

Présentation du projet

Appel à projets recherche 2008 de la Région des Pays de la Loire

SOMMAIRE

I-	Fiche d'identité du projet	p. 2
II-	Résumé du projet	p. 5
III-	Financement sollicité auprès de la Région des Pays de la Loire. Appel à projets Recherche 2008.	p. 6
IV-	Présentation plus détaillée du Coordinateur Scientifique et des Partenaires du Projet.	p. 8
V-	Description du Projet	p. 19
A-	Objectifs et contexte	
	A.1. Objectifs scientifiques du projet	p. 20
	A.2. Originalité de notre approche	p. 20
	A.3. Eléments de contexte et Objectifs technologiques	p. 21
	A.4. Intérêt structurant pour le développement du laboratoire	p. 21
B-	Description du projet scientifique	p. 22
	B.1. Les axes opérationnels (AXO)	p. 23
	B.1.1. Questions posées et collections de souches utilisées.	p. 23
	B.1.2. AXO1 : Caractérisation pathologique des souches	p. 24
	B.1.3. AXO2 : Caractérisation de la composition des répertoires de Gènes Associés à l'Interaction avec la Plante (GAIPs)	p. 25
	B.1.4. AXO3 : Etude de la diversité allélique des GAIPs	p. 25
	B.1.4.1. Elaboration d'amorces pour la puce DiagGene.	p. 25
	B.1.4.2. Détermination de l'histoire évolutive des GAIPs.	p. 25
	B.1.5. AXO4 : Développement d'un outil d'identification probabiliste de souches inconnues de <i>Xanthomonas</i> au niveau pathovar.	p. 26
	B.2. Calendrier, Membres impliqués et rôles de chacun.	p. 28
	B.3. Actions envisagées de valorisation et diffusion de la culture scientifique et technique.	p. 28
C-	Qualités du consortium	p. 29
	C.1. Expériences antérieures et adéquations entre chercheurs	p. 29
	C.2. Complémentarité et synergies des membres de l'équipe	p. 29
D-	Suivi et gestion du projet	p. 31
	D.1. Organisation et mode de gestion du projet	p. 31
	D.1.1. Financement de personnel non-permanent	p. 31
	D.1.2. Financement d'équipements mi-lourds	p. 31
	D.1.3. Frais de prestations de service	p. 32
	D.1.4. Frais de fonctionnement	p. 32
	D.2. Structure assurant le suivi et la gestion financière	p. 32
	D.3. Appui en personnel dédié	p. 32
E-	Résultats et potentiel de développement	p. 33
	E.1. Etat actuel des résultats	p. 34
	E.2. Résultats attendus	p. 35
	E.3. Potentiel de développement dans le domaine d'études	p. 35
	E.4. Impact Potentiel sur les dispositifs de formation d'enseignement supérieur	p. 35
F-	Coût et plan de financement	p. 36
G-	Précisions à apporter sur les emplois scientifiques susceptibles d'être financés dans le cadre de ce projet.	p. 38
H-	Bibliographie	p. 39
	ANNEXE 4.	p. 40

Présentation du projet

Appel à projets recherche 2008 de la Région des Pays de la Loire

Dossier à retourner impérativement avant le lundi 21 avril à 17 heures

N°dossier :
(cadre réservé à la Région)

I - FICHE D'IDENTITE DU PROJET

Titre : Exploitation de répertoires de gènes et génétique des populations pour identifier les bases génétiques de la spécificité d'hôte de souches de vastes collections de *Xanthomonas*.

Acronyme : XANTHOST

(8 caractères maximum)

Dépôt d'une demande de soutien dans le cadre

- du volet « paris scientifiques régionaux »

Porteur du projet (centre de recherche qui assume la responsabilité du projet)

Nom du laboratoire/équipe de recherche :

UMR PaVé INRA-INH-Université d'Angers.

Equipe EDTa-BP : Ecologie Diversité et Taxonomie des Bactéries Phytopathogènes

Etablissement de rattachement : INRA et Université d'Angers.

42 rue G. Morel, BP 60057, 49071 Beaucouzé cedex

FRANCE

Coordinateur scientifique du projet :

Nom : **BOUREAU**

Prénom : **Tristan**

Titre/fonction : Maître de Conférences Université d'Angers

Coordonnées (tél/mail/adresse) : tristan.bureau@univ-angers.fr

02 41 22 57 01

Partenaire 2

Nom du laboratoire/équipe de recherche :

HIFI, UPRES 3859, IFR132

Etablissement de rattachement :

Université d'Angers, UFR Sciences, 2bd Lavoisier 49049 Angers

FRANCE

Partenaire 3

Société DiagGene.

Etablissement de rattachement :

Nombre de personnes impliquées dans ce projet (en équivalent temps plein : moyenne ETP/an)

Nom Prénom	Unité de rattachement	Discipline	Statut et grade*	temps de recherche consacré au projet (ETP)*
Boureau Tristan	UMR PaVé	Bactériologie-Pathologie végétale.	MCF Université Angers	0,4 ETP (=80% du temps de recherche)
Fischer LeSaux Marion	UMR PaVé	Taxonomie Bactérienne	CR2 INRA	0,5 ETP
Poussier Stéphane	UMR PaVé	Bactériologie-Pathologie Végétale	MCF INH	0,4 ETP (80% du temps de recherche)
Lemaire Christophe	UMR PaVé	Génétique des populations	MCF Université d'Angers	0,25 ETP (50% du temps de recherche)
Jacques Marie-Agnès	UMR PaVé	Ecologie bactérienne	CR1 INRA	0,5 ETP
Darrasse Armelle	UMR PaVé	Ecologie bactérienne	IE2 INRA	0,5 ETP
Manceau Charles	UMR PaVé	Biodiversité des bactéries phytopathogènes	IR1-HDR INRA	0,1 ETP
Hunault Gilles	HiFi	Mathématiques appliquées, Informatique	MCF Université d'Angers	0,3 ETP (15 % du temps de recherche)
Kerkoud Mohammed	Société DiagGène	Développement de kit de diagnostic.	Docteur de l'Université d'Angers	0,25 ETP
Durand Karine	UMR PaVé	Biologie moléculaire	TR-EX INRA	0,8 ETP
Brin Chrystelle	UMR PaVé	Bactériologie-Pathologie végétale. Biologie moléculaire.	TR-N INRA	0,8 ETP
Hajri Ahmed	UMR PaVé	Biologie moléculaire-Pathologie Végétale-	Doctorant	1 ETP

		Bioinformatique		
Mhedbi Nadia	UMR PaVé	Biologie moléculaire Pathologie végétale Imagerie végétale	Doctorante	1 ETP

Total : 13 participants, pour 6,65 ETP recherche.

* Statut et grade : chercheurs, enseignants chercheurs permanents, doctorants, post doctorants, étudiants, ingénieurs, techniciens...(précisez PU, MCF, MCF-HDR, DR, CR, etc.)

* ETP : équivalent temps plein par personne investie dans le projet en considérant à la fois son temps de recherche et d'enseignement.

II – RESUME DU PROJET (1 page maximum)

Attention ce résumé sera mis en ligne sur le site internet de la Région en cas de financement du projet. Il devra donc être compréhensible par un public non averti.

Contexte

Les bactéries phytopathogènes du genre *Xanthomonas* sont responsables de maladies sur plus de 400 espèces végétales. Cependant, chaque souche, individuellement, n'attaque qu'un nombre limité d'espèces végétales. Différentes souches peuvent induire des maladies sur des plantes différentes. Les souches possédant une spécificité d'hôte identique, c'est à dire des souches qui causent des symptômes identiques sur un même hôte, sont regroupées au sein d'un même « pathovar ». La compréhension des bases génétiques de la spécificité d'hôte est un enjeu important dans la perspective d'améliorer les méthodes de lutte contre les bactéries phytopathogènes.

Objectifs

L'objectif de ce projet *in fine*, est d'identifier les bases génétiques de la spécificité d'hôte au niveau pathovar/espèce végétale chez les bactéries du genre *Xanthomonas*. La spécificité d'hôte est le résultat de plusieurs phases successives d'interaction entre les bactéries et les plantes :

- attraction de la bactérie et contact avec la plante hôte,
- pouvoir pathogène et capacité à se multiplier dans les tissus végétaux,
- transmission à un nouvel hôte sain.

Ainsi, pour atteindre ces objectifs, nous proposons de caractériser les répertoires de gènes bactériens impliqués dans ces 3 phases. Les répertoires candidats sont les répertoires de « Methyl-accepting Chemotaxis Proteins » (MCPs), des senseurs impliqués dans la perception de signaux chimiques par les bactéries, les répertoires d'adhésines qui permettent à la bactérie d'adhérer à la surface des tissus végétaux, et les répertoires d'effecteurs de type III, qui sont impliqués dans la capacité de la bactérie à se multiplier dans les tissus de l'hôte. Ces répertoires de Gènes Associés à l'Interaction avec la Plante (GAIPs) seront caractérisés sur plusieurs collections de souches bactériennes représentatives de la diversité des *Xanthomonas*.

Chaque lot de souches bactérienne utilisé a été constitué de manière à répondre à des questions scientifiques précises :

- Peut-on obtenir une empreinte génétique caractéristique de la spécificité d'hôte des souches, en identifiant des correspondances entre la nature des répertoires de GAIPs et la gamme d'hôte des souches ?
- Peut-on identifier des modifications de répertoires conduisant à l'émergence de souches responsables d'une nouvelle maladie en révélant des correspondances entre la nature du répertoire de GAIPs et le caractère émergent des souches ?
- Peut-on mettre en évidence une évolution des répertoires de GAIPs suite à l'introduction d'une nouvelle culture intensive ?

Les résultats de ce projet seront exploités pour développer au sein d'une collaboration entre l'UMR PaVé et l'entreprise DiagGene, une méthode rapide d'identification de souches inconnues de *Xanthomonas* au niveau pathovar. Enfin, les résultats de ce projet alimenteront la base de données associée à la Collection Française des Bactéries Phytopathogènes, hébergée à l'INRA Angers (CFBP: <http://www.angers.inra.fr/cfbp/>).

Méthodologie

Pour atteindre nos objectifs, nous déterminerons par PCR et hybridation sur membrane à partir d'une vaste collection de souches du genre *Xanthomonas* parfaitement caractérisées pour leur origine, la présence ou l'absence d'orthologues des GAIPs candidats. Ensuite, les différents orthologues seront séquencés, afin d'analyser leur histoire évolutive par une approche utilisant la théorie de la coalescence. Les GAIPs étant susceptibles d'être transférés par transfert horizontal de gènes entre souches non apparentées, le positionnement taxonomique précis de chaque souche de la collection sera déterminé par une approche Multi-Locus Sequence Typing (MLST) sur 7 gènes de ménage, et le pouvoir pathogène des souches sera caractérisé sur une gamme d'hôtes végétaux.

