Les biofilms de rivières, réservoirs de bactéries phytopathogènes ?
Une approche d'écologie globale dans le bassin de la Durance

Contexte de la recherche

Pour tenter de mieux prévoir les risques d'émergence ou de réémergence d'agents pathogènes, les écologistes en santé humaine se sont engagés ces dernières années dans une approche d'écologie globale, en opérant un changement d'échelle (Cangelosi et al. 2004 ; Guégan et al. 2007). Cette approche est développée dans le domaine de la santé des plantes par le partenaire « INRA-Patho » de ce projet, sur le modèle « *Pseudomonas syringae* » étudié à l'échelle du bassin versant et non plus à celle de la plante ou de la parcelle (Morris et al. 2009). Ce modèle a été choisi car des études récentes ont révélé que l'écologie de cette bactérie phytopathogène est étroitement liée au cycle de l'eau douce (Morris et al. 2008), alors que *P. syringae* est principalement étudiée de par le monde lors de l'interaction pathogène qu'elle produit sur un grand nombre de plantes économiquement importantes. *P. syringae* possède un système de sécrétion de type III pour la translocation d'une grande variété d'effecteurs (Ma et al. 2006) délivrés aux cellules végétales pouvant conduire à la suppression des défenses de la plante et à la maladie. Les déterminants de la spécificité d'hôte restent mal identifiés (Sarkar et al. 2006). La prévention est actuellement le meilleur moyen de lutte contre les épidémies provoquées par *P. syringae* et l'approche d'écologie globale apparaît pertinente voire nécessaire pour que cette prévention soit efficace.

P. syringae est une bactérie qui colonise de nombreux habitats y compris hors des agrosystèmes et on la retrouve dans la neige, les eaux de pluie et de ruissellement, dans les ruisseaux, les rivières, les lacs, les biofilms des rivières, sur les plantes sauvages et dans les nuages (Morris et al. 2007, 2008). Le compartiment que nous proposons d'étudier dans ce projet ECCOREV est celui des biofilms de rivières, les autres compartiments étant traités par ailleurs. Ces biofilms sont des assemblages biologiques complexes dans lesquels les bactéries sont très abondantes et où les micro-algues dominent par leur biomasse (Werner 1977). Les interactions entre bactéries et microalgues sont étudiées depuis peu et peuvent être mises en parallèle avec celles entre les plantes autotrophes et leur cortège microbien rhizosphérique hétérotrophe bien étudiées par le partenaire CNRS-Cadarache : relations trophiques, rôle des exsudats dans la structure des communautés bactériennes (Sapp et al. 2007, Haichar et al. 2008), influence des bactéries sur la sensibilité aux métaux des algues (Levy et al. 2009), influence des métabolites secondaires (Bressan et al. 2009 ; Leflaive & Ten-Hage, 2007) par exemple. Parmi les microalgues, les diatomées sont les plus fréquemment rencontrées dans les biofilms de rivière. Ce groupe est utilisé comme bioindicateur de pollution des eaux douces à travers l'Indice Biologique Diatomées, (IBD normes AFNOR) utilisé dans des réseaux de suivi de la qualité des rivières (Etor & Rimet 2005 ; Directive Cadre de l'Eau européenne). Des méthodes de micro-respirométrie adaptées aux biofilms sont développées par le partenaire INRA-Emmah pour caractériser de façon globale la diversité catabolique au niveau de la communauté microbienne hétérotrophe et sa sensibilité aux polluants.

Nous avons rassemblé les compétences autour de la question du risque que ces biofilms constituent un réservoir de souches phytopathogènes de *P. syringae* dans les rivières du bassin de la Durance dont les eaux irriguent en aval des zones agricoles. Rien n'est connu sur la diversité et la dynamique des populations de *P . syringae* qui coexistent dans ces biofilms avec des microalgues. Rien n'est connu non plus sur le rôle (négatif ou positif) que pourraient avoir ces biofilms suivant la structure des communautés qui les composent, dans la sélection et/ou l'enrichissement en bactéries phytopathogènes plus ou moins agressives. Ceci soulève la question du rôle des microalgues de biofilms épilithes dans la diversité et l'évolution du pouvoir pathogène de cette bactérie et peut-être d'autres agents pathogènes.

