

Année de l'AAP : 2007

Projet N° 07012 Achevé

Titre du projet : Étude de la pathogénie de <i>Xanthomonas albilineans</i> , un modèle original en pathologie végétale

Unité responsable du projet : BGPI (Biologie et Génétique des Interactions plantes-pathogènes) (CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro)

Porteur de projet : Monique Royer (monique.royer(a)cirad.fr)

Pays associés au projet : USA

Sous-axes thématiques : BIP-2: Maladies et ravageurs des plantes, protection intégrée des cultures, écologie des populations

Objectifs :

Le xylème des plantes est envahi par de nombreuses bactéries phytopathogènes. Néanmoins, il n'existe à ce jour pas ou très peu de données sur les mécanismes qui permettent à ces pathogènes de coloniser le xylème de leur hôte. La bactérie *Xanthomonas albilineans* est un pathogène systémique du xylème qui provoque la maladie de l'échaudure des feuilles de canne à sucre. Les symptômes de cette maladie varient d'une simple ligne blanche à la mort de la plante, en passant par des blanchiments et des nécroses du feuillage.

X. albilineans sévit dans plus de 60 pays tropicaux et subtropicaux producteurs de canne à sucre. Cette bactérie produit une toxine particulière et spécifique, l'albicidine, qui provoque les symptômes foliaires de la maladie. L'albicidine est un puissant inhibiteur de l'ADN gyrase, qui agit en bloquant la différenciation des chloroplastes par inhibition de la réplication de l'ADN chloroplastique. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine ont été clonés et séquencés à l'UMR BGPI en collaboration avec le Professeur Dean W. Gabriel de l'Université de Floride. Bien que les gènes de biosynthèse de l'albicidine soient essentiels dans la pathogénie de *X. albilineans*, d'autres gènes, encore inconnus, jouent également un rôle important dans les interactions hôte-pathogène.

Pour faciliter l'identification de ces gènes pathogènes inconnus, le séquençage du génome complet de *X. albilineans* a récemment été réalisé au Génoscope (Evry, France). L'analyse de ce génome a confirmé que *X. albilineans* constituait un modèle original en pathologie végétale. La taille de ce génome (3,7 Mb) est inférieure à celle d'autres espèces de *Xanthomonas* (environ 5 Mb). Ce génome ne possède pas le système de sécrétion de type III nécessaire aux bactéries phytopathogènes pour l'injection d'effecteurs protéiques de pathogénie dans les cellules de la plante hôte. De plus, il présente 754 ORF qui n'ont été trouvées dans aucune autre espèce de *Xanthomonas*. L'objectif de l'UMR BGPI est d'identifier les gènes pathogènes de *X. albilineans*, afin d'envisager l'élaboration de nouvelles méthodes de lutte contre les maladies des plantes.

Le présent projet va permettre:

- de renforcer une collaboration existante entre le Cirad et l'Université de Floride, en finançant un séjour de trois mois d'un étudiant du Cirad dans cette université. Il y apprendra différents techniques moléculaires récemment développées dans le laboratoire américain.
- d'amorcer une collaboration avec le groupe du Dr Caitilyn Allen de l'université du Wisconsin (Madison, USA). Dr Monique Royer (Cirad) and Dr Philippe Rott (Université de Floride) y effectueront un séjour d'une semaine.

Actions menées et résultats obtenus :

Action 1 : Isabelle Pieretti a effectué un stage de 3 mois à l'université de Floride du 1er février au 30 avril 2008 sous la direction du professeur Dean Gabriel. Ses travaux ont permis d'identifier des gènes spécifiques d'une souche de *X. albilineans* très pathogène en utilisant la technique d'hybridation soustractive et suppressive. Ce séjour aux USA a également permis à I. Pieretti d'améliorer sa pratique de l'anglais, aussi bien à l'oral qu'à l'écrit.

