

A scanning electron micrograph (SEM) showing several bacteriophages. The phages have a distinct head-tail structure. They are positioned near a textured, brownish surface, likely a plant cell wall. The background is a dark blue field with some faint, out-of-focus structures.

Caractérisation d'un nouveau bactériophage dirigé contre *Erwinia amylovora* dans une perspective de biocontrôle

Encadrant: Clara Torres-Barcelo

Romain Delattre Master IMHE

Merci à la vie...

SOMMAIRE

I – Introduction p1-5

1.1 Le feu bactérien p1

1.1.1 Description de la maladie p1

1.1.2 *Erwinia amylovora*, agent causal du feu bactérien p2

1.1.3 Un outil de taxonomie récent pour évaluer la diversité des souches d'*Erwinia amylovora* :les systèmes CRISPR p2

1.2 Les bactériophages p2

1.2.1 Découverte et histoire des bactériophages p2

1.2.2 Biologie et cycle de vie des bactériophages p3

1.2.3 Rôles écosystémiques des bactériophages p3

1.2.4 Domaines d'applications des bactériophages p4

1.2.4.1 La santé humaine et animale p4

1.2.4.2 Le traitement des eaux usées p4

1.2.4.3 L'industrie agro-alimentaire p4

1.2.4.4 L'agriculture p5

1.3 Les bactériophages dirigés contre *Erwinia amylovora* p5

II – Matériel et Méthodes p6-9

III – Résultats p9-12

IV – Discussion et perspectives p12-15

V – Références bibliographique p15-17

Annexes p17

Abréviations :

PACA : Provence Alpes Côte d'Azur

Mbase : Megabase

Kbase : Kilobase

SST3 : Système de sécrétion de type 3

EPS : Exopolysaccharides

CRISPR :Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (« Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées »)

AMR: Résistance antimicrobienne

CFPBP : Collection française de bactéries phytopathogènes

kV : Kilovolte

DO: Densité optique

MET : Microscopie électronique à transmission

I – Introduction

Aujourd'hui, l'agriculture doit faire face à des menaces de plusieurs types comme les microorganismes phytopathogènes (virus, viroïdes, bactéries, champignons) mais aussi le changement climatique ou les insectes ravageurs de cultures. Une des maladies bactériennes des plus problématique à l'heure actuelle est le feu bactérien causé par *Erwinia amylovora*, qui attaque pommiers et poiriers (Mansfield *et al.*, 2012). Dans un contexte économique, la pomme est l'un des fruits les plus consommés au monde. En 2007, la production mondiale de pommes a atteint 64 millions de tonnes. Le premier producteur mondial est actuellement la Chine et la France occupe la 7^{ème} place (<http://faostat.fao.org/>). Selon l'Union Européenne, *E. amylovora* est considérée comme un organisme de quarantaine, pour lequel la lutte est obligatoire en pépinière (Directive Européenne 2000/29/CE) et en verger (Arrêté du 31 Juillet 2000). Il n'existe actuellement pas de traitements chimiques, efficaces et durables. En effet, la résistance d'*E. amylovora* à la streptomycine, antibiotique utilisé de façon polémique dans certains pays pour lutter contre le feu bactérien, est devenue courante depuis les années 90 (Joyce E. Loper, 1991). Dans des conditions climatiques optimales, le feu bactérien peut détruire la totalité d'un verger en une saison, ce qui est économiquement difficile pour l'industrie et engendrer des pertes financières pour les producteurs (Gianessi *et al.*, 2002). En région PACA, l'impact économique n'est pas encore évalué, mais la maladie est bien présente. Par conséquent, le développement d'une stratégie innovante de contrôle efficace du feu bactérien, économiquement abordable et respectueuse de l'environnement, est un défi prioritaire pour la production de fruits dans la région PACA, mais aussi en France. Les bactériophages, en tant qu'ennemis naturels des bactéries déjà présents dans l'environnement, sont des candidats très adaptés pour une lutte intégrée.

1.1 Le feu bactérien

1.1.1 Description de la maladie

Décrit pour la première fois par Paulin en 1996, cette maladie originaire des USA qui s'est dispersée à travers le monde en 218 ans (Born et Van der Zwet, 2000), affecte les *Maloidae*, une sous-famille des *Rosaceae* comprenant les arbres fruitiers à pépins (pommiers, poiriers, cognassiers) et certains arbustes d'ornement (aubépines, pyracanthas, cotoneasters) (Van der Zwet et Keil, 1979). Au printemps, durant la période de floraison, la bactérie se dissémine à partir de lésions via des facteurs abiotiques (vent et averses), les activités humaines (greffe, arrosage) et les insectes pollinisateurs. Par la suite, elle pénètre à l'intérieur de la plante par les stomates ou par les blessures et se multiplie préférentiellement dans les tissus jeunes en pleine croissance. La bactérie peut donc envahir l'ensemble de la plante en se multipliant dans les espaces intercellulaires du parenchyme et en atteignant les vaisseaux du xylème où elle se déplace contre le flux ascendant de sève (Bogs *et al.*, 1998). Cette période d'incubation peut se traduire par l'apparition d'exsudats (mélange de polysaccharides et de cellules bactériennes), de nécroses et de dessèchements (Figure 1). Ces exsudats vont faciliter la dissémination rapide de la maladie. En automne, il se formera par la suite des chancres sur les branches, entraînant le dépérissement partiel ou total des arbres atteints. La bactérie entrera ensuite dans un état végétatif durant l'hiver, préparant une nouvelle dissémination au printemps suivant (Figure 2).

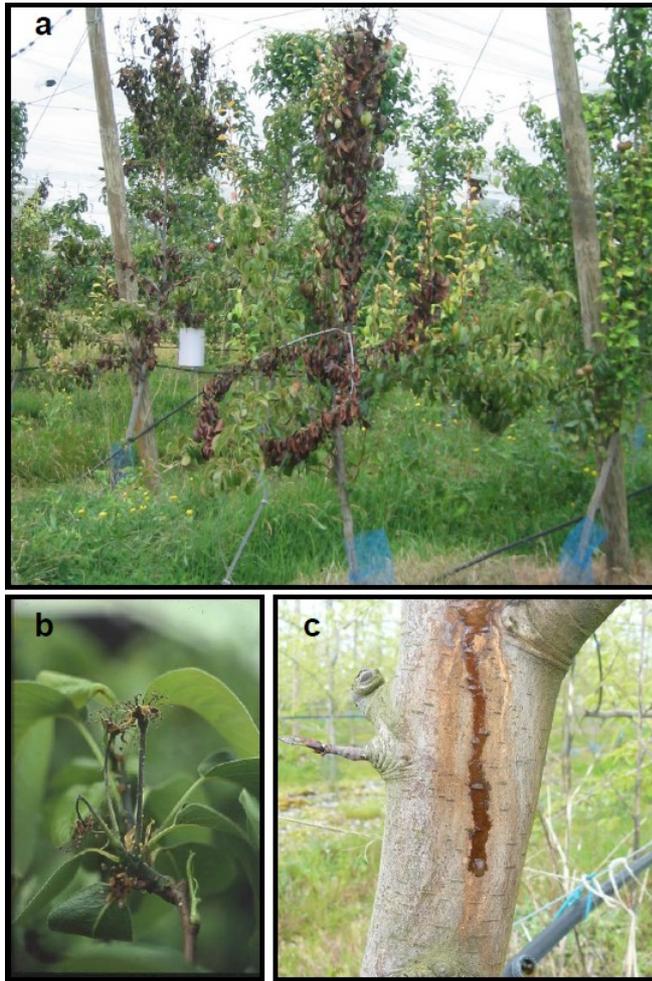


Figure 1 : Symptômes du feu bactérien sur poirier, (a) nécroses sur pousses, (b) nécroses et exsudat sur fleurs et (c) exsudat sur tronc, d'après Cesbron, 2009.

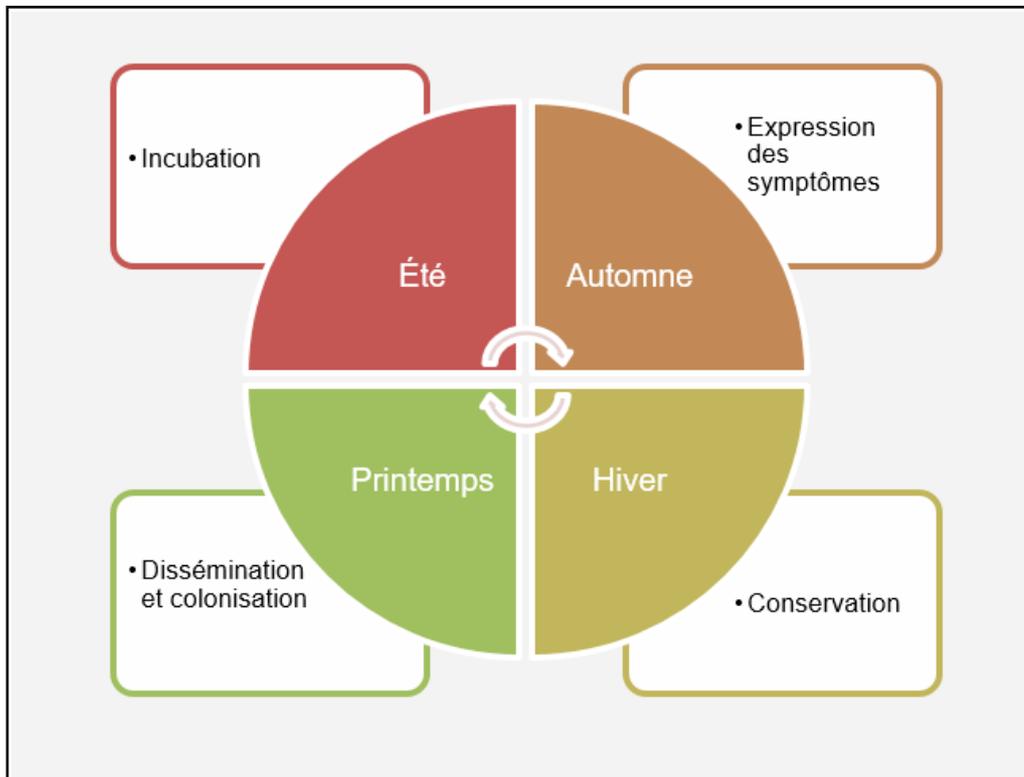


Figure 2 : Cycle du feu bactérien chez les *Maloideae*.

1.1.2 *Erwinia amylovora*, agent causal du feu bactérien

Erwinia amylovora est une bactérie à Gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. Elle est l'agente causale du feu bactérien. C'est une bactérie saprophyte, aéro-anaérobie facultative et mobile grâce à des flagelles péritriches. Elle possède un chromosome circulaire mesurant 3,8 Mbase ainsi qu'un plasmide de 28 Kbase (Smits *et al.*, 2010). Cette bactérie phytopathogène possède de nombreux déterminants de la virulence. Les plus importants sont (i) les systèmes de sécrétion de type III (SST3), (ii) les exopolysaccharides (EPS), (iii) la formation de biofilm et (iv) la motilité. De plus, pour établir une infection efficace, *E. amylovora* utilise aussi des voies de régulation pour détecter les signaux environnementaux et coordonner l'expression de ses facteurs de virulence, impliquant des systèmes à deux composants et de détection des signaux du « quorum sensing » (Piqué *et al.*, 2015).

1.1.3 Un outil de taxonomie récent pour évaluer la diversité des souches d'*Erwinia amylovora* : les systèmes CRISPR

Des études génomiques à différents niveaux (comparaison du génome entier, gènes de virulence, contenu plasmidique, etc.) entre les différentes souches d'*E. amylovora* révèlent une grande homogénéité génétique de cette bactérie phytopathogène (Mann *et al.*, 2013). Ne pouvant différencier les variants génétiques, une nouvelle approche a dévoilé une diversité relative plus importante. Le système CRISPR-Cas est un mécanisme de défense des bactéries contre les ADN exogènes, notamment les bactériophages (Figure 3). Ce système hautement spécifique est capable de détecter et d'éliminer les gènes exogènes grâce à des protéines effectrices (Cas) et à des fragments d'ADN (CRISPR) intégrés au sein du/des chromosomes bactériens. Il s'agit en plus d'une forme de système immunitaire héritable par transmission aux cellules filles (Asma Hatoum-Aslan, 2018). Toutes les souches d'*E. amylovora* contiennent des systèmes CRISPR-Cas et ont récemment été différenciées en groupes géographiques basés sur le locus CRISPR du fait de l'homogénéité de leur génome (Rezzonico *et al.*, 2011). L'analyse des loci CRISPRs a regroupé trois groupes, dont les souches d'Amérique du Nord avec des CRISPR appartenant aux groupes I, II et III et des souches d'Europe, du Moyen-Orient et de la Nouvelle-Zélande appartenant au groupe I (Rezzonico *et al.*, 2011). Ce système de défense des bactéries contre les bactériophages est donc utile pour connaître la diversité d'*E. amylovora*, mais aussi pour mettre en évidence le rôle potentiel des bactériophages en tant que pression de sélection sur ces bactéries.