III-FINANCEMENT SOLLICITE AUPRES DE LA REGION DES PAYS DE LA LOIRE **APPEL A PROJETS RECHERCHE 2008**

Acronyme du projet : XANTHOST

Durée et calendrier du projet : 3 ans.

Estimation du coût SUPPLEMENTAIRE du projet (TTC) : 197200 €.

Ne sont pas éligibles à un financement régional les salaires des personnels permanents des laboratoires. A noter que la convention de financement sera établie sur la base de ce montant de dépenses.

Montant total de l'aide demandée à la région des Pays de la Loire (TTC) :

A titre d'information, les modalités de versement de la subvention sont envisagées de la manière suivante :

- un premier acompte de 30 % sera versé à la signature de la convention,
- un second acompte de 40 % sera versé 18 mois après la signature de la convention sur présentation d'un état des dépenses réalisées certifié acquitté par le comptable assignataire. *Ce second acompte sera donc versé sans obligation d'avoir atteint un niveau de dépenses de 70 %. Si toutefois le montant des dépenses engagées s'avérait supérieur à 70 % du coût total du projet, le versement sera effectué au prorata des dépenses réalisées,*
- le solde de 30 % sur présentation d'un bilan du projet et un état récapitulatif des dépenses réalisées certifié acquitté par le comptable assignataire.

Par ailleurs, les allocations de recherche (doctorale et post-doctorale) seront versées selon des conventions spécifiques, établies au fur et à mesure des recrutements. Le montant des allocations et les conditions de paiement respecteront les règlements adoptés par la Région des Pays de la Loire. Ainsi :

- pour une bourse post-doctorale le montant forfaitaire s'élève à 45 600 euros pour 12 mois, versés en deux fois : 50% sur présentation, par l'organisme de gestion, du contrat à durée déterminée signée par l'employeur et le post-doctorant, le solde au pro rata des dépenses réalisées,
- pour une bourse doctorale le montant forfaitaire s'élève à 79 560 euros pour 36 mois, versés en trois fois. Les 3 versements se font sur la présentation des justificatifs suivants :
 1. présentation par l'organisme de gestion, d'une attestation de la mise en place d'un contrat de travail à durée déterminée ;
 2. récapitulatif régional type de versements des 18 premiers mois de salaire au doctorant visé par le responsable financier et d'un rapport intermédiaire de thèse (non obligatoire pour les bourses cofinancées par les grands organismes) ;
 3. Le solde sur remise du rapport de soutenance de thèse et du récapitulatif régional type de paiement des 18 derniers mois de salaires, visé par le responsable financier. La subvention sera versée au prorata de la dépense justifiée.

Le montant de la participation régionale inscrit dans la convention est fixé pour 3 ans. Les éventuelles revalorisations effectuées par l'organisme, non prévues lors de l'établissement de la convention, sont irrecevables.

Visa du Coordinateur scientifique du projet :
Tristan BOUREAU

Nom, prénom, date et signature du coordinateur du projet avec la mention « lu et approuvé »

Visa du Responsable du Centre de Recherche/Laboratoire
Charles MANCEAU

Nom, prénom, date et signature du responsable de l'organisme, avec la mention « lu et approuvé »

Visa du Responsable d'établissement

Nom, prénom, date et signature du responsable de l'organisme, avec la mention « lu et approuvé »

NB : Ces trois visas sont obligatoires pour la recevabilité du dossier.

Autres participants du centre de recherche du coordinateur scientifique :
Membre A - 1

Nom : Fischer-LeSaux	Prénom : Marion	Grade : CR2 INRA
Emploi actuel : Chargée de Recherche en Taxonomie Bactérienne, Conservatrice de la Collection Française des Bactéries Phytopathogènes (CFBP).		
Temps mensuel consacré au projet : 50% du temps		
Responsabilité dans le projet : Responsable des collections bactériennes. Co-responsable du développement de la méthode d'identification probabiliste de souches inconnues de <i>Xanthomonas</i> avec G. Hunault.		
Expériences professionnelles : Doctorat en Microbiologie en 1999 à l'Université de Montpellier 2. 2 ans de PostDoc à l'Ifremer, Brest. 2 ans de poste d'ATER à mi-temps à l'Université d'Angers. Depuis 5 ans, dirige la CFBP.		
publications (ou brevets) les plus significatives des cinq dernières années :		
Mantelin S., Fischer-Le Saux M. , Zakhia F., Bena G., Bonneau S., Jeder H., De Lajudie P., Cleyet-Marel J.C., 2006. Emended description of the genus <i>Phyllobacterium</i> and description of four novel species associated with plant roots: <i>Phyllobacterium bourgognense</i> sp. nov., <i>Phyllobacterium ifriqiyense</i> sp. nov., <i>Phyllobacterium leguminum</i> sp. nov. and <i>Phyllobacterium brassicacearum</i> sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56: 827-839.		
Portier P., Fischer-Le Saux M. , Mougel C., Lerondelle C., Chapulliot D., Thioulouse J., Nesme X., 2006. Identification of genomic species in <i>Agrobacterium</i> biovar 1 by AFLP genomic markers. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7123-7131		
Samson, R; Legendre, JB; Christen, R; Fischer-Le Saux, M ; Achouak, W; Gardan. 2005. Transfer of <i>Pectobacterium chrysanthemi</i> (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and <i>Brenneria paradisiaca</i> to the genus <i>Dickeya</i> gen. nov as <i>Dickeya chrysanthemi</i> comb. nov and <i>Dickeya paradisiaca</i> comb. nov and delineation of four novel species, <i>Dickeya dadantii</i> sp nov., <i>Dickeya dianthicola</i> sp nov., <i>Dickeya dieffenbachiae</i> sp nov and <i>Dickeya zeae</i> sp nov. Int J Syst Evol Microbiol, 55: 1415-1427.		
F. Poliakoff, M. Fischer-Le Saux , G. Hunault, C. François, C. Rivoal, S. Bonneau, S. Perret, H. Soubelet and D. Caffier. 2005. Computer-assisted identification and clustering for regulated phytopathogenic bacteria: construction of a reference database and development of a computer system. <i>EPPO Bulletin</i> , 35 : 61-68.		
Rojas A.M., Garcia De Los Rios J.E., Fischer-Le Saux M. , Jimene, P., Reche P., Bonneau S., L., S., Mathieu-Daude F., McClelland M., 2004. <i>Erwinia toletana</i> sp. nov., associated with <i>Pseudomonas savastanoi</i> -induced tree knots. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 2217-2222.		

Membre A - 2

Nom : Poussier

Prénom : Stéphane

Grade : MCF-INH

Emploi actuel : Enseignant-chercheur à l'INH

Temps mensuel consacré au projet : 80% du temps de recherche.

Responsabilité dans le projet : Responsable de la constitution d'une gamme d'hôte différentielle et des tests de pouvoir pathogène.

Expériences professionnelles : Doctorat en 2000 en Génétique et Productions Végétales, Université de Rennes. 2 ans de Post-Doc à l'INRA Toulouse. 2 ans de Post-Doc à l'Université Kansas State (USA). 4 ans de poste d'enseignant chercheur à l'INH. Encadrement d'une thèse en Pathologie Végétale soutenue à l'Université d'Angers en 2006.

publications (ou brevets) les plus significatives des cinq dernières années :

Alavi, S.M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C. & **Poussier S.** Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. *Applied and Environmental Microbiology*, in press.

Alavi, S.M., **Poussier, S.** & Manceau C., 2007. Characterization of ISXax1, a novel insertion sequence restricted to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (variants *fuscans* and *non-fuscans*) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1678-1682.

Fouché-Weich, J. P., **Poussier, S.**, Trigalet-Demery D., Berger D. K. & Coutinho T. A., 2006. Molecular identification of some African strains of *Ralstonia solanacearum* from eucalyptus and potato. *Journal of General Plant Pathology*, 72, 369-373.

Berruyer, R., **Poussier, S.**, Kankanala, P., Mosquera, G. & Valent, B., 2006. Quantitative and qualitative influence of inoculation methods on *in planta* growth of the rice blast fungus. *Phytopathology* 96, 346-355.

Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet-Demery, D., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M. & Trigalet, A., 2003. Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular Microbiology* 49, 991-1003.

Membre A - 3

Nom : Lemaire Prénom : Christophe Grade : MCF Université d'Angers

Emploi actuel : Enseignant Chercheur Université d'Angers

Temps mensuel consacré au projet : 50% du temps de recherche.

Responsabilité dans le projet : Génétique des Populations. Reconstitution de l'histoire évolutive des orthologues des GAIPs.

Expériences professionnelles : Doctorat en 2001 en Génétique Evolutive à l'Institut National Agronomique Paris Grignon (AgroParisTech). 3 ans de post-doc à l'IFREMER, Nantes. 2ans de post-doc à l'Université de Californie (Santa-Cruz). Depuis 3 ans, Maître de Conférences à l'Université d'Angers. Encadrement d'une thèse en Génétique à l'Université d'Angers.

Publications (ou brevets) les plus significatives des cinq dernières années :

Fauvelot C., **Lemaire C.**, Planes S., Bonhomme, F. (2007). Inferring gene flow in coral reef fishes from different molecular markers: Which loci to trust? *Heredity*, 99(3), 331-339.

Lemaire C., Versini J.-J., Bonhomme, F. (2005). Maintenance of genetic differentiation across a transition zone in the sea: Discordance between nuclear and cytoplasmic markers. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(1), 70-80.

Guinand B, **Lemaire C.**, Bonhomme F. (2004). How to detect polymorphisms undergoing selection in marine fishes? A review of methods and case studies, including flatfishes. *Journal of Sea Research*, 51(3-4), 167-182.

Membre A - 4

Nom : Jacques

Prénom : Marie-Agnès

Grade : CR1-INRA

Emploi actuel : Chercheur en Pathologie Végétale

Temps mensuel consacré au projet : 50% du temps de recherche.

 Responsabilité dans le projet : Analyse des répertoires de senseurs des souches de *Xanthomonas* étudiées.

Expériences professionnelles : Doctorat de Pathologie Végétale, Université Paris XI, en 1994. 2 ans de post-doc à Oxford. 3 ans de chercheur à l'INRA Avignon. 10 ans de chercheur à l'INRA, UMR Pavé, Angers.

publications (ou brevets) les plus significatives des cinq dernières années

-Darsonval, A. Darrasse, D. Meyer, M. Demarty, K. Durand, C. Bureau, C. Manceau and **M.-A. Jacques**. 2008. Type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible bean. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press).

-Darrasse, A., C. Bureau, R. Samson, C. Morris, and **M.-A. Jacques**. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**:203-215.