Références

Bressan M. Roncato M.A., Bellvert F., Comte G., Haichar F.Z., Achouak W., Berge O., 2009. Exogenous glucosinolate produced by *Arabidopsis thaliana* has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. ISME Jl 3 (11) 1243-1257.

Cangelosi G A, Freitag N E & Buckley M R 2004. From outside to inside: Environmental microorganisms as human pathogens. A report of the American Academy of Microbiology, Washington, DC (USA), http://www.asm.org/ASM/files/ccLibraryFiles/FILENAME/000000001402/EnvironMicroBW.pdf, 18 p.

Ector L & Rimet F 2005. Using bioindicators to assess rivers in Europe: An overview. In Lek S., Scardi M., Verdonschot P.F.M., Descy J.-P., Park Y.S. (eds), Modelling community structure in aquatic ecosystems. Springer Verlag, 7-19. pdf

Guégan JF, Constantin de Magny G, Durand P & Renaud F 2007. Écologie de la santé: le Macroscope comme nouvel outil ! in "Écologie et Évolution des systèmes parasités. Thomas F, Renaud F, Guégan JF Eds. De Boeck Université, Paris, France. 301-344.

Haichar F Z, Achouak W, Christen R., Heulin T, Marol C, Marais M F, Mougel C, Ranjard L, Balesdent J & Berge O 2007. Identification of cellulolytic bacteria in soil by Stable Isotope Probing. Environ Microbiol 9 (3), 625-634**.**

Leflaive J & Ten-Hage L 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolistes in freshwaters a comparison of allelopathic compounds and toxins. Freshwater Biol, 52, 199-214.

Levy J L, Stauber J L, Wakelin S A & Jolley D F 2009. The effect of bacteria on sensitivity of microalgae to copper in laboratory bioassays. Chemosphere, 74, 1266-1274.

Ma W, Dong F F T, Stavrinides J & Guttman D S 2006. Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. PloS Genet 2 (12), 2131-2142.

Morris C E, Bardin M, Kinkel L L, Moury B, Nicot P C, and Sands D C 2009. Expanding the Paradigms of Plant Pathogen Life History and Evolution of Parasitic Fitness beyond Agricultural Boundaries. PLoS Pathog 5(12)

Morris C E, Kinkel L L, Xiao K, Prior P & Sands D 2007. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Infect Genet Evol 7, 84-92.

Morris C E, Sands D C, Vinatzer B A, Glaux C, Guilbaud C, Buffière A, Yan S, Dominguez H & Thompson BM 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. The ISME Journal 2, 321-334.

Sap M, Schwaderer A S, Wiltshire K H, Hoppe H G, Gerdts G & Wichels A 2007. Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae. Microb Ecol, 53, 683-699.

Sarkar F S, Gordon J S, Martin G B & Guttman D S 2006. Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. Genetics 174, 1041-1056.

Werner D 1977. The Biology of Diatoms. Univ California Press, Berkeley p 250

Objectifs de la demande

Ce projet exploratoire est centré sur l'étude des communautés microbiennes, bactéries et microalgues, coexistant avec des populations de *P. syringae* dans les biofilms épilithes, à l'échelle du bassin versant de la Durance. On s'intéresse à ces populations le long du gradient croissant d'anthropisation depuis les Alpes jusqu'au confluent avec le Rhône.

L'objectif est d'étudier d'une façon générale la stabilité de ces peuplements (bactéries, algues...) en fonction du site et de la date, et plus précisément de déterminer s'il existe un lien entre la présence de certains pathotypes de *P. syringae* et certaines espèces de diatomées. On cherchera à relier la qualité des eaux de rivière et la présence et/ou la diversité de *P. syringae.* Nous proposons pour cela une approche « terrain » pour l'étude des biofilms épilithes de rivières hors système de culture en haute Durance, et en zone agricole en basse Durance.

