed by analogy to natural compounds known as QSI [24–31]. This latter category includes the imidazolium derivatives found to be active in this study and designed as analogues of calmidazolium which were identified as QSIs by virtual (*in silico*) screening [21, 22].

1.3.3.3 Screening for QSIs

Compounds of the chemical library were individually assayed for QSI-activity at two concentrations (100 μ M and 0.1 μ M) in 96-microwell plates in the presence of the AHL 3-OC8-HSL at 1.5 μ M and the *Pectobacterium* QS-biosensor. After 4 h of incubation at 30 °C, β -glucuronidase activities were measured using the appropriate substrate 4-nitrophenyl- β -D-glucuronide, as previously described [32]. The 4-nitropyridine-*N*-oxide (4-NPO) was used as a QSI reference [23]. The added DMSO did not exceed 5% of the total volume of culture medium and did not alter the bacterial growth.

1.3.3.4 Measurement of AC₅₀, GIAC₅₀, MIC and MBC Values of the QSIs

In the case of the *Pectobacterium* QS-biosensor, half maximal activity concentrations (AC₅₀) were calculated using QSI concentrations ranging from 0.1 to 100 μ M. At the AC₅₀ concentrations, the growth index (GIAC₅₀) was calculated as the ratio of the OD_{600nm} mean-values measured for bacterial cultures performed with and without QSI. Toxicity of these compounds was also evaluated by measuring the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC). MICs, which are the lowest concentrations of QSI inhibiting any visible growth after 40 h of incubation at 30 °C, were estimated by culturing 10⁵ CFU/mL of the *Pectobacterium* cells in the presence of different concentrations of QSI. MBCs, which are the lowest concentrations of

QSI (μM) that result in a 99.9% reduction of the initial bacterial population (10^5 CFU/mL) after 40 h of incubation at 30 °C in the presence of different concentrations of QSI, were estimated by plating 100 μL of the *Pectobacterium* cultures onto agar TY plates. After an incubation of 24 or 48 h at 30 °C, CFU were enumerated and the MBC values calculated.

1.3.3.5 Virulence Assays on Potato Tubers

Potato tubers of *S. tuberosum* var. Bintje (length 35 to 45 mm, CNPPT/SIPRE, Achicourt, France) were surface sterilized by washing in a diluted commercial bleach solution for 10 min. Next, the potatoes were rinsed once with sterile water and allowed to dry at room temperature overnight. An overnight culture (25°C; 200 rpm) of the *P. atrosepticum* wild-type strain CFBP6276 in TY medium was collected by centrifugation (room temperature, 4000 rpm, 15 min) and washed twice using 0.8% NaCl. The bacterial pellet was resuspended in 0.8% NaCl (room temperature, 4000 rpm, 15 min). Each tuber ($n = 10$ per conditions) was inoculated with 10^7 CFU of *P. atrosepticum* in presence of the QSIs at 20 μM . The infected tubers were incubated at 25 °C in a water saturated atmosphere. Five days post-infection, the tubers were cut in the middle, photographed and the soft-rot symptoms were categorized using a virulence scale that contained four categories, depending on the diameter (D) of the maceration zone around the infection site: 1, no maceration; 2, low maceration ($D < 2$ mm); 3, moderate maceration ($D < 5$ mm) and 4, strong maceration ($D \geq 5$ mm). The Kruskal and Wallis statistical test with $\alpha = 5$ or 10% allowed the statistical analysis of symptoms on potato tubers.

1.3.4 Conclusions

Our work highlighted a novel family of QSI that limit *Pectobacterium*-induced symptoms in the potato tubers. The identified QSIs are *N, N'*-bisalkylated imidazolium salts which exhibited QSI-activity when used under sub-lethal concentrations. Future works should

evaluate the QSI strategy under greenhouse and field conditions, especially in combination with biocontrol-strategies [33–36] to limit the symptoms caused by the pathogens *Pectobacterium* and *Dickeya*.

Acknowledgments

The authors thank Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS-France), Agence nationale de la recherche (ANR – project ECORUM - ANR 11-BSV7-019), Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre (FN3PT/RD3PT) and Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT-CIFRE n°1282/2011) for financial supports. Potato tubers were kindly supplied by CNPPT/SIPRE.

References

1. Pérombelon, M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: An overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* **2002**, *51*, 1–12.
2. Pöllumaa, L.; Alamäe, T.; Mäe, A. Quorum sensing and expression of virulence in pectobacteria. *Sensors* **2012**, *12*, 3327–3349.
3. Crépin, A.; Beury-Cirou, A.; Barbey, C.; Farmer, C.; Hélias, V.; Burini, J.F.; Faure, D.; Latour, X. *N*-Acyl homoserine lactones in diverse *Pectobacterium* and *Dickeya* plant pathogens: Diversity, abundance, and involvement in virulence. *Sensors* **2012**, *12*, 3484–3497.
4. Liu, H.; Coulthurst, S.J.; Pritchard, L.; Hedley, P.E.; Ravensdale, M.; Humphris, S.; Burr, T.; Takle, G.; Brurberg, M.B.; Birch, P.R.J.; *et al.* Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000093.
5. Smadja, B.; Latour, X.; Faure, D.; Chevalier, S.; Dessaux, Y.; Orange, N. Involvement of *N*-acylhomoserine lactones throughout the plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2004**, *17*, 1269–1278.
6. Fuqua, W.C.; Winans, S.C.; Greenberg, E.P. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 269–275.
7. Dong, Y.H.; Wang, L.H.; Xu, J.L.; Zhang, H.B.; Zhang, X.F.; Zhang, L.H. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserinelactonase. *Nature* **2001**, *411*, 813–817.
8. Uroz, S.; D'Angelo-Picard, C.; Carlier, A.; Elasri, M.; Sicot, C.; Petit, A.; Oger, P.; Faure, D.; Dessaux, Y. Novel bacteria degrading *N*-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology* **2003**, *149*, 1981–1989.
9. Dong, Y.H.; Zhang, X.F.; Xu, J.L.; Zhang, L.H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 954–960.
10. Cirou, A.; Diallo, S.; Kurt, C.; Latour, X.; Faure, D. Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ. Microbiol.* **2007**, *9*, 1511–1522.
11. Manefield, M.; Welch, M.; Givskov, M.; Salmond, G.P.; Kjelleberg, S. Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *205*, 131–138.
12. Palmer, A.G.; Streng, E.; Jewell, K.A.; Blackwell, H.E. Quorum sensing in bacterial species that use degenerate autoinducers can be tuned by using structurally identical non-native ligands. *Chembiochem* **2011**, *12*, 138–147.
13. Palmer, A.G.; Streng, E.; Blackwell, H.E. Attenuation of virulence in pathogenic bacteria using synthetic quorum-sensing modulators under native conditions on plant hosts. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1348–1356.
14. Kalia, V.C. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 224–245.
15. Stevens, A.M.; Queneau, Y.; Soulère, L.; von Bodman, S.; Doutheau, A. Mechanisms and synthetic modulators of AHL-dependent gene regulation. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4–27.

16. Galloway, W.R.; Hodgkinson, J.T.; Bowden, S.D.; Welch, M.; Spring, D.R. Quorum sensing in gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 Quorum sensing pathways. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 28–67.
17. Rasch, M.; Rasmussen, T.B.; Andersen, J.B.; Persson, T.; Nielsen, J.; Givskov, M.; Gram, L. Well-known quorum sensing inhibitors do not affect bacterial quorum sensing-regulated bean sprout spoilage. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102*, 826–837.
18. Kwasiborski, A.; Mondy, S.; Beury-Cirou, A.; Faure, D. Genome sequence of the *Pectobacterium atrosepticum* strain CFBP6276, causing blackleg and soft rot diseases on potato plants and tubers. *Genome Announc.* **2013**, *1*, doi:10.1128/genomeA.00374-13.
19. Latour, X.; Diallo, S.; Chevalier, S.; Morin, D.; Smadja, B.; Burini, J.F.; Haras, D.; Orange, N. Thermoregulation of *N*-acyl homoserine lactones-based quorum sensing in the soft rot bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 4078–4081.
20. Cui, Y.; Chatterjee, A.; Hasegawa, H.; Chatterjee, A.K. *Erwinia carotovora* subspecies produce duplicate variants of ExpR, LuxR homologs that activate *rsmA* transcription but differ in their interactions with *N*-acylhomoserine lactone signals. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 4715–4726.
21. Soulère, L.; Sabbah, M.; Fontaine, F.; Queneau, Y.; Doutheau, A. LuxR-dependent quorum sensing: Computer aided discovery of new inhibitors structurally unrelated to *N*-acylhomoserine lactones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4355–4358.
22. Sabbah, M.; Soulère, L.; Reverchon, S.; Queneau, Y.; Doutheau, A. LuxR dependent quorum sensing inhibition by *N,N*-disubstituted imidazolium salts. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4868–4875.
23. Rasmussen, T.B.; Bjarnsholt, T.; Skindersoe, M.E.; Hentzer, M.; Kristoffersen, P.; Ko, M.; Nielsen, J.; Eberl, L.; Givskov, M. Screening for Quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 1799–1814.
24. Reverchon, S.; Chantegrel, B.; Deshayes, C.; Doutheau, A.; Cotte-Pattat, N. New synthetic analogues of *N*-acyl homoserine lactones as agonists or antagonists of transcriptional regulators involved in bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1153–1157.
25. Castang, S.; Chantegrel, B.; Deshayes, C.; Dolmazon, R.; Gouet, P.; Haser, R.; Reverchon, S.; Nasser, W.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Doutheau, A. *N*-sulfonylhomoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5145–5149.
26. Frezza, M.; Castang, S.; Estephane, J.; Soulère, L.; Deshayes, C.; Chantegrel, B.; Nasser, W.; Queneau, Y.; Reverchon, S.; Doutheau, A. Synthesis and biological evaluation of homoserine lactone derived ureas as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4781–4791.
27. Frezza, M.; Soulère, L.; Reverchon, S.; Guilian, N.; Jerez, C.; Queneau, Y.; Doutheau, A. Synthetichomoserine lactone-derived sulfonylureas as inhibitors of *Vibrio fischeri* quorum sensing regulator. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3550–3556.
28. Boukraa, M.; Sabbah, M.; Soulère, L.; El Efrif, M.L.; Queneau, Y.; Doutheau, A. AHL-dependent quorum sensing inhibition: Synthesis and biological evaluation of α -(*N*-alkyl-carboxamide)- γ -butyrolactones and α -(*N*-alkyl-sulfonamide)- γ -butyrolactones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6876–6879.
29. Sabbah, M.; Fontaine, F.; Grand, L.; Boukraa, M.; Efrif, M.L.; Doutheau, A.; Soulère, L.; Queneau, Y. Synthesis and biological evaluation as LuxR-dependent Quorum-Sensing modulators of new *N*-acyl-homoserine-lactone analogues based on triazole and tetrazole scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4727–4736.
30. Estephane, J.; Dauvergne, J.; Soulere, L.; Reverchon, S.; Queneau, Y.; Doutheau, A. *N*-Acyl-3-amino-5*H*-furanone derivatives as new inhibitors of LuxR-dependent quorum sensing: Synthesis, biological evaluation and binding mode study. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4321–4324.
31. Sabbah, M.; Bernollin, M.; Doutheau, A.; Soulère, L.; Queneau, Y. A new route towards fimbrolide analogues: Importance of the exomethylene motif in LuxR dependent quorum sensing inhibition. *Med. Chem. Comm.* **2013**, *4*, 363–366.
32. Tannières, M.; Beury-Cirou, A.; Vigouroux, A.; Mondy, S.; Pellissier, F.; Dessaux, Y.; Faure, D. A metagenomic study highlights phylogenetic proximity of quorum-quenching and xenobiotic-degrading amidases of the AS-family. *PLoS One* **2013**, *8*, e65473.
33. Wood, E.M.; Miles, T.D.; Wharton, P.S. The use of natural plant volatile compounds for the control of the potato postharvest diseases, black dot, silver scurf and soft rot. *Biol. Control* **2013**, *64*, 152–159.

34. Cirou, A.; Mondy, S.; An, S.; Charrier, A.; Sarrazin, A.; Thoison, O.; DuBow, M.; Faure, D. Efficient biostimulation of the native and introduced quorum-quenching *Rhodococcus erythropolis* revealed by a combination of analytical chemistry, microbiology and pyrosequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 481–492.
35. Cirou, A.; Raffoux, A.; Diallo, S.; Latour, X.; Dessaux, Y.; Faure, D. Gamma-caprolactone stimulates the growth of quorum-quenching *Rhodococcus* populations in a large-scale hydroponic system for culturing *Solanum tuberosum*. *Res. Microbiol.* **2011**, *162*, 945–950.
36. Jafra, S.; Przysowa, J.; Czajkowski, R.; Michta, A.; Garbeva, P.; van Der Wolf, J.M. Detection and characterization of *N*-acyl homoserinelactone-degrading bacteria from the potato rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* **2006**, *52*, 1006–1015.

1.4 Etudes complémentaires à l'article 3

1.4.1 Etudes complémentaires avec la souche bio-indicatrice d'*A. tumefaciens* NT1(pZNLR4)

La souche bio-indicatrice *A. tumefaciens* NT1(pZNLR4) (Cha *et al.*, 1994) est mutée au niveau des gènes codant la synthétase et ne produit donc plus de molécules signal type NAHL. Cette souche a été modifiée pour exprimer le gène *lacZ* (β -galactosidase) lorsqu'elle perçoit dans l'environnement les molécules 3-OC8-HSL. Il devient ainsi possible par un dosage colorimétrique de tester rapidement et simplement un grand nombre de molécules QSI ciblant la reconnaissance ou la synthèse de la 3-OC8-HSL chez *A. tumefaciens*. Les souches bio-indicatrices, *A. tumefaciens* NT1(pZNLR4) et *P. atrosepticum* CFBP6276-EI (pME6031-*rsmA::uidA*) utilisent la même molécule signal de type NAHL. Ces deux souches bio-indicatrice ont permis d'évaluer si d'une espèce à coloration de gram négative à une autre, l'efficacité des molécules QSI pouvait être similaire.

1.4.1.1 Matériel et méthodes

La chimiotèque de 240 composés est la même que celle étudiée précédemment dans l'article n° 3 (des Essarts *et al.*, 2013). La souche bio-indicatrice est cultivée sur milieu de culture AB additionné de mannitol comme source de carbone (0,2%) et de Gentamicine à 25 μ g/mL.

La procédure de criblage des composés chimiques avec cette souche est la même que celle développée pour la souche de *Pectobacterium* excepté la concentration en 3-OC8-HSL qui est abaissée à 0.5 nM dans les tests de criblage des QSI. Le test colorimétrique se réalise par la

Molécule	<i>P. atrosepticum</i>			<i>A. tumefaciens</i>		
	CA ₅₀ ^a	CMI	CMB	CI ₅₀	CMI	CMB
4-NPO	> 100 (12%) ^b	50	> 100	> 100 (17%)	> 100	> 100
29-L-A06	18	25	25	62	< 2.5	25
29-L-A11	14	10	25	52	< 2.5	10
29-L-B02	16	< 2.5	2.5	50	< 2.5	75
29-L-C03	20	25	25	64	< 2.5	75

Tableau 2 : Caractéristiques biologiques des quatre QSI sélectionnés pour les souches bio-indicatrices, *P. atrosepticum* et *A. tumefaciens* étudiées. Abréviations : CA₅₀ : Concentration activatrice de 50 % de l'activité enzymatique maximale des cellules, CMI : Concentration maximale inhibitrice de croissance, CMB : Concentration maximale bactéricide et CI₅₀ : Concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique maximale des cellules.

^a Les valeurs sont données en µM

^b Entre parenthèses, l'inhibition (%) avec une concentration testées de 100 µM (concentration maximale testée dans cette étude).

révélation de l'activité enzymatique de la β -galactosidase, encodée par *lacZ*, avec le substrat ONPG (Ortho-nitrophényl- β -galactoside). La détermination de la CI_{50} pour la souche d'*Agrobacterium* est réalisée de la même façon que la détermination de la CA_{50} chez *P. atrosepticum* CFBP6276-EI (cf. [article 3](#)). La différence réside dans le fait que pour la souche de *P. atrosepticum*, une activation du système rapporteur est recherchée en présence de QSI, alors que chez *A. tumefaciens*, il s'agit d'une recherche d'activation du système rapporteur.

1.4.1.2 Résultats

1.4.1.2.1 Identification des QSI d'*Agrobacterium*

Dans une première étape les composés ont été utilisés à la concentration de 100 μ M et 55 molécules ont été identifiées avec *A. tumefaciens*. Dans un second criblage, utilisant les molécules chimiques à 50, 10, 2,5 ou 0,1 μ M, il est ressorti 6 molécules QSI dont les 4 plus actives sont les molécules : 29-L-A06, 29-L-A11, 29-L-B02 et 29-L-C03, c'est-à-dire les mêmes que celles sélectionnées pour la souche bio-indicatrice *P. atrosepticum* CFBP6276-EI (cf. figure 2 de [l'article 3](#) ; des Essarts *et al.*, 2013).