-**Jacques M.-A.**, K. Josi, A. Darrasse & R. Samson. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied and Environmental Microbiology* 71:2008-2015.

-Moura M.L., L.M Brito., I.M. Mourao, J. Duclos & **M.-A. Jacques**. 2005. Tomato pith necrosis (TPN) caused by *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* : severity of damages and crop loss assessment. Proceedings of the First International Symposium on Tomato Diseases, Orlando, Florida, USA, 21-24 June, 2004. *Acta Hort.* 695: 365-371.

-Boureau T., **M.-A. Jacques**, R. Berruyer, Y. Dessaux, H. Dominguez & C.-E. Morris. 2004. Comparison of the phenotypes and genotypes of biofilm and solitary epiphytic bacterial populations on broad-leaved endive. *Microbial Ecology* 47:87-95.

Membre A - 5

Nom : Darrasse

Prénom : Armelle

Grade : IE2-INRA

Emploi actuel : Ingénieur d'études à l'UMR PaVé

Temps mensuel consacré au projet : 50% du temps de recherche.

Responsabilité dans le projet : Analyse des répertoires d'adhésines des souches de *Xanthomonas* étudiées.

Expériences professionnelles : Doctorat en Pathologie Végétale à l'Université Paris XI, 1993. 8ans d'ingénieur d'études à l'INRA en Guadeloupe. 7 ans d'ingénieur d'études à l'INRA, UMR PaVé, Angers.

publications (ou brevets) les plus significatives des cinq dernières années

Darsonval, A., **Darrasse, A.**, Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., Manceau, C. and Jacques M.-A. 2008. Type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible bean. Appl. Environ. Microbiol. (in press).

Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C. E. & Jacques, M. A. (2007). Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. Eur. J. Plant Pathol. 119, 203-215.

Jacques, M. A., Josi, K., Samson, R. & **Darrasse, A.** (2005). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans allowing resistance to hydric stress. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2008-2015.

Jacques, M.-A., **A. Darrasse**, C. Bureau & E. Laurent. 2006. Field transmission of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* to progeny of symptomless beans. Proceedings of the 11th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 10-14 July 2006, Edinburgh, UK.

Membre A - 7

Nom : Hajri Prénom : Ahmed Grade : Doctorant

Emploi actuel : Doctorant en Pathologie Végétale à l'UMR PaVé.

Temps mensuel consacré au projet : 100% du temps de recherche.

Responsabilité dans le projet : Détermination et analyse des répertoires d'effecteurs de type III et détermination des propriétés pathologiques des souches de *Xanthomonas axonopodis* étudiées.

Expériences professionnelles : Stage de fin d'études au CIRAD, La Réunion : Analyse de la structure génétique des populations de *Bemisia tabaci*.

publications (ou brevets) les plus significatives des cinq dernières années :

Prix de mérite de l'IRESA (Ministère Tunisien de l'Education Supérieure et Ministère Tunisien de l'Agriculture)

Poster

Determination of repertoires of type III effectors in the pathovars of *Xanthomonas axonopodis*.

Hajri A., Delcourt S., Brin C., Manceau C., Poussier S., and Boureau T. (2008). 8th meeting of plant-bacteria (January 14-18, 2008, Aussois France)

Membre A - 8

Nom : Mhedbi Prénom : Nadia Grade : Doctorante

Emploi actuel : Doctorante en Pathologie Végétale à l'UMR PaVé.

Temps mensuel consacré au projet : 100% du temps de recherche.

Responsabilité dans le projet : Détermination et analyse des répertoires d'adhésines et de senseurs, et détermination des propriétés pathologiques des souches de *Xanthomonas axonopodis* étudiées.

Expériences professionnelles : Stage de fin d'études à AgroParistech : Etude des régulateurs globaux de la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*.

publications (ou brevets) les plus significatives des cinq dernières années

Prix de mérite de l'IRESA (Ministère Tunisien de l'Education Supérieure et Ministère Tunisien de l'Agriculture)

Poster:

Control of *Erwinia chrysanthemi* virulence genes expression during infection in Arabidopsis: Role of the GacA, PecS and PecT global regulators. Lebeau A., Reverchon S., Gaubert S., **Mhedbi N.**, Kraepiel Y., Nasser W. and Van Gijsegem F. (2007), XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (July 21-27, 2007 Sorrento Italy).

Membre A - 9

Nom : Durand (nom de jeune fille : Josi) Prénom : Karine Grade : TREX-INRA

Emploi actuel : Technicienne à l'UMR PaVé, Angers.

Temps mensuel consacré au projet : 80% du temps de recherche.

Responsabilité dans le projet : Soutien technique en biologie moléculaire.

Expériences professionnelles : Certificat Universitaire en Biotechnologie CNED/Rennes. 3ans de technicien à l'INSERM U298. 15 ans de technicien à l'UMR PaVé.

publications (ou brevets) les plus significatives des cinq dernières années

1. Jacques M.-A., **K. Josi**, A. Darrasse & R. Samson. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli var. fuscans is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Applied and Environmental Microbiology* 71:2008-2015.
2. Darsonval, A., Darrasse, A., Bureau, C., **Durand, K.** & Jacques, M. A. 2005. Specific interaction and molecular determinants of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* implicated in bean asymptomatic colonization. In *5th ISTA SHC Seed Health Symposium*, Angers, 10-13 Mai 2005

Membre A - 10

Nom : Brin Prénom : Chrystelle Grade : TRN-INRA

Emploi actuel : Technicienne à l'UMR PaVé, Angers.

Temps mensuel consacré au projet : 80% du temps de recherche.

Responsabilité dans le projet : Soutien technique en Microbiologie et Pathologie Végétale.

Expériences professionnelles : 15 ans de technicien à l'UMR PaVé, Angers.

publications (ou brevets) les plus significatives des cinq dernières années

Alavi, S.M., Sanjari, S., Durand, F., **Brin, C.**, Manceau, C. & Poussier S. Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiplex suppression subtractive hybridizations. *Applied and Environmental Microbiology*, in press.

Hajri, A., Delcourt, S., **Brin, C.**, Manceau, C., Poussier, S. & Boureau T. (2008). Détermination des répertoires d'effecteurs de type III chez divers pathovars de *Xanthomonas axonopodis*. In 8th meeting Plant-Bacteria, 14-18 janvier 2008, Aussois, France.

Alavi, S.M., Sanjari, S., **Brin, C.**, Manceau C. & Poussier, S. (2007). Identification of virulence and host specificity gene candidates in *Xanthomonas axonopodis* pathovar *phaseoli* by using suppression subtractive hybridizations. 13th international congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, July 21-27 2007, Sorrento, Italy.

Manceau C., Grall S., **Brin C.**, Guillaumes J., 2005. Bacterial extraction from grapevine and detection of *Xylophilus ampelinus* by a PCR and Microwell plate detection system. Bulletin OEPP/EPP 35, 55-60

Alavi M., **Brin C.**, Manceau C., 2004. Caractérisation génétique du pathovar *phaseoli* responsable de la tache grasse commune du haricot chez l'espèce *Xanthomonas axonopodis*. In 6th meeting Plant-Bacteria, 11-15 Janvier 2004, Aussois, France.

Partenaire 3 : Société DiagGene

Un responsable scientifique de l'équipe partenaire doit être désigné

Responsable scientifique

Nom : Kerkoud

Prénom : Mohamed

Grade : Docteur

Emploi actuel : Chargé de développement

Temps mensuel consacré au projet : 25%

Responsabilité dans le projet : Développement d'une Macropuce pour la caractérisation rapide des répertoires de GAIPs, dans la perspective de l'identification d'une espèce inconnue de *Xanthomonas* sur la base de son répertoire GAIPs.

Expériences professionnelles : : Doctorat 2001 en Sciences Agronomiques/pathologie végétale de l'Institut National Agronomique d'Alger réalisé au sein de l'UMR PaVé Angers. 2 ans de post-doc à la SNES Angers sur développement d'une méthode moléculaire pour la détection de *Ditylenchus dipsaci* parasite de la luzerne. 1 an Mission de Chargé de Recherche pour Vilmorin BioPCR de la graine de l'haricot. 18 mois de Post-Doc à l'Université d'Angers (Développement d'un prototype de puce ADN pour la détection des maladies des crucifères). Chef d'entreprise et chargé de développement : Diag-Gene société spécialiste dans la détection et l'identification des agents pathogènes des plantes par des outils moléculaires.

Publications (ou brevets) les plus significatives des cinq dernières années :

Mohamed Kerkoud, Charles Manceau, Philippe Simoneau, Brassipuce prototype de biopuce, outil de diagnostic multiparamétriques (En préparation)

Mohamed Kerkoud, Magali Esquibet, Olivier Plantard, Myriam Avrillon, Corinne Guimier, Martine Franck, Joël Léchappé and Rene Mathis (2007). Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions. EJPP, 118(4) 323-332

Mohamed Kerkoud, Charles Manceau, and Jean Pierre Paulin (2002) Rapid Diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. papulans, the Causal Agent of Blister Spot of Apple, by Polymerase Chain Reaction Using Specifically Designed hrpL Gene Primers Phytopathology, Vol. 92 (10) 1077-1083

Mohamed Kerkoud, Charles Manceau, Louis Gardan, Regine Samson and Jean-Pierre Paulin. Epiphytic Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. papulans (Rose) in France, Where Blister Spot has Never Been Seen. EJPP, 106(5) 481-485

V – DESCRIPTION DU PROJET

Acronyme : XANTHOST

Titre court : Exploitation de répertoires de gènes et génétique des populations pour identifier les bases génétiques de la spécificité d'hôte de souches de vastes collections de *Xanthomonas*.

A – Objectifs et contexte : *(2 pages maximum en Times 12, simple interligne)*

Volet « paris scientifiques régionaux »

Afin d'ouvrir son champ de compétences scientifiques, la Région des Pays de la Loire souhaite garder une capacité d'ouverture vers de nouvelles pistes de recherche et susciter l'émergence de nouveaux axes qui puissent s'inscrire dans les thématiques énumérées dans le SRR ou à titre exceptionnel en dehors. Il s'agit donc

- de soutenir le développement de nouveaux champs de compétences par diversification ou autour de sujets originaux ayant un fort potentiel de développement et de visibilité,*
- de soutenir les laboratoires ou groupes de laboratoires dont le projet permet d'anticiper une évolution de leur positionnement scientifique.*

A.1. Objectifs scientifiques du projet :

Le genre *Xanthomonas* regroupe 27 espèces pathogènes de plantes responsables de maladie sur plus de 400 hôtes végétaux différents, dont plusieurs espèces de grand intérêt économique (riz, canne à sucre, banane, *Citrus*...). Sur tous les continents, de façon récurrente, on assiste à l'émergence de populations pathogènes, responsables d'épidémies dont l'incidence socio-économique peut-être majeure. En Europe, ces observations ont conduit à l'inscription de plusieurs de ces microorganismes dans les annexes de la directive européenne 2000/29/CE (*X. arboricola* pv. *pruni*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*...) et dans la réglementation des biens à double-usage (civil et militaire) : *X. albilineans* et *Xanthomonas* pathogènes des *Citrus* et *X. oryzae* pv. *oryzae*.