1.2 Les bactériophages

1.2.1 Découverte et histoire des bactériophages

En 1917, le franco-canadien Félix D'Hérelle observe et découvre des « plages claires » au sein d'une culture bactérienne sur gélose formulant ainsi l'hypothèse que ces plages pouvaient être provoquées par un agent inconnu nommé « microbe filtrant » (D'Hérelle, 1917). Très tôt, Félix D'Hérelle imagine un usage thérapeutique de ce « microbe filtrant », qu'il concrétise en 1919 avec la guérison d'un enfant atteint de dysenterie bacillaire. La phagothérapie venait de naître. Si tôt qu'en 1924 les bactériophages ont été aussi utilisés contre les bactéries pathogènes de plantes. Les premiers travaux pionniers furent ceux de Mallman et Hemstree. Ils remarquèrent que le filtrat recueilli à partir de choux en décomposition inhibait la croissance de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Mallman et Hemstree, 1924)

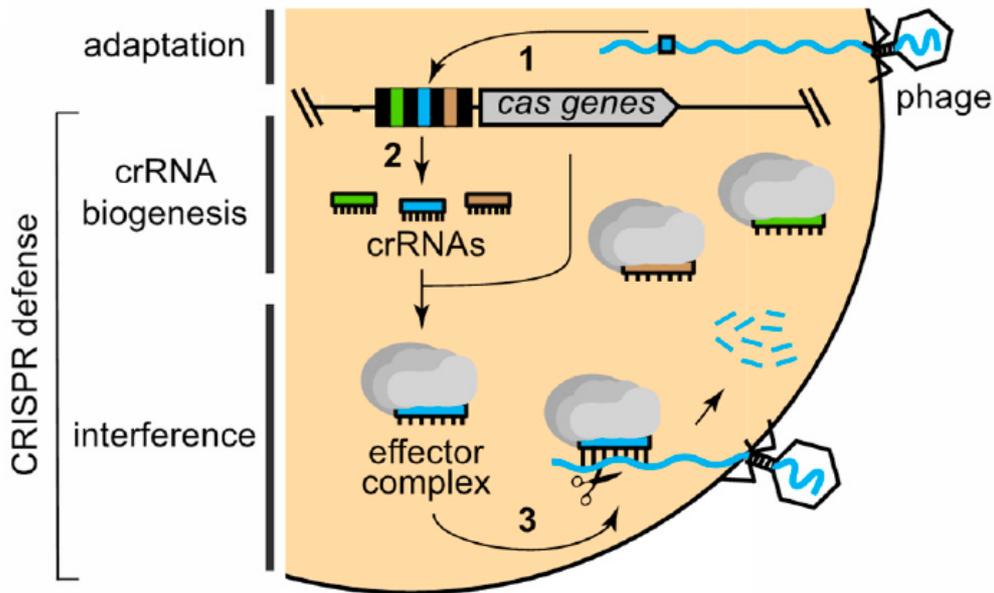


Figure 3: Mécanisme général de la voie CRISPR ; Les trois étapes de l'immunité CRISPR – Cas consiste en (1) une adaptation; (2) biogenèse d'ARNc; et (3) interférences. Les deux dernières étapes constituent la défense CRISPR. Au sein du locus CRISPR, les répétitions d'ADN (rectangles noirs), les espaceurs (rectangles colorés) et les gènes cas (gris) sont présentés. D'après Asma Hatoum-Aslan, 2018.

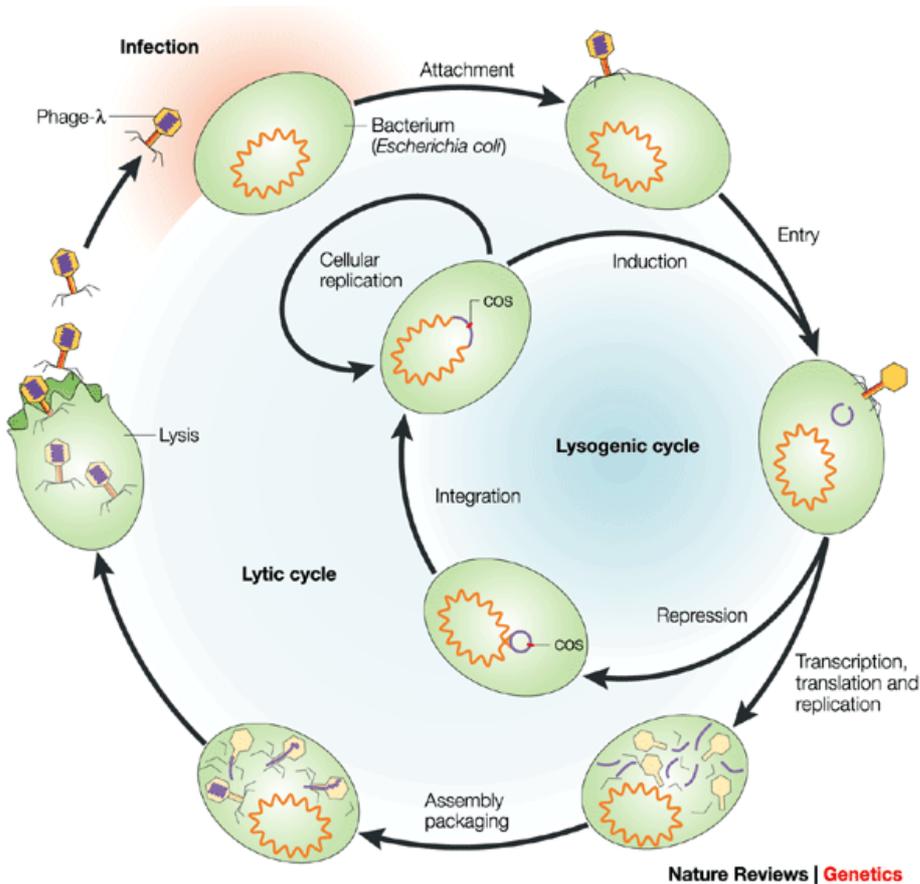


Figure 4: Cycles de vie des bactériophages. Le phage se fixe à la surface de la cellule par l'extrémité de sa queue. L'ADN du phage entre et ensuite, les extrémités de la molécule d'ADN linéaire se rejoignent pour former un cercle. Le point de fermeture s'appelle le site cohésif (cos). Dans certaines cellules infectées, l'ADN est transcrit, traduit et répliqué. Dans d'autres cellules infectées, la réplication du phage est réprimée et son ADN s'intègre au chromosome bactérien. La cellule lysogène résultante peut se répliquer indéfiniment, mais peut être amenée à revenir au cycle lytique avec l'excision de l'ADN phagique du chromosome. D'après Allan Campbell, 2003.

En 1925, Kotila et Coons ont démontré que des phages isolés du sol inhibaient la croissance de *Pectobacterium carotovorum subsp atrosepticum*, l'agent responsable de la maladie de la jambe noire de la pomme de terre (Kotila et Coons, 1925). En revanche, la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 puis la Seconde Guerre mondiale, qui a généré des besoins immenses en traitements anti-infectieux entraînera par la suite l'abandon progressif de la phagothérapie. Cependant, depuis l'émergence de bactéries multi résistantes aux antibiotiques, celle-ci bénéficie d'un regain d'intérêt de la part des thérapeutes (Ravat *et al.*, 2015).

1.2.2 Biologie et cycle de vie des bactériophages

Les phages sont des virus capables d'infecter les bactéries, de taille variable, mesurant 20 à 200 nm. Actuellement, 96 % des phages isolés et identifiés, appartiennent à l'ordre des Caudovirales (Ackermann, 2007). Ces virus sont caractérisés par une capsidie protéique icosaédrique contenant un ADN double brin connecté à une queue. Comme tous les virus, les phages sont des parasites intracellulaires obligatoires, ils ont besoin d'un hôte pour se développer. Deux cycles d'infection les caractérisent et permettent leur classification : lytique et/ou lysogénique (Figure 4).

Lors d'un cycle lytique, il y a réplication du génome, transcription et traduction des gènes viraux pour pouvoir assembler de nouvelles particules virales qui seront libérées par la lyse de la cellule sous l'action d'enzymes virales, les endolysines. La première étape de l'infection est la reconnaissance de la cellule hôte. Celle-ci est déterminante, car chaque phage reconnaît de manière spécifique un ou plusieurs composants exposés à la surface de la cellule. Cette interaction se fait via des protéines de liaison au récepteur du bactériophage (Receptor Binding Protein), situées à l'extrémité des fibres caudales. La nature des récepteurs varie selon les caractéristiques de l'enveloppe bactérienne et d'autres structures extracellulaires telles que les capsules, les EPS, les flagelles et pili (Bertozzi Silva *et al.*, 2016). Dans le cycle lysogénique, le génome du phage est généralement intégré dans le chromosome par recombinaison via des sites spécifiques, il est alors appelé prophage. En cas de stress de l'hôte, le prophage parvient à détourner les voies de signalisation et s'excise du génome de l'hôte pour redémarrer un cycle lytique par réplication de son génome (Allan Campbell, 2003). Les prophages présents dans les génomes apportent aux bactéries qui les hébergent des avantages sélectifs importants et/ou des facteurs de virulence (Nadeem et Wahl, 2017). De plus, dans de nombreux cas, les prophages résidents confèrent une résistance aux bactériophages qui tentent d'infecter la bactérie lysogénique. Cette résistance implique différents mécanismes tels que la modification du récepteur bactérien, ou la dégradation de l'ADN entrant (Berngruber *et al.*, 2010).

1.2.3 Rôles écosystémiques des bactériophages

Les bactériophages représentent les entités biologiques les plus nombreuses et les plus divers de la biosphère (Clokic *et al.*, 2011). Les interactions entre les bactériophages et leurs hôtes sont de type prédateur-proie (bactériophages virulents), parasitaires (bactériophages tempérés) et mutualistes (les valeurs sélectives de la bactérie lysogénique et de son prophage sont mutuellement augmentées) (Wang *et al.*, 2010).

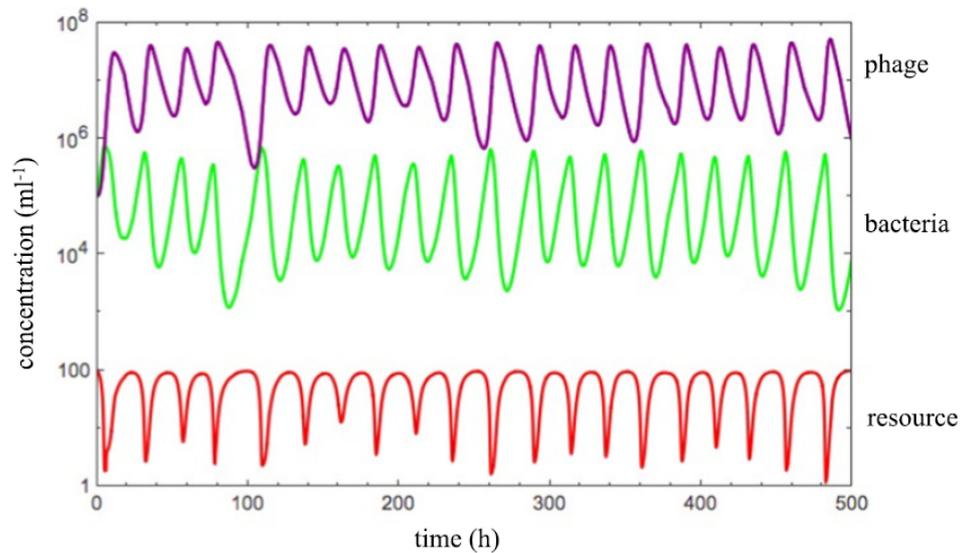


Figure 5 : Modèle de dynamique de population dans une communauté simple comprenant un seul type de phage lytique, un seul type de bactérie susceptible et des ressources pour la croissance bactérienne. Cette simulation montre des cycles dits 'prédateurs-proies' causés par la croissance bactérienne et la mort par infection des bactéries. Comme les phages (ligne violette) consomment des bactéries (ligne verte) et produisent plus de phages, il se produit une augmentation du faisceau de phages et une diminution correspondante de leur abondance. À mesure que l'abondance des bactéries diminue, les phages ont moins de cellules pour se répliquer, et diminue aussi. Le déclin de l'abondance des phages permet aux bactéries de se multiplier, ce qui entraîne un accroissement de la population des phages et une propagation continue de la dynamique de cette communauté. La ressource bactérienne (ligne rouge) est directement affectée par la population de phages par la lyse bactérienne. D'après Burmeister *et al.*, 2019 .