Suite prévue pour le projet

L'eau douce représente un enjeu très important pour l'humanité et sa gestion est très encadrée au niveau européen. Ce projet qui démarre rassemble actuellement des chercheurs en Écologie Microbienne en Phytopathologie et en Écotoxicologie aquatique, qui s'intéressent à la diversité microbienne, à son rôle et à sa dynamique dans l'environnement. Ce projet sera l'occasion de développer des partenariats (Eccorev, Agences de bassin, …) pour étudier

l'impact des principales sources de pollution des eaux de la Durance sur les biofilms et les populations de *P. syringae* qui les habitent. L'approche « terrain » destinée à mieux connaître la diversité naturelle des souches bactériennes et algales qui cohabitent dans les biofilms sera suivie d'une approche « labo » prévue pour tester les hypothèses sur ces interactions biotiques. Des tests pour déterminer les fitness bactériennes en co-culture avec des microalgues en milieu liquide et en biofilm sont prévus. La collection de souches de *P. syringae* du partenaire INRA-Patho représentant une grande partie de la diversité de cette espèce sera criblée afin de poser les bases de la diversification bactérienne. Ces premiers résultats serviront de base pour répondre aux futurs appels d'offre, FRB, ANR…

Réalisations prévues

Rien n'est connu des partenaires microbiologiques que rencontrent les populations de *P. syringae* dans leur cycle au fil de l'eau. Ce projet propose de caractériser dans les mêmes biofilms épilithes la diversité microbienne par une méthode de fingerprints (DGGE) et la diversité et l'agressivité des *P. syringae*. le partenaire INRA-Patho développe un projet plus large en collaboration avec l'INRA-Emmah, portant sur la neige, l'eau, les nuages, les plantes alpines dans des sites du bassin versant de la Durance qui pourra bénéficier à ce projet ECCOREV. Les étapes de la réalisation du projet Eccorev sont les suivantes :

1 – Échantillonnage sur le terrain. Des échantillons de biofilms de rivière, prélevés à l'automne 2009 sont en cours d'étude (3 sites à l'amont, 3 échantillons/prélèvement). Une nouvelle campagne de prélèvements est prévue au printemps-été 2010 dans les 3 sites à l'amont et dans des sites à l'aval à définir en relation avec le Réseau National de Bassin (Agence de l'eau).
2a – Isolement des populations de *P. syringae* par une technique sélective, identification et mise en collection pour caractériser des propriétés liées au pouvoir pathogène.
2b – Identification de la communauté des microalgues (diatomées) par microscopie avec l'aide d'un laboratoire spécialisé (INRA Thonon-les-Bains). Calcul de l'IBD.
2c – Sur les mêmes échantillons, extraction de l'ADN métagénomique
2d – Sur les mêmes échantillons, caractérisation de la diversité catabolique microbienne (sur substrats carbonés), par micro-respirométrie.
3 – Caractérisation de la diversité moléculaire par DGGE de gènes codant pour l'ARN ribosomique.
4 – Comparaison de la structure des communautés pour les différents échantillons. Étude des sources de variabilité et identification de situations particulières (peu de diversité par exemple).
5 - Identification des populations dominantes d'intérêt par séquençage des bandes DGGE (avec ou sans étape de clonage). Les bactéries et les chloroplastes des algues sont identifiés par l'ADNr16S et les microeukaryotes par l'ADNr 18S.
6 - Dans les biofilms, les grands groupes présents pourront être visualisés avec des sondes fluorescentes en microscopie confocale.

Résultats attendus

Une meilleure connaissance du contexte biologique des biofilms épilithes à différents niveaux du bassin de la Durance : espèces bactériennes et groupes de diatomées dominants, agressivité des *P. syringae*. Lien entre groupes de diatomées et pathotypes de *P. syringae*.

Plan financier succinct

BUDGET DEMANDÉ À ECCOREV	Montant (k€)
Equipement (préciser)	0
Fonctionnement	
Isolement P. syringae, caractérisation et tests sur plantes	3,2
Diversité moléculaire microbiennes en DGGE	1,5
Diversité fonctionnelle des biofilms	0,5
Missions	
Prélèvements sur le terrain (3 sites, 3 dates, amont, aval)	1,0
Avignon - Cadarache pour DGGE	1,0
Réunions	0,5
Stagiaire	
Stagiaire IUT Avril-Juin 2011	1,2
Frais généraux	0,36
TOTAL (2) = 9,26 k€	

Description courte du mode d'interaction prévu entre les équipes

Les manipes seront partagées entre les équipes d'Avignon et de Cadarache qui travailleront sur les mêmes échantillons et valoriseront les résultats ensembles. Un stagiaire sera recruté dans l'équipe INRA-Patho pour réaliser l'échantillonnage de terrain, la caractérisation des *P. syringae* et l'activité catabolique. Une étudiante d'Avignon sera formée à la DGGE à Cadarache. Une réunion de travail sera organisée au départ et à la fin (et plus si nécessaire).