Chez les bactéries du genre *Xanthomonas*, comme pour de nombreuses bactéries phytopathogènes, l'adaptation à l'hôte est très étroite et est désignée sous le terme « pathovar ». Un pathovar est une division infraspécifique qui regroupe les souches bactériennes responsables d'un même type de symptômes sur une même gamme d'hôte (une espèce ou une gamme d'espèces végétales). **L'ambition première de ce projet est de mettre en évidence les bases génétiques de la spécificité d'hôte des pathovars définis chez les bactéries phytopathogènes.** Notre hypothèse est que la spécificité d'hôte d'une souche peut être expliquée par son répertoire de Gènes Associés à l'Interaction avec la Plante (GAIPs). Dans le cadre d'un tel schéma, à un hôte donné possédant un répertoire de « gènes de garde » correspondrait un répertoire de « gènes de colonisation » chez la bactérie. Ce schéma « Répertoire pour Répertoire » s'inscrit dans le cadre d'une généralisation de l'hypothèse « gène pour gène » (Flor, 1956) suggérée par le modèle de Jones et Dangl (2006).

En effet, selon toute vraisemblance, la spécificité d'hôte n'est pas gouvernée par un seul gène. Si tel était le cas, l'émergence de nouvelles maladies serait aussi fréquente que les contournements de résistance monogénique. La spécificité d'hôte reflète une adaptation étroite des bactéries à la plante et est le résultat de plusieurs phases d'interaction : 1) la capacité des bactéries à percevoir et à entrer en contact avec l'hôte, 2) le pouvoir pathogène des souches et leur capacité à se multiplier *in planta*, et 3) la capacité des bactéries à se disperser et se transmettre à une nouvelle plante hôte. Les répertoires de gènes impliqués dans ces trois étapes sont donc de bons candidats pour expliquer la spécificité d'hôte.

La compréhension des phénomènes régissant la spécificité d'hôte est cruciale, et l'identification des bases génétiques devrait avoir d'importantes répercussions en termes de prédiction des émergences de nouvelles maladies. Les résultats de ce projet pourraient aider à la mise en œuvre de politiques visant à limiter la diffusion d'agents pathogènes particulièrement dévastateurs.

A.2. Originalité de notre approche :

Jusqu'à présent, la recherche des déterminants moléculaires de la spécificité d'hôte n'a été abordée que par des approches de génomique comparative exploitant les données obtenues sur quelques souches dont le génome est séquencé. Cependant, la généralisation des résultats de ce type d'étude est difficile, car seules les 12 souches de *Xanthomonas* dont le génome est séquencé ne sauraient représenter pleinement la diversité des souches présentes en champs. Or, on sait que les souches appartenant à un même pathovar peuvent être très diverses au niveau génétique (Alavi et al., in press.), mais on ne sait rien de la diversité des répertoires de gènes associés à l'interaction avec la plante.

Notre approche prévoit d'appliquer une même approche méthodologique simple et robuste (hybridation, PCR et séquençage) à plusieurs collections de souches de *Xanthomonas*. Chaque collection de souches de *Xanthomonas* a été choisie de façon à aborder un aspect complémentaire de la spécificité d'hôte. Dans un premier temps, la caractérisation des

répertoires de GAIPs chez des bactéries présentant des spécificités d'hôte distinctes permettra d'identifier les principales combinaisons de gènes qui expliquent la capacité à coloniser un hôte donné. Ensuite, le séquençage des GAIPs permettra d'identifier l'histoire évolutive des GAIPs et les pressions de sélections imposées par un hôte végétal donné sur chacun des orthologues. Ce type d'information permettra d'établir l'importance d'un GAIP pour l'infection d'un hôte donné.

Un atout majeur de notre approche est le positionnement taxonomique précis des souches. En effet, les GAIPs sont souvent situés sur de régions mobiles du génome, et sont donc susceptibles d'être transmis par transfert horizontal de gènes (Jackson et al., 1999 ; Grant et al., 2006), et la comparaison entre le positionnement taxonomique et l'histoire évolutive des GAIPs permettra de mettre en évidence les événements de transfert horizontal entre les souches. De telles informations sont cruciales dans la perspective de la mise en place de systèmes durables de lutte contre les phyto bactérioses.

A.3. Eléments de contexte et Objectifs technologiques :

Un écueil majeur pour la caractérisation des bactéries émergentes en vue de l'établissement et de la révision des textes réglementaires comme les listes de quarantaine ou de Bioterrorisme, est l'absence d'outils simples d'identification tant au niveau de l'espèce que du pathovar.

Les résultats obtenus sur les répertoires de GAIPs seront exploités pour **développer, en collaboration avec l'entreprise régionale DiagGene**, un kit d'identification probabiliste de souches inconnues de *Xanthomonas* au niveau espèce et pathovar. Cette collaboration permettra un transfert de connaissances de la recherche publique régionale vers une entreprise privée régionale, et cette action s'inscrit pleinement dans la dynamique du pôle de compétitivité Végépolys. Le développement de ce kit comportera deux parties :

- **le développement d'une macropuce par la société DiagGene** permettant à partir d'ADN génomique d'une souche inconnue de *Xanthomonas*, l'identification rapide et facilement reproductible de la présence ou de l'absence d'un répertoire d'orthologues impliqués dans la spécificité d'hôte.
- **le développement d'un logiciel d'identification probabiliste** associé au site de la CFBP, **en libre accès**, permettant à partir des répertoires mis en évidence par la puce, de positionner taxonomiquement la souche inconnue parmi des accessions de référence.

A.4. Intérêt structurant pour le développement du (des) laboratoires(s) concerné(s)

Ce projet s'inscrit dans la perspective de la caractérisation des souches de *Xanthomonas* de la CFBP. Les données issues de notre projet seront intégrées dans les bases de données associées à la CFBP. Ceci répondra à un enjeu majeur des Centres de Ressources Biologiques actuellement, qui est de proposer à la communauté scientifique un matériel biologique très bien caractérisé. **D'un point de vue stratégique, ce projet permettra à notre équipe et à la CFBP de se positionner sur le plan international.** En effet, actuellement, le seul projet visant à caractériser une vaste collection de souches phytopathogènes n'envisage qu'un rapide positionnement taxonomique des souches, ne permettant ni la caractérisation de génotypes émergent, et ni d'expliquer la spécificité d'hôte (projet du *Central Science Laboratory*, York, Royaume Uni).

De plus, la CFBP est l'une des plus importantes collections de bactéries phytopathogènes dans le monde, et l'exploitation d'une collection aussi riche dans le cadre d'études de génétique des populations des bactéries phytopathogènes ouvre des perspectives scientifiques que seule notre équipe peut aborder au niveau international. Enfin, la caractérisation des répertoires de GAIPs nous permettra aussi de nous positionner comme un groupe de référence dans le domaine de l'écologie des bactéries phytopathogènes.

B – Description du projet scientifique: *(6 pages maximum en Times 12, simple interligne)*

- Axes opérationnels,
- Calendrier,
- Membres impliqués et rôle de chacun,
- Actions envisagées de valorisation et diffusion de la culture scientifique et technique (régional, national, européen, international)
-

B.1. Les Axes Opérationnels (AXO).

Notre projet s'articule autour de 4 axes opérationnels, que l'on appliquera à différentes collections de souches de *Xanthomonas*, de manière à répondre à des questions scientifiques différentes :

- **AXO 1** : Caractérisation des compétences pathologiques de souches.
- **AXO 2** : Etude de la diversité de composition des répertoires de gènes associés à l'interaction.
- **AXO 3** : Etude de la diversité allélique des gènes associés à l'interaction avec la plante.
- **AXO 4** : Développement d'un outil d'identification probabiliste de souches inconnues de *Xanthomonas* au niveau pathovar.

B.1.1. Questions posées et lots de souches utilisés :

Nous avons constitué une collection de travail de 340 souches appartenant à plusieurs espèces du genre *Xanthomonas*. Cette collection est constituée de plusieurs lots de souches distincts, et chaque lot de souche constitue un modèle qui nous permettra d'aborder des objectifs scientifiques distincts. **Afin de poser des bases scientifiques solides pour ce projet, la position taxonomique précise de l'ensemble des souches de notre collection de travail est garantie par le projet BIORESSOURCES (AIP INRA, acceptée janvier 2008).**

En accord avec les schémas de génotypage multiloci (MLST) utilisés dans le monde médical, le positionnement taxonomique de nos souches sera obtenu par séquençage de 7 gènes de ménage. Il s'agit des gènes : *atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD*, *tpiA*, qui se répartissent de façon homogène autour du chromosome de *Xanthomonas*. Ces 7 gènes ont déjà été utilisés dans notre équipe pour la caractérisation de l'espèce *X. campestris* par une approche de phylogénie et de génétique des populations (Fargier *et al.*, soumis).

Ainsi, le projet Bioressources nous fournit la structure phylogénétique des pathovars de *Xanthomonas* étudiés dans le cadre du présent projet Région Pays de la Loire. De plus la caractérisation des souches par MLST permet la caractérisation de populations émergentes de *Xanthomonas*, d'identifier lesquelles sont constituées de clones uniques, et si les clones impliqués dans les épidémies dans des régions géographiques distinctes sont différents ou identiques.

Question 1 : Existe-t-il des correspondances entre répertoire de GAIPs et le groupement des souches en pathovars au sein d'une même espèce bactérienne ?

L'espèce *Xanthomonas axonopodis* comprend une trentaine de pathovars ayant des gammes d'hôte bien différentes (Vauterin *et al.*, 2000, Rademaker *et al.*, 2005). 140 souches de l'espèce *Xanthomonas axonopodis*, représentatives de 15 pathovars différents ont été sélectionnées dans notre collection de travail. Ces souches sont d'origines géographiques différentes et ont été isolées à partir d'hôtes différents, de manière à maximiser leur diversité.

Ces souches ont été choisies dans l'objectif d'effectuer la comparaison de répertoires de GAIPs chez des bactéries appartenant à la même espèce, mais possédant des gammes d'hôtes distinctes et des compétences pathologiques variées.

Question 2 : Quelle est la diversité des répertoires de gènes associés à l'interaction au sein d'un pathovar ?