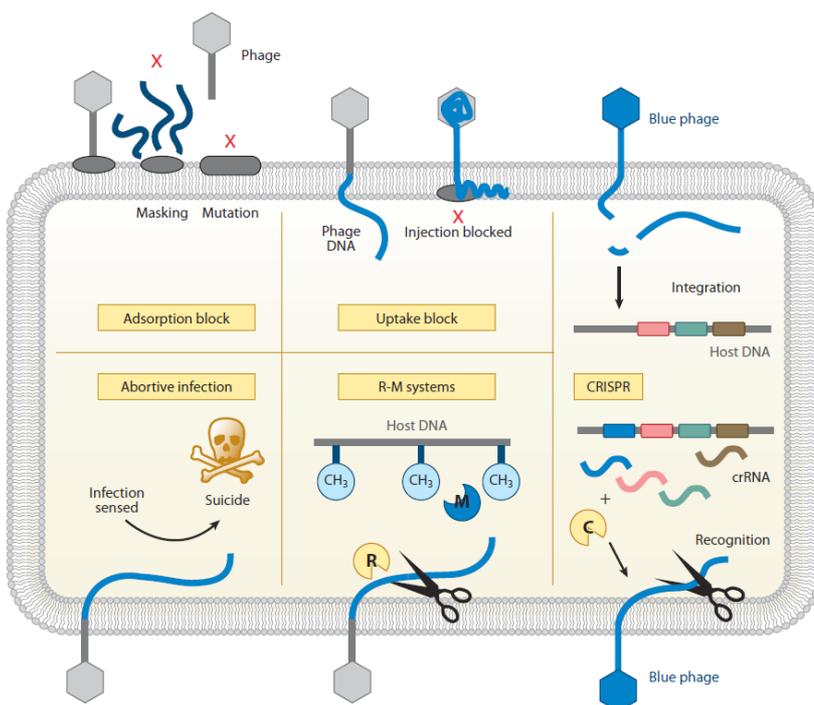


Figure 6 : Schéma des systèmes de défense procaryotes contre les phages. Les mécanismes de défense incluent le blocage de l'entrée du phage, adsorption ou injection d'ADN. D'autres systèmes agissent directement sur l'ADN de l'envahisseur, tels que la restriction / modification et CRISPR/Cas. Une autre défense consiste aux suicide de certaines bactéries pour limiter la destruction de la population par le phage. **Abbréviations:** C : protéines Cas; M : méthyltransférase; R : endonucléase de restriction. D'après Westra *et al.*, 2012.

Les pressions de sélection exercées par les bactériophages sur les populations bactériennes contribuent à la diversification microbienne et modifient les paramètres physico-chimiques du cycle du carbone (Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004). De plus, les populations de phages fluctuent avec les populations bactériennes dans le temps (Burmeister *et al.* 2019) (Figure 5). Au niveau des interactions avec leurs hôtes, les phages font face à une gamme de mécanismes antiviraux, mais ils ont développé de multiples tactiques pour éviter, contourner et renverser ces mécanismes. Spécifiquement, les systèmes de défense antiviraux utilisés par les bactéries sont entre autres, le masquage des récepteurs, le blocage de l'injection d'ADN de phage, les systèmes de restriction/modification ou d'infection abortive (Westra et al., 2013 ; Figure 6). Tout comme les prophages, les phages capables du mécanisme de « transduction », ont un rôle significatif dans l'acquisition de nouveaux traits par transfert horizontal de gènes, des bactéries et des archées (Westra *et al.*, 2013).

1.2.4 Domaines d'applications des bactériophages (Figure 7)

1.2.4.1 La santé humaine et animale

En tant qu'agent antimicrobiens, les phages ont vu une renaissance ces dernières années, spécialement dans le domaine médical contre les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. Une publication récente a montré qu'un patient de 15 ans atteint de fibrose kystique et présentant une infection disséminée à *Mycobacterium abscessus* (AMR) montrait une amélioration de l'état clinique, avec une fermeture de la plaie sternale, une amélioration de la fonction hépatique et une diminution des nodules cutanés infectés suite à un traitement par un cocktail de trois phages mis au point par génie génomique et génétique avancée. (Dedrick *et al.*, 2019). Il est à savoir que les enzymes lytiques comme les lysines du phages sont considérées comme une nouvelle classe d'antibiotiques, appelés enzybiotiques (Nelson *et al.*, 2001).

1.2.4.2 Le traitement des eaux usées

Les phages peuvent potentiellement améliorer le traitement des eaux usées. Des phages provenant de sources environnementales aquatiques peuvent s'attaquer aux bactéries non désirées telles que *Salmonella*, *E. coli* entéropathogène, *Shigella*, *Vibrio cholera*, etc., afin d'empêcher ces bactéries dangereuses d'atteindre les rivières, étangs et lacs (Jassim *et al.* 2016). De plus, les phages sont peu coûteux à produire, rapide et respectueux de l'environnement par rapport aux méthodes actuelles utilisées dans les stations d'épuration. Néanmoins, l'application réussie du biocontrôle des phages pour le traitement des eaux usées nécessite une meilleure compréhension de la dynamique et des interactions de la communauté microbienne des eaux usées (Jassim *et al.* 2016).

1.2.4.3 L'industrie agro-alimentaire

Les maladies d'origine alimentaire restent une cause majeure d'hospitalisation et de décès dans le monde entier malgré les nombreux progrès réalisés dans les techniques d'hygiène alimentaire et de surveillance des agents pathogènes (Hoffmann *et al.*, 2012). Comme exemple, une préparation disponible dans le commerce (nommé ECP-100 ou EcoShield™) composée de trois bactériophages lytiques spécifique de Ecoli O157:H7 a significativement réduit la concentration en bactéries testées dans les produits frais (Abuladze *et al.*, 2008).

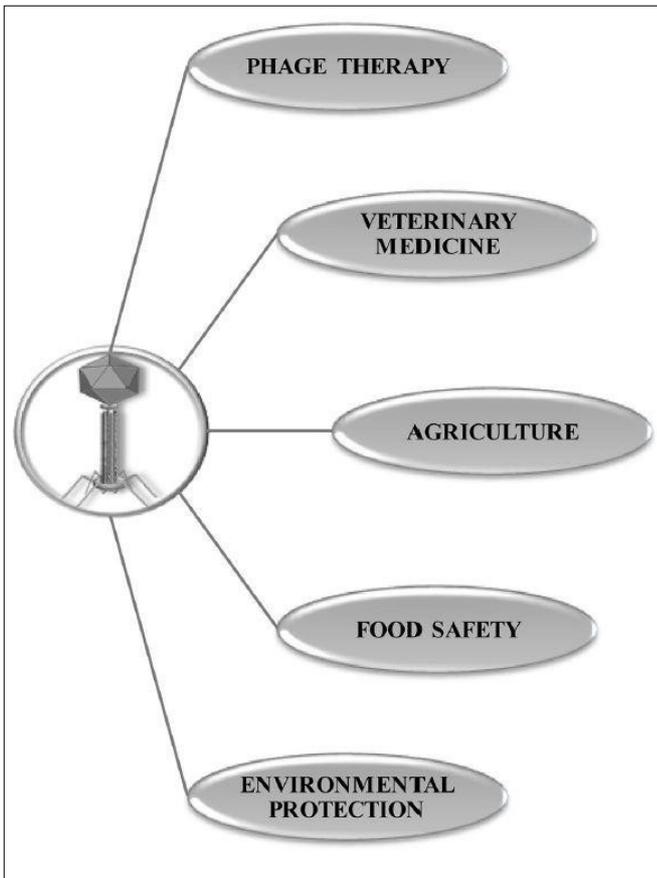


Figure 7: Résumé des différents secteurs d'applications des phages comme agent de biocontrôle. D'après Fernández *et al.*, 2018.

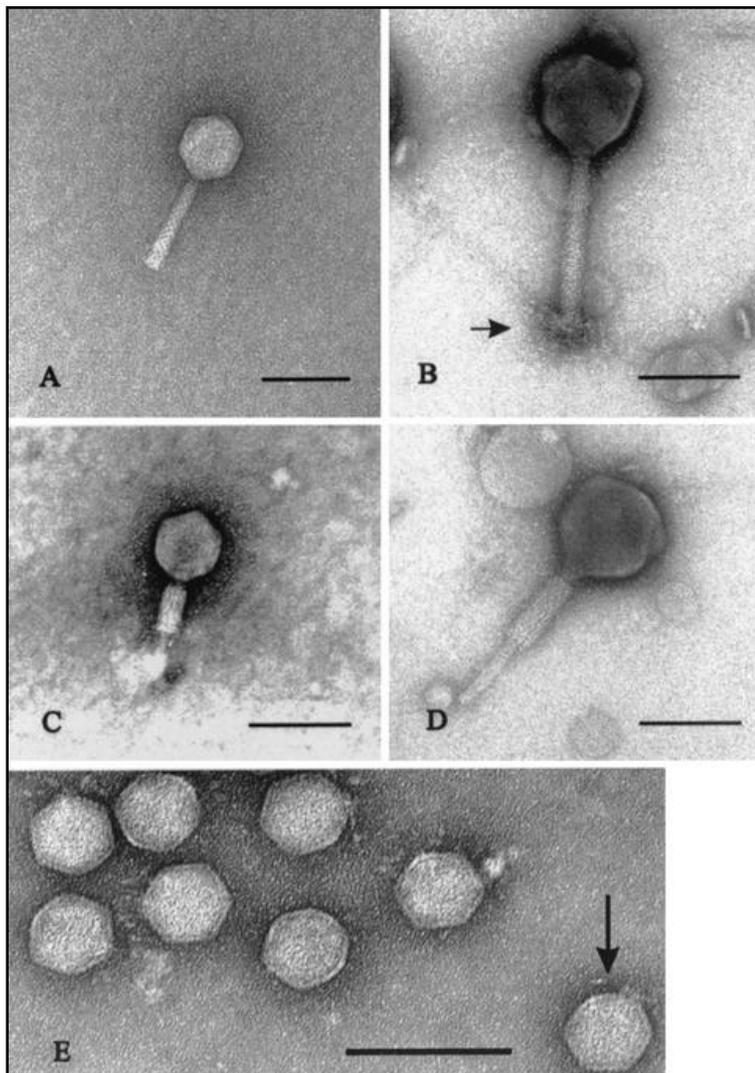


Figure 8:

(Photographies de microscopie électronique de différentes phages d'*Erwinia amylovora*. (A à D) phages appartenant aux Myoviridae. Phage à l'état non contracté (A), plus grand phage à l'état non contracté (B), phage à l'état contracté (C) et le plus grand phage à l'état contracté (D) est affichés. Le panneau E montre les phages appartenant aux Podoviridae. La flèche pointe vers la région de la queue. D'après Gill *et al.*, 2003. **Échelle : Marqueur = 100 nm.**

.Les réductions allaient de 94 % (à environ 120 h post-traitement des échantillons de tomates) à 100 % (environ 24 h après le traitement). Le biocontrôle des bactériophages est donc une technique prometteuse qui attaque spécifiquement les bactéries pathogènes afin de les éliminer ou réduire considérablement leurs teneurs dans les aliments.

1.2.4.4 L'agriculture

Dans le contexte agroalimentaire, les deux types d'antimicrobiens (phages et protéines lytiques du phage) peuvent être utilisés pour assurer la sécurité alimentaire tout au long de la chaîne de fabrication (de la ferme à la fourchette) (García *et al.*, 2008). Un secteur cible potentiel pour l'application de bactériophages est la production primaire, où ils peuvent remplacer ou compléter les antibiotiques et les pesticides. En conséquence, les phages pourraient aider à limiter l'augmentation de la résistance aux antibiotiques associée aux pratiques agricoles et d'élevage. (Fernandez *et al.*, 2018). En effet, *Agriphage* (USA) et *BioLyse* (UK) sont les premières entreprises à avoir commercialisé des préparations de phages contre les bactéries phytopathogène.