Description du consortium : liste des participants (avec leur statut et le pourcentage d'implication)

Nom, prénom	Statut	%	Équipe	Laboratoire
Berge Odile	CR1 CNRS	70 %	Bactériologie	Cadarache : CNRS-UMR 6191 & Avignon : INRA-Patho UR 407
Morris Cindy	DR INRA	10 %	Bactériologie	Avignon : INRA-Patho UR 407
Glaux Catherine	T INRA	20 %	Bactériologie	Avignon : INRA-Patho UR 407
Guilbaud Caroline	T INRA	5 %	Bactériologie	Avignon : INRA-Patho UR 407
Monteil Caroline	Doctorante	10 %	Bactériologie	Avignon : INRA-Patho UR 407
xxx	Stagiaire IUT	100 %	Bactériologie	Avignon : INRA-Patho UR 407
Achouak Wafa	CR1 CNRS	5 %	LEMIRE	Cadarache : CNRS-UMR 6191
Santaella Catherine	CR1 CNRS	5 %	LEMIRE	Cadarache : CNRS-UMR 6191
Bérard Annette	IC GREF	10 %	EMMAH	Avignon : INRA-UMR 1114

CV porteure Équipe Bactériologie INRA UR 407-Avignon

Odile BERGE, CR1-CNRS
odile.berge@avignon.inra.fr; Tél / Fax: 04 32 72 28 86 / 28 42

Spécialité : Écologie microbienne

Affectation et thématique:
Unité de Pathologie Végétale UR 407, INRA-PACA . ***Écologie des agents phytopathogènes hors des agrosystèmes. Interaction algues* - Pseudomonas syringae *dans les biofilms aquatiques***

Formation, carrière
2009 **Mobilité, mise à disposition** à l'INRA-PACA, Montfavet
1996 **Mobilité**, CNRS-CEA-Univ Mediterannee, Cadarache
1995 **Passage CR1** CNRS-CEA-Univ Mediterannee, Cadarache
1991 **Recrutement CR2** CNRS, CPB, CNRS Nancy
1989 **Ingénieure de Recherche** contractuelle, CPB, CNRS Nancy
1988 **Doctorat** d'agronomie de l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL)
1984 **Ingénieur Agronome** de l'ENSAIA, INPL, Nancy

Recherche : > 30 publications. Participation congrès.

Expertise
Relectrice des revues scientifiques, **Jury de thèse, Comité d'évaluation** (INRA)**, Jury de concours de recrutement** (INRA)**, Expertise de projet** (IFS), **Membre de conseils d'unités** (CNRS, CEA)

Sélection de trois publications en rapport avec le projet
Bressan M. Roncato M.A., Bellvert F., Comte G., Haichar F.Z., Achouak W., **Berge O. 2009**. Exogenous glucosinolate produced by *A. thaliana* has an impact on µbes in the rhizosphere and plant roots **ISME J** 1-15
Berge O., Lodhi A., Brandelet G., Santaella C., Roncato M., Christen R., Heulin T., Achouak W. **2009**. *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. **Int J Syst Evol Microbiol** 59 (2), 367 - 372
Santaella C., Schue M., **Berge O**., Heulin T. and Achouak W. **2008**. The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. **Environ Microbiol**10 (8), 2150 – 2163

CV porteure Équipe LEMIRE CNRS UMR 6191-Cadarache

Wafa ACHOUAK

Domaine de recherche : Plant-microbe interactions

Affectation: UMR 6191 CNRS-CEA-Université Aix-Marseille II,
« *Biologie Végétale et Microbiologie Environnementales* »

1993 Thèse de Doctorat en Écologie Microbienne, Université Henri Poincaré, Nancy
1994 Stage post-doctoral USDA, Beltsville, USA
1994 **Chargée de Recherche CR2**, CNRS UPR 6831 Vandœuvre-lès-Nancy
1995- Mobilité pour UMR 6191 CNRS-CEA-Université Aix-Marseille II, Cadarache
1999- **Chargée de Recherche CR1**, CNRS
2002 Habilitation à Diriger des Recherches (**HDR**), Université Aix-Marseille II.
2004- **Responsable du LEMiRE** « Équipe d'Écologie Microbienne de la Rhizosphère et d'Environnements extrêmes »

Production scientifique:
48 publications (PloS Genetics, PloS One, ISME J., 2 J. Bacteriol., 4 Env. Microbiol., 2 Environ. Sci. Technol., 13 IJSEM); 2 brevets

Membre de :
Comité d'évaluation du programme ANR VMC (2007)
Comité d'évaluation du programme ANR « La 6ème Extinction » (2009-)
CS d'Action Thématique Microbiologie Environnementale (EC2CO, CNRS) (2006-)
CS d'Action Thématique CYTRIX (EC2CO, CNRS) (2006-)
CS des « Rencontres plantes-bactéries », Aussois (2005-)

CA AFEM (2004-)

Associate Editor pour Microbiology.