La taxonomie de l'espèce *Xanthomonas campestris* vient d'être récemment remaniée, et les souches se répartissent en 3 pathovars distincts, parmi lesquels 9 races sont distinguées (Fargier et Manceau 2007). Un lot de 40 souches de *Xanthomonas campestris* représentatives des 3 pathovars et des 9 races ont été sélectionnées, **dans l'objectif de savoir si il existe, au**

niveau des répertoires de GAIPs, plus de différences entre souches de 2 pathovars distincts qu'entre souches provenant de 2 races d'un même pathovar.

Question 3 : Les répertoires de GAIPs peuvent-ils expliquer la convergence pathologique entre souches éloignées phylogénétiquement ?

Les bactéries de l'espèce *Xanthomonas oryzae* sont pathogènes sur le riz. Trente souches représentatives de *Xanthomonas oryzae* et des pv *oryzae* et *oryzicola* ont été sélectionnées. Parmi ces souches, certaines proviennent d'Afrique et d'autres d'Asie. Il a été montré récemment que les souches asiatiques et africaines représentent des groupes phylogénétiquement distincts (Gonzales et al., 2007). Ces souches ont été choisies avec l'objectif de mettre en lumière une éventuelle convergence des répertoires de gènes associés à l'interaction avec la plante chez des souches dont le fonds génétique est pourtant éloigné. Un tel résultat traduirait une adaptation pathologique des souches à un hôte donné, le riz, et jetterait ainsi les bases du déterminisme génétique de la spécificité d'hôte des *Xanthomonas* pathogènes du riz.

Question 4 : Les pratiques agricoles ont-elles un impact sur l'évolution des pathogènes bactériens ?

Parmi les souches de *Xanthomonas oryzae* isolées d'Afrique, certaines ont été isolées il y a 30 ans, et d'autres récemment. Durant ces 30 ans, la culture du riz, plante hôte de *Xanthomonas oryzae*, a été développée de manière drastique. **Le choix de ces souches a été réalisé dans l'objectif de mettre en évidence un éventuel impact de 30 ans de culture intensive du riz sur les répertoires de gènes associés à l'interaction.**

Question 5 : L'évolution des répertoires de GAIPs peut-elle expliquer l'émergence de nouvelles maladies ?

Xanthomonas arboricola est une espèce bactérienne qui est divisée en six pathovars. Des souches de ces pathovars sont responsables de maladies émergentes (par ex : *X. a. pv. pruni*, *X. a. pv. juglandis*). **Un lot de 90 souches de l'espèce *Xanthomonas arboricola* ont été choisies dans l'objectif d'étudier les corrélations entre l'évolution du répertoire de gènes associés à l'interaction avec la plante et l'émergence de nouvelles phytobactérioses .**

Question 6 : Quelle est la valeur prédictive des répertoires de GAIPs pour la détermination de la gamme d'hôte d'une souche inconnue de *Xanthomonas* ?

Enfin, nous caractériserons les répertoires de GAIPs de 40 souches de *Xanthomonas* isolées de semences de haricot, mais non-pathogènes sur haricot. Le spectre d'hôte de ces souches est totalement inconnu. **Ces souches ont été choisies dans l'objectif de savoir en quelle mesure la connaissance du répertoire de gènes associés à l'interaction permet de prédire la gamme d'hôte.**

B.1.2. AXO1 : Caractérisation pathologique des souches.

La caractérisation du pouvoir pathogène des souches sera réalisée en portant une attention particulière aux souches du pathovar *phaseoli* de l'espèce *Xanthomonas axonopodis*. Nous avons montré que ce pathovar est constitué de 4 lignées génétiques distinctes (Alavi *et al.*, in press.). Jusqu'à présent, les tests de pouvoir pathogène n'avaient été menés que sur haricot, et aucune différence de pouvoir pathogène n'a pu être mise en évidence entre ces 4 lignées génétiques. Il est cependant probable que, malgré la capacité à induire une même

maladie sur haricot, les souches appartenant aux 4 lignées génétiques de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* présentent des différences de gamme d'hôte. Dans le cadre de ce projet, nous testerons aussi le pouvoir pathogène de souches représentatives des 4 lignées génétiques du pathovar *phaseoli* sur une gamme d'hôtes de *Fabaceae*, l'objectif étant de mettre en évidence d'éventuelles différences dans les gammes d'hôtes de ces 4 lignées. Ces différences de gammes d'hôtes seront analysées en regard des répertoires de gènes associés à l'interaction avec la plante.

La gamme d'hôte comprend :

- *Phaseolus vulgaris* : variétés commerciales Masai et Canadian Wonder, qui possèdent des niveaux de résistance différents aux bactérioses affectant le haricot, telles que *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*.
- *Phaseolus acutifolius*, et *Phaseolus coccineus*, qui sont des espèces utilisées dans les schémas de sélection du haricot commun pour l'introduction de résistances à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.
- *Pisum sativum* : cv. Kelvedon Wonder (sensible à toutes les races de *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) et cv. Fortune (sensible seulement à race 6 de *P.s.* pv. *pisi*).
- *Glycine max* : deux variétés (une chinoise et une américaine) permettant de maximiser la diversité des fonds génétiques de soja testés.
- *Vicia faba* (sous-famille des Viciae),
- *Medicago sativa* (sous-famille des Trifolieae, plante hôte de *X. axonopodis* pv. *alfalfae*),
- *Medicago truncatula* (sous-famille des Trifolieae),
- *Lotus corniculatus* (sous-famille des Loteae).

B.1.3. AXO2 : Caractérisation de la composition des répertoires de Gènes Associés à l'Interaction avec la Plante (GAIPs).

Choix des répertoires de gènes candidats :

Nous proposons donc de caractériser la présence ou l'absence pour chacune des souches de notre collection d'étude d'une centaine d'effecteurs de type III (T3Es), senseurs et adhésines par PCR à l'aide d'amorces spécifiques, puis par hybridation sur membrane. Nous construirons les amorces et les sondes nécessaires à la caractérisation de ces répertoires à partir des 12 séquences génomiques de *Xanthomonas* disponibles dans les bases de données (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html).

En effet, les senseurs confèrent aux souches capacité à détecter les stimuli environnementaux, et l'importance des senseurs dans les interactions entre plantes et microorganismes a été largement documentée, aussi bien dans le cadre d'interactions symbiotiques (Yost *et al.*, 2005 ; Gage, 2004), que dans le cadre d'interactions pathogènes (Hawes et Smith, 1989 ; Yao et Allen, 2006).

L'adhésion sur des tissus végétaux et l'aggrégation en biofilm augmente la résistance des bactéries à divers stress biotiques et abiotiques, mais favorise aussi la coordination des réponses face à un changement d'environnement (Danhorn et Fuqua, 2007). Le répertoire d'adhésines d'une souche peut donc jouer un rôle lors de l'interaction entre la bactérie et son hôte végétal.

La présence de microorganismes dans les tissus végétaux est reconnue par la plante qui induit alors des défenses. La plupart des bactéries phytopathogènes possèdent un système de sécrétion de type III, qui leur permet d'injecter des effecteurs de type III directement à l'intérieur de la cellule végétale. Ces effecteurs de type III (T3Es) permettent de supprimer les défenses de la plante et donc favorisent la multiplication du pathogène dans les tissus végétaux. Dans certains cas, l'action de ces T3Es est reconnue par la plante, induisant alors le

déclenchement d'une réaction hypersensible, empêchant ainsi le développement du pathogène (Jones et Dangl, 2006).

L'implication de ces répertoires de gènes dans les interactions entre la plante et la bactérie en font d'excellents répertoires candidats pour expliquer la spécificité d'hôte.

B.1.4. AXO3 : Etude de la diversité allélique des GAIPs.

Cet axe opérationnel est développé de manière à atteindre deux objectifs distincts :

B.1.4.1. Elaboration d'amorces pour la macropuce DiagGene.

Dans un premier temps, l'alignement des séquences des différents allèles de gènes associés à l'interaction permettra de définir des zones conservées afin de dessiner des sondes à déposer sur la macro puce développée par DiagGene (cf infra).

B.1.4.2. Détermination de l'histoire évolutive des GAIPs.

Au cours de l'AXO2, seules les présences/absences des orthologues de GAIP ont été considérées. Cependant, certains GAIPs peuvent être présents chez plusieurs pathogènes, mais les orthologues retrouvés chez les souches des différents pathovars peuvent présenter des séquences divergentes. Ainsi, la variabilité des répertoires peut aussi résider au niveau allélique.

La caractérisation de la diversité allélique et la reconstitution de l'histoire évolutive des GAIPs permettra de préciser les conclusions amorcées en regard des compositions des répertoires. Nous comparerons les histoires évolutives des bactéries déterminées par MLST (AIP BioRessources INRA, janvier 2008), avec celles des allèles des gènes associés à l'interaction. Ceci permettra de mettre en évidence quels gènes des répertoires testés sont transmis selon un mode vertical ou bien selon un mode horizontal. Nous pourrons aussi tester l'existence d'évènements de recombinaison au sein des GAIPs, et estimer le taux de nouvelles associations de gènes issues de la recombinaison. De telles précisions peuvent être particulièrement importantes pour interpréter la distribution de GAIPs qui semblent être associés à l'émergence d'une nouvelle maladie. L'analyse de séquence par la théorie de la coalescence renseignera sur les pressions des sélections exercées par un hôte particulier sur chaque gène des répertoires considérés. De telles connaissances pourraient permettre d'acquérir des bases pour compréhension de la durabilité des résistances de plantes au champ.

De plus, au niveau fonctionnel, la séquence donnera des informations importantes pour déterminer si chaque orthologue est actif (fonctionnel), ou inactif (non-fonctionnel). En effet, des travaux similaires ont montré que différents allèles d'effecteurs de type III semblent inactivés par l'insertion de séquences mobiles, des délétions, ou bien des substitutions entraînant des modifications du cadre de lecture (Lavie *et al.*, 2004 ; Wichmann *et al.*, 2005 ; Ma *et al.*, 2006).

Au sein de cet axe opérationnel, les GAIP dont l'étude de distribution suggère qu'ils pourraient être impliqués dans la spécificité d'hôte seront séquencés. Les données obtenues seront analysées dans le cadre de la théorie de la coalescence en utilisant des logiciels tels que DNASP (Rozas *et al.*, 2003) et SNAP Workbench (Price et Carbone, 2005).

B.1.5. AXO4 : Développement d'un outil d'identification probabiliste de souches inconnues de *Xanthomonas* au niveau pathovar.