1.4.1.2.2 Valeurs des IC_{50} et évaluation de la toxicité bactérienne (paramètres CMI/CMB) des QSI chez *Agrobacterium*

Pour la souche *A. tumefaciens* NT1(pZNLR4), la concentration inhibitrice 50 (CI_{50}) est la concentration à laquelle il est observée une inhibition de moitié de l'activité maximale enzymatique des *Agrobacterium*. La CI_{50} a été déterminée pour les quatre QSI sélectionnés en communs aux deux souches bio-indicatrice étudiées (29-L-A06, 29-L-A11, 29-L-B02 et 29-L-C03). L' IC_{50} est déterminée en utilisant un dégradé de concentration en QSI, s'étendant de 0,1 μ M à 100 μ M. L' IC_{50} de ces quatre composés varie entre 50 et 64 μ M (tableau 2). Les paramètres d'évaluation de la toxicité des molécules sur *Agrobacterium*, d'abord la concentration maximale inhibitrice (CMI), puis la concentration maximale bactéricide (CMB) sont déterminés de la même façon que pour *Pectobacterium* ([article 3](#)). Les résultats obtenus

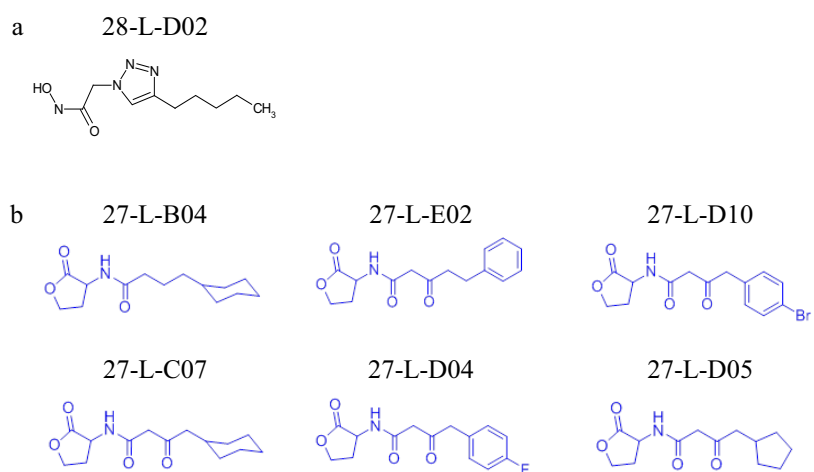


Figure 4 : Structures des molécules agonistes aux molécules signal chez *Pectobacterium* (a) et *Agrobacterium* (b) trouvées dans cette étude.

pour les quatre molécules chimiques avec les deux souches bio-indicatrices étudiées sont présentés dans le tableau 2. Il est à remarquer que ces quatre molécules décrites jusqu'à présent comme molécules QSI pour *A. tumefaciens* apparaissent comme toxiques pour cette souche car les valeurs des CI_{50} de chacune d'entre elles sont bien supérieures à celles de leurs CMI respectives. Les molécules 29-L-A06 et 29-L-A11 seraient même bactéricide pour cette souche.

1.4.2 Molécules de la chimiothèque agonistes au signal QS chez *Pectobacterium* et *Agrobacterium*

La banque de 240 molécules chimiques utilisée comprend une fraction d'analogues structuraux aux NAHL (types de molécules utilisées dans la signalisation QS des pathogènes étudiés). En ce sens, cette banque de molécules a été également testée pour leur activité agoniste en utilisant deux concentrations différentes de l'ensemble des 240 molécules chimiques (100 nM et 100 μ M). Cinquante molécules ont ainsi pu être sélectionnées pour la souche bio-indicateur *A. tumefaciens* NT1(pZNLR4) et seule une molécules pour la souche *P. atrosepticum* CFBP6276-EI. Après confirmation grâce à l'utilisation d'un dégradé de concentration de ces molécules retenues, il apparait que seule une molécule pour *P. atrosepticum* CFBP6276-EI(pME6031-*rsmA::iudA*) et 6 molécules pour *A. tumefaciens* NT1(pZNLR4-*traG::lacZ*) seraient des molécules agonistes au signal QS dans les systèmes respectifs. La structure de ces molécules agonistes au signal QS d'*A. tumefaciens* et *P. atrosepticum* sont présentées dans la figure 4 et apparaissent très proches des molécules signal type NAHL utilisées dans la signalisation QS de ces souches (cf. figure 2 a, [article 3](#)).

1.5 Conclusions et bilan du chapitre IV

Sur la base de ces criblages de molécules QSI pour la souche *A. tumefaciens* NT1(pZNLR4-*traG::lacZ*) et la souche *P. atrosepticum* CFBP6276-EI (pME6031-*rsmA::iudA*) comprenant 2 criblages successifs, 6 molécules étaient trouvées comme QSI pour les deux bio-indicateurs.

Parmi elles, les plus actives pour leur capacité à perturber le QS sont les 4 molécules suivantes : 29-L-A06, 29-L-A11, 29-L-B02 et 29-L-C03 (structures données en figure 2). Il est à remarquer que l'ensemble de ces dernières appartiennent à la famille de molécules des dérivés d'imidazolium qui présentent une substitution avec un groupe polyaromatique et/ou une chaîne aliphatique plus ou moins étendue (figure 2). Comme écrit dans l'article n°3, ces composés ont été conçus par analogie aux calmidazolium, identifiés précédemment comme QSI par criblage virtuel *in-silico* (Soulère *et al.*, 2010). La longueur de la chaîne alkyle sur les atomes d'azote est importante dans l'activité QSI de ces molécules lorsqu'elle est testée sur *Vibrio fischeri* (Sabbah *et al.*, 2011, 2012 et 2013 ; Boukraa *et al.*, 2011). Dans notre étude, bien que toutes les activités QSI soient de l'ordre du μM , on obtient des activités légèrement supérieures lorsque le cycle imidazolium est substitué avec un fragment benzhydryle dichloré et de l'autre côté avec une plus courte chaîne alkyle. Néanmoins, ce fragment dichloré, est très certainement responsable de la toxicité de ces molécules trouvées après détermination de leur CMI/CMB (tableaux 1 et 2).

Les valeurs de CI_{50} et de CA_{50} des 4 composés (29-L-A06, 29-L-A11, 29-L-B02 et 29-L-C03) varient entre 50 et 64 μM pour *A. tumefaciens* et entre 14 et 20 μM pour *P. atrosepticum* (tableaux 1 et 2), ce qui suggère que la voie de signalisation du QS apparait comme plus sensible à ces QSI pour *Pectobacterium* qu'*Agrobacterium*. Le QSI de référence, le 4-NPO, actif sur *P. aeruginosa* (Rasmussen *et al.*, 2005) apparait moins efficace que ces dérivés d'imidazolium contre les pathogènes étudiés (tableau 2).

La CMI et la CMB évaluées pour tous les QSI avec les deux agents, montrent pour la souche *A. tumefaciens* NT1(pZNL4), des valeurs en dessous de la valeur de l' IC_{50} , révélant la toxicité de ces composés (tableau 2). Pour *P. atrosepticum*, le QSI 29-L-B02 présente des valeurs de CMI et CMB inférieures à la valeur d' AC_{50} , tandis que les autres QSI présentent des valeurs supérieures aux valeurs AC_{50} , ou au moins une valeur d'ordre similaire dans le cas

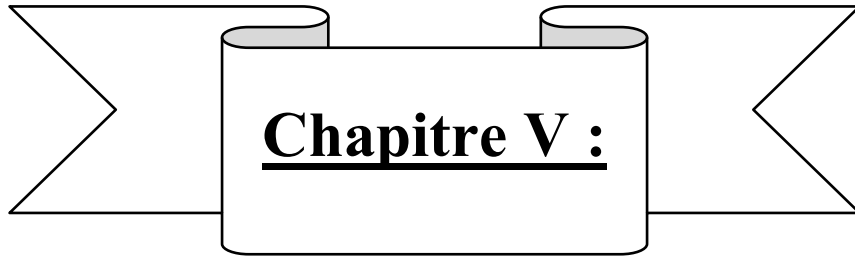
de la CMI du 29-L-A11 (tableau 2). Les molécules apparaissant donc toxiques ne sont cependant pas à rejeter en masse. En effet, elles pourraient être valorisées dans la composition d'une stratégie de lutte biologique intégrée contre un ensemble de pathogènes. Cette stratégie reposerait alors sur l'antibiose des pathogènes.

Les dérivés imidazolium étaient trouvés comme les plus efficaces (action de l'ordre du μM également) pour perturber la signalisation QS chez la bactérie marine *V. fischeri* qui utilise le 3-OC6-HSL comme signal (Sabbah *et al.*, 2011), ce qui renforce l'idée qu'ils peuvent être utilisés comme molécules QSI ciblant un large spectre de pathogènes. Outre les espèces de *Pectobacterium* dans lesquelles le QS joue un rôle clé dans la virulence, le QS a également été impliqué dans la régulation partielle de la virulence chez *D. solani* et *D. dianthicola*, d'autres agents responsables de la jambe noire sur pommes de terre (Crépin *et al.*, 2012a et b). Une évaluation des mêmes QSI identifiés dans ce travail pourrait être entreprise sur ces organismes afin d'augmenter le spectre des organismes cibles, mais cela à condition au préalable de concevoir les souches bio-indicatrices correspondantes. Par exemple, en créant des mutants des souches *D. dianthicola* RNS04.9 ou *D. solani* 3337.

Outre les molécules QSI, cette étude nous a permis de révéler également des molécules candidates pour un effet agoniste aux molécules signal du QS. Les expériences montrent que seules 6 molécules auraient cet effet avec le bio-indicateur *Agrobacterium* et une seule avec *Pectobacterium* (structures présentées figure 4). Ces molécules sont proches au niveau de leur structure aux molécules de type 3-OC8- ou 3-OC6-HSL à partir desquelles la chaîne alkyle est modifiée. Ce qui expliquerait leur effet agoniste sur les souches bio-indicatrices. Pour valoriser les molécules agonistes au signal QS sélectionnées par ce travail, il serait envisageable de voir leur coût par rapport aux molécules de type NAHL utilisées habituellement au laboratoire. Par exemple, 100 mg de 3-OC8-HSL coûte 300 euros dans le commerce (Sigma-Aldrich). Si l'activité d'un agoniste est sensiblement identique à celle des

NAHL (sans être toxique pour les bactéries) et à un coût moindre, il serait envisageable de réaliser les études du QS chez *Agrobacterium* ou *Pectobacterium* avec ce type de molécules.

Le traitement par les QSI peut être proposé comme un complément aux autres approches anti-QS telles que l'utilisation d'agents de lutte biologique capables de dégrader les signaux QS (Uroz *et al.*, 2003 et Cirou *et al.*, 2007). Des travaux futurs pourraient évaluer les stratégies anti-QS en serre et au champ, en particulier en combinaison avec d'autres stratégies de biocontrôle pour limiter les symptômes causés par les phytopathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya*.



Discussion Générale et Travaux Futurs

Discussion générale et Travaux futurs

1.1 Discussion générale

Ce travail de thèse a porté sur l'étude du pouvoir pathogène *in-vitro* et *in-planta* de deux souches de *Dickeya* isolées récemment de symptômes de jambe noire au champ, *D. dianthicola* RNS04.9 (des Essarts *et al.*, 2015) et *D. solani* 3337 (=RNS08.23.3.1A) (Hélias, 2008 ; Khayi *et al.*, 2014), et sur le développement de stratégies de lutte biologique ciblant ces phytopathogènes. Ce projet a débouché sur l'acquisition de nouvelles connaissances concernant la virulence, le métabolisme et les traits génétiques de ces souches phytopathogènes de la pomme de terre (chapitre II). Une meilleure compréhension de la pathogénie des phytopathogènes permet de proposer des stratégies de bio-lutte appropriées. Les stratégies de lutte biologique développées dans les chapitres III et IV ont ciblé la viabilité des agents pathogènes et l'expression de leurs facteurs de virulence.

Ce chapitre vise à discuter des acquis de ces travaux de doctorat permettant d'envisager, en perspective, des stratégies de lutte biologique combinées vis-à-vis des deux genres bactériens *Pectobacterium* et *Dickeya* responsables des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle causant d'importants dégâts en culture de pomme de terre.

1.1.1 Pouvoir pathogène de *D. dianthicola* et *D. solani*

Les souches *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337, respectivement isolées en 2004 et 2008 (Hélias *et al.*, 2008) ont été caractérisées par des études biochimiques, phytopathologiques, génomiques et transcriptomiques (Crépin *et al.*, 2012a et b ; Khayi *et al.*, 2014, Pédrón *et al.*, 2014 ; des Essarts *et al.*, 2015). Ces études montrent que la souche *D. dianthicola* RNS04.9 (Ddi04.9) est plus agressive que la souche *D. solani* 3337 (Dsol3337) pour l'expression de la jambe noire sur plante entière. Cependant, Ddi04.9 apparaît moins

virulente que Dsol3337 lors des tests réalisés sur tubercules de pomme de terre. Ces résultats sont contraires à la description faite par Toth *et al.* (2011) qualifiant l'espèce *D. solani* comme plus virulente. Ils rejoignent néanmoins d'autres études récentes montrant que la virulence des *Dickeya* dépend de multiples facteurs dont : les tissus végétaux infectés, la physiologie de ces tissus, la variété de pomme de terre ou encore les souches des pathogènes (Hélias *et al.*, 2014 ; Gill *et al.*, 2014 ; Rouffiangue *et al.*, 2014 ; Jafra *et al.*, 2008). Les travaux présentés ici, ont fait l'objet d'études sur la variété Bintje (*S. tuberosum*). Cette variété est classée comme variété, moyennement sensible, vis-à-vis de *Pectobacterium atrosepticum*. Il n'est donc exclu que les variétés de pommes de terre puissent montrer des sensibilités différentes face aux deux souches de pathogènes utilisées dans cette étude (Hélias, communication personnelle ; Hélias *et al.*, 2014 ; Gill *et al.*, 2014).

En ce sens, les études de comparaison génomique et fonctionnelle entre Ddi04.9 et Dsol3337 permettraient de mettre en évidence certains traits particuliers relatifs à chacune des souches bactériennes phytopathogènes (voire même relatif aux espèces bactériennes macergènes de la pomme de terre, si et seulement si, des études complémentaires viennent étayer ces données). Notamment, l'installation/l'invasion préférentielle par l'une ou l'autre des deux espèces de *Dickeya* au sein de la plante hôte, voire au sein des tissus végétaux, pourront être étudiées. Les études de comparaison génomique, menées avec les souches *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337, corrélées à la capacité métabolique de certains substrats ont par exemple révélé que la présence ou l'absence de 4 régions particulières dans le génome de ces souches permettent d'expliquer le phénotype vis-à-vis de l'urée, du galactonate, du rhamnose ou de l'arabinose. Une étude similaire, entre les souches *D. dadantii* 3937 et Dsol3337, a déjà été publiée par Pédrón *et al.* (2014) (article en annexe du manuscrit).

L'étude du transcriptome menée dans le travail de thèse fait figure d'étude pionnière dans l'analyse des transcriptomes de *D. dianthicola* et de *D. solani* en phase d'infection. L'analyse

préliminaire des résultats présentés dans le chapitre II devra être poursuivie. L'approfondissement des analyses, qui n'a pu être réalisé faute de temps, devra être poursuivi afin d'aboutir à l'identification (puis à la validation) de gènes activés ou réprimés dans les conditions de virulence chez ces phytopathogènes. Ces analyses contribueront alors à une meilleure connaissance de la pathogénie de ces pathogènes et pourraient permettre de proposer des méthodes de bio-protection encore mieux adaptées vis-à-vis de ces pathogènes. Conscient que les modalités utilisées dans notre étude pour Ddi04.9 et Dsol3337 : infection sur tranches de tubercules (condition *in-vivo*) comparées à des conditions de croissance en culture pure (condition *in-vitro*) conduisent probablement à augmenter l'expression de gènes non liés à la phase d'infection *stricto sensu*. Pour s'affranchir de ce biais, une comparaison des transcriptomes de ces bactéries en phase d'infection sur tubercules *versus* ces bactéries en phase de colonisation racinaire (la figure 1 montre schématiquement le principe de cette expérience) pourra être particulièrement intéressante à mener. Il faudra pour ce faire, réussir à surmonter les difficultés techniques rencontrées lors de notre étude. Notamment ces deux conditions devront être réalisées dans une atmosphère adéquate, en micro-aérophilie pour restreindre l'effet de l'oxygène et identique pour les deux modalités. Une méthodologie d'isolement appropriée des bactéries en phase d'infection racinaire devra être mise au point afin de permettre un correct séquençage. Notamment, cette procédure devra permettre de diminuer à l'état de trace les éventuelles molécules/composés issues du milieu de croissance des micro-plants (carraghénane contenu dans le milieu gélosé de culture) agissant négativement sur la procédure du séquençage.