Sélection de trois publications

ERABLE B., RONCATO MA., **ACHOUAK W.** & A. BERGEL. (**2009**). Sampling natural biofilms: a new route to build efficient microbial anodes,. ***Environ. Sci. Technol***.

HAICHAR F-Z, MAROL C., BERGE O., RANGEL-CASTRO J. I., PROSSER J. I., BALESDENT J., HEULIN T., & **W. ACHOUAK** (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. ***ISME J. 2:1221-30***

VANDECANDELAERE I, NERCESSIAN O, FAIMALI M, SEGAERT E, MOLLICA A, **ACHOUAK W**, DE VOS P, VANDAMME P. (**2009**). Bacterial diversity of the cultivable fraction of a marine electroactive biofilm. ***Bioelectrochemistry.*** [Epub ahead of print]

CV porteure équipe EMMAH INRA UMR1114-Avignon

Annette Bérard IC GREF ***Spécialité : Écologie microbienne, écotoxicologie***
a.berard@avignon.inra.fr; Tél / Fax: 04 32 72 22 28 / 22 12

Affectation :
Depuis 2007 : IC GREF détachée INRA, Scientifique dans l'équipe Environnement Méditerranéen et Modélisation des AgroHydrosystèmes (EMMAH) 1114 INRA/UAPV de l'INRA-PACA,
Impact des stress d'origine chimique sur les communautés microbiennes des biofilms de rivière. Impact des stress d'origine climatique sur les communautés microbiennes des sols agricoles méditerranéens.

Formation Universitaire et Expériences de recherche
2006- 2007 Scientifique dans l'équipe d'écologie microbienne des milieux anthropisés du Cemagref de Lyon.
2003-2006 Expert national et européen écotoxicologue pour la Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole.
2002 diplôme d'Habilitation à Diriger les Recherches, spécialité Ecologie, à **l'Université d'Avignon**
1994-2003 Chargée de Recherche au laboratoire Dynamique et Evolution des Communautés Algales de l'UMR CARTELL INRA-Université de Chambéry, animation de l'équipe «écotoxicologie algale». Chargée de Recherche au Laboratoire de Toxicologie Environnementale de l'UMR 406 INRA–Université d'Avignon, création d'un nouveau thème scientifique sur les algues, bio-indicateurs de pollutions des sols
1993 diplôme de Doctorat, spécialité Hydrobiologie au **Muséum National d'Histoire Naturelle**, Paris
1989 diplôme d'Ingénieur d'Agronomie, Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agronomiques Appliquées (**Dijon**).
1988 diplôme d'Ingénieur Agronome de l'ENSA de **Toulouse**, spécialité Productions Animales

Recherche > 30 publications. Participation congrès.

Expertise
Relectrice des revues scientifiques , **Jurys et commités de thèse, Jury de concours de recrutement** (INRA)**, Expertise de projets** (ANR, IRSN, FNSRS, FNRL), **Membre** Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole

Sélection de trois publications

Tlili A., **Bérard** A, Roulier J-L, Volat B., Montuelle B, 2010. PO4 dependence of biofilm autotrophic and heterotrophic communities tolerance to copper and diuron. Sous presse *Aquatic Toxicology*

Tlili A., Dorigo U., Montuelle B., Margoum C., Carluer N., Gouy V., Bouchez A., **Bérard** A.' 2008 Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron. An experimental study simulating flooding events in a small river running through a vineyard watershed. *Aquatic Toxicology* 87 : 252-263.

Bérard A., Dorigo U., Humbert J.F, Martin F., 2005. Microalgae community structure analysis based on 18S rDNA amplification from DNA extracted directly from soil as a potential soil bioindicator. *Agronomie 25 : 285-291*.