A l'heure actuelle, l'identification de souches de *Xanthomonas* repose sur l'hôte d'isolement, sur l'observation des symptômes sur l'hôte, ainsi que sur des tests de pouvoir pathogène sur une gamme d'hôtes. Ces tests impliquent l'utilisation d'équipements coûteux

tels que des serres et des enceintes de confinement agréées pour la manipulation d'organisme de Quarantaine (cas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas oryzae*). De plus, ce type d'expérimentation nécessite une main d'œuvre abondante et beaucoup de temps d'expérimentation. Pour quelques pathovars, des tests de diagnostic exploitant la technique de PCR ont été développés (par ex : Robène-Soustrade et al., 2006). Cependant, il n'existe aucun outil pour l'identification sans *a priori* d'une souche inconnue de *Xanthomonas* au niveau pathovar. Or, il est fréquent d'isoler des souches de *Xanthomonas* qui n'induisent aucun symptôme sur leur hôte d'isolement, et dont la gamme d'hôtes reste totalement inconnue.

Les résultats préliminaires obtenus dans le cadre d'une étude de faisabilité de ce projet (voir plus bas pour détails) ont montré que la constitution de dendrogrammes à partir de matrices présence/absence des GAIPs, permet de regrouper les souches en fonction de leur pathovar, malgré une origine polyphylétique des souches. **Dans le cadre de ce quatrième axe opérationnel, nous proposons de développer un kit d'identification probabiliste de souches inconnues de *Xanthomonas* au niveau pathovar, fondé sur la composition des répertoires de GAIPs des souches étudiées.**

Un tel kit implique le développement d'une puce permettant de détermination de la composition des répertoires de GAIPs à partir d'un extrait d'ADN génomique de la souche inconnue de *Xanthomonas*. Des sondes spécifiques de 100 GAIPs seront déposées sur des minipuces, afin de déterminer la composition du répertoire de GAIPs de la souche étudiée. **Le développement de cette macropuce sera confié à M. Kerkoud de la société DiagGene.** En effet, ce dernier a déjà développé une Brassipuce, permettant selon un principe similaire, de détecter la présence ou l'absence de pathogènes spécifiques des *Brassicaceae* dans un échantillon végétal.

La matrice de présence/absence des GAIPs, obtenue grâce aux résultats de la macropuce, sera utilisés dans le cadre d'une identification probabiliste des souches étudiées. L'identification probabiliste est le fondement théorique de kits d'identification bactérienne tels que les plaquettes API (BioMérieux). L'innovation conceptuelle, ici, réside dans le fait d'appliquer les procédures mathématiques d'identification probabiliste sur des caractères moléculaires, et non plus sur des résultats biochimiques, ce qui pourrait fournir des résultats plus robustes.

Notre groupe possède déjà une bonne expérience pour l'implémentation des algorithmes de classification ascendante pour la classification des bactéries phytopathogènes, puisque des membres de notre groupe ont déjà développé le logiciel Cabiq (Poliakoff et al., 2005 ; <http://www.info.univ-angers.fr/~gh/Idas/Wcabiq/cabiq.htm>), dans le cadre d'un projet commun INRA/DGAL 493. L'adaptation de calculs déjà développés dans Cabiq, comme les Coefficients possédant une Capacité de Diagnostic (CCD ; Descamps et Véron, 1981) pourront être adaptés. En effet, les CCD sont des indicateurs décrivant la capacité d'un caractère à discriminer un taxon particulier. Ainsi, l'utilisation des CCDs dans le cadre du présent projet pourrait permettre d'identifier les GAIPs majeurs responsables de la structuration en pathovars.

La validation de notre approche sera effectuée en procédant à l'identification de souches inconnues de *Xanthomonas* isolées de haricot, mais non pathogènes sur haricot. Les résultats d'identification probabiliste fourniront une gamme d'hôte candidate, sur laquelle le pouvoir pathogène des souches inconnues sera testé. Dans le cas où le pouvoir pathogène des souches inconnues sur la gamme d'hôte prédite est vérifié, alors notre approche d'identification sera validée.

B.2. Calendrier, Membres impliqués et Rôles de chacun :

Axes Opérationnels	Personnes impliquées	Role	Année 1		Année 2		Année 3	
			6	12	18	24	30	36
1. AXO1 Nature: Détermination des propriétés pathologiques des souches. Responsable: Stéphane Poussier	Darrasse A.	Expérimentation/interprétation						
	Hajri A.	Expérimentation/interprétation						
	Mhedbi N.	Expérimentation/interprétation						
	Brin C.	Soutien technique						
2. AXO2 Nature: Caractérisation de la composition des répertoires de GAIPs Responsable: Tristan Boureau	Jacques M-A.	Interprétation/ management scientifique						
	Durand K. Post-Doc	Soutien technique						
	Hajri A.	Expérimentation						
	Mhedbi N.	Expérimentation/interprétation						
3. AXO3 Nature: Reconstitution de l'histoire évolutive des GAIPs. Responsable: Christophe Lemaire	Boureau T.	Analyse de séquence						
	Brin C.	Soutien technique						
	Post-Doc	Expérimentation / analyse de séquence						
4. AXO4 Nature: Développement d'un outil d'identification probabiliste de souche inconnues de <i>Xanthomonas</i> au niveau pathovar. Responsable: Marion Fischer-Lesaux	Manceau C.	Expertise diversité des souches / management scientifique						
	Hunault G.	Implémentation des algorithmes et programmation logiciel						
	Kerkoud M.	Mise au point de la minipuce						

B.3. Actions envisagées de valorisation et diffusion de la culture scientifique et technique

Tableau prévisionnel de valorisations du projet		Nombre de mois à compter du début du projet
AXO	Intitulé et nature des valorisations	
1.	Publication: Gamme de Fabaceae différentielle pour la discrimination des 4 lignées génétiques de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> .	24
	Publication: (en collaboration avec AXO2 et 4): Valeur prédictive des répertoires de GAIP pour identifier la gamme d'hôtes d'un isolat inconnu de <i>Xanthomonas</i> .	36
2.	Publication: Comparaison des répertoires de GAIP entre souches de pathovars différents de <i>Xanthomonas axonopodis</i>	12
	Publication: Comparaison de la diversité des répertoires de GAIP entre les différentes races et les différents pathovars de <i>Xanthomonas campestris</i> .	18
	Publication: Comparaison des répertoires de GAIP entre les souches africaines et asiatiques de <i>Xanthomonas oryzae</i> .	24
	Publication: L'émergence du Chancre Vertical Suintant du noyer correspond-elle à une évolution du répertoire de GAIP de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> ?	30
		36
3.	Publication: Reconstitution de l'histoire évolutive des cystéine-protéases C55 chez les pathovars de <i>Xanthomonas axonopodis</i> .	18
	Publication: Reconstitution de l'histoire évolutive des MCPs (senseurs) chez les pathovars de <i>Xanthomonas axonopodis</i> .	24
	Publication: Reconstitution de l'histoire évolutive des adhésines chez les pathovars de <i>X. axonopodis</i> .	30
4.	Technologie: Minipuce pour déterminer le répertoire de GAIP d'isolats inconnus de <i>Xanthomonas</i>	36
	Technologie: Interface d'identification probabiliste d'un isolat inconnu de <i>Xanthomonas</i> .	24

C - Qualités du consortium : (2-3 pages maximum en Times 12, simple interligne)

- Adéquation entre les spécialités des chercheurs et le programme de recherche,
- Expériences antérieures,
- Etc.

C.1. Expériences antérieures et adéquation entre les spécialités des chercheurs et le programme de recherche:

Initialement, l'UMR PaVé comportait trois groupes indépendants dont les directions de travail étaient les suivantes: Biodiversité des microorganismes (dirigé par C. Manceau), Taxonomie Bactérienne (dirigé par L. Gardan), Ecologie et épidémiologie des bactéries phytopathogènes (dirigé par M-A. Jacques).

Ces dernières années, le modèle *Xanthomonas*, a gagné en importance au sein de chacun des trois groupes, ce qui a conduit au développement de projets communs tels que :

- l'étude de la bactérie phytopathogène *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*: diversité, épidémiologie et écologie (2 thèses: M. Alavi, soutenue en décembre 2006, A. Darsonval, soutenue en avril 2008),
- Amélioration de la taxonomie du genre *Xanthomonas* (1 thèse: E. Fargier, soutenue en juin 2007).

De jeunes scientifiques, M. Fischer-Lesaux (INRA) et S. Poussier (INH), ont été recrutés au sein de ces groupes en 2004, pour remplacer le départ de chercheurs (L. Gardan, R. Samson and L. Sutra). Ensuite, T. Boureau (Université d'Angers), a été recruté sur un poste ouvert pour renforcer le secteur recherche du Pôle de Compétitivité Végépolys, et a rejoint ces groupes en septembre 2006. Ce moment coïncidait avec le renouvellement de l'UMR PaVé pour 4 ans. Le moment était donc propice pour organiser la fusion des trois groupes en une équipe unique appelée désormais EDTa-BP (Ecologie, Diversité et Taxonomie des Bactéries Phytopathogènes). A présent, cette équipe focalise ses efforts sur un modèle unique, le genre *Xanthomonas*, ainsi que le souhaitent les organismes tutelles des membres de l'équipe.

Le thème de la spécificité d'hôte proposé par les chercheurs et enseignants-chercheurs nouvellement recrutés permet de faire converger les compétences des trois anciens groupes, et le projet de cette nouvelle équipe EDTa-BP a été approuvé lors de l'évaluation de l'Unité par les organismes de tutelle (INRA, DGER, Université d'Angers) en février 2007. En effet, le projet actuel fait appel à la taxonomie bactérienne, à la diversité microbienne et à l'écologie, et exploite la ressource incomparable qu'est la CFBP. Le développement de ce projet requiert de solides compétences en génétique des populations. C'est pourquoi, C. Lemaire, recruté comme Maître de Conférence en 2005 et responsable du Master 1 de Génétique des Populations à l'Université d'Angers, doit prochainement rejoindre l'UMR PaVé.

Enfin, la participation de G. Hunault, Maître de Conférences au Département de Mathématiques de l'Université d'Angers, assure les compétences requises pour le traitement mathématique de l'identification probabiliste, ainsi que la programmation de l'interface d'identification qui sera associée au site web de la CFBP. Sa participation au projet permet de renforcer une collaboration déjà effective depuis quelques années entre les départements de Biologie et de Mathématiques de l'Université d'Angers.

C.2. Complémentarité et synergie des membres de l'équipe.

Ce projet est un projet interdisciplinaire qui met en jeu des compétences dans les domaines de l'Ecologie, la Taxonomie, les Interactions moléculaires entre plantes et bactéries,

la génétique des populations, les biotechnologies de diagnostic, les mathématiques et l'informatique.

Ce projet rassemble de jeunes scientifiques possédant des compétences complémentaires pour accomplir les objectifs des 4 axes opérationnels envisagés :

M. Fischer-Lesaux est une taxonomiste bactérienne et dirige la CFBP.

S. Poussier a développé des compétences en écologie bactérienne, sur la diversité génétique des bactéries phytopathogènes et dans le domaine des interactions moléculaires entre plantes et bactéries.