Il est admis que l'une des sources d'inoculum des pathogènes est le tubercule lui-même (*cf.* chapitre I). De plus, il est décrit que les *Dickeya* sont très mobiles dans les tissus vasculaires de la plante et des tubercules. En effet, lorsque la contamination a lieu, la densité bactérienne la plus élevée est souvent retrouvée à l'extrémité du stolon (talon), indiquant l'existence d'un

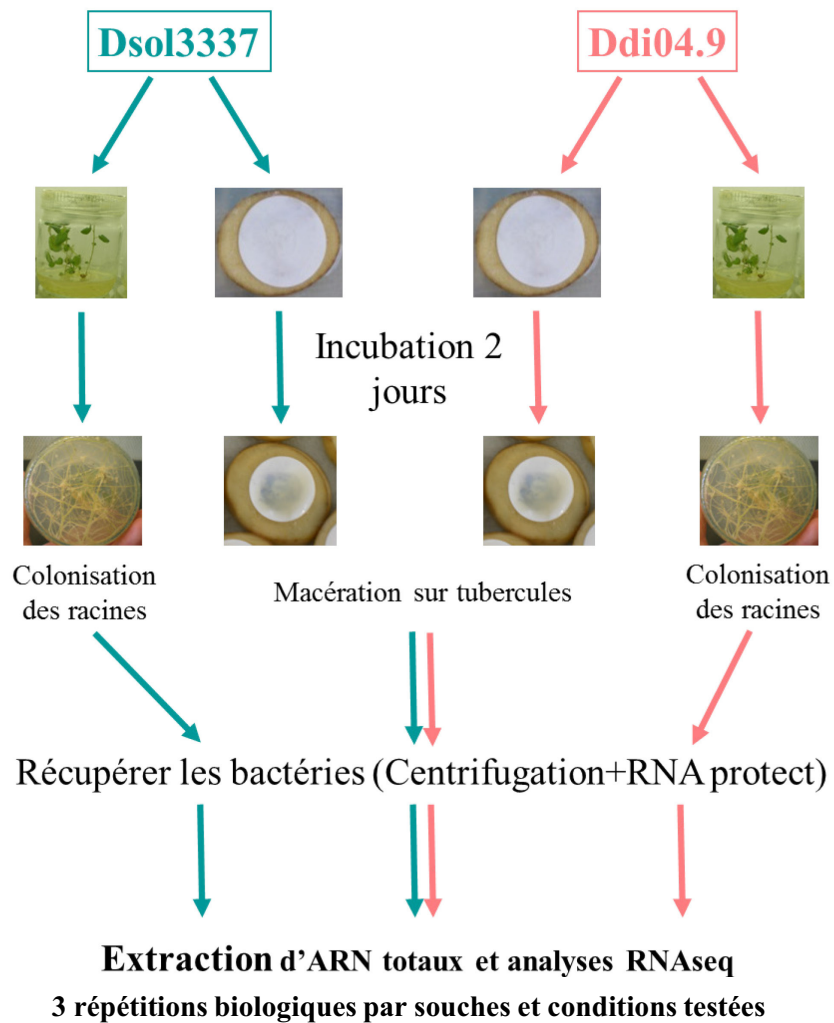


Figure 1 : Schéma du protocole de l'analyse transcriptomique d'origine. Cette analyse devait mettre en évidence les gènes différemment exprimés entre une condition de macération et une condition de colonisation racinaire dans lesquelles sont inoculés *D. dianthicola* RNS 04.9 (Ddi04.9) ou *D. solani* 3337 (Dsol3337).

transport des bactéries à travers les tissus vasculaires du tubercule ; elles peuvent ensuite être véhiculées et contaminer la plante entière et les tubercules fils en cours de développement (Charkoswki, 2007 ; Czajkowski *et al.*, 2010 a et b). D'autre part, les phytopathogènes présents dans le sol peuvent être véhiculés *via* du sol l'eau et pénétrer les racines, les tubercules, entraîner l'infection systémique de la plante et conduire à l'expression de la jambe noire ou de la pourriture molle (Czajkowski *et al.*, 2010 ; Pérombelon, 2002 ; Nykyri *et al.*, 2014 ; Reverchon et Nasser, 2013). Le pathosystème sur plante entière et en conditions contrôles (serre) mis au point lors de la première partie de l'étude a tenu compte et intégré ces caractéristiques écologiques et épidémiologiques de *Dickeya*. Les pathosystèmes en serre miment une infection naturelle *via* de l'eau contaminée (arrosage 3 semaines après la plantation des plantes de pomme de terre avec une suspension de *Dickeya*). Ce procédé permet d'atteindre un taux de jambe noire souhaité, défini au préalable pour les besoins de l'étude (*cf.* chapitre III). Les pathosystèmes développés pour *D. dianthicola* et *D. solani* donnent des résultats reproductibles permettant de contrôler le développement épidémique de la maladie de façon fiable et fournissent un outil novateur et performant, facilement transférable à des fins de développement. Jusqu'alors, les études s'effectuaient avec une inoculation artificielle (infiltration) des tubercules avant plantation (Czajkowski *et al.*, 2011). De plus, ces pathosystèmes apparaissent comme des outils pouvant être transférables en conditions réelles (au champ). Le pathosystème en serre développé et validé lors de ce travail constitue un outil précieux pour pouvoir, suite à ce travail, (i) étudier la pathogénicité des souches pectinolytiques en serre ; (ii) poursuivre les évaluations de stratégies de bio-lutte ou étendre les travaux à de nouveaux antagonistes ; et (iii) la pathogénèse des souches si des outils d'études sont développés (par exemple : souches phytopathogènes traçables dans le tissu).

1.1.2 Stratégies de lutte biologique

Bien que des stratégies de lutte contre les agents pathogènes responsables des symptômes de jambe noire et de pourriture molle soient étudiées depuis longtemps, aucune méthode de lutte n'apparaît réellement efficace contre les pathogènes responsables. Certains travaux ont conduit à proposer notamment des traitements chimiques à base de cuivre ou d'organomercure voire même d'antibiotiques (Bartz, 1999 ; Mills *et al.*, 2006). Toutefois ces traitements chimiques sont interdits (risques de résistances ou toxicité). Les stratégies de bio-protection constituent, dans un contexte de protection environnementale, une alternative de lutte intéressante.

1.1.2.1 Les agents bactériens ciblant l'inhibition de la croissance des pathogènes

Depuis les années 2000, de nombreuses études décrivent sur le criblage et l'évaluation des capacités que possèdent certaines rhizobactéries dans la phytoprotection. Certaines rhizobactéries ont fait l'objet de développements aboutissant à leur commercialisation. Deux produits à base d'agents biologiques actuellement sur le marché, des *Pseudomonas* (Bayer ; Buddrus-Schiemann *et al.*, 2010) et des *Bacillus* (Sourcon-Padena ; Serrano *et al.*, 2011) en tant que fertilisant à base de bio-produits sont décrits par les firmes les commercialisant comme ayant une efficacité contre la maladie de la jambe noire et de la pourriture molle. Toutefois, ces produits restent utilisés de manière préventive et en complément d'autres traitements. De plus, aucun résultat de tests montrant leur efficacité vis-à-vis des bactéries pathogènes n'ont à ce jour été communiqués par les firmes concernées.

Aujourd'hui, comme décrit dans le chapitre I, seules des mesures prophylactiques combinant les bonnes pratiques de culture et l'utilisation de plants certifiés permettent de limiter les pertes dues aux agents pathogènes (Priou et Jouan, 1996; Hélias, 2008 ; Latour *et al.*, 2008). Depuis les études de Kloepper (1983), les genres bactériens les plus utilisés dans des

stratégies de lutte à base d'agents biologiques sont les *Pseudomonas* et les *Bacillus*. Par exemple, les *Pseudomonas* spp. fluorescents, connus pour posséder une forte capacité à extraire le fer du sol pour leur besoin nutritionnel, sont ainsi de bons colonisateurs de la rhizosphère (Latour et Lemanceau, 1997 ; Haas, 2005). De plus, ils sont en outre capables de synthétiser plusieurs types d'antibiotiques et autres métabolites secondaires impliqués dans l'antibiose (Haas *et al.*, 2005). Cependant, l'activité de lutte biologique de tels isolats n'est pas toujours clairement démontrée en conditions naturelles (au champ). En effet, le maintien d'une bactérie à une concentration suffisamment élevée pour être efficace est difficile sur la durée (Duffy *et al.*, 2003 ; Compant *et al.*, 2005). Les bactéries introduites artificiellement entrent en compétition avec les bactéries indigènes, généralement mieux adaptées aux conditions des sols dans lesquelles elles se trouvent. Deux autres difficultés associées à la lutte biologique sont la mise au point d'un support et celle d'une formulation stable garantissant l'intégrité des propriétés antagonistes de bactéries (Cirou *et al.*, 2012).

Pour tenter de trouver de nouvelles rhizobactéries naturelles et efficaces contre les agents pathogènes étudiés, des isollements de bactéries issues de différents environnements de plants de pomme de terre ont été entrepris. Plusieurs prélèvements de rhizosphère, de plants contaminés ou exempts de pathogènes responsables de jambe noire ont été fournis par l'ensemble des organisations de producteurs de la FN3PT/RD3PT. Un total de 10000 souches bactériennes appartenant principalement aux genres *Pseudomonas* (60%) et *Bacillus* (30%) ont été retenues dans une première phase de criblage *in-vitro* pour leur efficacité d'antibiose contre les deux *Pectobacterium* (Pcc98.1 et Pa6276) et deux *Dickeya* (Ddi04.9 et Dsol3337) (*cf.* [article 2](#)). Ces résultats de screening sont cohérents avec ceux issus de précédents travaux qui montrent une diversité bactérienne présentant des activités antagonistes en faveur de ces deux genres bactériens (Czajkowski *et al.*, 2011 ; Cirou *et al.*, 2007). Au terme des tests de criblage *in-vitro* et sur tubercules, seuls 6 isolats bactériens ont été sélectionnés au regard de

leur capacité prometteuse dans la lutte biologique contre les *Dickeya* et *Pectobacterium*. Ces 6 agents de biocontrôle ont fait l'objet d'une étude phylogénétique (*Multilocus Sequence Analysis*) : PA4C2 et PA3G8 sont des *P. fluorescens*, PA14H7 un *P. putida*, PP1-210F et PA1G7 sont des *P. brassicacearum* et BA2H3 un *B. simplex* (Khayati *et al.*, 2015 et Cigna *et al.*, 2015). Seuls trois *Pseudomonas* (PA14H7, PA3G8 et PA4C2) permettent de réduire la croissance de l'ensemble des pathogènes étudiés contrairement aux trois autres souches isolées (PP1-210F, PA1G7 et BA2H3) qui n'ont un effet que sur les pathogènes appartenant au genre *Pectobacterium* (tests *in-vitro*). Les trois agents de lutte (PA14H7, PA3G8 et PA4C2) efficaces contre l'ensemble des pathogènes ont été testés sur le pathosystème pomme de terre/*D. dianthicola* RNS04.9/sol mis au point en serre (*cf.* chapitre 3), de manière monophylétique ou en mélange. L'utilisation du mélange de souches permet une bonne protection contre l'apparition de la jambe noire et la transmission de la contamination à la descendance par *D. dianthicola* RNS04.9 (*cf.* [article 2](#)) et son effet a permis d'obtenir des résultats d'efficacité de traitement plus stables et reproductibles d'une année sur l'autre. Ces résultats rejoignent les recherches d'A. Cirou *et al.* (2010) menées sur l'utilisation et/ou la bio-stimulation de consortia bactériens permettant de lutter efficacement contre les bactéries macergènes de la pomme de terre. A ce titre, ces deux travaux sont originaux puisque l'ensemble des études portant sur la lutte biologique dirigée contre *Dickeya* et/ou *Pectobacterium*, ne décrivent jusqu'à présent que des souches utilisées de manière monophylétique pour lutter contre ces pathogènes (Czajkowski *et al.*, 2010a, 2011, Cirou *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les essais en serre effectués avec les antagonistes de croissance révèlent un maintien à haut niveau de cette population d'antagonistes dans le sol rhizosphérique tout au long de l'expérimentation en serre. Les études préliminaires au champ (non présentées ici) effectuées en 2014 par Euphrasie Munier (sur le site de la SIPRE à Achicourt) sont en accord

avec ces observations. La caractérisation d'amorces souches spécifiques pour les pathogènes et agents de lutte biologique étudiés ici, constitue d'ailleurs un résultat marquant du projet de doctorat.

Partant de l'ensemble de ces connaissances (bibliographiques et travaux sur les trois agents de lutte biologique), il pourrait être judicieux à ce stade de l'étude, d'étudier les mécanismes mis en place par ces trois *Pseudomonas* pour exprimer leur caractère d'antagoniste de développement vis-à-vis des agents pectinolytiques. Il serait judicieux d'identifier précisément les composés susceptibles d'avoir un pouvoir d'antibiose chez ces organismes. Ceci pourrait être réalisé au travers une étude génomique (le génome révélant des possibilités pour la synthèse d'antibiotiques tels que des composés β -lactame ou Collicine-M-like mais aussi de plusieurs types de sidérophores), mais également par une comparaison transcriptomique entre deux conditions dans lesquelles seraient mise la souche de *Pseudomonas* avec ou sans la souche pathogène. Il serait également envisageable de mélanger non plus trois mais deux agents de bio-protection pour évaluer la phytoprotection des plantes vis-à-vis des pathogènes. Une étude de toxicité pour les plantes et les animaux mais aussi l'humain doit être conduite pour la mise sur le marché de telles solutions de lutte biologique composées d'agents bactériens. Il s'agit de s'assurer que les bactéries sont inertes et qu'elles n'ont aucun impact sur la sécurité sanitaire. Des études préliminaires ont d'ores et déjà été initiées en ce sens au laboratoire, notamment grâce à l'analyse des génomes incomplets des trois *Pseudomonas* (Cigna *et al.*, 2015 et Khayi *et al.*, 2015b) avec un outil informatique qui permet de prédire la toxicité d'une souche sur la base de son génome (<http://www.pseudomonas.com/>). De plus, les différents pathosystèmes utilisés au cours de ce projet pour la sélection, la validation et l'évaluation de l'efficacité de ces souches contre les pathogènes, n'ont mis en évidence aucun caractère phytotoxique, de la part de ces trois *Pseudomonas*. Néanmoins, la mise au point d'une formulation puis d'un produit à but de

commercialisation, nécessite la réalisation de tests de toxicité agréés complémentaires. Ces tests sont demandés lors de l'autorisation de mise sur le marché afin de montrer l'innocuité des agents de lutte biologique dans l'environnement mais surtout leur non responsabilité de déclaration de maladie humaine ou végétale. La confection de formulation avec une seule souche ou deux souches peut s'annoncer économiquement plus profitable par rapport à une formulation contenant trois souches. En ce sens, des études futures pourront faire l'objet d'une restriction en termes de nombre de souches inoculées dans le sol.

1.1.2.2 Stratégie ciblant l'expression des gènes régulés par QS

Plusieurs études conduites sur différents pathogènes tels qu'*A. tumefaciens*, *P. aeruginosa* ou *Pectobacterium atrosepticum* ont porté sur le criblage de molécules perturbant la signalisation *Quorum-Sensing* dans le but de contrôler soit l'expression de la virulence (*Pectobacterium*) (Beury-Cirou *et al.*, 2013, des Essarts *et al.*, 2014 ; Jafra *et al.*, 2006 ; Reverchon *et al.*, 2012) soit la dissémination du pouvoir pathogène (*Agrobacterium*). Ainsi, le chapitre III de ce travail explique comment a été criblée une banque de 240 molécules dans le but de sélectionner des molécules QSI ciblant *P. atrosepticum* CFBP6276. Au total 4 molécules actives contre Pa CFBP6276 ont été dans un premier temps identifiées comme QSI. Les résultats des tests de virulence sur pomme de terre mettent évidence 2 molécules permettant de protéger la pomme de terre contre l'apparition de symptôme de pourriture molle induite par la souche Pa CFBP6276 (*cf.* [article 3](#)). Mais seule la molécule 29-L-C03, un dérivé de calmidazolium, montre la capacité à diminuer l'apparition des symptômes grâce à son action de QSI. Les autres molécules présentent en effet une légère toxicité pour la bactérie. L'utilisation de telles molécules pourrait être envisagée dans le cadre d'un développement d'une stratégie de lutte intégrée. Par exemple, pour augmenter le spectre d'action d'une lutte biologique, il pourrait être envisageable de coupler une stratégie de type QSI avec une stratégie ciblant la croissance des pathogènes dans la rhizosphère.

Bien que les différentes espèces appartenant aux genres *Dickeya* n'utilisent probablement pas toutes une régulation QS NAHL dépendante pour gérer leur virulence (Nasser *et al.*, 2014), la régulation QS régie par les NAHL a été décrit pour certaines souches de pathogène (Crépin *et al.*, 2012 a et b). En complément, il serait intéressant d'évaluer l'effet de la molécule 29-L-C03 sur une souche bio-indicatrice de *Dickeya* (également à coloration de Gram négative), dérivant par exemple de *D. dianthicola* RNS04.9 ou *D. solani* 3337.

1.1.3 Lutte biologique intégrée

Dans le chapitre I, il est mentionné que l'utilisation d'intrants chimiques doit être raisonnée et réduite dans le cadre du projet plant Ecophyto 2018. Néanmoins des composés chimiques produits de manière naturelle par la flore bactérienne du sol pourraient être utilisés dans la mise en œuvre de stratégies combinées de lutte biologique. Ils ont pour rôle d'optimiser le spectre d'action du traitement antagoniste en étant intégrés par exemple dans la composition d'un support ou d'une formulation.