1.3 Les bactériophages dirigés contre *Erwinia amylovora* (Figure 8)

Plusieurs études ont montré le potentiel des phages pour cibler *E. amylovora*, la bactérie responsable du feu bactérien objet de notre étude. Il a été démontré que plusieurs phages sont capables de dégrader l'EPS de différentes souches d'*E. amylovora* (Roach *et al.*, 2013). De plus, il a été décrit que certains phages d'*E. amylovora* agissaient spécifiquement sur le flagelle de la bactérie. En effet, les bactéries mutantes et résistantes à ces phages ont montré un pouvoir pathogène atténué, sûrement dû à une mobilité non-optimale provoquée par des mutations au niveau du flagelle (Evans *et al.*, 2010). Fait intéressant, il se trouve que des phages ont déjà été testés pour contrôler *E. amylovora in vivo* avec des résultats encourageants (Naggy *et al.*, 2012). En général, une réduction de la quantité de bactéries phytopathogènes était observée et de même qu'une diminution des plantes malades (pommiers ou poiriers). Par contre, les résultats de ces expériences sont améliorables si différents facteurs sont prises en compte, tel que l'utilisation des phages comme traitement préventif, des cocktails de plusieurs phages par opposition à l'utilisation d'un seul phage.

Additionnellement, dans la conception de stratégies antimicrobiennes efficaces, il est essentiel de prendre en compte l'évolution des résistances bactériennes afin de minimiser tout impact possible du développement de la résistance dans un but de thérapie efficace. Parmi les données manquantes et nécessaires pour une stratégie de biocontrôle durable, des recherches en épidémiologie d'*E. amylovora* en région PACA devront être fait en parallèle de ce projet. De plus, la mise en place de diverses approches utilisant différents principes évolutifs des bactéries phytopathogènes nous permettrait de viser et de détecter des phages potentiellement efficaces sur le long terme pour une stratégie de biocontrôle durable.

II – Matériel et Méthodes

Souches Bactériennes

Les 35 souches d'*Erwinia amylovora* utilisées provenaient d'un échantillonnage local, de l'équipe du Dr. Theo H. M. Smits (Institute for Environment and Natural Resources ZHAW Zürich; University for Applied Sciences Grüental, PO-Box, CH-8820 Wädenswil, Switzerland) et de la collection du CFBP. Elles ont été cultivées sur milieu gélosé ou liquide Luria-Bertani (Difco) et incubées à 28 °C. Toutes les souches des bactéries utilisées dans les expériences et leur origine sont énumérées dans le tableau (Tableau 1 Appendix).

Identification de souches d'*Erwinia amylovora*

6 échantillons soupçonnés d'être *E. amylovora* provenant de la campagne d'échantillonnage de Remollon en août 2018 ont été testés avec une PCR spécifique pour vérifier l'identité de la bactérie. Les échantillons étaient des colonies bactériennes pures, isolées à partir de matériel végétal infecté dans un verger de pommiers et poiriers atteint de feu bactérien. Les séquences d'amorces spécifiques du gène de biosynthèse de l'amylovorane d'*E. amylovora* étaient 5 'TACTGCAGACGTGCTC 3' pour AMSJ14258 et 5 'ATCTTCTCCGCCGACA 3' pour AMSJ14258. Les amorces devaient amplifier un produit de 600 pb. Les réactions ont été conduites dans des volumes de 12,5 µl en utilisant une concentration de 2µM de chaque amorce AMSJ14258 et AMSJ14258 (Eurofins Genomics), 5X de tampon GoTaqFlexi (Promega, Blue/Orange 6X Loading Dye G190), 25mM de désoxyribonucléotides triphosphates (Promega, U1240), 25 mM de MgCl₂ et 5U de GoTaq® G2 Flexi DNA pol (Promega, M7805). 1 µl des échantillons de suspensions bactériennes dans de l'H₂O milliQ a été utilisé comme matrice de la PCR. Les réactions ont été effectuées dans un thermocycleur Eppendorf (Mastercycler Gradient) dans les conditions suivantes : 94 ° C, 4 min ; 94 ° C, 30 s, 52 ° C, 30 s et 72 ° C, 1 min, 30 cycles.

Campagnes d'échantillonnages de bactériophages d'*E. amylovora*

39 échantillons au total ont été collectés pour détecter des potentiels phages contre *E. amylovora*. 15 provenaient d'une campagne d'échantillonnage dans un verger de pommiers et poiriers atteint de feu bactérien en août 2018 à Remollon (05) et 24 provenaient d'une prospection en avril 2019 dans deux vergers atteints de feu bactérien l'année dernière à Mallemort (13) et Graveson (13). Le site de Graveson étant certifié agriculture biologique. Sur les parcelles de Remollon, seulement des parties aériennes des arbres ont pu être échantillonnées alors que sur les sites de Mallemort et Graveson des échantillons de sol à la base des arbres ainsi que les parties aériennes des arbres ont été prélevés (Tableau 2).

Isolement de bactériophages d'*E. amylovora*

Les 39 échantillons ont été homogénéisés dans du milieu Luria-Bertani (LB) sous agitation pendant une heure à 28 °C. Pour éliminer les bactéries environnementales, une centrifugation à 6000 g et une filtration avec un filtre de 0,23 µm ont été réalisées. Ensuite, les échantillons filtrés ont été enrichis avec différentes souches d'*E. amylovora* pour favoriser la réplique des phages potentiellement divers. Pour cette étape, 5 souches d'*E. amylovora*, à savoir UPN527, LebA3, MO-E-101b, UTRJ2 et Ea4, ont été utilisées. 5 ml de

chaque filtrats a été réparti dans 5 tubes et ensemencé avec 500 µl d'une culture bactérienne des différentes souches en phase exponentielle ($OD_{600\text{ nm}} = 0.6$). Les mélanges filtrat/souche ont été cultivés sous agitation pendant 24 heures à 28 °C. Suivant à cette étape d'enrichissement (amplification) des phages spécifiques des différentes souches d'*E. amylovora*, les phages ont été purifiés et les bactéries éliminées après ajout de 10 % de chloroforme. La suspension résultante a été vortexée et centrifugée à 4 °C à 13000 rpm pendant 5 min. Le surnageant (10 µL) contenant les phages a été retiré et appliqué sur des tapis bactériens semi-solides correspondant aux 5 souches de l'étape d'enrichissement pour s'assurer de la présence des bactériophages. Les plages de lyse ont été vérifiées après 18 h d'incubation à 28 °C. Les phages ont été isolés en sélectionnant des plages individuelles à l'aide d'une pipette Pasteur et remis en suspension dans 100 µL de tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 6,8). Cette étape a été répétée au moins deux fois pour assurer la pureté de l'isolat de phage.

Production d'un stock de phages

Afin d'avoir un volume de phage important pour la suite de nos expériences, une inoculation avec le phage a été réalisée dans 30 ml d'une culture bactérienne d'UPN527 en phase exponentiel ($DO_{600\text{nm}} = 0.6$). Le mélange a été incubé à 28°C sous agitation à 80 rpm pendant 16 heures. Une purification des phages avec du chloroforme, tel qu'expliqué dans la section précédente, a été utilisé, mais répété deux fois et filtré (0,23 µm) pour assurer la pureté finale du stock de phage.

Microscopie électronique à transmission du phage d'*E. amylovora*

Afin de concentrer et de purifier l'échantillon de phage, pour les observer en microscopie électronique, le protocole suivant a été utilisé. Une solution de phage liquide été préparée et centrifugée à 20 800 g à 4 °C pendant 1 h pour séparer les phages des autres particules. Le surnageant contenant les phages a été centrifugé de nouveau à 20 800 g pendant 1 h à 4 °C. Le culot de phage a été remis en suspension dans du tampon phosphate de sodium 10 mM (pH 6,8). Une goutte de la suspension a été déposée sur une grille de nickel revêtue de formvar et laissée reposer pendant 2 min. Les phages sur la grille ont été colorés négativement avec 1 % de molybdate d'ammonium. À chaque solution de colorant, 4 mM de $MgCl_2$ ont été ajoutés dans un rapport 1: 1 (vol / vol). L'échantillon a été examiné à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi HT7800 avec une tension d'accélération de 80 kV.

Analyse de la gamme d'hôtes du phage d'*E. amylovora*

La capacité d'infecter les 35 souches d'*E. amylovora* (Tableau 1) du phage isolé a été testé. Des tapis bactériens ont été préparés en ensemencant 1,8 ml de LB agar semi-solide avec les différentes bactéries en suspension dans du LB liquide à une $DO_{600\text{nm}}$ de 0,6 nm. Le phage a été dilué par la suite à une concentration allant de 10^{-1} à 10^{-3} et 10 µL de chaque dilution ont été appliqués sur ces tapis bactérien. Les boîtes de pétri ont été incubées à 28 °C pendant 18 h. Les expériences ont été répétées trois fois et les plages de lyses ont été dénombrées à l'aide d'une loupe binoculaire dans la dilution la plus appropriée. La concentration des

« plaque forming units » par millilitre (pfu/mL) du phage chez chaque bactérie a été calculée pour analyser la gamme d'hôtes globale du phage (Tableau 1)

Recherche de prophages dans le génome des souches d'*E. amylovora*

Des contigs de 3 souches (CFBP1232, UPN527 et 01SFR-BO) provenant des travaux de Rachel A. Mann (Mann *et al.*, 2013) ont été téléchargés à partir de la banque de données EMBL (European Molecular Biology Laboratory). Dans le but de détecter de possibles prophages, les contigs ont été mappés en prenant comme référence CFBP1430 (« golden strain »). Suite au mapping des contigs combiné à un assemblage *de novo* à l'aide du logiciel Geneious, 3 génomes chromosomiques ont été obtenus et manuellement assemblés. Par la suite, une recherche de région d'intégration de prophage a été réalisée à l'aide du logiciel Phaster ainsi qu'un blastx.

III - Résultats :

Isolement et identification des souches locales d'*Erwinia amylovora*

Dans le but de répondre à une problématique de gestion du feu bactérien en région PACA, le premier objectif était d'isoler quelques souches d'*E. amylovora* locales actuelles, en absence criante de données épidémiologiques sur cette bactérie et ainsi trouver des bactériophages capables de les infecter. En effet, depuis 1972, seulement 2 souches françaises ont pu être isolées et seulement la souche CFBP1430 séquencée. Une campagne de prospection à Remollon (05) a donc permis d'isoler 6 colonies bactériennes suspectées comme *E. amylovora*. Un premier test sérologique sur la présence de l'amylovorane a été effectué sur les colonies Ea4 et Ea6. Le résultat positif concernant la souche Ea4, nous a permis de définir un témoin positif et négatif (Figure 9). Ensuite, une PCR spécifique a été réalisée sur les colonies candidates et les amplicons issus, révèlent la présence d'*E. amylovora* dans 3 des 6 colonies suspectées. Spécifiquement, nous pouvons observer l'amplification d'un fragment de 600pb d'une région codant la biosynthèse de l'amylovorane chez les bactéries nommées Ea1, Ea4 et Ea5 (Figure 9). Ces 3 souches identifiées maintenant en tant que *E. amylovora* ont été isolées sur un même arbre (*Pyrus communis*) atteint de feu bactérien.

Recherche de prophages d'*Erwinia amylovora* chez les souches avec des génomes séquencés

Une recherche de prophages a été effectuée sur les génomes de 4 souches d'*E. amylovora* (CFBP1430, CFBP1232, 01SFR-BO et UPN527) dans l'objectif d'associer leur présence à la résistance ou sensibilité des bactéries aux phages postérieurement isolés.

Préalablement, les contigs du génome des trois souches d'*E. amylovora* étaient disponibles mais non assemblés. Les souches 01SFR-BO, UPN527 et CFBP1232 avaient respectivement : 12, 18 et 43 contigs ; mesuraient en moyenne 640 494, 602 674 et 177 096 pb ; et avaient une couverture de 97,44 %, 96,7 % et 97,43 % lors du mapping sur le génome de la souche de référence CFBP1430.