Résultat de l'action 1 : L'Hybridation Soustractive et Suppressive ou SSH (« Suppression Subtractive Hybridization ») est une méthode de criblage différentiel couplée à la PCR qui a été adaptée pour comparer des génomes bactériens. Elle permet de révéler des différences majeures de séquences entre deux souches bactériennes relativement proches. Notre expérimentation a porté sur deux souches de *X. albilineans* (XAFL07-1 et Xa23R1) appartenant à des groupes génétiques et des groupes de pathogénie différents, et elles sont toutes les deux originaires de Floride. Nous avons cherché à mettre en évidence des gènes susceptibles d'être fortement impliqués dans la colonisation épiphyte et vasculaire de la canne à sucre par la souche très pathogène XAFL07-1, la souche « Tester » dans notre analyse. Cette souche appartient au même groupe génétique que la souche GPE PC73 dont on possède aujourd'hui la séquence du génome complet. La souche Xa23R1 qui est beaucoup moins pathogène, et qui n'est pas impliquée dans la colonisation épiphyte de la canne à sucre, nous a servi quant à elle de souche « Driver », c'est-à-dire d'échantillon témoin auquel a été comparé la souche « Tester ». En utilisant le kit PCR-select Bacterial Genome Subtraction Kit (Clontech), nous avons généré une banque soustractive enrichie de 576 clones comprenant après vérification par hybridation Southern blot, 188 séquences considérées comme spécifiques de la souche XaFL07-1. Les 188 clones ont été séquencés puis analysés en comparant leurs séquences avec celles du génome complet de la souche GPE PC73. De toutes ces analyses comparatives, 83 séquences ont été écartées car elles étaient absentes chez GPE PC73 ou parce qu'il s'agissait de séquences de plasmides, de phages ou de transposases. Les 105 séquences restantes ont été retenues pour être validées par PCR et par Dot blot. Il s'agit, entre autres, de séquences codant une hémagglutinine/hémolysine, un récepteur TonB-dépendant, une ADN méthyltransferase, un récepteur membranaire de grande taille, des perméases ou des transporteurs. Ces travaux font l'objet d'une publication en cours de rédaction. Une partie de ces travaux a été réalisée à l'UMR BGPI (Montpellier) par I. Pieretti à son retour de l'université de Floride.

Action 2 : Monique Royer et Philippe Rott ont effectué une mission à l'université du Wisconsin-Madison du 15 au 18 avril 2008 dans le laboratoire du professeur Caitilyn Allen. Monique Royer a profité de ce séjour aux USA pour visiter également le laboratoire de Dean Gabriel à l'université de Floride.

Résultat de l'action 2 : M. Royer et P. Rott ont fait le point avec le professeur C. Allen des recherches en cours sur *X. albilineans* à l'UMR BGPI à Montpellier (M. Royer) et à l'Université de Floride (P. Rott), afin d'établir une nouvelle collaboration. Il a été convenu de la visite à Montpellier de janvier à juin 2009 du professeur C. Allen dans le cadre d'une demi-année sabbatique. Au cours de cette période, le professeur C. Allen donnera des cours à Montpellier SupAgro et effectuera des travaux de recherche sur *X. albilineans* à l'UMR BGPI. Le professeur Allen essaiera notamment d'identifier les gènes induits chez *X. albilineans* lors de la colonisation de la canne à sucre par cet agent pathogène, en utilisant des puces à ADN. Ce projet a été soumis et sélectionné dans le cadre de l'AAP 2008 du RTRA. M. Royer et P. Rott ont présenté au département de phytopathologie de l'Université du Wisconsin un séminaire intitulé : "Genomics and functional genomics of *Xanthomonas albilineans*, an unusual *xanthomonas* that causes leaf scald disease of sugarcane". Ils ont également rencontré des chercheurs des départements de pathologie et de microbiologie de l'Université du Wisconsin-Madison spécialisés dans la biosynthèse d'antibiotiques et la recherche de nouvelles molécules produites par divers microorganismes.

Perspectives :

Les travaux réalisés par Isabelle Pieretti ont permis d'identifier plusieurs gènes candidats potentiellement impliqués dans la pathogénie de *X. albilineans*. Le professeur Caitilyn Allen sera accueillie à l'UMR BGPI de janvier à juin 2009 dans le cadre d'un nouveau projet RTRA (N° 0802-012). Ces travaux permettront d'identifier d'autres gènes candidats. Tous les gènes candidats feront l'objet d'études plus approfondies, notamment par analyse fonctionnelle de la souche GPE PC73. Ces études seront réalisées dans le cadre de collaborations avec l'université de Floride et l'université du Wisconsin-Madison.

Financement total par Agropolis Fondation : 12 749 € (frais de déplacement)

Catégorie(s) de soutien : soutiens divers (soutien pour le financement de déplacements de doctorants et de post-doctorants à l'étranger)

Durée du projet: 2 janvier 2008 – 30 juin 2008

Mots clés: *Xanthomonas albilineans* – pathogénie – plante –xylème - toxine – canne à sucre – échaudure des feuilles