Les travaux de développement de stratégies d'anti-virulence des *P. atrosepticum* conduits par Amélie Beury-Cirou durant sa thèse (2007-2010) constituent un exemple de combinaison des moyens de lutte biologique. La stratégie étudiée visait à identifier des bactéries (naturellement présentes dans l'environnement), capables de métaboliser les NAHL produites par les pathogènes, afin de réduire l'expression des facteurs de virulence et ainsi diminuer les symptômes de jambe noire et pourriture molle. Cette approche implique la sélection d'un agent biologique dégradant efficacement les NAHL, *Rhodococcus erythropolis* (souche R138 dans le cas de l'étude), isolée d'une rhizosphère de pomme de terre cultivée en hydroponie, et capable d'exercer un effet de protection vis-à-vis de *Pectobacterium* sur tubercules de pomme de terre. Des travaux complémentaires ont permis d'identifier des agents biochimiques analogues des NAHL, sélectifs de consortia microbiens dégradant les NAHL, de type gamma caprolactone (GCL) et gamma heptolactone (GHL) (Cirou *et al.*, 2007). La bio-stimulation,

l'apport de bactéries antagonistes de lutte biologique et l'application de molécules chimiques anti-QS ne sont pas des méthodes exclusives et pourraient être combinées dans une pratique de lutte intégrée. Par exemple, des molécules naturelles comme la vincadifformine ou l'hordenine ayant potentiellement une activité anti-QS (Beury-Cirou *et al.*, 2013) pourraient être associées à des biostimulants et des souches de lutte biologique. La molécule 29-L-C03 identifiée lors de nos travaux, pourrait également avoir un intérêt dans l'optique d'une association de stratégies de lutte.

D'autre part, il a été démontré que certaines plantes de la famille des légumineuses sont capables de dégrader les NAHL (Delalande *et al.* 2005). L'intérêt d'une co-culture de ces plantes avec des espèces sensibles aux bactéries macergènes comme la pomme de terre ou de leur utilisation en rotation culturale ou de couvert végétal afin de limiter l'infection pourrait être évalué. Ceci nécessiterait que l'activité de telle plantes sur la communauté phytopathogènes demeure stable sur une longue période au-delà de leur culture. Le QS n'agit pas, ou indirectement, sur la viabilité et donc la pérennité dans le sol des bactéries macergènes. Les possibilités d'association entre des antagonistes et des activateurs de défenses des plantes (cf. Chapitre I) pourraient être étudiées dans une perspective de lutte intégrées contre le cortège bactérien pathogène. L'ensemble des stratégies doivent être envisagées dans le respect des mesures prophylactiques préconisées jusqu'alors (rotation des cultures, bonne pratique de culture).

A cela peut être combinée l'utilisation de variétés de pomme de terre peu sensibles à ces pathogènes. Différentes études ont mis en évidence des différences de sensibilités variétales vis à vis des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle (Hélias *et al.*, 2014, Gill *et al.*, 2014 Rouffiane *et al.*, 2014, Laurila *et al.*, 2010).

L'évaluation de ressources génétiques vis-à-vis des bactéries macergènes doit tenir compte du fait que les niveaux de sensibilité d'un matériel génétique donné varient selon que l'on

mesure la sensibilité à la pourriture molle ou la sensibilité à la jambe noire. C'est ainsi qu'au cours de nos travaux nous avons identifié que *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 présentaient une agressivité différente sur tubercules et sur plantes de pomme de terre (cf. chapitre II). Les sensibilités variétales peuvent varier selon l'état physiologique des pommes de terre mais aussi à l'espèce bactérienne pathogène (Hélias, communication personnelle, del-Pilar Marquez-Villavicencio *et al.*, 2011). L'évolution du cortège bactérien mis en évidence nécessite de tenir compte de l'ensemble de cette diversité dans les travaux de génétique. Même si les symptômes sont toujours favorisés par une atmosphère humide, par une pluviométrie importante et des blessures qui permettent l'entrée des bactéries dans la plante, *P. atrosepticum* se développe principalement dans des régions tempérées (15-20°C) alors que les *Pcc* et les *Dickeyas* ont mieux adaptés à un climat chaud tropical ou subtropical (25°C ; Smadja *et al.* 2004). La prise en compte de l'ensemble de ces paramètres est critique pour la mise en place d'un système de criblage adapté à l'évaluation de nouvelles variétés.

Mettre au point une lutte intégrée contre ces pathogènes macergènes responsables de pertes économiques sur culture de pommes de terre est un véritable enjeu pour la filière du plant de pomme de terre. La possibilité de combiner différentes stratégies de lutte biologique est une perspective intéressante à étudier. Outre les évaluations de faisabilité des traitements en cohérence avec les itinéraires techniques appliqués (à quel moment et où traiter, récurrence du traitement, etc.), des études d'évaluation du coût de revient de tels traitements, et de leur impact sur l'environnement (sur les cultures, sur la flore microbienne du sol) restent des notions auxquelles il est nécessaire de penser et d'avoir bien conscience.

1.2 Perspectives

1.2.1 Perspectives sur l'étude des pathogènes

L'exploitation complète des résultats de transcriptomique, réalisées en collaboration avec la plateforme d'Imagif (cf. chapitre II), sur *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337, apparaît

ici comme une des perspectives les plus prometteuses. Suite à l'identification des gènes clés contrôlant l'activation de la virulence de ces pathogènes, une sélection des gènes de ménage dont l'expression dans les différentes conditions expérimentales, ne varie pas sera faite sur la base des résultats de comparaisons conduites. L'analyse des gènes différemment exprimés d'une condition à l'autre, devra ainsi être confirmée par des expériences de RT-qPCR normalisées par rapport à l'expression de tels gènes. D'autre part, une autre étude comparative avec ces mêmes données transcriptomiques peut aussi être envisagée. Nous avons ici procédé à une comparaison de *D. dianthicola* RNS04.9 ou de *D. solani* 3337 dans deux états physiologiques différents (phase d'infection sur tubercules *versus* phase croissance en culture pure ; cf. chapitre II). Il serait intéressant de comparer les gènes différemment exprimés entre *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 pour les deux conditions physiologiques et particulièrement en phase d'infection. Cette comparaison pourrait nous permettre d'identifier des traits particuliers à chaque souche étudiée ; mais aussi, par extrapolation des résultats obtenus pour ces deux souches, à identifier des traits particuliers à chacune des espèces. Notamment, des traits particuliers impliqués dans l'initiation de la macération des tissus végétaux par exemple.

Pour compléter nos travaux, je propose des perspectives en lien avec les stratégies de lutte biologique développées ou en cours d'étude au sein de la SIPRE/CNPPT (cf. partie suivante), d'analyser plus en profondeur les génomes, les transcriptomes et les capacités métaboliques des bactéries pathogènes appartenant au genre *Pectobacterium* et *Dickeya*. En effet, comme indiqué dans le chapitre I, les principales bactéries responsables de symptômes de jambe noire et de pourriture molle, en France, sont les bactéries appartenant au genre *Pectobacterium*, dont *P. atrosepticum* et *P. c.* subsp. *carotovorum*. Les travaux de recherche conduits par la RD3PT-FN3PT sur la diversité des bactéries *Dickeya* et *Pectobacterium* ont montré que cette dernière sous-espèce constituait en réalité un complexe d'espèces et de sous-espèces

précédemment non identifiées. La mise en place de nouveaux outils moléculaires par la RD3PT-FN3PT a ainsi permis d'identifier *P. wasabiae* et *P. c. subsp. Brasiliense* (Hélias *et al.*, 2014), comme par ailleurs en Europe et au-delà. Les travaux d'épidémiologie menés depuis 2003 par V. Hélias en collaboration avec les OP (programme national de recherche RD3PT-FN3PT en collaboration avec l'INRA- UMR IGEPP 1349) ont conduit la RD3PT à élaborer une collection de souches très importante qui constitue aujourd'hui une ressource en matériel biologique unique, très précieuse de par sa diversité. Plusieurs perspectives de recherche peuvent ainsi s'appuyer sur ce matériel vivant conservé depuis plus de 10 ans. Plusieurs souches représentatives de ces espèces et issues de symptômes de jambe noire et/ou de pourriture molle sur pomme de terre au champ pourront être sélectionnées et leurs génomes étudiés après séquençage. Il serait intéressant de réaliser ensuite des études de génomique comparative et ainsi tenter de comprendre comment ces souches sont devenues, acquièrent ou déclenchent leur pathogénicité sur pomme de terre. D'autre part, il serait intéressant de détecter des traits fonctionnels propres aux *Pectobacterium*. Une comparaison avec les souches de *Dickeya* déjà étudiées au laboratoire, notamment au travers de la présente étude, pourrait permettre d'expliquer leur adaptation ou leur capacité d'invasion différente (en lien avec le déplacement à travers les tissus vasculaires par exemple) de la plante hôte. Enfin une comparaison génomique pourra faire l'objet de corrélation avec des études fonctionnelles (métabolique et transcriptomique par exemple) pour appuyer les conclusions. Ceci intégrera l'étude réalisée en 2014 sur les *Dickeya* à laquelle j'ai participé (Pedron *et al.*, 2014, Khayi *et al.*, 2014).

Une des missions de la RD3PT vise à assurer une veille technologique et à développer des outils de détection permettant un diagnostic fiable des pathogènes cibles. Ses travaux récents dans ce domaine ont ainsi permis l'identification de l'espèce *P. wasabiae* et *P. c. subsp. brasiliense* (Hélias *et al.*, 2014) ainsi qu'un transfert effectif des méthodes correspondantes

vers les laboratoires des OP. Après séquençage du génome des pathogènes pectinolytiques, il deviendra opportun de développer, améliorer ou travailler à la mise en place de systèmes de détection de ces pathogènes (Duarte *et al.*, 2004 ; Pritchard *et al.*, 2013 ; Kim *et al.*, 2011 ; Kang *et al.*, 2003 et Waleron *et al.*, 2002). L'étude des données de séquences acquises dans le cadre des perspectives de travaux ci-dessus pourront également être exploitées pour dériver des outils spécifiques des espèces ou sous espèces identifiées. Le développement d'outils de détection des pathogènes est un enjeu important pour la FN3PT/RD3PT afin d'assurer la sélection sanitaire dans le domaine du diagnostic et de la certification du plant.

1.2.2 Perspectives des stratégies de biocontrôle

Cette thèse donne un aperçu des possibilités de lutte biologique vis-à-vis de la jambe noire et de la pourriture molle mais aussi contre leur diffusion aux tubercules fils, grâce à l'utilisation de bactéries ayant un effet antagoniste de croissance vis-à-vis des pathogènes pectinolytiques ([article 2](#)).

Considérant le schéma généalogique de production des plants de pomme de terre, il est admis que la contamination des tubercules peut survenir rapidement après la première année de multiplication au champ des G0/G1 (*cf.* chapitre I), à la faveur de leur contact avec l'inoculum primaire de contamination présent dans l'environnement (sol, eau) (Czajkowski *et al.*, 2011, Charkowski, 2007). Il serait donc intéressant de réaliser une étude permettant d'identifier le(s) moment(s) clés de la contamination et ainsi connaître l'étape à laquelle il serait le plus adéquat au traitement par nos antagonistes.

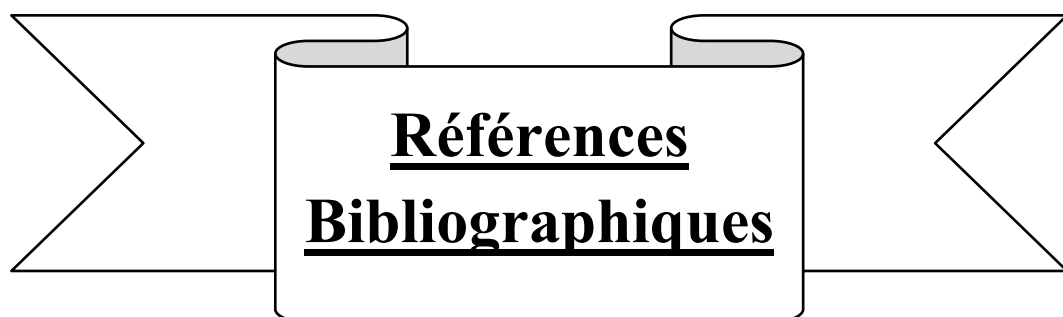
Les travaux d'épidémiologie de la FN3PT/RD3PT ont mis en évidence la présence d'une population polyphylétique de pathogènes au sein des symptômes (Hélias, communication personnelle). Ainsi, des travaux futurs devront permettre l'étude des populations polyphylétiques en rapport avec le développement de maladies. En lien avec les travaux de la SIPRE/CNPPT, il a été proposé pour l'année 2015 de mettre au point des

pathosystèmes en serre impliquant un mélange de pathogènes récemment décrits comme agents de la jambe noire, soient *P. wasabiae* (Khayati *et al.*, 2014), *P. c. brasiliense* (Duarte *et al.*, 2004) et *P. atrosepticum*. Ceci a pour objet d'obtenir à terme un pathosystème en serre plante-*Pectobacterium*-sol. Des travaux de mise au point d'un pathosystème utilisant *P. atrosepticum* ont toutefois été effectués lors de notre étude mais ont résulté en une absence de développement de symptôme. Le nouveau pathosystème pourrait être une adaptation directe du pathosystème développé dans ce travail de thèse avec *D. dianthicola* RNS04.9. Il devra être adapté aux souches de *Pectobacterium* et impliquer, par exemple, une température plus fraîche que celle utilisée pour *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 à savoir 18°C le jour et 15°C la nuit. Ce pathosystème pourra également permettre l'évaluation de stratégies de bio-protection en cours de développement. Ainsi, l'utilisation des 3 agents de biocontrôle identifiés dans cette thèse, en mélange, couplés ou non à l'agent *R. erythropolis* R138, peut être envisagée. En parallèle une nouvelle campagne de mise en place de pathosystème impliquant un sol naturel infecté par un mélange de *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 (Achicourt, SIPRE) pourrait être conduite, afin de valider l'effet du mélange d'agents antagonistes contre un mélange de pathogènes *Dickeya*. Il a été proposé également de combiner des méthodes de lutte biologique, comme pour le pathosystème *Pectobacterium* décrit ci-dessus.

Ces deux pathosystèmes en serre seront également adaptés au champ afin de valider avec une deuxième campagne l'effet de la stratégie de lutte biologique développée dans ce travail. Les amorces PCR souches spécifiques développées par Jérémy Cigna (Ingénieur SIPRE ; en 2014) permettront là encore un suivi des populations pathogènes et antagonistes au cours de temps. La SIPRE continue également de procéder à des essais chez les producteurs avec les agents de lutte développés dans ce travail, notamment sur des jeunes générations de plants (G0/G1, cf. figure 6, Chapitre I). Ce travail s'inscrit dans une logique de prévention de la

contamination par les pathogènes au niveau des lenticelles des tubercules ou des racines des plantes afin qu'ils ne soient pas présent dans les tubercules de « semence » commercialisés.

A plus long terme, il a été proposé à la SIPRE-CNPPT d'élucider les mécanismes de l'effet antagoniste des *Pseudomonas* retenus dans la stratégie de lutte. Notamment, les chimistes et biochimistes de la SIPRE pourraient mettre au point et/ou utiliser des protocoles permettant l'étude des métabolites secondaires sécrétés par ces bactéries. L'étude du transcriptome de ces bactéries en présence et absence des pathogènes, pourra être envisageable pour élucider précisément les mécanismes activés. De plus, le travail présenté dans le Chapitre IV pourrait faire l'objet d'études combinatoires de stratégies de lutte biologique à condition que ces molécules chimiques puissent être produites de manière propre. Evidemment, la recherche de molécules bio-stimulatrices de croissance des agents de biocontrôle pourrait aussi être étudiée afin d'augmenter l'efficacité de ces agents.



Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abd-El-Khair, H., and Karima, H.E.H. (2007). Application of some bactericides and bioagents for controlling the soft rot disease in potato. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3, 463–473.
- Adriaenssens, E.M., Van Vaerenbergh, J., Vandenheuvel, D., Dunon, V., Ceyssens, P.-J., De Proft, M., Kropinski, A.M., Noben, J.-P., Maes, M., and Lavigne, R. (2012). T4-Related Bacteriophage LIMEstone Isolates for the Control of Soft Rot on Potato Caused by “*Dickeya solani*.” *PLoS ONE* 7, e33227.
- Afek, U., and Orenstein, J. (2002). Disinfecting potato tubers using steam treatments. *Can. Jour. Plant Pathol.* 24, 36–39.
- Ahrenholtz, I., Harms, K., de Vries, J., and Wackernagel, W. (2000). Increased killing of *Bacillus subtilis* on the hair roots of transgenic T4 lysozyme-producing potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1862–1865.
- Alvarez, A.M. (2004). INTEGRATED APPROACHES FOR DETECTION OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA AND DIAGNOSIS OF BACTERIAL DISEASES. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 339–366.
- Andersson, R.A., Eriksson, A.R., Heikinheimo, R., Mäe, A., Pirhonen, M., Kõiv, V., Hyytiäinen, H., Tuikkala, A., and Palva, E.T. (2000). Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of *expR(Ecc)*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 13, 384–393.
- Andrivon, D., Corbière, R., Lucas, J.M., Pasco, C., Gravouelle, J.M., Pellé, R., Dantec, J.P., Ellissèche, D. (2003). Resistance to late blight and soft rot in six potato progenies and glycoalkaloid contents in the tubers. *Am. J. Potato Res.* 80, 125–134.
- Andrivon, D., Pellé, R., and Ellissèche, D. (2006). Assessing resistance types and levels to epidemic diseases from the analysis of disease progress curves: Principles and application to potato late blight. *Am. J. Potato Res.* 83, 455–461.
- Arce, P., Moreno, M., Gutierrez, M., Gebauer, M., Dell’Orto, P., Torres, H., Acuña, I., Oliger, P., Venegas, A., Jordana, X., et al. (1999). Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the *attacin* or the *cecropin SB-37* genes. *Am. J. Potato Res.* 76, 169–177.
- Armon, R., Dosoretz, C., Yoirish, A., Shelef, G., and Neeman, I. (1995). Survival of the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in sterile and non-sterile soil, sand and their admixture. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 513–518.
- Arora, R.K., and Khurana, S.M.P. (2004). Major Fungal and Bacterial Diseases of Potato and their Management. In *Fruit and Vegetable Diseases*, K.G. Mukerji, ed. (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), pp. 189–231.
- Avrova, A.O., Hyman, L.J., Toth, R.L., and Toth, I.K. (2002). Application of Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Taxonomy and Identification of the Soft Rot Bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1499–1508.
- Bain, R.A., Pérombelon, M.C.M., Tsrer, L., and Nachmias, A. (1990). Blackleg development and tuber yield in relation to numbers of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on seed potatoes. *Plant Pathol.* 39, 125–133.
- Bain, R.A., Millard, P., and Perombelon, M.C.M. (1996). The resistance of potato plants to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in relation to their calcium and magnesium content. *Potato Res.* 39, 185–193.
- Barnard, A.M., Bowden, S.D., Burr, T., Coulthurst, S.J., Monson, R.E., and Salmond, G.P.. (2007). Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 1165–1183.
- Barras, F., van Gijsegem, F., and Chatterjee, A.K. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 201–234.
- Barat, J., Paran, G., Bernabé, C. (2012). LA POMME DE TERRE BILAN DE CAMPAGNE 2010/11. *FranceAgriMer*. 1-6.

- Bartz, J.A. (1999). Suppression of bacterial soft rot in potato tubers by application of kasugamycin. *Am. J. Potato Res.* 76, 127–136.
- Bartz, J., and Kelman, A. (1985). Effect of air-drying on soft rot potential of potato tubers inoculated by immersion in suspensions of *Erwinia carotovora*. 69, 128–131.
- Basset, A., Khush, R.S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J.A., and Lemaitre, B. (2000). The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3376–3381.
- Baz M., Lahbabi D., Samri S., Val F., Hamelin G., Madore, I., Bouarab, K., Beaulieu, C., Ennaji, M.M., Barakate M. (2012). Control of potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* by Moroccan actinobacteria isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 28, 303–311.
- Bdliya, B.S., and Haruna, H.U. (2007). Efficacy of solar heat in the control of bacterial soft rot of potato tubers caused by *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *J. Plant Prot. Res.* 47, 11–18.
- Beaulieu, C., Boccara, M., and Van Gisjegem, F. (1993). Pathogenic Behavior of Pectinase-Defective *Erwinia chrysanthemi* Mutants on Different Plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 6, 197–202.
- Berry, S.Z., Madumadu, G.G., and Uddin, M.R. (1988). Effect of calcium and nitrogen nutrition on bacterial canker disease of tomato. *Plant Soil* 112, 113–120.
- Beury-Cirou, A., Tannières, M., Minard, C., Soulère, L., Rasamiravaka, T., Dodd, R.H., Queneau, Y., Dessaux, Y., Guillou, C., Vandeputte, O.M., et al. (2013). At a Supra-Physiological Concentration, Human Sexual Hormones Act as Quorum-Sensing Inhibitors. *PLoS ONE* 8, e83564.
- Bolwell, G.P., and Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51, 347–366.
- Boukraa, M., Sabbah, M., Soulère, L., El Efrat, M.L., Queneau, Y., and Doutheau, A. (2011). AHL-dependent quorum sensing inhibition: synthesis and biological evaluation of α -(N-alkyl-carboxamide)- γ -butyrolactones and α -(N-alkyl-sulfonamide)- γ -butyrolactones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 6876–6879.
- Buddrus-Schiemann, K., Schmid, M., Schreiner, K., Welzl, G., and Hartmann, A. (2010). Root Colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and Impact on the Indigenous Rhizosphere Bacterial Community of Barley. *Microb. Ecol.* 60, 381–393.
- Cahill, G., Fraser, K., Kowalewska, M.J., Kenyon, D.M., and Saddler, G.S. (2012). Recent findings from the Dickeya survey and monitoring programme. *Dundee Conf. Crop Prot. North. Br.* 171–176.
- Campos, E., Maher, C.A., and Kelman, A. (1982). Relationship of Pectolytic Clostridia and *Erwinia carotovora* Strains to Decay of Potato Tubers in Storage. *Plant Dis.* 66, 543–546.
- Carputo, D., Cardi, T., Speggorin, M., Zoina, A., and Frusciante, L. (1997). Resistance to blackleg and tuber soft rot in sexual and somatic interspecific hybrids with different genetic background. *Am. Potato J.* 74, 161–172.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.-C., Shaw, P.D., and Farrand, S.K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 11, 1119–1129.
- Charkowski, A.O. (2007). The Soft Rot *Erwinia*. In *Plant-associated bacteria*, (Springer), pp423-505
- Charkowski, A.O. (2009). Decaying signals: will understanding bacterial–plant communications lead to control of soft rot? *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 178–184.
- Cigna, J., Raoul des Essarts, Y., Mondy, S., Hélias, V., Beury-Cirou, A., and Faure, D. (2015). Draft Genome Sequences of *Pseudomonas fluorescens* Strains PA4C2 and PA3G8 and *Pseudomonas putida* PA14H7, Three Biocontrol Bacteria against *Dickeya* Phytopathogens: Table 1. *Genome Announc.* 3, e01503–e01514.
- Cirou, A., Diallo, S., Kurt, C., Latour, X., and Faure, D. (2007). Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ. Microbiol.* 9, 1511–1522.
- Cirou, A., Raffoux, A., Diallo, S., Latour, X., Dessaux, Y., and Faure, D. (2011). Gamma-caprolactone stimulates growth of quorum-quenching *Rhodococcus* populations in a large-scale hydroponic system for culturing *Solanum tuberosum*. *Res. Microbiol.* 162, 945–950.

- Cirou, A., Mondy, S., An, S., Charrier, A., Sarrazin, A., Thoison, O., DuBow, M., and Faure, D. (2012). Efficient Biostimulation of Native and Introduced Quorum-Quenching *Rhodococcus erythropolis* Populations Is Revealed by a Combination of Analytical Chemistry, Microbiology, and Pyrosequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 481–492.
- Collmer, A., and Keen, N.T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24, 383–409.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., and Barka, E.A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4951–4959.
- Costa, A.B., Eloy, M., Cruz, L., Janse, J.D., and Oliveira, H. (2006). Studies on pectolytic *Erwinia* spp. in Portugal reveal unusual strains of *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. *J. Plant Pathol.* 88, 161–169.
- Cother, E.J., Bradley, J.K., Gillings, M.R., and Fahy, P.C. (1992). Characterization of *Erwinia chrysanthemi* biovars in alpine water sources by biochemical properties, GLC fatty acid analysis and genomic DNA fingerprinting. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 99–107.
- Crépin, A., Barbey, C., Beury-Cirou, A., Hélias, V., Taupin, L., Reverchon, S., Nasser, W., Faure, D., Dufour, A., Orange, N., et al. (2012a). Quorum Sensing Signaling Molecules Produced by Reference and Emerging Soft-Rot Bacteria (*Dickeya* and *Pectobacterium* spp.). *PLoS ONE* 7, e35176.
- Crépin, A., Beury-Cirou, A., Barbey, C., Farmer, C., Hélias, V., Burini, J.-F., Faure, D., and Latour, X. (2012b). N-Acyl Homoserine Lactones in Diverse *Pectobacterium* and *Dickeya* Plant Pathogens: Diversity, Abundance, and Involvement in Virulence. *Sensors* 12, 3484–3497.
- Crépin, A., Barbey, C., Cirou, A., Tannières, M., Orange, N., Feuilloley, M., Dessaux, Y., Burini, J.F., Faure, D., and Latour, X. (2012c). Biological control of pathogen communication in the rhizosphere: A novel approach applied to potato soft rot due to *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Soil.* 358, 27–37.
- Cronin, D., Moëne-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D.N., and O’Gara, F. (2006). Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 95–106.
- Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C.K., and Chatterjee, A.K. (1995). Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *J. Bacteriol.* 177, 5108–5115.
- Cui, Y., Chatterjee, A., and Chatterjee, A.K. (2001). Effects of the Two-Component System Comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the Production of Global Regulatory *rsmB* RNA, Extracellular Enzymes, and HarpinEcc. *Mol. Plant-Mic. Int.* 14, 516–526.
- Czajkowski, R., Grabe, G.J., and van der Wolf, J.M. (2009). Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 263–275.
- Czajkowski, R., de Boer, W.J., van Veen, J.A., and van der Wolf, J.M. (2010a). Downward vascular translocation of a green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp.(biovar 3) from stem and leaf inoculation sites on potato. *Phytopathology* 100, 1128–1137.
- Czajkowski, R., de Boer, W.J., Velvis, H., and van der Wolf, J.M. (2010b). Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology* 100, 134–142.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., van Veen, J.A., and van der Wolf, J.M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review: Control of *Dickeya* and *Pectobacterium* species in potato. *Plant Pathol.* 60, 999–1013.
- Czajkowski, R., de Boer, W.J., van Veen, J.A., and van der Wolf, J.M. (2012a). Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. biovar 3 in vitro and in planta: *Dickeya* sp. antagonists from rotting potato tissue. *Plant Pathol.* 61, 169–182.
- Czajkowski, R., de Boer, W.J., van Veen, J.A., and van der Wolf, J.M. (2012b). Studies on the interaction between the biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A30, and blackleg-causing *Dickeya* sp. (biovar 3) in potato (*Solanum tuberosum*): Interaction between *Serratia* A30 and *Dickeya* sp. IPO2222. *Plant Pathol.* 61, 677–688.

- Czajkowski, R., Ozymko, Z., and Lojkowska, E. (2014). Isolation and characterization of novel soilborne lytic bacteriophages infecting *Dickeya* spp. biovar 3 (" *D. solani* "). Plant Pathol. 63, 758–772.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., van der Wolf, J.M., and Sledz, W. (2015a). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review: Detection of soft rot *Enterobacteriaceae*. Ann. Appl. Biol. 166, 18–38.
- Czajkowski, R., van der Wolf, J.M., Krolicka, A., Ozymko, Z., Narajczyk, M., Kaczynska, N., and Lojkowska, E. (2015b). Salicylic acid can reduce infection symptoms caused by *Dickeya solani* in tissue culture grown potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. Eur. J. Plant Pathol. 141, 545–558.
- Dabiré, C.M., Palé, E., Nèbié, R.H.C., Samaté, A.D., Millogo/Rasolodimby, J., and Nacro, M. (2009). L'huile essentielle de *Grangea maderaspatana* (L.) poir. du Burkina Faso : rendement d'extraction et composition chimique. J. Soc. Ouest-Afr. Chim. 28, 81-86.
- 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.
- De Boer, S.H., VERDONCK, L., Vrugink, H., Harju, P., Bang, H.O., and De Ley, J. (1987). Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. J. Appl. Bacteriol. 63, 487–495.
- De Haan, E.G., Dekker-Nooren, T.C.E.M., van den Bovenkamp, G.W., Speksnijder, A.G.C.L., van der Zouwen, P.S., and van der Wolf, J.M. (2008). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. Eur. J. Plant Pathol. 122, 561–569.
- Delalande, L., Faure, D., Raffoux, A., Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Elasri, M., Carlier, A., Berruyer, R., Petit, A., Williams, P., et al. (2005). N-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. FEMS Microbiol. Ecol. 52, 13–20.
- del Pilar Marquez-Villavicencio, M., Groves, R.L., and Charkowski, A.O. (2011). Soft rot disease severity is affected by potato physiology and *Pectobacterium* taxa. Plant Dis. 95, 232–241.
- De Mendonça, M., and Stanghellini, M.E. (1979). Endemic and soilborne nature of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*, a pathogen of mature sugar beets. Phytopathology 69, 1096–1099.
- De Nys, R., Dworjanyn, S.A., and Steinberg, P.D. (1998). A new method for determining surface concentrations of marine natural products on seaweeds. Marine Ecology Progress Series. 162, 79-87.
- des Essarts, Y.R., Sabbah, M., Comte, A., Soulère, L., Queneau, Y., Dessaux, Y., Hélias, V., and Faure, D. (2013). N,N'-alkylated Imidazolium-Derivatives Act as Quorum-Sensing Inhibitors Targeting the *Pectobacterium atrosepticum*-Induced Symptoms on Potato Tubers. Int. J. Mol. Sci. 14, 19976–19986.
- des Essarts, Y.R., Mondy, S., Hélias, V., and Faure, D. (2015). Genome Sequence of the Potato Plant Pathogen *Dickeya dianthicola* Strain RNS04.9. Genome Announc. 3, e00581-15.
- Diallo, S., Latour, X., Groboillot, A., Smadja, B., Copin, P., Orange, N., Feuilleley, M.G.J., and Chevalier, S. (2009). Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). Eur. J. Plant Pathol. 125, 349–354.
- Diallo, S., Crépin, A., Barbey, C., Orange, N., Burini, J.-F., and Latour, X. (2011). Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere: Biological control mediated through the potato rhizosphere. FEMS Microbiol. Ecol. 75, 351–364.
- Dictionnaire Larousse. (2002). La pomme de terre. In Larousse agricole, (Larousse), pp443-448
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F., and Zhang, L.H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature 411, 813–817.
- Dong, Y.-H., Zhang, X.-F., Xu, J.-L., and Zhang, L.-H. (2004). Insecticidal *Bacillus thuringiensis* Silences *Erwinia carotovora* Virulence by a New Form of Microbial Antagonism, Signal Interference. Appl. Environ. Microbiol. 70, 954–960.

- Duarte, V., De Boer, S.H., Ward, L.J., and Oliveira, A.M.R. (2004). Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 96, 535–545.
- Duffy, B., Schouten, A., and Raaijmakers, J.M. (2003). Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 501–538.
- Dupraz, C. (2006). Entre agronomie et écologie: vers la gestion d'écosystèmes cultivés. In *Demeter*, (Version 4), pp1-16
- Dupuis, B., Michelante, D., Garcia-Albeniz, N., and Nimal, C. (2005). LE POINT SUR LES INFECTIONS PAR *ERWINIA* spp. EN PLANT DE POMMES DE TERRE. In *Journée d'étude Pomme Terre*, (CRAW Gembloux–23 Novembre), pp34–40.
- Eckert, J.W., and Ogawa, J.M. (1988). The Chemical Control of Postharvest Diseases: Deciduous Fruits, Berries, Vegetables and Root/Tuber Crops. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 433–469.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., and Böttger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 7843–7853.
- El-Karkouri, A., El Hassani, F.Z., El Mzibri, M., Benlemlih, M., El Hassouni, M. (2010). Isolation and identification of an actinomycete strain with a biocontrol effect on the phytopathogenic *Erwinia chrysanthemi* 3937VIII responsible for soft rot disease. *Ann. Microbio.* 60, 263–268.
- Elphinstone, J., and Pérombelon, M.C.M. (1986). Contamination of Progeny tubers of potato plants by seed- and leaf-borne *Erwinia carotovora*. *Potato Res.* 29, 77–93
- Epstein, L., and Bassein, S. (2003). Patterns of pesticide use in California and the implications for strategies for reduction of pesticides. *Annual Review of Phytopathology.* 41, 351–75.
- Erbs, G., and Newman, M.A. (2003). The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology.* 14, 421–425.
- Faquihi, H., Mhand, R.A., Ennaji, M., Benbouaza, A., and Achbani, E. (2014). *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud, a Biological Control against Soft Rot Disease in Potato Caused by *Pectobacterium carotovorum*. *Int. J. Sci. Res.* 3, 1779–1786.
- Faure, D., and Dessaux, Y. (2007). Quorum sensing as a target for developing control strategies for the plant pathogen *Pectobacterium*. *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 353–365.
- Ferluga, S., Steindler, L., and Venturi, V. (2008). N-Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing in Gram-negative Rhizobacteria. In *Soil Biology, Secondary Metabolites in soil ecology*, (Springer), pp69-90.
- Fessehaie, A., De Boer, S.H., and Lévesque, C.A. (2002). Molecular characterization of DNA encoding 16S 23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. *Can. J. Microbiol.* 48, 387–398.
- Fiers, M., Edel-Hermann, V., Chatot, C., Le Hingrat, Y., Alabouvette, C., and Steinberg, C. (2012). Potato soil-borne diseases. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 93–132.
- FN3PT/RD3PT, GNIS et ARVALIS. (2015). Variétés de pomme de terre produites en France. In *Catalogue 2015*, (CIP MEDIAS).
- Fock, I., Collonnier, C., Luisetti, J., Purwito, A., Souvannavong, V., Vedel, F., Servaes, A., Ambroise, A., Kodja, H., Ducreux, G., et al. (2001). Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 899–908.
- Fraaije, B.A., Appels, M., De Boer, S.H., Van Vuurde, J.W.L., and Van den Bulk, R.W. (1997). Detection of soft rot *Erwinia* spp. on seed potatoes: conductimetry in comparison with dilution plating, PCR and serological assays. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 183–193.
- Fravel, D.R. (2005). Commercialization and Implementation of Biocontrol ¹. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337–359.
- Frechon, D., Exbrayat, P., Helias, V., Hyman, L.J., Jouan, B., Llop, P., Lopez, M.M., Payet, N., Pérombelon, M.C.M., Toth, I.K., et al. (1998). Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Res.* 41, 163–173.