L'analyse des prophages chez les 4 génomes assemblés d'*E. amylovora* avec le logiciel Phaster, indiquait la présence de 2 sites d'intégration Att par souches ainsi que l'assimilation des séquences de chaque gène de prophage par blastx . Les sites d'intégration étaient en moyenne situés à 1,9Mb et 3,4Mb sur le chromosome bactérien. Ces sites ne révélaient pas de régions contenant de prophage intact, car les tailles des régions étaient inférieur à 15 Kbase et trop de gènes étaient considérés comme putatifs (Figure 10)

Recherche de bactériophages d'*Erwinia amylovora*

Une fois les 39 échantillons des campagnes de prospection récupérés, nous avons enrichi ces derniers avec 5 souches différentes d'*E. amylovora* afin de détecter la présence de bactériophages capables d'attaquer la diversité génétique de la bactérie. Parmi les 195 combinaisons effectuées, seulement 1 échantillon était positif pour la recherche de bactériophages d'*E. amylovora*. Spécifiquement, un échantillon provenant de la campagne de Graveson (13) sur une exploitation de poires (Guyot) certifiée biologique était capable d'infecter la souche UPN527 (Figure 11).

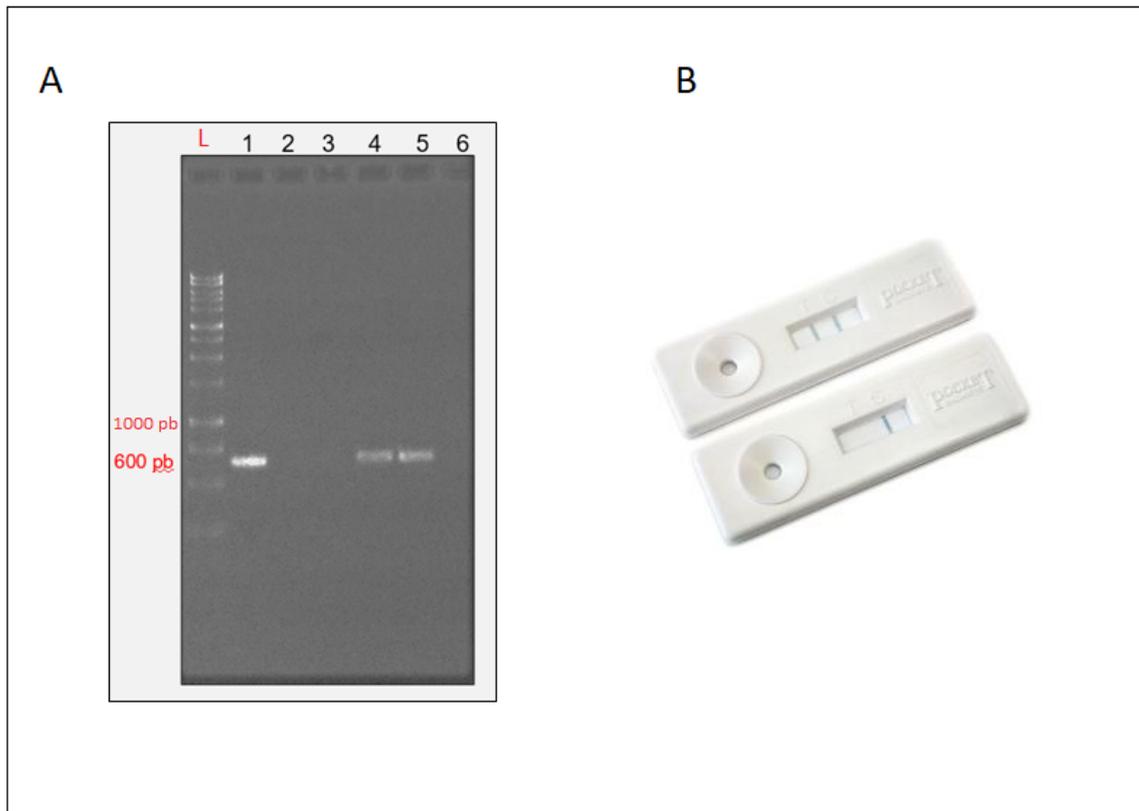


Figure 9 : Détection des souches locales d'*Erwinia amylovora* – A) Gel d'électrophorèse issue d'une PCR présentant un trois amplicons de 600pb du gène de biosynthèse de l'amylovoran pour les souches Ea1, Ea4 et Ea5 ; L= ladder 1kb ; B) Test sérologique positif pour Ea4 (haut) et négatif pour Ea6 (bas).

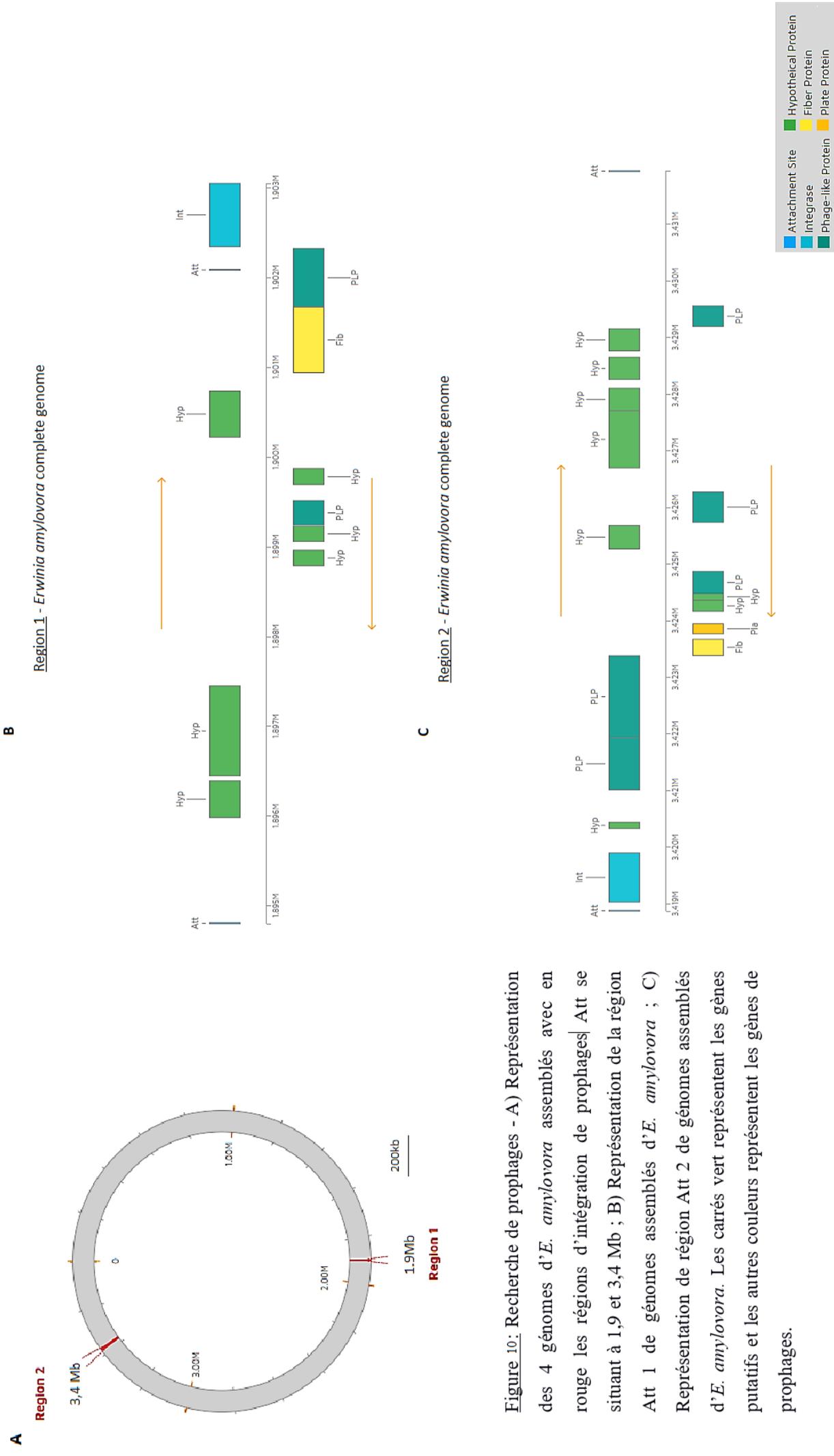


Figure 10: Recherche de prophages - A) Représentation des 4 génomes d'*E. amylovora* assemblés avec en rouge les régions d'intégration de prophages| Att se situant à 1,9 et 3,4 Mb ; B) Représentation de la région Att 1 de génomes assemblés d'*E. amylovora* ; C) Représentation de région Att 2 de génomes assemblés d'*E. amylovora*. Les carrés vert représentent les gènes putatifs et les autres couleurs représentent les gènes de prophages.

Taxonomie morphologique du bactériophage à l'aide de la microscopie électronique à transmission

Pour caractériser morphologiquement notre bactériophage et l'assigner dans l'ordre des Caudovirales, une microscopie électronique à transmission a été réalisée. Des structures biologiques redondantes mesurant entre 75 et 80 nm, légèrement en angle, rappellent un Podoviridae. La concentration du phage était faible ($2,5 \cdot 10^4$ pfu/mL dans la souche UPN527).

La première photo nous montre une structure biologique de 80 nm avec un côté plus triangulaire connecté à une possible queue (Figure 12-A). En revanche, la deuxième photo nous montre en son centre une possible vésicule de 108 nm par la présence d'une couche épaisse avec un possible phage en bas à droite, d'un diamètre de 76 nm (Figure 12-B).

Gammes d'hôte

Dans l'objectif de déterminer des phages candidats pour un traitement de biocontrôle du feu bactérien, connaître en profondeur les souches bactériennes que chaque phage est capable d'infecter est essentiel. Pour cela, le phage isolé a été confronté à un panel de souches d'*E. amylovora*, représentant la diversité génétique de la bactérie ainsi que les souches locales détectées. Parmi les 35 souches étudiées, 24 étaient sensibles au phage, 9 étaient résistantes et 2 présentaient une infection abortive (le phage était capable de détecter la bactérie mais la multiplication du phage était « avortée » par le mécanisme de mort programmée de la bactérie). Dans les 9 souches résistantes : 6 provenaient des USA, 2 du Liban, 2 de la France (locales) et 1 du Royaume-Uni. Même si limitées par l'utilisation d'un seul phage, différentes analyses ont été menées pour déterminer l'existence de possibles rapports entre la sensibilité des bactéries au phage et : (i) l'origine des souches, (ii) le type de systèmes de défense CRISPR, et (iii) le type de plantes hôtes de chaque souche. La variable analysée était la capacité du phage à se répliquer dans chaque souche bactérienne, mesurée en pfu/mL.

Après avoir testé la normalité des données, le test non-paramétrique Kruskal-Wallis a révélé un effet non significatif ($p\text{-value} = 0,4902$) de l'origine géographique des souches bactériennes sur la capacité du phage à se multiplier dans les différentes souches d'*E. amylovora*. Les souches françaises étaient dans le groupe Méditerranée. Selon ce test, le phage ne paraît pas plus adapté aux souches proches géographiquement qu'aux souches éloignées (Figure 13-A).

Une deuxième analyse comparait aussi l'efficacité du phage mais, cette fois-ci en fonction des différents groupes CRISPR que possédaient les souches, étant donné que cette caractéristique est à la fois importante dans la classification phylogénétique d'*E. amylovora* et en tant que mécanisme de défense contre les bactériophages. Pour les groupes « A » (Ancestrales : premier groupe CRISPR identifié chez *E. amylovora*) et IH (appartenant possiblement au groupe I), les souches bactériennes n'étaient pas sensibles. En revanche, les groupes I, II, III, R (R : CRISPR appartenant aux isolats sur *Rubus sp.*) et I/II (groupe I et II) étaient sensibles sans différence apparente entre eux par rapport à la multiplication du phage puisque le test non-paramétrique Kruskal-Wallis a révélé un effet non significatif ($p\text{-value} = 0,4389$) (Figure 13-B).