T. Boureau a développé des compétences dans le domaine des interactions moléculaires entre les bactéries phytopathogènes et les plantes, ainsi qu'en écologie microbienne et en bioinformatique.

C. Lemaire est un généticien des populations, et sa participation au projet garantit une exploitation rigoureuse des données de séquence pour reconstituer l'histoire évolutive des GAIPs.

M-A. Jacques et **A. Darrasse** sont spécialistes de l'écologie des pathogènes bactériens des parties aériennes des plantes.

C. Manceau est spécialiste de la biodiversité microbienne.

G. Hunault est spécialiste en Mathématiques appliquées, Informatique et spécialiste d'identification probabiliste.

Enfin, les scientifiques impliqués dans ce projet sont complémentaires en termes de modèles bactériens qu'ils maîtrisent : S. Poussier, M-A Jacques et A. Darrasse sont spécialistes de *Xanthomonas axonopodis*, M. Fischer-Lesaux et C. Manceau sont spécialistes de *Xanthomonas campestris* et *Xanthomonas arboricola*.

D- Suivi et Gestion du projet : (2-3 pages maximum en Times 12, simple interligne)

- Organisation et description du mode de gestion du projet,
- Appui en personnel dédié,
- Structure, organisme ou établissement assurant le suivi et la gestion financière du projet

D.1. Organisation et mode de gestion du projet :

La partie la plus importante du projet sera réalisée par le partenaire 1, au sein des locaux occupés par l'équipe EDTa-BP, dans les bâtiments de l'UMR PaVé, sur le site INRA de Beaucouzé. La CFBP, dirigée par M. LeSaux, fournit les souches nécessaires à l'étude, et en réalise le positionnement taxonomique précis par une approche MLST sur 7 gènes de ménage.

La mise en place méthodologique et conceptuelle est réalisée dans le cadre de la collection de souches de *Xanthomonas axonopodis*. L'étude des répertoires de GAIPs chez *Xanthomonas axonopodis* est répartie entre deux sujets de thèse confiés à des doctorants déjà présents dans l'équipe. Pour chacune des thèses, un ensemble de GAIPs est caractérisé (Thèse 1 : effecteurs de type III ; thèse 2 : senseurs et adhésines), puis analysé en regard de la spécificité d'hôte. L'analyse des séquences des GAIPs et la reconstitution de leur histoire évolutive seront entreprises par les doctorants pour quelques GAIPs intéressants, et de manière systématique par un post-doc recruté sur les fonds du projet.

Le reste de la collection de souches de *Xanthomonas* sera analysés de manière identique par les permanents du partenaire 1, après mise au point en routine de la méthodologie employée pour *Xanthomonas axonopodis*.

La mise au point de la puce par la société DiagGene nécessitera une collaboration entre M. Kerkoud et le post-doc recruté, de manière à définir les sondes à déposer sur la puce. La mise au point méthodologique de la puce et sa mise en routine incombent à la société DiagGene. Le matériel nécessaire à la mise au point de la puce sera financé par les provisions de fonctionnement spécifiquement demandées pour le partenaire DiagGene.

Les résultats obtenus sur la collection entière de souches de *Xanthomonas* serviront de banque de référence pour la mise en place de la procédure d'identification probabiliste des souches. Le partenaire 2 sera en charge du développement de l'algorithme d'identification, ainsi que de la mise en place de l'interface web d'identification associée au site de la CFBP. La gestion de la base de données associée à la CFBP, ainsi que la mise en place de l'interface web se fera en collaboration entre les partenaires 1 et 2, sous la direction de M. LeSaux, conservatrice de la CFBP. Les résultats sur les répertoires de GAIPs obtenus sur la collection entière de souches de *Xanthomonas* sont la propriété de l'UMR PaVé, ainsi que le logiciel d'identification probabiliste.

D.1.1. Financement de personnels non-permanents :

Une partie importante des ressources financières demandées dans le cadre de ce projet vise à recruter un post-doc pour 24 mois. Ce post-doc sera recruté sur un profil de génétique des populations pour effectuer un travail de reconstitution de l'histoire évolutive des GAIPs (AXO3), et sera encadré par C. Lemaire et T. Boureau.

D.1.2. Financement d'équipement mi-lourds :

Dans le cadre de ce projet, les expérimentations envisagées nécessitent l'acquisition par notre laboratoire d'une centrifugeuse, d'un four à hybridation et d'un thermocycleur. Le montant estimé pour l'acquisition de ces matériels est de 24000 euros.

D.1.3. Frais de Prestations de service:

La reconstitution de l'histoire évolutive des GAIPs nécessite la réalisation d'un très grand nombre de réactions de séquence. Nous utiliserons des prestataires de service pour la réalisation de ces réactions de séquence. En effet, les séquences seront envoyées sur la plateforme de séquençage haut débit Ouest-Génopole de Roscoff ou sur la plateforme Ouest-Génopole de Nantes. Nous prévoyons 35000 euros de budget pour les réactions de séquence.

D.1.4. Frais de fonctionnement :

a- Partenaire public : UMR PaVé

Le fonctionnement provisionné ici correspond aux frais découlant de l'activité de biologie moléculaire de notre équipe pour les trois ans du projet. Ces frais sont estimés à 40000 euros.

b- Partenaire privé : DiagGene

Le fonctionnement provisionné ici correspond aux frais découlant de la mise au point de la minipuce qui constituera la base du kit d'identification probabiliste des souches inconnues de *Xanthomonas*. Cette minipuce permettra d'établir rapidement le répertoire complet de GAIPs d'une souche inconnue de *Xanthomonas*, à partir d'ADN génomique de la souche. Ces frais sont estimés à 30000 euros pour la durée du projet.

D.2. Structure, organisme ou établissement assurant le suivi et la gestion financière du projet

L'INRA assurera le suivi et la gestion financière du projet.

D.3. Appui en personnel dédié :

L'équipe EDTa-BP constitue ainsi une des 4 équipes de l'UMR77 Pavé à Angers. Notre nouvelle équipe bénéficie de 2 étudiants en thèse, dont le projet de thèse s'inscrit totalement dans le cadre de ce projet:

- A. Hajri (janvier 2007-janvier 2010, thèse co-encadrée par S. Poussier et T. Boureau),
- N. Mhedbi (septembre 2007-septembre 2010, thèse encadrée par M-A. Jacques).

De plus, 2 techniciennes sont aussi pleinement impliquées dans ce projet : C. Brin et K. Durand. Ainsi, l'UMR77 Pavé a mis en place un appui conséquent en personnel dédié pour l'aboutissement de ce projet.

E - Résultats et potentiel de développement : *(2 pages maximum en Times 12, simple interligne)*

- Etats actuels des résultats
- Résultats scientifiques attendus et impact en terme de visibilité nationale voire européenne,
- Potentiel de développement dans le domaine d'étude
- Impact(s) potentiel(s) sur les dispositifs de formation en enseignement supérieur

E.1. Etat actuel des résultats :

Afin de vérifier la faisabilité de ce projet, nous avons réalisé une étude préliminaire. Nous avons déterminé la répartition des gènes codant 30 effecteurs de type III (T3Es) dans une collection de 96 souches de *Xanthomonas axonopodis* représentatives de la diversité de 15 pathovars. **Nos résultats montrent que les répertoires de T3Es sont différents entre des souches appartenant à des pathovars différents. Il semble donc exister une corrélation entre répertoires de GAIPs et la structuration en pathovars.**

Au sein d'un même pathovar, les répertoires de T3Es sont très conservés. Une certaine variabilité des répertoires de T3Es peut cependant être observée au sein d'un même pathovar. L'observation de la répartition des gènes étudiés suggère que cette variabilité des répertoires de gènes associés à l'interaction est corrélée à la diversité génétique du pathovar. Par exemple, les 4 lignées génétiques définies chez *Xanthomonas axonopodis* pathovar *phaseoli* (Alavi et al., in press.) possèdent des répertoires très semblables, mais cependant différenciables.

Pour vérifier ces hypothèses, nous avons construit un dendrogramme à partir des matrices de présence/absence de T3Es chez les souches testées. Dans la plupart des cas, ce dendrogramme permet de regrouper les souches en fonction de leurs pathovars (figure 1b). Ce résultat est particulièrement intéressant si l'on revient sur le cas des souches du pathovar *phaseoli*. En effet, d'après les résultats d'une analyse phylogénétique par AFLP, la lignée génétique NF1 est très éloignée phylogénétiquement des autres lignées du pathovar *phaseoli* (figure 1a). Les résultats obtenus à partir de l'analyse des répertoires de GAIPs, la lignée NF1 est regroupée avec les autres lignées génétiques du pathovar *phaseoli*. Ainsi, nos résultats préliminaires suggèrent que les répertoires de GAIPs peuvent expliquer une convergence pathologique des souches sur haricot. Cependant, certains pathovars de *Xanthomonas axonopodis* restent difficilement différenciables sur la base des répertoires testés jusqu'à présent. C'est le cas par exemple des pathovars *begoniae*, *vasculorum* et *dieffenbachiae*, ou bien des pathovars *alfalfae* et *citrumelonis* (figure 1b).

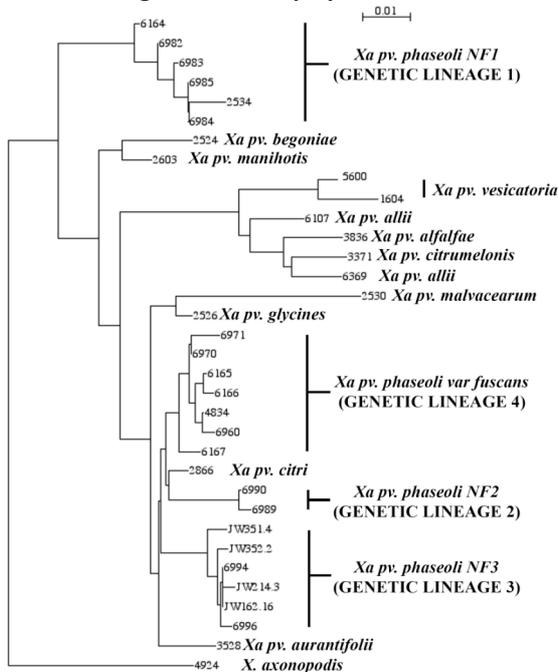


Figure 1a.: Phylogeny of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and related xanthomonads. The dendrogram is constructed based on AFLP fingerprints using Neighbor Joining method (from Alavi et al., in press).