- Fuqua, C., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35, 439–468.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269–275.
- Galloway, W.R.J.D., Hodgkinson, J.T., Bowden, S.D., Welch, M., and Spring, D.R. (2011). Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways. *Chem. Rev.* 111, 28–67.
- Gardan, L. (2003). Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 381–391.
- Gerardin, D., Rouffiangue, J., Kellenberger, I., Schaerer, S., and Dupuis, B. (2013). Sensibilité de la pomme de terre à la pourriture molle provoquée par *Dickeya* spp. *Rech. Agron. Suisse* 4, 288–295.
- Gill, E.D., Schaerer, S., and Dupuis, B. (2014). Factors impacting blackleg development caused by *Dickeya* spp. in the field. *Eur. J. Plant Pathol.* 140, 317–327.
- Gillet, A. (2015). Innovation et qualité. *Pom. Ter. Fr.* 597, 50–51.
- Graham, D.C. and Harrison, M.D. (1975). Potential Spread of *Erwinia* spp. in Aerosols. *Phytopathology Notes.* 65, 739–741.
- Grenier, A.-M., Duport, G., Pages, S., Condemine, G., and Rahbe, Y. (2006). The Phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) Is a Pathogen of the Pea Aphid. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1956–1965.
- Gross, H., and Charbonnier, E. (2014). La thématique “biodiversité et agriculture” dans les projets de recherche et développement français : Quelles approches ? Quels acteurs impliqués ? *Rapport de l'étude ACTA/FRB 2013*, 1–68.
- Haas, D., and Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 307–319.
- Harris, R.I. (1979). Chemical control of bacterial soft-rot of wounded potato tubers. *Potato Res.* 22, 245–249.
- Harrison, M.D., Quinn, C.E., Ann Sells, I., and Graham, D.C. (1977). Waste potato dumps as sources of insects contaminated with soft rot coliform bacteria in relation to re-contamination of pathogen-free potato stocks. *Potato Res.* 20, 37–52.
- Hauben, L., Moore, E.R., 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.
- Hauben, L., Van Gijsegem, F., and Swings, J. (2005). Genus XXIV. *Pectobacterium* Waldee 1945, 469AL emend. Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck and Swings 1999a. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: second edition*, (Springer), pp721–730
- Helander, I.M., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., and Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 235–244.
- Hélias, V. (2008). *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxi. *Cah. Agric.* 17, 349–354.
- Hélias, V., Le Roux, A.-C., Bertheau, Y., Andrivon, D., Gauthier, J.-P., and Jouan, B. (1998). Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 685–699.
- Helias, V., Andrivon, D., Jouan, B., and others (2000a). Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* under field conditions and their effects on the yield of individual potato plants. *Plant Pathol.* 49, 23–32.
- Helias, V., Andrivon, D., Jouan, B., and others (2000b). Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*. *Plant Pathol.* 49, 33–42.
- 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*: Isolating pectolytic bacteria on CVP. *Plant Pathol.* 61, 339–345.

- Hélias, V., Quêtu-Laurent, A., Gauthier, J.-P., Le-Hingrat, Y., and Andrivon, D. (2014). Screening *Dickeya* pathogenicity to potato shows inter- and intraspecific diversity. *Potato Res.* 57, 175.
- Hidalgo, O.A., and Echandi, E. (1982). Evaluation of potato clones for resistance to tuber and stem rot induced by *Erwinia chrysanthemi*. *Am. Potato J.* 59, 585–592.
- Hijmans, R.J., and Spooner, D.M. (2001). Geographic distribution of wild potato species. *Am. J. Bot.* 88, 2101–2112.
- Hoang, T.T., and Schweizer, H.P. (1999). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *J. Bacteriol.* 181, 5489–5497.
- Howarth, F.G. (1991). Environmental impacts of classical biological control. *Annu. Rev. Entomol.* 36, 485–509.
- Hyytiäinen, H., Montesano, M., and Palva, E.T. (2001). Global regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-rsmB system in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 14, 931–938.
- Jafra, S., Figura, I., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Lojkowska, E. (1999). Expression of *Erwinia chrysanthemi* pectinase genes *pelI*, *pelL*, and *pelZ* during infection of potato tubers. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 12, 845–851.
- Jafra, S., Przysowa, J., Czajkowski, R., Michta, A., Garbeva, P., and Van der Wolf, J.M. (2006). Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading *N*-acyl-homoserine lactone. *Can. J. Microbiol.* 52, 1006–1015.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. al, Birdsall, M., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Cox, A.J., Golby, P., Reeves, P.J., Stephens, S., et al. (1993). The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J.* 12, 2477–2482.
- Jorge, P.E., and Harrison, M.D. (1986). The association of *Erwinia carotovora* with surface water in Northeastern Colorado. I. The presence and population of the bacterium in relation to location, season and water temperature. *Am. Potato J.* 63, 517–531.
- Junaid, J.M., Dar, N.A., Bhat, T.A., Bhat, A.H., and Bhat, M.A. (2013). Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *Int. J. Mod. Plant Anim. Sci.* 1, 39–57.
- Kalia, V.C. (2013). Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol. Adv.* 31, 224–245.
- Kamysz, W., Krolicka, A., Bogucka, K., Ossowski, T., Lukasiak, J., and Lojkowska, E. (2005). Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Against Plant Pathogenic *Pectobacterium* Species. *J. Phytopathol.* 153, 313–317.
- Kang, H.W., Kwon, S.W., and Go, S.J. (2003). PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathol.* 52, 127–133.
- Kapsa, J.S. (2008). Important Threats in Potato Production and Integrated Pathogen/Pest Management. *Potato Res.* 51, 385–401.
- Kastelein, P., Schepel, E.G., Mulder, A., Turkensteen, L.J., and Van Vuurde, J.W.L. (1999). Preliminary selection of antagonists of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Van Hall) Dye for application during green crop lifting of seed potato tubers. *Potato Res.* 42, 161–171.
- Kato, J., Kakehata, H., Maekawa, Y., and Yamashita, T. (2006). Regioselectivity control of radiation-induced reaction: electron beam-induced fries rearrangement of sulfonamide within a beta-cyclodextrin inclusion complex. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 4498–4500.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D., and Defago, G. (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 - importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant Microbe Interactions.* 5, 4–13.
- Khay, S., Mondy, S., Beury-Cirou, A., Moumni, M., Hélias, 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.
- Khay, S., Raoul des Essarts, Y., Quêtu-Laurent, A., Moumni, M., Hélias, V., and Faure, D. (2015a). Genomic overview of the phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* strain RNS 08.42.1A suggests horizontal acquisition of quorum-sensing genes. *Genetica* 143, 241–252.

- Khay, S., Raoul des Essarts, Y., Mondy, S., Moumni, M., Hélias, V., Beury-Cirou, A., and Faure, D. (2015b). Draft Genome Sequences of the Three Pectobacterium-Antagonistic Bacteria *Pseudomonas brassicacearum* PP1-210F and PA1G7 and *Bacillus simplex* BA2H3: TABLE 1. *Genome Announc.* 3, e01497–14.
- Kim, H.-S., Thammarat, P., Lommel, S.A., Hogan, C.S., and Charkowski, A.O. (2011). *Pectobacterium carotovorum* elicits plant cell death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE does not suppress callose or induce expression of plant genes early in plant-microbe interactions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 773–786.
- Kloepper, J.W. (1983). Effect of Seed Piece Inoculation with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Populations of *Erwinia carotovora* on Potato Roots and in Daughter Tubers. *Phytopathology* 73, 217–219.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M., and Zhang, S. (2004). Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259–1266.
- Kwasiborski, A., Mondy, S., Beury-Cirou, A., and Faure, D. (2013). Genome Sequence of the *Pectobacterium atrosepticum* Strain CFBP6276, Causing Blackleg and Soft Rot Diseases on Potato Plants and Tubers. *Genome Announc.* 1, e00374–13.
- Kwon, S.-W., Go, S.-J., Kang, H.-W., Ryu, J.-C., and Jo, J.-K. (1997). Phylogenetic Analysis of *Erwinia* Species Based on 16S rRNA Gene Sequences†. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1061–1067.
- Laferriere, L.T., Helgeson, J.P., and Allen, C. (1999). Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor. Appl. Genet.* 98, 1272–1278.
- Lapwood, D.H., Read, P.J., and Spokes, J. (1984). Methods for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* and *carotovora*. *Plant Pathol.* 33, 13–20.
- Latour, X., and Lemanceau, P. (1997). Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes à oxydase positive. *Agronomie* 17, 427–443.
- Latour, X., Faure, D., Diallo, S., Smadja, B., Dessaux, Y., Cirou, A., and Orange, N. (2008). Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium* spp. (*Erwinia carotovora*). *Cah. Agric.* 17, 355–360.
- 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.
- Laurila, J., Hannukkala, A., Nykyri, J., Pasanen, M., Hélias, V., Garland, L., and Pirhonen, M. (2010). Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 249–262.
- le-Hingrat, Y., Hélias, V., Le Roux-Nio, A.-C., Cellier, G., Prior, P., Rivoal, C., Poliakov, F., Soubelet, H., Moreau, M., Deveaux-Gobert, V., et al. (2012). Evaluation (et Gestion) des risques sanitaires bactériens liés aux itinéraires culturaux de la pomme de terre et d'autres cultures spécialisées. *Innov. Agron.* 25, 253–267.
- Liao, C.-H. (1989). Analysis of pectate lyases produced by soft rot bacteria associated with spoilage of vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1677–1683.
- Lim, J.-A. (2013). Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Using Bacteriophage PP1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1147–1153.
- Lin, Y.H., Xu, J.L., Hu, J., Wang, L.-H., Ong, S.L., Lead better, J.R., Zhang, L.-H. (2003). Acylhomoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology.* 47, 849–860.
- Liu, Y., Cui, Y., Mukherjee, A., and Chatterjee, A.K. (1998). Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Mol. Microbiol.* 29, 219–234.
- Łojkowska, E., and Kelman, A. (1994). Comparison of the effectiveness of different methods of screening for bacterial soft rot resistance of potato tubers. *Am. Potato J.* 71, 99–113.
- Lorenc-Kukuła, K., Jafra, S., Oszmiański, J., and Szopa, J. (2005). Ectopic expression of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in potato tuber causes increased resistance to bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 53, 272–281.

- Lumb, V.M., Perombelon, M.C.M., and Zutra, D. (1986). Studies of a wilt disease of the potato plant in Israel caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathol.* 35, 196–202.
- Luzzatto, T., Golan, A., Yishay, M., Bilkis, I., Ben-Ari, J., and Yedidia, I. (2007). Priming of antimicrobial phenolics during induced resistance response towards *Pectobacterium carotovorum* in the ornamental monocot calla lily. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10315–10322.
- Lyon, C.E., Lyon, G.D., and Robertson, W.M. (1989). Observations on the structural modification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in rotted potato tuber tissue. *Physio. Mol. Plant Pathol.* 34, 181–187.
- Lyon, G.D., Heilbronn, J., Forrest, R.S., and Johnston, D.J. (1992). The biochemical basis of resistance of potato to soft rot bacteria. *Neth. J. Plant Pathol.* 98, 127–133.
- Ma, B., Hibbing, M.E., Kim, H.-S., Reedy, R.M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J.D., Perna, N.T., Kelman, A., et al. (2007). Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* 97, 1150–1163.
- Mackay, J.M., and Shipton, P.J. (1983). Heat treatment of seed tubers for control of potato blackleg (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) and other diseases. *Plant Pathol.* 32, 385–393.
- Makhlouf, A.H., and Abdeen, R. (2014). Investigation on the Effect of Chemical and Biological Control of Bacterial Soft Root Disease of Potato in Storage. *J. Biol. Agric. Healthc.* 4, 31–44.
- Mäki-Valkama, T., and Karjalainen, R. (1994). Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *carotovora* by RAPD-PCR. *Ann. Appl. Biol.* 125, 301–309.
- Manefield, M., Welch, M., Givskov, M., Salmond, G.P.C., and Kjelleberg, S. (2001). Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 131–138.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., et al. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: Top 10 plant pathogenic bacteria. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614–629.
- McCarter-Zorner, N.J., Franc, G.D., Harrison, M.D., Michaud, J.E., Quinn, C.E., Sells, I., and Graham, D.C. (1984). Soft rot *Erwinia* bacteria in surface and underground waters in southern Scotland and in Colorado, United States. *J. Appl. Bacteriol.* 57, 95–105.
- McCarter-Zorner, N.J., Harrison, M.D., Franc, G.D., Quinn, C.E., Sells, I., and Graham, D.C. (1985). Soft rot *Erwinia* bacteria in the rhizosphere of weeds and crop plants in Colorado, United States and Scotland. *J. Appl. Bacteriol.* 59, 357–368.
- McGuire, R.G. (1984). Reduced Severity of *Erwinia* Soft Rot in Potato Tubers with Increased Calcium Content. *Phytopathology* 74, 1250–1257.
- MDowell, P., Affas, Z., Reynolds, C., Holden, M.T., Wood, S.J., Saint, S., Cockayne, A., Hill, P.J., Dodd, C.E., Bycroft, B.W., et al. (2001). Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 41, 503–512.
- Mills, A.A.S., (Bud) Platt, H.W., and Hurta, R.A.R. (2006). Sensitivity of *Erwinia* spp. to salt compounds in vitro and their effect on the development of soft rot in potato tubers in storage. *Postharvest Biol. Technol.* 41, 208–214.
- Miyairi, S., Tateda, K., Fuse, E.T., Ueda, C., Saito, H., Takabatake, T., Ishii, Y., Horikawa, M., Ishiguro, M., Standiford, T.J., et al. (2006). Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-protein conjugate protects mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J. Med. Microbiol.* 55, 1381–1387.
- Moh, A.A., Massart, S., Lahlali, R., Jijakli, M.H., Lepoivre, P., and others (2011). Predictive modelling of the combined effect of temperature and water activity on the in vitro growth of *Erwinia* spp. infecting potato tubers in Belgium. *Biotechnol. Agron Soc Env.* 15, 379–386.
- Moh, A.A., Massart, S., Jijakli, M.H., and Lepoivre, P. (2012). Models to predict the combined effects of temperature and relative humidity on *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* population density and soft rot disease development at the surface of wounded potato tubers. *J. Plant Pathol.* 94, 181–191.