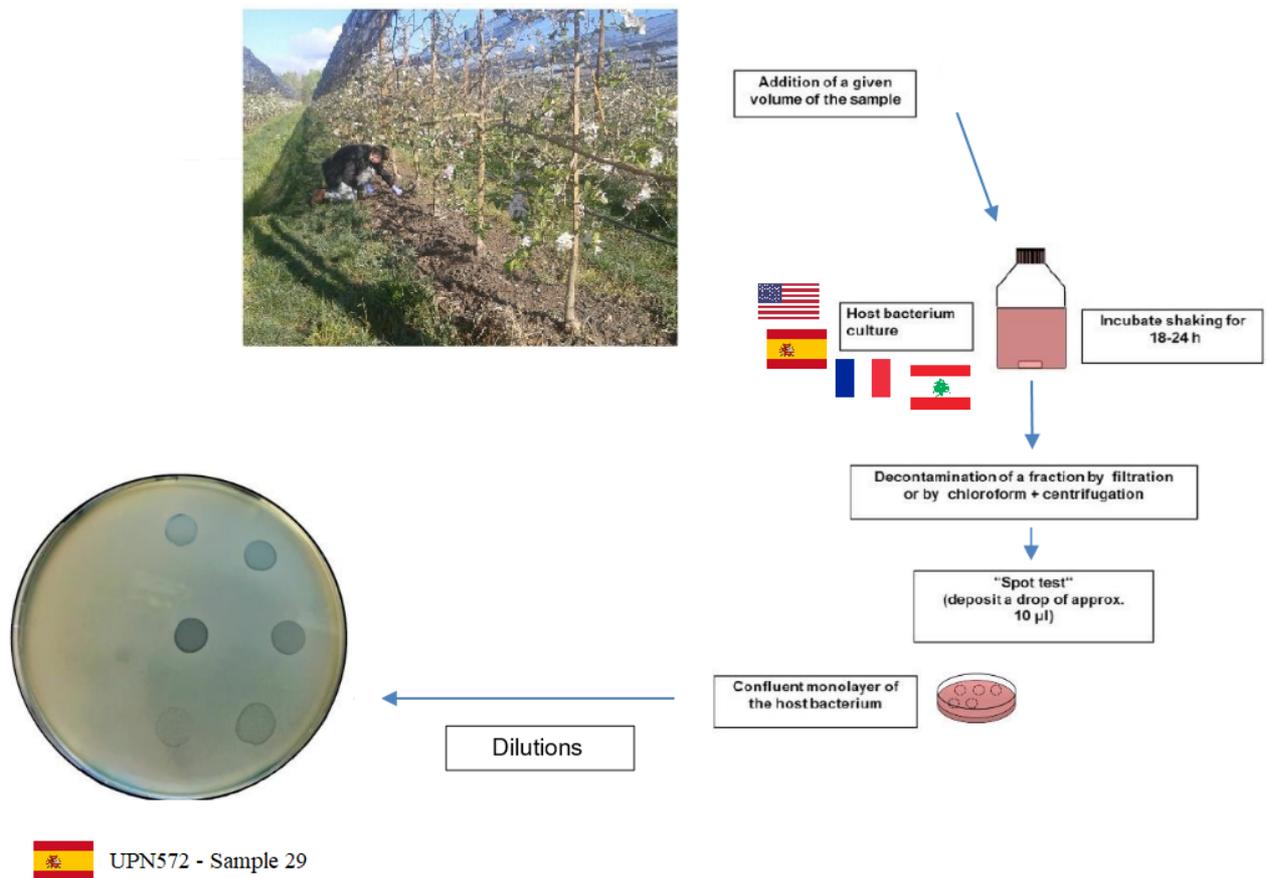


Figure 11 : Schéma représentant la recherche de bactériophages.

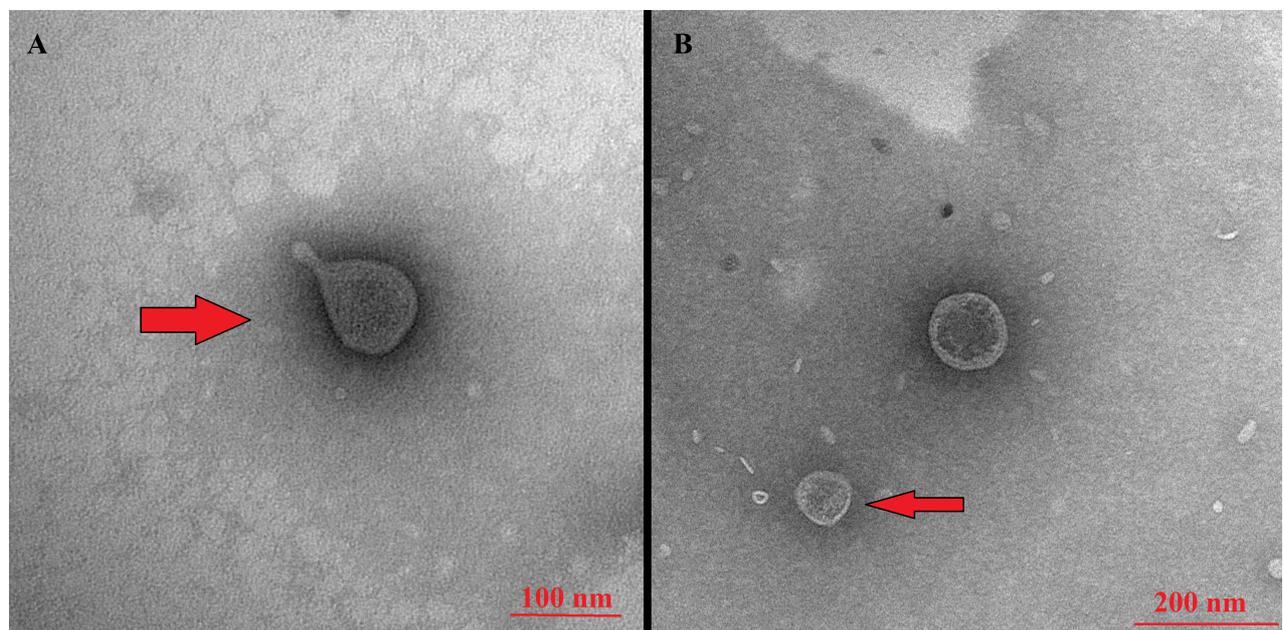


Figure 12 : Observation du phage au microscope électronique à transmission - A) Observation (x550k) d'une structure biologique morphologiquement proche d'un Podoviridae d'*E. amylovora*, mesurant 80 nm B) Observation (x330k) d'une autre structure biologique morphologiquement proche d'un Podoviridae, mesurant 76 nm et à côté d'une possible vésicule. Les flèches en rouge montrent les possibles phages.

Pour la troisième analyse, qui cherchait une corrélation entre l'efficacité du phage et le type de plantes hôtes où les souches bactériennes ont été isolées, le test non-paramétrique Kruskal-Wallis a aussi révélé un effet non significatif ($p\text{-value} = 0,084$) (Figure 13-C).

Pour finir, les tests des interactions entre les différentes variables (origin*CRISPR ; CRISPR*plante hôte ; origin*plante hôte) n'ont pas révélé des effets significatives par rapport à la multiplication du phage étudié.

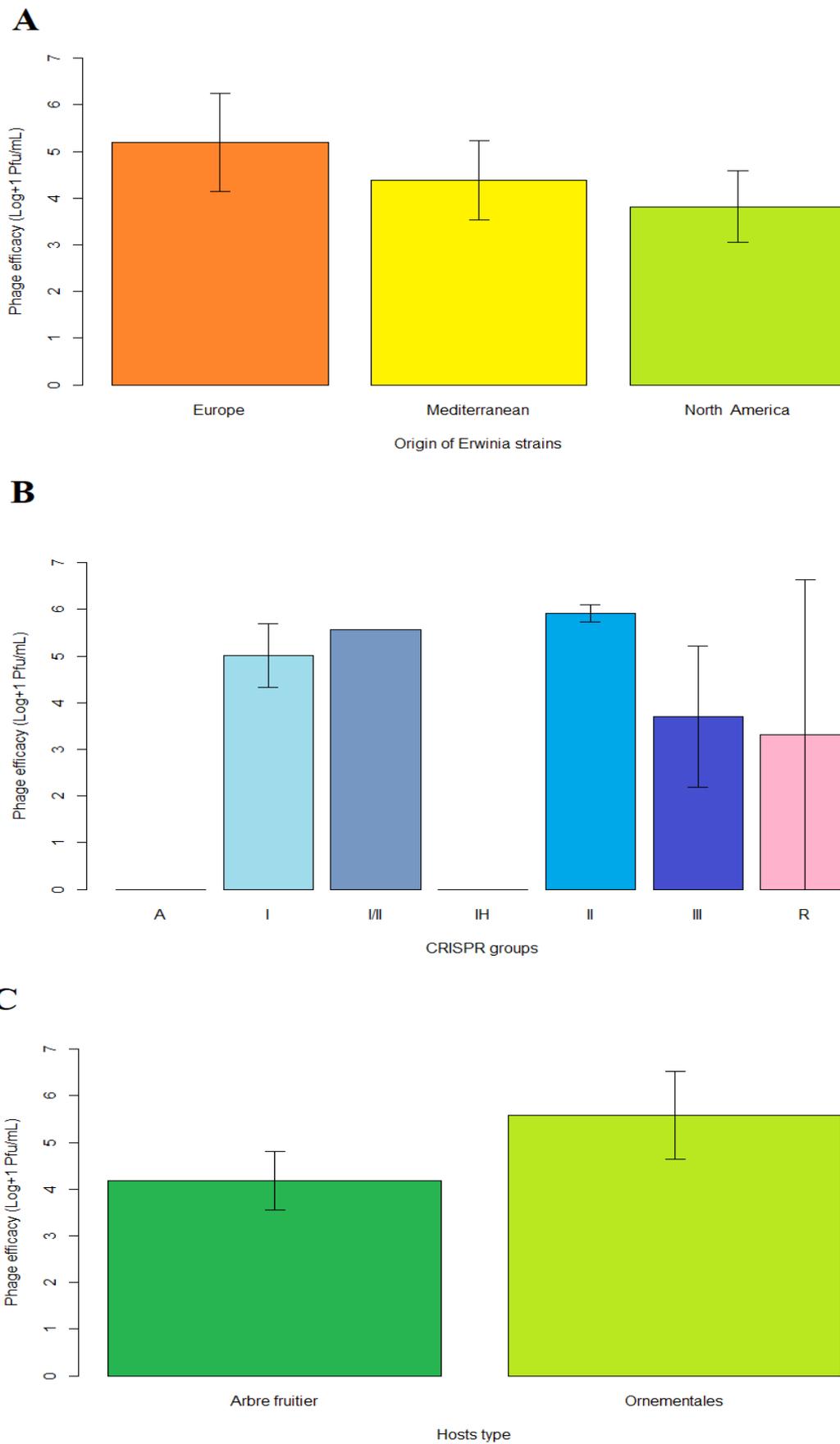


Figure 13 : Capacité du phage a se multiplier en fonction de A) l'origine géographique des souches bactériennes d'*E. amylovora* ; B) en fonction des groupes CRISPR ; C) en fonction des hôtes.

IV – Discussion et perspectives

Ce stage est une prémisse dans la recherche de bactériophages dirigés contre *E. amylovora* mais aussi de la bactérie phytopathogène dans la perspective d'une stratégie de biocontrôle en France. Ici, nous avons isolé 1 phage que nous avons confronté à une collection de souches d'*E. amylovora* représentant la diversité générale de la bactérie. À cette collection, s'ajoutent 3 nouvelles souches isolées en région PACA, la dernière isolée datait de 2009. De plus, nous avons révélé que ce phage est généraliste envers la diversité d'*E. amylovora*.

Par rapport à l'objectif de collecter des données sur les populations de souches bactériennes locales, avec seulement 3 campagnes d'échantillonnage, 3 souches d'*E. amylovora* locales ont été identifiées. Par la suite, elles devront être séquencées afin de les assigner à leur phylogroupe CRISPR. Ce qui possiblement pourrait nous indiquer l'origine géographique de ces bactéries et comprendre des aspects épidémiologiques comme l'a fait Rezzonico *et al.* (Rezzonico *et al.*, 2011).

Dans la recherche de phages locaux contre *E. amylovora*, nous avons utilisé des souches locales et du bassin Méditerranéen pour répondre à une demande de lutte en région PACA. De plus, à ce choix nous avons ajouté deux souches américaines afin de compléter les différents groupes CRISPR (diversité génétique de la bactérie) et faciliter la détection de tous les potentiels phages. Le choix de 5 souches est une quantité relativement faible par rapport aux 35 souches disponibles dans notre collection, ce qui pourrait avoir donné des faux négatifs dans la recherche des phages. Par contre, étant donné les capacités généralistes des phages d'*E. amylovora*, cette quantité paraît suffisante.