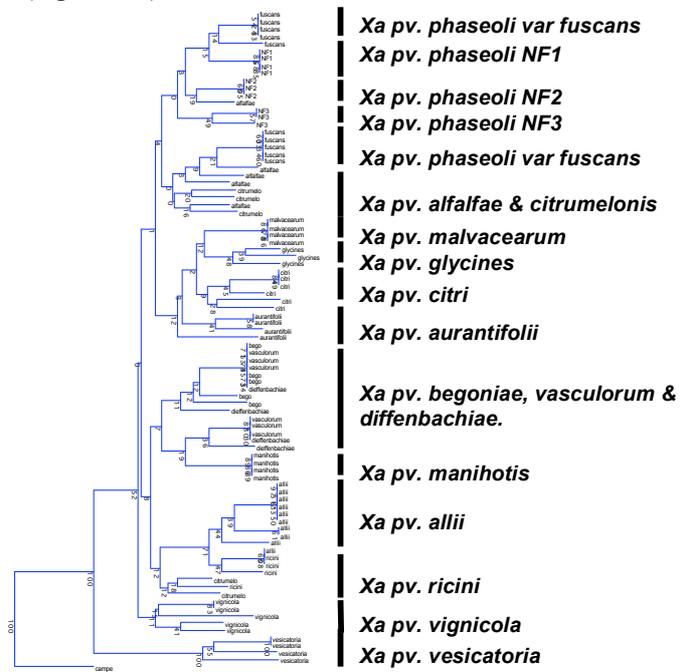


Figure 1b: Dendrogram of strains belonging to diverse pathovars of *Xanthomonas axonopodis*, based on composition of T3Es repertoires (presence /absence). The dendrogram was constructed using Chord distances and Neighbor joining method (preliminary unpublished results).

Nous avons donc besoin d'augmenter le nombre de gènes inclus dans les répertoires de GAIPs afin d'obtenir une meilleure discrimination des pathovars et de consolider les résultats de cette étude préliminaire avec de meilleures valeurs de bootstrap. Dans le cadre de cette étude préliminaire, nous n'avons regardé qu'un répertoire de 30 T3Es, et nous devons encore inclure les répertoires de senseurs et d'adhésines afin de mieux rendre compte de toutes les étapes des interactions entre la plante et les microorganismes susceptibles d'influer sur la spécificité d'hôte. C'est pourquoi nous proposons dans le cadre de ce projet de porter à 100 le nombre de GAIPs inclus dans les répertoires étudiés.

L'étude préliminaire n'a été réalisée que sur une collection de souches de *Xanthomonas axonopodis* et nous projetons d'élargir notre étude à d'autres collections de souches appartenant aux espèces *Xanthomonas arboricola* et *Xanthomonas oryzae*, ainsi qu'à une collection d'isolats inconnus de *Xanthomonas*.

E.2. Résultats attendus

Ce projet nous permettra de mieux comprendre les bases génétiques de la spécificité d'hôte. De plus, la caractérisation des répertoires de GAIPs alimentera les bases de données associées à la CFBP. L'accès à ces bases de données sera ouvert à la communauté scientifique internationale, et renforcera l'attractivité des souches inscrites au catalogue de la CFBP.

Ce projet aboutira à la mise en place d'un kit d'identification probabiliste de souches de *Xanthomonas* au niveau pathovar. Dans le cas où l'outil développé atteint un niveau de fiabilité suffisant, un éventuel développement commercial de ce kit par la société DiagGene pourrait avoir un impact non négligeable sur les procédures de diagnostic des agents pathogènes de quarantaine du genre *Xanthomonas*.

E.3. Potentiel de Développement dans le domaine d'études

Au niveau national, un tel projet renforcera le réseau français G3X d'étude sur les *Xanthomonas*, qui regroupe des scientifiques de Montpellier (CIRAD et IRD), Toulouse (INRA, CNRS et Université de Toulouse III) et Angers (INRA, INH, Université d'Angers). Le réseau G3X a récemment obtenu le séquençage par le Génoscope (Appels à Projets 2005 et 2006) de plusieurs souches de *Xanthomonas* (*Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* et une souche africaine de *Xanthomonas oryzae*), et les membres de l'équipe EDTa-BP participent à l'annotation des génomes. De plus, ces résultats permettront d'estimer la représentativité du génome d'une souche modèle séquencée, et permettra ainsi la mise en place de bases solides pour de futures études de génomique comparative par le réseau G3X, au sein desquelles le pôle angevin pourra assumer une place prépondérante.

E.4. Impact Potentiel sur les dispositifs de formation d'enseignement supérieur.

Grâce aux publications prévues dans le cadre de ce projet, les jeunes scientifiques récemment recrutés pourront envisager d'obtenir leur Habilitation à Diriger les Recherches à court ou moyen terme. Ceci permettra de renforcer la capacité d'accueil de notre équipe pour les doctorants, et de consolider la visibilité et l'activité de recherche de l'UMR PaVé au sein de l'IFR Quasav (Qualité et Santé du Végétal) nouvellement labellisé.

Le type d'approche proposé dans le cadre de ce projet est conceptuellement novateur, et pourrait aboutir à la mise en place de modules d'enseignement traitant de l'évolution des bactéries phytopathogènes au sein des master co-habilités par l'Université d'Angers.

**Montant de la bourse Post-doctorant : 45 600 euros pour 12 mois.

Sont considérées comme éligibles à un financement de la Région des Pays de la Loire, les coûts additionnels induits par le projet, soit :

En fonctionnement :

- les salaires et charges sociales uniquement des personnels contractuels non titulaires (CDD, post-doctorants, doctorants, stagiaires),
- les frais d'études, d'analyses, de prestations de services réalisées par des entités extérieures à l'organisme, donnant lieu à facturation,
- les frais de mission, de déplacements,
- les petits matériels de laboratoire.

En équipement :

- acquisition des équipements nécessaires à la réalisation du projet

A ce stade, il n'est pas demandé au porteur du projet de détailler la demande de financement par partenaires. Toutefois, il est souhaitable de réaliser ce travail préparatoire dès l'élaboration de ce dossier :

- afin de présenter une demande de financement au plus près des besoins,
- afin de pouvoir présenter, dès la sélection du projet et pour la formalisation de la convention correspondante, le détail précis des dépenses par partenaire et par année

G – Précisions à apporter sur les emplois scientifiques susceptibles d'être financés dans le cadre de ce projet

Nombre de nouveaux doctorants envisagés pour la réalisation de ce projet, sujets prévus et laboratoire de rattachement

Partenaire concerné	Nombre d'allocations doctorales	Sujets envisagés
TOTAL		

Nombre de nouveaux post-doctorants envisagés pour la réalisation de ce projet, sujets prévus et laboratoire de rattachement

Partenaire concerné	Nombre d'allocations post-doctorales	Sujets envisagés
Partenaire 1 (+collaboration ponctuelle partenaire 3)	1 (24 mois)	Reconstitution de l'histoire évolutive des GAIPs chez les bactéries du genre <i>Xanthomonas</i> en regard de leur implication potentielle dans le déterminisme génétique de la spécificité d'hôte. Détermination des répertoires de GAIPs chez <i>Xanthomonas arboricola</i> et <i>Xanthomonas oryzae</i> . Collaboration mise au point de la Macropuce DiagGene.
TOTAL	1 (24 mois)	

Nombre de nouveaux CDD envisagés pour la réalisation de ce projet, sujets prévus et laboratoire de rattachement

Partenaire concerné	Type de CDD (ingénieurs, techniciens, stagiaires,)	Nombre d'emplois envisagés
TOTAL		

H. Bibliographie :

- Alavi, S.M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C. and Poussier, S. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press.
- Danhorn, T. and Fuqua, C. 2007. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:401-422.
- Descamps, P. and Véron, M. 1981. *Ann. Microbiol.* 132:157-170.
- Fargier, E. and Manceau, C. 2007. *Plant Pathol.* 56:805-818.
- Flor, H.H. 1956. *Science* 124:888-889.
- Gage, D.J. 2004. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:280-300.
- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M. and Dangl, J. L. 2006. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:425-449.
- Gonzalez, C., Szurek, B., Manceau, C., Mathieu, T., Sere, Y., and Verdier, V. 2007. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:534-546.
- Hawes, M. C. and Smith, L.Y. 1989. *J. Bacteriol.* 171:5668-5671.
- Jackson, R.W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Sesma, A., Arnold D.L., Gibbon, M.J., Murillo, J., Taylor, J.D. and Vivian, A. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:10875-10880.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. 2006. *Nature.* 444:323-329.
- Lavie, M., Seunes, B., Prior P. and Boucher, C. 2004 *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:931-940.
- Ma, W.B., Dong, F.F.T., Stavrinides, J. and Guttman, D.S. 2006. *Plos Genetics* 2 : 2131-2142.
- Price, E.W., and Carbone, I. 2005. *Bioinformatics* 21:402-404.
- Rademaker, J. L. W, Louws, F. J., Schultz, M. H, Rossbach, U., Vauterin, L., Swings J. and de Bruijn F.J. 2005. *Phytopathology* 95:1098-1111.
- Robène-Soustrade, I., Laurent, P., Gagnevin, L., Jouen, E. and Pruvost, O. 2006. *Appl Environ Microbiol.* 72:1072-1078.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. and Rozas, R. 2003. *Bioinformatics.* 19:2496-2497.
- Vauterin, L., Rademaker, J. and Swings, J. 2000. *Phytopathology* 90:677-682.
- Wichmann, G., Ritchie, D., Kousik, C.S. and Bergelson, J. 2005 *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2418-2432.
- Yao, J. and Allen, C. 2006. *J. Bacteriol.* 188:3697-3708.
- Yost, C.K., Clark, K.T., Del Bel, K.L. and Hynes, M.F. 2003. *BMC Microbiol.* 3:1.

Annexe 4 : Grille d'évaluation scientifique des projets

Titre du projet :

Acronyme :

Le projet présenté s'inscrit dans le cadre
- du volet « paris scientifiques régionaux »

Porteur du projet (structure) : INRA

Nom du coordinateur scientifique : Tristan Boureau

Les éléments suivants constituent la base de l'évaluation des projets par les experts. La note totale est calculée sur 20. Chacune des 4 rubriques est notée sur 5 et évaluée de 0 à 5, selon la gradation suivante :

- 0 informations manquantes, incomplètes, ou inadéquates
- 1 faible ;
- 2 moyen ;
- 3 bon ;
- 4 très bon ou excellent;
- 5 exceptionnel.

Les évaluations < 5 ou > 15 devront être particulièrement argumentées.

L'évaluation du projet porte sur 18 critères classés en 4 catégories

1- Pertinence et excellence scientifique du projet.

Score :

- Qualité et clarté de l'exposé sur les objectifs,
- Originalité et ambition des objectifs
- Qualité du programme des activités de recherche proposées
- Cohérence du projet (adéquation entre les objectifs et le programme d'activités)
- Faisabilité du projet (adéquation entre les compétences des partenaires avec les exigences des travaux de recherche, affectation suffisante et pertinence des moyens mobilisés..)

Commentaires :