- Moleleki, L.N., Onkendi, E.M., Mongae, A., and Kubheka, G.C. (2013). Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing blackleg and soft rot diseases in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 135, 279–288.
- Molina, J.J., and Harrison, M.D. (1977). The role of *Erwinia carotovora* in the epidemiology of potato blackleg I. Relationship of *E. carotovora* var. *carotovora* and *E. carotovora* var. *atroseptica* to potato blackleg in Colorado. *Am. Potato J.* 54, 587–591.
- Molina, J.J., Harrison, M.D., and Brewer, J.W. (1974). Transmission of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* by *Drosophila melanogaster* Meig. I. Acquisition and transmission of the bacterium. *Am. Potato J.* 51, 245–250.
- Morohoshi, T., Nakamura, Y., Yamazaki, G., Ishida, A., Kato, N., and Ikeda, T. (2007). The plant pathogen *Pantoea ananatis* produces N-acylhomoserine lactone and causes center rot disease of onion by quorum sensing. *J. Bacteriol.* 189, 8333–8338.
- Muniz, C.A., Jaillard, D., Lemaitre, B., and Bocard, F. (2007). *Erwinia carotovora* Evf antagonizes the elimination of bacteria in the gut of *Drosophila* larvae. *Cell. Microbiol.* 9, 106–119.
- Narayanasamy, P. (2008). In *Molecular biology in plant pathogenesis and disease management: Microbial Plant Pathogens Volume 1*, (Springer).
- Nassar, A., Darrasse, A., Lemaitre, 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, 2228–2235.
- Nasser, W., Reverchon, S., Condemine, G., and Robert-Baudouy, J. (1994). Specific Interactions of *Erwinia chrysanthemi* KdgR Repressor with Different Operators of Genes Involved in Pectinolysis. *J. Mol. Biol.* 236, 427–440.
- Nasser, W., Bouillant, M.L., Salmond, G., and Reverchon, S. (1998). Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expI-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol.* 29, 1391–1405.
- Nasser, W., Dorel, C., Wawrzyniak, J., Van Gijsegem, F., Groleau, M.-C., Déziel, E., and Reverchon, S. (2013). Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of *Dickeya dadantii*: New quorum sensing signal in *Dickeya*. *Environ. Microbiol.* 15, 865–880.
- Nunes Leite, L., de Haan, E.G., Krijger, M., Kastelein, P., van der Zouwen, P.S., van den Bovenkamp, G.W., Tebaldi, N.D., and van der Wolf, J.M. (2014). First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands. *New Dis. Rep.* 29, 24.
- Nykyri, J., Niemi, O., Koskinen, P., Nokso-Koivisto, J., Pasanen, M., Broberg, M., Plyusnin, I., Törönen, P., Holm, L., Pirhonen, M., et al. (2012). Revised Phylogeny and Novel Horizontally Acquired Virulence Determinants of the Model Soft Rot Phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *PLoS Pathog.* 8, e1003013.
- Nykyri, J., Fang, X., Dorati, F., Bakr, R., Pasanen, M., Niemi, O., Palva, E.T., Jackson, R.W., and Pirhonen, M. (2014). Evidence that nematodes may vector the soft rot-causing enterobacterial phytopathogens. *Plant Pathol.* 63, 747–757.
- Oh, H., Hedberg, M., Wade, D., and Edlund, C. (2000). Activities of synthetic hybrid peptides against anaerobic bacteria: aspects of methodology and stability. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 68–72.
- Olivier, M. (2004). Fertilisation azotée : nouvelles de la campagne de mesures avec le chlorophyllomètre. *FIWAP INFO.* 83, 14-16.
- Pagel, W., and Heitefuss, R. (1989). Calcium content and cell wall polygalacturonans in potato tubers of cultivars with different susceptibilities to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35, 11–21.
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M.A., and Lopez, M.M. (2006). Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. *Ann. Appl. Biol.* 148, 157–164.
- Palmer, A.G., Streng, E., and Blackwell, H.E. (2011a). Attenuation of Virulence in Pathogenic Bacteria Using Synthetic Quorum-Sensing Modulators under Native Conditions on Plant Hosts. *ACS Chem. Biol.* 6, 1348–1356.

- Palmer, A.G., Streng, E., Jewell, K.A., and Blackwell, H.E. (2011b). Quorum Sensing in Bacterial Species that Use Degenerate Autoinducers Can Be Tuned by Using Structurally Identical Non-native Ligands. *ChemBioChem* 12, 138–147.
- Palva, T.K. (1994). Salicylic Acid Induced Resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in Tobacco. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 7, 356–363.
- Parent, J.-G., Lacroix, M., Pagé, D., and Vézina, L. (1996). Identification of *Erwinia carotovora* from Soft Rot Diseased Plants by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *PlantDisease* 90, 494–499.
- Park, S.Y., Hwang, B.J., Shin, M.H., Kim, J.-A., Kim, H.-K., Lee, J.-K. (2006). N-acylhomoserine lactonase producing *Rhodococcus* spp. with different AHL-degrading activities. *FEMS Microbiology Letters.* 261, 102–108.
- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., and Greenberg, E.P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4360–4365.
- Pasco, C., Bozec, M., Ellissèche, D., and Andrivon, D. (2007). Resistance Behaviour of Potato Cultivars and Advanced Breeding Clones to Tuber Soft Rot Caused by *Pectobacterium atrosepticum*. *Potato Res.* 49, 91–98.
- Paulin, J.-P., Ridé, M., and Prunier, J.-P. (2001). Découverte des bactéries phytopathogènes il y a cent ans: controverses et polémiques transatlantiques. *Comptes Rendus Académie Sci.-Ser. III-Sci. Vie* 324, 905–914.
- Paulitz, T.C., and Bélanger, R.R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 103–133.
- Pédron, J., Mondy, S., des Essarts, Y.R., Van Gijsegem, F., 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, 283–293.
- Pérombelon, M.C.M. (1992). Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Neth. J. Plant Pathol.* 98, 135–146.
- Pérombelon, M.C.M. (2000). Blackleg risk potential of seed potatoes determined by quantification of tuber contamination by the causal agent and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: a critical review. *EPPO Bull.* 30, 413–420.
- 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., and Van Der Wolf, J.M. (2002). Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. In *Scottish Crop Research Institute Occasional Publication No. 1, (Revised Version 2002)*, pp1-82
- Perombelon, M.C., and Kelman, A. (1980). Ecology of the soft rot erwinias. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18, 361–387.
- Pérombelon, M.C.M., and Burnett, E.M. (1991). Two modified crystal violet pectate (CVP) media for the detection, isolation and enumeration of soft rot erwinias. *Potato Res.* 34, 79–85.
- Perombelon, M.C.M., and Kelman, A. (1987). Blackleg and Other Potato Diseases Caused by Soft Rot Erwinias: Proposal for Revision of Terminology. *Plant Dis.* 71, 283–285.
- Pérombelon, M.C.M., and Salmond, G.P.C. (1995). Bacterial soft rots. In *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases, Volume I prokaryotes*, (Pergamon,Elsevier Science Ltd), pp1-20.
- Pérombelon, M.C.M., Lumb, V.M., and Hyman, L.J. (1987). A rapid method to identify and quantify soft rot erwinias on seed potato tubers1. *EPPO Bull.* 17, 25–35.
- Pérombelon, M.C.M., Lumb, V.M., Zutra, D., Hyman, L.J., and Burnett, E.M. (1989). Factors Affecting Potato Blackleg Development. In *Vascular Wilt Diseases of Plants*, E.C. Tjamos, and C.H. Beckman, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 421–431.
- Persson, P., and Sletten, A. (1995). Fatty acid analysis for the identification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *E. carotovora* subsp. *carotovora*1. *EPPO Bull.* 25, 151–156.

- Peters, J., Sledz, W., Bergervoet, J.H.W., and van der Wolf, J.M. (2007). An enrichment microsphere immunoassay for the detection of *Pectobacterium atrosepticum* and *Dickeya dianthicola* in potato tuber extracts. *Eur. J. Plant Pathol.* 117, 97–107.
- Phillips, J.A., and Kelman, A. (1982). Direct Fluorescent Antibody Stain Procedure Applied to Insect Transmission of *Erwinia carotovora*. *Phytopathology* 72, 898–901.
- Pitman, A.R., Harrow, S.A., and Visnovsky, S.B. (2010). Genetic characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand. *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 423–435.
- Platero, M., Tejerina, G. (1976). Calcium nutrition in *Phaseolus vulgaris* in relation to its resistance to *Erwinia carotovora*. *Jour. Phyt.* 85, 314–9
- Powelson, M.L. (1985). Potato early dying disease in the Pacific Northwest caused by *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* and *E. carotovora* pv. *atroseptica*. *Am. Potato J.* 62, 173–176.
- Priou, S., and Jouan, B. (1996). Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. In *La pomme de terre*, (Paris : Institut national de la recherche agronomique : Institut technique des céréales et des fourrages), pp260–274
- 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: *Dickeya diagnostics from draft bacterial genome sequences*. *Plant Pathol.* 62, 587–596.
- Quéré, B., and Ponserre, N. (2015). Un nouveau cadre pour la filière. *Pomme Terre Fr.* 598, 56–57.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., and De Souza, J.T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 537–547.
- Rahman, M.M., Ali, M.E., Khan, A.A., Akanda, A.M., Uddin, M.K., Hashim, U., and Abd Hamid, S.B. (2012). Isolation, Characterization, and Identification of Biological Control Agent for Potato Soft Rot in Bangladesh. *Sci. World J.* 2012, 1–6.
- Ranganna, B., Kushalappa, A.C., and Raghavan, G.S.V. (1997). Ultraviolet irradiance to control dry rot and soft rot of potato in storage. *Can. J. Plant Pathol.* 19, 30–35.
- Rasch, M., Rasmussen, T.B., Andersen, J.B., Persson, T., Nielsen, J., Givskov, M., and Gram, L. (2007). Well-known quorum sensing inhibitors do not affect bacterial quorum sensing-regulated bean sprout spoilage. *J. Appl. Microbiol.* 102, 826–837.
- Rasche, F., Velvis, H., Zachow, C., Berg, G., Van Elsas, J.D., and Sessitsch, A. (2006). Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. *J. Appl. Ecol.* 43, 555–566.
- Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M.E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kote, M., Nielsen, J., Eberl, L., and Givskov, M. (2005). Screening for Quorum-Sensing Inhibitors (QSI) by Use of a Novel Genetic System, the QSI Selector. *J. Bacteriol.* 187, 1799–1814.
- Reeves, A.F., Olanya, O.M., Hunter, J.H., and Wells, J.M. (1999). Evaluation of potato varieties and selections for resistance to bacterial soft rot. *Am. J. Potato Res.* 76, 183–189.
- Reiter, B., Pfeifer, U., Schwab, H., and Sessitsch, A. (2002). Response of Endophytic Bacterial Communities in Potato Plants to Infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microb.* 68, 2261–2268.
- Rendulic, S. (2004). A Predator Unmasked: Life Cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a Genomic Perspective. *Science* 303, 689–692.
- Reverchon, S., and Nasser, W. (2013). *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 622–636.
- Reverchon, S., Bouillant, M.L., Salmond, G., and Nasser, W. (1998). Integration of the quorum-sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* 29, 1407–1418.
- Rodionov, D.A. (2004). Comparative genomics of the KdgR regulon in *Erwinia chrysanthemi* 3937 and other gamma-proteobacteria. *Microbiology* 150, 3571–3590.

- Rouffiangé, J., Gerardin, D., Kellenberger, I., Schaerer, S., and Dupuis, B. (2013). Sensibilité de la pomme de terre aux pourritures de tiges provoquées par *Dickeya* spp. *Rech. Agron. Suisse* 4, 424–431.
- Rouffiangé, J., Gerardin, D., Riot, G., Thévoz, E., Kellenberger, I., Schaerer, S., and Dupuis, B. (2014). Sensibilité de la pomme de terre à la maladie de la jambe noire provoquée par *Dickeya* spp. *Rech. Agron. Suisse* 96.
- Rousselle, P., Robert, Y., and Crosnier, J.-C. (1996). In *La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations* (Paris : Institut national de la recherche agronomique : Institut technique des céréales et des fourrages).
- Sabbah, M., Soullère, L., Reverchon, S., Queneau, Y., and Doutheau, A. (2011). LuxR dependent quorum sensing inhibition by N,N'-disubstituted imidazolium salts. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 4868–4875.
- Sabbah, M., Fontaine, F., Grand, L., Boukraa, M., Efrat, M.L., Doutheau, A., Soullère, L., and Queneau, Y. (2012). Synthesis and biological evaluation of new N-acyl-homoserine-lactone analogues, based on triazole and tetrazole scaffolds, acting as LuxR-dependent quorum sensing modulators. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 4727–4736.
- Sabbah, M., Bernollin, M., Doutheau, A., Soullère, L., and Queneau, Y. (2013). A new route towards fimbrolide analogues: importance of the exomethylene motif in LuxR dependent quorum sensing inhibition. *Med Chem Commun* 4, 363–366.
- Samson, R. (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, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1415–1427.
- Sau, G., Gaillard, F., Legentil, L., Nugier-Chauvin, C., Ferrières, V., Andrivon, D., and Val, F. (2014). Identification of Three Elicitins and a Galactan-Based Complex Polysaccharide from a Concentrated Culture Filtrate of *Phytophthora infestans* Efficient against *Pectobacterium atrosepticum*. *Molecules* 19, 15374–15390.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W., Jackson, M.A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*. 94, 1267–1271.
- Scott, R.I., Chard, J.M., Hocart, M.J., Lennard, J.H., and Graham, D.C. (1996). Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. *Potato Res.* 39, 333–344.
- Serrano, C., Arce-Johnson, P., Torres, H., Gebauer, M., Gutierrez, M., Moreno, M., Jordana, X., Venegas, A., Kalazich, J., and Holuigue, L. (2000). Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Am. J. Potato Res.* 77, 191–199.
- Serrano, L., Manker, D., Brandi, F., and Cali, T. (2011). THE USE OF *BACILLUS SUBTILIS* QST 713 AND *BACILLUS PUMILUS* QST 2808 AS PROTECTANT FUNGICIDES IN CONVENTIONAL APPLICATION PROGRAMS FOR BLACK LEAF STREAK CONTROL.
- Sharga, B.M., and Lyon, G.D. (1998). *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. *Can. J. Microbiol.* 44, 777–783. *ISHS Acta Horticulturae*. 986, 1-17.
- Shirsat, S.G., Thomas, P., and Nair, P.M. (1991). Evaluation of treatments with hot water, chemicals and ventilated containers to reduce microbial spoilage in irradiated potatoes. *Potato Res.* 34, 227–231.
- Shrestha, A., Kim, E.C., Lim, C.K., Cho, S., Hur, J.H., and Park, D.H. (2009). Biological control of soft rot on Chinese cabbage using beneficial bacterial agents in greenhouse and field. *Korean J. Pestic. Sci.* 13, 325–331.
- Singh, V., Shi, W., Almo, S.C., Evans, G.B., Furneaux, R.H., Tyler, P.C., Painter, G.F., Lenz, D.H., Mee, S., Zheng, R., et al. (2006). Structure and inhibition of a quorum sensing target from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 12929–12941.
- Smadja, B., Latour, X., Trigui, S., Burini, J.F., Chevalier, S., and Orange, N. (2004). Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp.). *Can. J. Microbiol.* 50, 19–27.
- Smith, K.M., Bu, Y., and Suga, H. (2003). Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Chem. Biol.* 10, 563–571.

- Song, G., Ryu, S., Kim, Y., Lee, J., Choi, J., and Ryu, C.-M. (2013). Elicitation of Induced Resistance against *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae* by Specific Individual Compounds Derived from Native Korean Plant Species. *Molecules* 18, 12877–12895.
- Soulère, L., Sabbah, M., Fontaine, F., Queneau, Y., and Doutheau, A. (2010). LuxR-dependent quorum sensing: Computer aided discovery of new inhibitors structurally unrelated to N-acylhomoserine lactones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 4355–4358.
- Stead, D. (1999). Bacterial diseases of potato: relevance to in vitro potato seed production. *Potato Res.* 42, 449–456.
- Stevens, A.M., Queneau, Y., Soulère, L., Bodman, S. von, and Doutheau, A. (2011). Mechanisms and Synthetic Modulators of AHL-Dependent Gene Regulation. *Chem. Rev.* 111, 4–27.
- Stommel, J.R., Goth, R.W., Haynes, K.G., and Kim, H.-S. (1996). Pepper (*Capsicum annuum*) soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Dis.* 80, 1109–1112.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G.S., Bycroft, B.W., and Pritchard, D.I. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect. Immun.* 66, 36–42.
- Terta, M., Kettani-Halabi, M., Ibenyassine, K., Tran, D., Meimoun, P., M'hand, R.A., El-Maarouf-Bouteau, H., Val, F., Ennaji, M.M., and Bouteau, F. (2010). *Arabidopsis thaliana* cells: a model to evaluate the virulence of *pectobacterium carotovorum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 23, 139–143.
- Thomson, N.R., Nasser, W., McGowan, S., Sebahia, M., and Salmond, G.P. (1999). *Erwinia carotovora* has two KdgR-like proteins belonging to the IciR family of transcriptional regulators: identification and characterization of the RexZ activator and the KdgR repressor of pathogenesis. *Microbiology* 145, 1531–1545.
- Toth, I.K., Bertheau, Y., Hyman, L.J., Laplaze, L., López, M.M., McNicol, J., Niepold, F., Persson, P., Salmond, G.P.C., Sletten, A., et al. (1999a). Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *J. Appl. Microbiol.* 87, 770–781.
- Toth, I.K., Hyman, L.J., and Wood, J.R. (1999b). A one step PCR-based method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. *J. Appl. Microbiol.* 87, 158–166.
- Toth, I.K., Avrova, A.O., and Hyman, L.J. (2001). Rapid Identification and Differentiation of the Soft Rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic Transcribed Spacer-PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4070–4076.
- Toth, I.K., Sullivan, L., Brierley, J.L., Avrova, A.O., Hyman, L.J., Holeva, M., Broadfoot, L., Perombelon, M.C.M., and McNicol, J. (2003). Relationship between potato seed tuber contamination by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, blackleg disease development and progeny tuber contamination. *Plant Pathol.* 52, 119–126.
- Toth, I.K., van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsrör Lahkim, L., and Elphinstone, J.G. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe: *Dickeya* spp. on potato in Europe. *Plant Pathol.* 60, 385–399.
- Trias, R., Bañeras, L., Montesinos, E., and Badosa, E. (2010). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *Int. Microbiol.* 11, 231–236.
- Truchado, P., Tomás-Barberán, F.A., Larrosa, M., Allende, A. (2012). Food phytochemicals act as Quorum Sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*. *Food Control.* 24, 78–85.
- Tsrör, L., Erlich, O., Lebiush, S., Hazanovsky, M., Zig, U., Slawiak, M., Grabe, G., van der Wolf, J.M., and van de Haar, J.J. (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.
- Tsrör Lahkim, L., Erlich, O., Hazanovsky, M., Ben Daniel, B., Zig, U., and Lebiush, S. (2012). Detection of *Dickeya* spp. latent infection in potato seed tubers using PCR or ELISA and correlation with disease incidence in commercial field crops under hot-climate conditions: Detection of *Dickeya* spp. latent infection in potato seed tubers. *Plant Pathol.* 61, 161–168.