De façon inattendue, le seul échantillon positif pour un phage d'*E. amylovora* était associée à la souche espagnole *E. amylovora* UPN527 et non aux souches locales. Plusieurs explications sont possibles, par exemple le fait que les phages n'ont n'était pas échantillonnées aux mêmes endroits que la souche bactérienne. Le peu d'échantillons positifs peut s'expliquer dans un premier temps par la période d'échantillonnage (avril) sur les parcelles de Graveson et Mallemort. En effet, selon des études précédentes, la période la plus propice s'étend de juillet à septembre puisque c'est la période d'expression des symptômes (Cesbron, 2009). Nous prévoyons un prochain échantillonnage les mois à venir où nous aurons probablement plus de chances de trouver des phages puisque les populations de bactériophages augmentent avec celle des bactéries (Burmeister *et al.* 2019). Dans un second temps, il faut savoir que ces parcelles ont été assainies l'année dernière pour réduire la présence d'*E. amylovora* par coupe, arrachage et brûlage des arbres atteints. Ce qui probablement diminuait encore plus la détection de phages (associés à la présence de bactéries) au sein du verger. Néanmoins, la détection du phage étudié dans notre étude soulève donc quelques interrogations intéressantes, mais à vérifier quant à la persistance de ce virus en particulier dans l'environnement car aucun arbre n'avait de symptômes. Pour les échantillons de Remollon, la période de prospection était la bonne, mais la quantité de matériel végétale amené n'était pas suffisante et il n'y avait pas d'échantillons du sol. En effet, plusieurs études montrent que les phages d'*E. amylovora* se trouvent plus

fréquemment dans le sol (Gill *et al.*, 2003). En conclusion, d'autres campagnes de prospection devront être menées pour trouver de nouveaux phages.

D'après les analyses de la MET, il est probable que nous ayons affaire à un Podoviridae. Différents détails dans le protocole d'amplification et purification pourraient avoir eu un effet négatif sur le phage et son observation. Par exemple, le protocole de Gill (Gill *et al.*, 2003) indique qu'il faudrait procéder à 3 amplifications pour optimiser la concentration du phage et seulement 1 amplification a été effectuée dans notre cas. Il est probable que le traitement au chloroforme peut aussi être à l'origine d'un titre faible, mais nous avons testé un échantillon seulement filtré sans avoir un mieux résultat. En plus d'optimiser les protocoles afin d'assigner la famille du phage grâce à la MET avec plus de précision, un séquençage haut débit devra être effectué pour identifier génétiquement le phage.

Les résultats sur les gammes d'hôtes nous révèlent que notre virus isolé est caractérisé comme étant généraliste, car le phage est adapté à plusieurs souches d'*E. amylovora*. Plus loin que ça, nous ne trouvons pas de différences significatives entre la capacité du phage à se multiplier dans plusieurs souches bactériennes. En effet, le manque de significativité des résultats concernant l'efficacité du phage par rapport aux types de groupes CRISPR chez les bactéries, l'origine géographique et le type d'hôtes confirme ces propos. En effet, Born *et al.*, a révélé que des phages dirigés contre *E. amylovora* pouvaient infecter un large éventail de souches, et même des bactéries appartenant à d'autres genres dans la famille des entérobactériaceae (Born *et al.*, 2011). Ces résultats peuvent certainement s'expliquer par le haut degré de similarité du génome des différentes souches d'*E. amylovora*. Par contre, notre nombre d'échantillons de phages est extrêmement faible, ce qui n'apporte pas de solidité aux conclusions. D'autres analyses de gamme d'hôtes vont être poursuivies avec d'autres phages isolés par d'autres campagnes d'échantillonnage et des échanges avec des laboratoires partenaires (Dr. Lars Hansen, Copenhagen University, Danemark) afin d'avoir des données beaucoup plus représentatives et confirmer nos conclusions préliminaires.

Autre fait intéressant est que les souches bactériennes locales de Remollon (Ea1, Ea4 et Ea5), isolées sur le même arbre ne sont pas toutes sensibles au phage, qui est contradictoire avec l'homogénéité des génomes d'*E. amylovora*. Il est quand même possible que notre phage reconnaisse un récepteur commun appartenant aux souches d'*E. amylovora* sensibles ou que ce récepteur soit modifié chez les souches résistantes puisque les interactions entre les phages et les bactéries sont très spécifiques (Bertozzi Silva *et al.*, 2016). De plus, le nombre et la combinaison de phages appropriés varient en fonction de la diversité génétique de l'agent pathogène ciblé. Les espèces bactériennes à faible diversité génétique et dont le nombre de récepteurs de phages est limité comme *Staphylococcus aureus* par exemple, peuvent être traitées avec seulement quelques phages. Cependant, à mesure que la diversité génétique de l'agent pathogène cible augmente, la diversité des phages nécessaire pour un traitement efficace augmente comme par exemple avec *Yersinia enterocolitica* (Torres-Barceló, 2018).

Sur le long terme, des études plus poussées sur les dynamiques des populations de cette bactérie en champs devront compléter ces recherches et nous indiquer si les populations sont vraiment homogènes comme décrit dans la littérature (Mann *et al.*, 2013).

Une étude de Roach et collaborateurs en 2013, a démontré que l'efficacité (multiplication) et probablement l'adsorption des phages qui s'attaquent aux *Erwinia spp.*, étaient associés à la présence d'amylovorane ou de lévane (EPS) comme site de liaison, notamment chez les Podoviridae (Roach *et al.*, 2013). Dans les perspectives au long terme, des souches mutantes de notre collection d'*E. amylovora*, ou avec le gène de l'amylovorane amplifié ou silencé pourrait être une approche intéressante pour affiner nos résultats. D'autres mécanismes de moléculaires de défense des bactéries contre les phages devront être aussi pris en compte et caractérisés. En effet, un autre mécanisme de résistance aux phages grâce aux événements d'intégration a été exploré dans cette étude et ne révèlent pas la présence de prophages au sein des 4 génomes assemblés. Ce résultat confirme les travaux de Roach (Roach *et al.*, 2015) qui montraient une absence de lysogénie dans les populations sauvages d'*E. amylovora* et de *Pantoea agglomerans*. Bien entendu, nous ne pouvons pas exclure la possibilité de présence de prophages au sein des génomes de nouvelles souches et il est nécessaire de le vérifier, tel que nous avons fait.

Le contrôle efficace des maladies des plantes nécessite généralement une stratégie de gestion de la maladie faisant appel à plusieurs approches intégrées. Actuellement, l'utilisation du contrôle biologique par les phages est une pratique émergente et encore peu courante. Cependant, les phages possèdent plusieurs propriétés qui peuvent s'ajouter à l'arsenal de moyens de lutte contre les maladies des plantes. Ils sont naturels, ce qui les rend aptes à l'agriculture biologique. Ils peuvent être utilisés en tant que cocktails de phages avec des gammes d'hôtes sur-mesure à épidémiologie locale de la bactérie pathogène. De plus, les phages ont naturellement le potentiel d'évoluer pour s'adapter à la résistance des nouvelles souches bactériennes. Aussi, ils peuvent être combinés avec d'autres agents chimiques ou biologiques.

En prenant tous ces résultats en compte, dans une perspective de stratégie de biocontrôle, plusieurs paramètres doivent être explorés plus profondément. Notamment les interactions entre phages et l'hôte bactérien. En effet certains phages d'*E. amylovora* sont généralistes et d'autres sont spécialistes. Dans la majorité des cas, les phages d'*E. amylovora* sont généralistes, une exception dans le monde des phages en général. Pour ces phages donc, le critère de choix pour les inclure dans un cocktail ne serait pas seulement les gammes d'hôte, mais des aspects plus fins tels que la probabilité d'apparition de résistances chez les bactéries, l'efficacité de production, le coût, l'impact potentiel sur des bactéries non ciblées et leur persistance dans la plante et l'environnement. De plus, le recueillement de données épidémiologiques absentes chez *E. amylovora* constitue un véritable défi dans une perspective de biocontrôle efficace de la maladie. Notre étude, établie une base au niveau méthodologique, et apporte des nouvelles bactéries et un phage pour poursuivre dans la lutte contre cette maladie agricole si problématique.

V – Références bibliographique

- Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M.Y., Dean, T., Senecal, A., Sulakvelidze, A., 2008. Bacteriophages Reduce Experimental Contamination of Hard Surfaces, Tomato, Spinach, Broccoli, and Ground Beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6230–6238. <https://doi.org/10.1128/AEM.01465-08>
- Ackermann, H.-W., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology* 152, 227–243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Berngruber, T.W., Weissing, F.J., Gandon, S., 2010. Inhibition of Superinfection and the Evolution of Viral Latency. *Journal of Virology* 84, 10200–10208. <https://doi.org/10.1128/JVI.00865-10>
- Bertozi Silva, J., Storms, Z., Sauvageau, D., 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters* 363, fnw002. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
- Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar, C., Geider, K., 1998. Colonization of Host Plants by the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* Marked with Genes for Bioluminescence and Fluorescence. *Phytopathology* 88, 416–421. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.5.416>
- Born G.W. and Van der Zwet, T., 2000. Fire blight the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora* – Ed [Joël L. Vanneste](#) - Chapter 1 p37-55
- Born, Y., Fieseler, L., Marazzi, J., Lurz, R., Duffy, B., Loessner, M.J., 2011. Novel Virulent and Broad-Host-Range *Erwinia amylovora* Bacteriophages Reveal a High Degree of Mosaicism and a Relationship to Enterobacteriaceae Phages. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5945–5954. <https://doi.org/10.1128/AEM.03022-10>
- Burmeister, A.R., Abedon, S.T., Turner, P.E., 2019. Bacteriophage Ecology, in: Reference Module in Life Sciences. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90677-0>
- Campbell, A., 2003. The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews Genetics* 4, 471–477. <https://doi.org/10.1038/nrg1089>
- Cesbron «Interaction entre des mutants hrp d'*Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, le parent pathogène et la plante hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité», 2009, <https://www.researchgate.net/publication/41308561>
- Clokic, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S., 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Dedrick, R.M., Guerrero-Bustamante, C.A., Garlena, R.A., Russell, D.A., Ford, K., Harris, K., Gilmour, K.C., Soothill, J., Jacobs-Sera, D., Schooley, R.T., Hatfull, G.F., Spencer, H., 2019. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature Medicine* 25, 730–733. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
- D'Hérelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Compte rendu de l'Académie des Sciences*. 1917;165:373–5.
- Evans, T.J., Trauner, A., Komitopoulou, E., Salmond, G.P.C., 2010. Exploitation of a new flagellotropic phage of *Erwinia* for positive selection of bacterial mutants attenuated in plant virulence: towards phage therapy. *Journal of Applied Microbiology* 108, 676–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04462.x>
- Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., García, P., 2018. Application of Bacteriophages in the Agro-Food Sector: A Long Way Toward Approval. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00296>
- García, P., Martínez, B., Obeso, J.M., Rodríguez, A., 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology* 47, 479–485. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02458.x>
- Gianessi, L.P., C.S. Silver, S. Sankula, Carpenter, J.E. (2002). Plant biotechnology: current and potential impact for improving pest management in U.S. Agriculture an analysis of 40 case studies: Bacterial resistant apple. National Centre for Food and Agricultural Policy, Washington, D.C.
- Gill, J.J., Svircev, A.M., Smith, R., Castle, A.J., 2003. Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2133–2138. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2133-2138.2003>
- Hatoum-Aslan, A., 2018. Phage Genetic Engineering Using CRISPR–Cas Systems. *Viruses* 10, 335. <https://doi.org/10.3390/v10060335>
- Van der Zwet, T. and Keil, H.A., 1979. Fire bright, a bacterial disease of Rosaceous plants. *USDA Agricultural Hand- book*, 510, 1-200.

- Hoffmann, S., Batz, M.B., Morris, J.G., 2012. Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection* 75, 1292–1302. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-417>
- Jassim, S.A.A., Limoges, R.G., El-Cheikh, H., 2016. Bacteriophage biocontrol in wastewater treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2028-1>
- Joyce E. Loper., 1991. Evaluation of Streptomycin, Oxytetracycline, and Copper Resistance of *Erwinia amylovora* Isolated from Pear Orchards in Washington State ; Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture. <https://doi.org/10.1094/PD-75-0287>
- Kotila JE, Coons GH. Investigations on the blackleg disease of potato. Michigan Agricultural Experimental Station Technical Bulletin. 1925;67:3–29
- Mallmann WL, Hemstreet CJ. Isolation of an inhibitory substance from plants. *Agricultural Research*. 1924;28:599–02
- Mann, R.A., Smits, T.H.M., Bühlmann, A., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J.E., Plummer, K.M., Beer, S.V., Luck, J., Duffy, B., Rodoni, B., 2013. Comparative Genomics of 12 Strains of *Erwinia amylovora* Identifies a Pan-Genome with a Large Conserved Core. *PLoS ONE* 8, e55644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055644>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G., Foster, G.D., 2012 Top 10 plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology* 13, 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Nadeem, A., Wahl, L.M., 2017. Prophage as a genetic reservoir: Promoting diversity and driving innovation in the host community: BRIEF COMMUNICATION. *Evolution* 71, 2080–2089. <https://doi.org/10.1111/evo.13287>
- Nagy, J., Király, L., Schwarczinger, I., 2012. Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Open Life Sciences* 7, 1–12. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0093-x>
- Nelson, D., Loomis, L., Fischetti, V.A., 2001. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 4107–4112. <https://doi.org/10.1073/pnas.061038398>
- Piqué, N., Miñana-Galbis, D., Merino, S., Tomás, J., 2015. Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 12836–12854. <https://doi.org/10.3390/ijms160612836>
- Ravat F, Jault P, Gabard J. Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann Burns Fire Disasters*. 2015 Mar 31;28(1):13-20. French. Epub 2015 Mar 31. PubMed PMID: 26668557
- Rezzonico, F., Smits, T.H.M., Duffy, B., 2011. Diversity, Evolution, and Functionality of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) Regions in the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 3819–3829. <https://doi.org/10.1128/AEM.00177-11>
- Roach, D.R., Sjaarda, D.R., Castle, A.J., Svircev, A.M., 2013. Host Exopolysaccharide Quantity and Composition Impact *Erwinia amylovora* Bacteriophage Pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 3249–3256. <https://doi.org/10.1128/AEM.00067-13>
- Roach, D.R., Sjaarda, D.R., Sjaarda, C.P., Ayala, C.J., Howcroft, B., Castle, A.J., Svircev, A.M., 2015. Absence of lysogeny in wild populations of *Erwinia amylovora* and *Pantoea agglomerans*: Absence of lysogeny in *Erwinia* and *Pantoea* spp. *Microbial Biotechnology* 8, 510–518. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12253>
- Smits, T.H.M., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Frey, J.E., Duffy, B., 2010. Complete Genome Sequence of the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and Comparison to Other *Erwinia* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 384–393. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-4-0384>
- Torres-Barceló, C., 2018. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerging Microbes & Infections* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0169-z>
- Wang, X., Kim, Y., Ma, Q., Hong, S.H., Pokusaeva, K., Sturino, J.M., Wood, T.K., 2010. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nature Communications* 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms1146>
- Weinbauer, M.G., Rassoulzadegan, F., 2003. Are viruses driving microbial diversification and diversity?: Viruses and prokaryotic diversity. *Environmental Microbiology* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00539.x>
- Westra, E.R., Swarts, D.C., Staals, R.H.J., Jore, M.M., Brouns, S.J.J., van der Oost, J., 2012. The CRISPRs, They Are A-Changin’: How Prokaryotes Generate Adaptive Immunity. *Annual Review of Genetics* 46, 311–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155447>

Annexes

Tableau 1 : Liste des souches

strain_id	continent	country	Host	CRISPR	pfu	pfu_mL	logpfu	R
Ea209	Mediterranean	Israel		I	690		5,83884972014909	Sensible
Leb_A3	Mediterranean	Liban	<i>Malus domestica</i>	I	0		0	0 Resistant
Leb_B66	Mediterranean	Liban	<i>Cydonia sp.</i>	I	0		0	0 Resistant
JL1168	North America	USA	<i>Pyrus communis</i>	I	2630		6,41995591362071	Sensible
JL1185	North America	USA	<i>Pyrus communis</i>	III	2933		6,4673121105229	Sensible
Ea625a	North America	USA	<i>Rubus sp.</i>	R	4300		6,63346855657829	Sensible
AFRS2	North America	USA		III	936		5,97127631272769	Sensible
Ea88-100	North America	USA		III	0		0	0 Resistant
IH3-11colE1	North America	USA		IH	0		0	0 Resistant
SLAPI#3	North America	USA		A	0		0	0 Resistant
ATTC BAA-2158 / IL5 / Ea246	North America	USA	<i>Rubus sp.</i>	R	0		0	0 Resistant
IPN627	Mediterranean	Espagne	<i>Malus domestica</i>	I	445		5,64836098692249	Sensible
Ea110	North America	USA		I	1666		6,22167525775165	Sensible
UTRJ2	North America	USA	<i>Malus domestica</i>	II	536		5,72916559994291	Sensible
OR25/pEU30	North America	USA	<i>Pyrus communis</i>	III	1226		6,08849082441919	Sensible
Mo-35	North America	USA	<i>Malus domestica</i>	III	363		5,559907821438	Sensible
Mo-E-101b	North America	USA	<i>Malus domestica</i>	III	0		0	0 Resistant
LA036	North America	USA	<i>Pyrus communis</i>	A	0		0	0 Resistant
CFBP 3049	North America	Canada	<i>Malus domestica</i>	I	670		5,82607545090106	Sensible
CFBP 1367	Mediterranean	France		I	1276		6,10585101474119	Sensible
CFBP 3860	Europe	Hongrie	<i>Crataegus sp.</i>	I	7333		6,86528174422027	Sensible
CFBP 3098	Mediterranean	Israel	<i>Malus domestica</i>	I	2033		6,30813759226046	Sensible
CFBP 3020	Europe	Hollande	<i>Malus domestica</i>	I	430		5,63346946556558	Sensible
CFBP 1252	Europe	UK	<i>Pyrus communis</i>	I	2166		6,33565865279456	Sensible
CFBP 3792	North America	USA	<i>Prunus sp.</i>	II	1266		6,10243404872582	Sensible
CFBP 1430	Mediterranean	France	<i>Crataegus sp.</i>	I	8666		6,93781873481311	Sensible
CFBP 1232T	Europe	UK	<i>Pyrus communis</i>	I	0		0	0 Abortive
CFBP3056	Europe	Allemagne	<i>Cotoneaster bullata</i>		1566		6,19479203504909	Sensible
CFBP7736	Europe	Russie	<i>Malus domestica</i>		1466		6,16613426654954	Sensible
CFBP7540	Mediterranean	Maroc	<i>Pyrus communis</i>		6900		6,83884915367848	Sensible
CFBP7249	Mediterranean	France	<i>Pyrus communis</i>		710		5,85125896040101	Sensible
CFBP7284	Mediterranean	Italie	<i>Sorbus sp.</i>	I	13333		7,12492791168343	Sensible
Ea1	Mediterranean	France	<i>Pyrus communis</i>		0		0	0 Abortive
Ea5	Mediterranean	France	<i>Pyrus communis</i>		0		0	0 Resistant
Ea4	Mediterranean	France	<i>Pyrus communis</i>		1933		6,28623207870231	Sensible

Tableau 2 : Liste des échantillons

ID	Date	Location	Type of production	Material	Tree	Variety	Notes
1	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	pear	NA	Fire blight in 2017
2	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	pear	NA	Fire blight in 2017
3	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	pear	NA	Fire blight in 2017
4	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	pear	NA	Fire blight in 2017
5	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	apple	NA	Fire blight in 2017
6	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	quince	NA	Fire blight in 2017
7	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	apple	NA	Fire blight in 2017
8	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	apple	NA	Fire blight in 2017
9	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	quince	NA	Fire blight in 2017
10	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	quince	NA	Fire blight in 2017
11	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	pear	NA	Fire blight in 2017
12	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	pear	NA	Fire blight in 2017
13	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	apple	NA	Fire blight in 2017
14	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	quince	NA	Fire blight in 2017
15	10/08/2018	Remollon	conventional	aerial part	pear	NA	Fire blight in 2017
16	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	soil	apple	Rozyglo	2 years (2017-2018) of fire blight, no symptoms, sanitized trees
17	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	soil	apple	Rozyglo	2 years (2017-2018) of fire blight, no symptoms, sanitized trees
18	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	soil	apple	Rozyglo	2 years (2017-2018) of fire blight, no symptoms, sanitized trees
19	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	branch on the floor	apple	Rozyglo	2 years (2017-2018) of fire blight, no symptoms, sanitized trees
20	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	soil	apple	Rozyglo	Snatched plot in October 2018
21	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	soil	apple	Rozyglo	Snatched plot in October 2018
22	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	soil	pear	Rozyglo	2 years (2017-2018) of fire blight, no symptoms, sanitized trees
23	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	soil	pear	Rozyglo	2 years (2017-2018) of fire blight, no symptoms, sanitized trees
24	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	soil	apple	Galla	2 years (2017-2018) of fire blight, no symptoms, sanitized trees
25	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	soil	apple	Galla	2 years (2017-2018) of fire blight, no symptoms, sanitized trees
26	04/04/19	Mallemort - Confiné	conventional	soil	apple	Galla	2 years (2017-2018) of fire blight, no symptoms, sanitized trees
27	04/04/19	Pugère	conventional	branch	apple	Galla	black tree, not sure it is fire blight
28	04/04/19	Graveson	organic	branch	pear	Guyot	Some symptomatic trees (dry branches)
29	04/04/19	Graveson	organic	branch	pear	Guyot	Some symptomatic trees (dry branches)
30	04/04/19	Graveson	organic	branch	pear	Guyot	Some symptomatic trees (dry branches)
31	04/04/19	Graveson	organic	branch	pear	Guyot	Some symptomatic trees (dry branches)
32	04/04/19	Graveson	organic	branch	pear	Guyot	Some symptomatic trees (dry branches)
33	04/04/19	Graveson	organic	branch	pear	Guyot	Some symptomatic trees (dry branches)
34	04/04/19	Graveson	organic	branch	pear	Guyot	Some symptomatic trees (dry branches)
35	04/04/19	Graveson	organic	branch	pear	Guyot	Some symptomatic trees (dry branches)
36	04/04/19	Graveson	organic	branch	pear	Guyot	Some symptomatic trees (dry branches)
37	29/03/19	Pugère	conventional	Branch, flowers, soil	apple	Rozyglo	Symptomatic tree (dry branches)
38	29/03/19	Pugère	conventional	Branch, flowers, soil	apple	Rozyglo	Symptomatic tree (dry branches)
39	29/03/19	Pugère	conventional	Branch, flowers, soil	apple	Rozyglo	Symptomatic tree (dry branches)

Résumé

Le feu bactérien est une maladie de plantes qui affecte les *Maloidae*, une sous-famille des *Rosaceae*. Provoquée par une bactérie nommée *Erwinia amylovora*, cette maladie engendre des dégâts considérables dans le secteur agronomique et les moyens de lutte actuels sont inefficaces ou absents. Par conséquent, le développement d'une stratégie de contrôle efficace du feu bactérien, économiquement abordable et respectueux de l'environnement, est un défi prioritaire pour la production de fruits en région PACA et en France. Les bactériophages sont des virus capables d'infecter spécifiquement les bactéries, et sont des bons candidats en tant qu'agents de biocontrôle d'un large éventail de pathosystèmes, dont du feu bactérien. Les objectifs de cette étude étaient d'isoler et de caractériser des nouveaux bactériophages infectant *E. amylovora* et d'évaluer leur gamme d'hôtes contre un panel de souches de cette bactérie. Dans un premier temps, nous avons aussi identifié des souches locales de l'agent causal du feu bactérien pour la première fois en France depuis 2009. Nous avons seulement isolé un phage contre *E. amylovora*, sûrement à cause de la période d'échantillonnage, dont la bactérie se trouvait en période de latence. Ce nouveau bactériophage possédait une gamme d'hôtes large chez les souches de cette bactérie, trait important en tant que candidat au biocontrôle. Nous poursuivons dans la recherche de nouveaux bactériophages en une période de l'année plus propice et dans l'étude des interactions possibles entre la bactérie et les phages dans une perspective de biocontrôle.

Abstract

Fire blight is a plant disease that affects *Maloidae*, a subfamily of *Rosaceae*. Caused by a bacterium called *Erwinia amylovora*, this disease causes considerable damage in the agronomic sector and the current control methods are ineffective or absent. Therefore, the development of an efficient fire blight control strategy, economically affordable and environmentally friendly, is a priority challenge for fruit production in the PACA region and in France. Bacteriophages are viruses that can specifically infect bacteria, and are good candidates for biocontrol agents for a wide range of pathosystems, including fire blight. The objectives of this study were to isolate and characterize new bacteriophages infecting *E. amylovora* and to evaluate their range of hosts against a panel of strains of this bacterium. First of all, we have also identified local strains of fire blight causal agent for the first time in France since 2009. We have only isolated a phage against *E. amylovora*, probably because of the sampling period, whose bacterium was in a latency period. This new bacteriophage has a wide host range in this bacterium strains, an important trait as a biocontrol candidate. We continue to search for new bacteriophages at a more favorable time of year and in the study of possible interactions between the bacterium and phages in a biocontrol perspective.