- Tweddell, R.J., Boulanger, R., and Arul, J. (2003). Effect of chlorine atmospheres on sprouting and development of dry rot, soft rot and silver scurf on potato tubers. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 445–454.
- Uroz, S. (2003). Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology* 149, 1981–1989.
- Val, F., Barzic, M.-R., Desender, S., Hamelin, G., Andrivon, D. (2006). Stockage des pommes de terre Un lipopolysaccharide bactérien... anti-bactérien ? Évaluation d'un candidat pour la protection biologique des tubercules de pomme de terre contre les bactérioses. *Phytoma, la défense des végétaux.* 596, 33-36.
- Van der Merwe, J.J., Coutinho, T.A., Korsten, L., and van der Waals, J.E. (2010). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 175–185.
- Van der Wolf, J.M., Perombelon, M.C.M., and Scottish Crop Research Institute (1998). Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes: a laboratory manual (Dundee: Scottish Crop Research Institute).
- Van der Wolf, J.M., Nijhuis, E.H., Kowalewska, M.J., Saddler, G.S., Parkinson, N., Elphinstone, J.G., Pritchard, L., Toth, I.K., Lojkowska, E., Potrykus, M., 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.
- Van der Wolf, J.M., and H. De Boer, S. (2007). Bacterial pathogens of potato. In *Potato Biology and Biotechnology*, (Elsevier), pp. 595–617.
- Van Vuurde, J., and Vries, P.M. (1994). Population dynamics of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on the surface of intact and wounded seed potatoes during storage. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 568–575.
- Vokou, D., Vareltzidou, S., and Katinakis, P. (1993). Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity. *Agric. Ecosyst. Environ.* 47, 223–235.
- Waleron, M., Waleron, K., Podhajska, A.J., and Lojkowska, E. (2002). Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology* 148, 583–595.
- Waleron, M., Waleron, K., and Lojkowska, E. (2014). Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. *Eur. J. Plant Pathol.* 139, 457–469.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319–346.
- Weber, J., Olsen, O., Wegener, C., and von Wettstein, D. (1996). Digalacturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48, 389–401.
- Wegener, C.B. (2001). Transgenic potatoes expressing an *Erwinia* pectate lyase gene — results of a 4-year field experiment. *Potato Res.* 44, 401–410.
- Wegener, C., Bartling, S., Weber, J., Susanne, H.-B., and Olsen, O. (1996). Transgenic potatoes that express an *Erwinia* pectate lyase isoenzyme. In *Progress in Biotechnology*, (Elsevier), pp. 385–397.
- Whitehead, N.A., Byers, J.T., Commander, P., Corbett, M.J., Coulthurst, S.J., Everson, L., Harris, A.K.P., Pemberton, C.L., Simpson, N.J.L., Slater, H., et al. (2002). The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 223–231.
- Wilson, K. (2001). Preparation of Genomic DNA from Bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 2.4.1-2.4.5.
- Wood, E.M., Miles, T.D., and Wharton, P.S. (2013). The use of natural plant volatile compounds for the control of the potato postharvest diseases, black dot, silver scurf and soft rot. *Biol. Control* 64, 152–159.
- Xu, G.W., and Gross, D.C. (1986). Selection of Fluorescent *Pseudomonads* Antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. *76*, 414-422.
- Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., Zhang, G., Yang, S., Li, R., Wang, J., et al. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475, 189–195.
- Yang, S., Peng, Q., San Francisco, M., Wang, Y., Zeng, Q., and Yang, C.-H. (2008). Type III Secretion System Genes of *Dickeya dadantii* 3937 Are Induced by Plant Phenolic Acids. *PLoS ONE* 3, e2973.

Yang, S.Y., Park, M.R., Kim, I.S., Kim, Y.C., Yang, J.W., and Ryu, C.-M. (2011). 2-Aminobenzoic acid of *Bacillus* sp. BS107 as an ISR determinant against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* SCC1 in tobacco. *Eur. J. Plant Pathol.* 129, 371–378.

Sites internet utilisés pour ce manuscrit :

L'agence canadienne d'inspection des aliments : www.inspection.gc.ca

Wikipedia : www.wikipedia.org

FN3PT/RD3PT : www.plantdepommedeterre.org

FAOstat : www.faostat.fao.org

CNIPT : www.cnipt-pommesdeterre.com

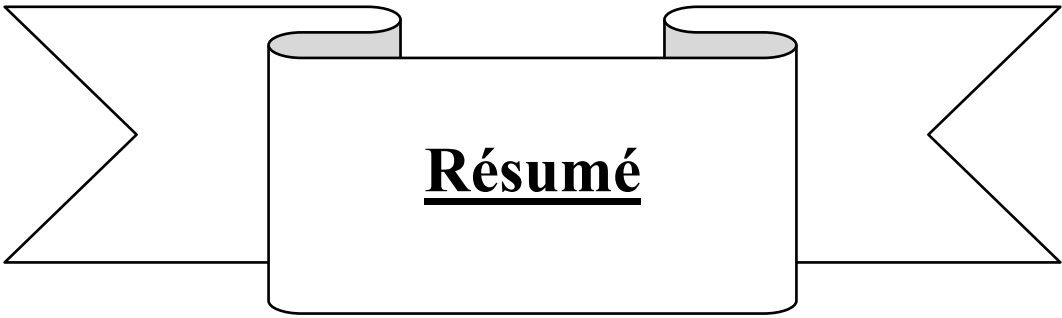
GNIS : www.gnis.fr

Biolog : www.biolog.com

XLSTAT : www.xlstat.com/fr/centre-d-apprentissage/tutoriels/analyse-de-kaplan-meier-avec-xlstat-life.html

IMAGIF Plateforme de séquençage : www.imagif.cnrs.fr

Pseudomonas analyses : www.pseudomonas.com



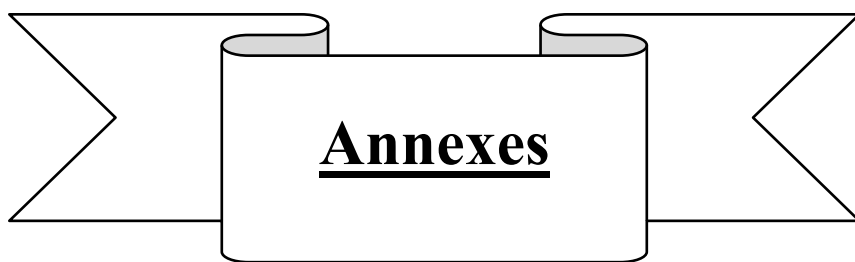
Pathogénie de *Dickeya dianthicola* et *Dickeya solani* chez *Solanum tuberosum*, développement et évaluation de stratégies de lutte biologique

Chez *S. tuberosum*, les pathogènes bactériens *Pectobacterium* et *Dickeya* causent les maladies de la jambe noire et de la pourriture molle au champ et lors du stockage des tubercules. Outre les méthodes de prophylaxie, aucune méthode de lutte n'est efficace contre ces bactéries. La FN3PT/RD3PT mène des projets de recherche en phytopathologie et épidémiologie pour mieux comprendre les traits de vie et la physiologie de ces pathogènes, et proposer des solutions de lutte adaptées. L'objectif de ce travail était double : comparer le pouvoir pathogène de deux bactéries émergentes *D. dianthicola* et *D. solani* et étudier des stratégies de lutte biologique contre *Pectobacterium* et *Dickeya*. D'abord, deux souches isolées au champ, *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 ont été comparées au niveau de leur pouvoir pathogène sur tubercules et sur plante entière. Cette étape a nécessité la mise au point de pathosystèmes appropriés. *D. dianthicola* RNS04.9 apparaît plus virulente que *D. solani* 3337 sur plante entière, alors que le contraire est observé sur tubercules. Une comparaison génomique complétée d'études fonctionnelles ont révélé l'existence de certains traits propres à chaque souche, notamment, le catabolisme de l'arabinose et de l'urée chez *D. solani* 3337 et celui du rhamnose chez *D. dianthicola* RNS04.9. Ensuite, un criblage d'isolats bactériens a été réalisé pour identifier des agents de lutte biologique capables d'inhiber la croissance de *Dickeya* et *Pectobacterium*. Six bactéries, des genres *Pseudomonas* ou *Bacillus*, ont été retenues. Les essais menés en serre ont montré l'efficacité d'une combinaison de trois *Pseudomonas* pour diminuer les symptômes de jambe noire causées par *D. dianthicola* et sa transmission à la descendance. La séquence du génome de ces agents de lutte biologique a été déterminée. Avec ces données, par qPCR, un maintien des agents de phytoprotection dans le sol a été observé. Enfin, un criblage de molécules chimiques a été réalisé sur la base de leur capacité anti-*quorum-sensing* pour réduire l'expression des facteurs de virulence chez *Pectobacterium*. Deux inhibiteurs du *quorum-sensing* ont été identifiés. En conclusion de ce travail, la possibilité de coupler différentes stratégies de lutte contre ces pathogènes pectinolytiques est discutée.

Pathogenesis of *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* onto *Solanum tuberosum*, development and evaluation of the biological control strategies

Pectobacterium and *Dickeya* phytopathogens are the causative agents of the blackleg and soft rot diseases on *S. tuberosum*, in the field or during tuber-storage. Today, no effective method permits to control these bacteria. The FN3PT / RD3PT conducts plant pathology and epidemiology researches to understand the life traits and physiology of these pathogens and propose adapted control solutions. The aim of this study was dual: to compare the virulence of two emerging pathogens *D. dianthicola* and *D. solani*, and to study biocontrol strategies directed at *Pectobacterium* and *Dickeya*. First, two strains were isolated from field samples, *D. dianthicola* RNS04.9 and *D. solani* 3337. The virulence of these strains was compared in tuber and whole plant-assays. This step required the development of appropriate pathosystems. *D. dianthicola* RNS04.9 appeared more virulent than *D. solani* 3337 on whole plant tests, while the opposite was observed on tubers tests. Genome comparisons and functional studies led to the identification of some genetic traits unique to each strain such as the catabolism of arabinose and urea in *D. solani* 3337 and that of rhamnose in *D. dianthicola* RNS04.9. A screening of bacterial isolates was also performed to identify biocontrol agents capable of inhibiting the growth of *Dickeya* and *Pectobacterium* strains. Six isolates, belonging to the *Pseudomonas* or *Bacillus* genera were selected. The greenhouse trials have shown the efficacy of a combination of 3 *Pseudomonas* to reduce blackleg symptoms caused by *D. dianthicola* and its transmission to the offspring. The sequence of the genome of each biocontrol agents has been determined. With these data, the survival of biocontrol agents in the soil has been investigated by qPCR. Finally, a screening of chemical compounds was carried out on the basis of their anti-*quorum sensing*, i.e. their ability to quench the expression of *Pectobacterium* virulence factors. Two *quorum-sensing* inhibitors have been identified. As a conclusion to this work, opportunities to mix the various biocontrol strategies directed at pectinolytic pathogens is discussed.

Mots clés (Keywords) : *Dickeya*, Jambe noire (Blackleg), Pourriture molle (soft-rot), stratégies de lutte biologique (biocontrol strategies), *S. tuberosum*, Antibiose (Antibiosis)



Cette partie annexe reflète des travaux complémentaires auxquels j'ai participé. Ils font partie intégrante des valorisations réalisées dans le cadre général de mon travail de thèse ou contribuent aux perspectives que laissent entrevoir ce travail.

La première partie reprend les travaux de valorisation du doctorat, l'article publié dans la rubrique « Cahier Plants » du journal national technico-professionnel, *La pomme de terre française*, n° 592, Mars-Avril 2014 (p. 48-50). Puis, l'acte publié lors de ma participation au colloque international, *The European Association for Potato Research* (Bruxelles, 2014) au cours duquel j'ai eu la chance de présenter mes travaux de doctorat oralement.

Dans la seconde partie intitulée travaux collaboratifs en lien avec le doctorat, seront présentés les articles acceptés dans divers journaux scientifiques internationaux auxquels j'ai pu participer durant ces trois années.

Pathogénie de *Dickeya dianthicola* et *Dickeya solani* chez *Solanum tuberosum*, développement et évaluation de stratégies de lutte biologique

Chez *S. tuberosum*, les pathogènes bactériens *Pectobacterium* et *Dickeya* causent les maladies de la jambe noire et de la pourriture molle au champ et lors du stockage des tubercules. Outre les méthodes de prophylaxie, aucune méthode de lutte n'est efficace contre ces bactéries. La FN3PT/RD3PT mène des projets de recherche en phytopathologie et épidémiologie pour mieux comprendre les traits de vie et la physiologie de ces pathogènes, et proposer des solutions de lutte adaptées. L'objectif de ce travail était double : comparer le pouvoir pathogène de deux bactéries émergentes *D. dianthicola* et *D. solani* et étudier des stratégies de lutte biologique contre *Pectobacterium* et *Dickeya*. D'abord, deux souches isolées au champ, *D. dianthicola* RNS04.9 et *D. solani* 3337 ont été comparées au niveau de leur pouvoir pathogène sur tubercules et sur plante entière. Cette étape a nécessité la mise au point de pathosystèmes appropriés. *D. dianthicola* RNS04.9 apparaît plus virulente que *D. solani* 3337 sur plante entière, alors que le contraire est observé sur tubercules. Une comparaison génomique complétée d'études fonctionnelles ont révélé l'existence de certains traits propres à chaque souche, notamment, le catabolisme de l'arabinose et de l'urée chez *D. solani* 3337 et celui du rhamnose chez *D. dianthicola* RNS04.9. Ensuite, un criblage d'isolats bactériens a été réalisé pour identifier des agents de lutte biologique capables d'inhiber la croissance de *Dickeya* et *Pectobacterium*. Six bactéries, des genres *Pseudomonas* ou *Bacillus*, ont été retenues. Les essais menés en serre ont montré l'efficacité d'une combinaison de trois *Pseudomonas* pour diminuer les symptômes de jambe noire causées par *D. dianthicola* et sa transmission à la descendance. La séquence du génome de ces agents de lutte biologique a été déterminée. Avec ces données, par qPCR, un maintien des agents de phytoprotection dans le sol a été observé. Enfin, un criblage de molécules chimiques a été réalisé sur la base de leur capacité anti-quorum-sensing pour réduire l'expression des facteurs de virulence chez *Pectobacterium*. Deux inhibiteurs du quorum-sensing ont été identifiés. En conclusion de ce travail, la possibilité de coupler différentes stratégies de lutte contre ces pathogènes pectinolytiques est discutée.

Pathogenesis of *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* onto *Solanum tuberosum*, development and evaluation of the biological control strategies

Pectobacterium and *Dickeya* phytopathogens are the causative agents of the blackleg and soft rot diseases on *S. tuberosum*, in the field or during tuber-storage. Today, no effective method permits to control these bacteria. The FN3PT / RD3PT conducts plant pathology and epidemiology researches to understand the life traits and physiology of these pathogens and propose adapted control solutions. The aim of this study was dual: to compare the virulence of two emerging pathogens *D. dianthicola* and *D. solani*, and to study biocontrol strategies directed at *Pectobacterium* and *Dickeya*. First, two strains were isolated from field samples, *D. dianthicola* RNS04.9 and *D. solani* 3337. The virulence of these strains was compared in tuber and whole plant-assays. This step required the development of appropriate pathosystems. *D. dianthicola* RNS04.9 appeared more virulent than *D. solani* 3337 on whole plant tests, while the opposite was observed on tubers tests. Genome comparisons and functional studies led to the identification of some genetic traits unique to each strain such as the catabolism of arabinose and urea in *D. solani* 3337 and that of rhamnose in *D. dianthicola* RNS04.9. A screening of bacterial isolates was also performed to identify biocontrol agents capable of inhibiting the growth of *Dickeya* and *Pectobacterium* strains. Six isolates, belonging to the *Pseudomonas* or *Bacillus* genera were selected. The greenhouse trials have shown the efficacy of a combination of 3 *Pseudomonas* to reduce blackleg symptoms caused by *D. dianthicola* and its transmission to the offspring. The sequence of the genome of each biocontrol agents has been determined. With these data, the survival of biocontrol agents in the soil has been investigated by qPCR. Finally, a screening of chemical compounds was carried out on the basis of their anti-quorum sensing, i.e. their ability to quench the expression of *Pectobacterium* virulence factors. Two quorum-sensing inhibitors have been identified. As a conclusion to this work, opportunities to mix the various biocontrol strategies directed at pectinolytic pathogens is discussed.

Mots clés (Keywords) : *Dickeya*, Jambe noire (Blackleg), Pourriture molle (soft-rot), stratégies de lutte biologique (biocontrol strategies), *S. tuberosum*, Antibiose (Antibiosis)