



HAL
open science

Evolution expérimentale de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* : bases génétiques et épigénétiques de l'adaptation à l'hôte

Alice Guidot

► **To cite this version:**

Alice Guidot. Evolution expérimentale de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* : bases génétiques et épigénétiques de l'adaptation à l'hôte. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier); Florian FRUGIER, Directeur de Recherche CNRS, Paris Rapporteur; Marie-Agnès JACQUES, Directeur de Recherche INRA, Angers Rapporteur; Denis FAURE, Directeur de Recherche CNRS, Paris Examineur; Jean-Baptiste FERDY, Professeur Université Toulouse III, Toulouse Examineur; Stéphane GENIN, Directeur de Recherche CNRS, Toulouse Examineur; Stéphane POUSSIER, Professeur Université de La Réunion, Saint-Pierre Examineur, 2019. tel-04213544

HAL Id: tel-04213544

<https://hal.inrae.fr/tel-04213544v1>

Submitted on 21 Sep 2023

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

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



Mémoire

En vue de l'obtention de

L'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

Délivrée par l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Alice GUIDOT

Chargée de Recherche, INRA

**Evolution expérimentale de la bactérie phytopathogène
Ralstonia solanacearum :
bases génétiques et épigénétiques de l'adaptation à l'hôte**

Le 15 Novembre 2019

Unité de recherche :

Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM) UMR CNRS/INRA-2594/441

Composition du jury :

Julien BRILLARD, Chargé de Recherche INRA, Montpellier	Rapporteur
Florian FRUGIER, Directeur de Recherche CNRS, Paris	Rapporteur
Marie-Agnès JACQUES, Directeur de Recherche INRA, Angers	Rapporteur
Denis FAURE, Directeur de Recherche CNRS, Paris	Examineur
Jean-Baptiste FERDY, Professeur Université Toulouse III, Toulouse	Examineur
Stéphane GENIN, Directeur de Recherche CNRS, Toulouse	Examineur
Stéphane POUSSIER, Professeur Université de La Réunion, Saint-Pierre	Examineur

SOMMAIRE

1. Curriculum Vitae	3
1.1. Etat civil.....	3
1.2. Formation Universitaire.....	3
1.3. Parcours Professionnel.....	3
1.4. Direction de Projets sous contrat.....	4
1.5. Responsabilités collectives.....	4
1.6. Activité d'expertise.....	5
1.7. Bilan des publications.....	5
1.8. Communications orales et posters.....	8
2. Enseignement et encadrement	10
2.1. Enseignement.....	10
2.2. Encadrement d'étudiants en stage.....	10
2.3. Encadrement doctoral.....	11
3. Synthèse des activités de Recherche	13
3.1. Structure et dynamique des populations de champignons.....	13
3.1.1. Analyse des populations du champignon ectomycorhizien <i>Hebeloma cylindrosporum</i> associées au pin maritime.....	13
3.1.2. Localisation des mycéliums parents chez l'Ascomycète décomposeur du bois brûlé <i>Daldinia loculata</i> par analyse du polymorphisme de gènes nucléaires.....	16
3.2. Génomique évolutive chez la bactérie phytopathogène <i>Ralstonia solanacearum</i>	18
3.2.1. Biodiversité naturelle des génomes de <i>R. solanacearum</i>	19
3.2.2. Transferts horizontaux de gènes chez <i>R. solanacearum</i>	21
3.2.3. Evolution expérimentale.....	36
3.2.4. Caractérisation fonctionnelle d'EfpR.....	58
4. Projet de Recherche	87
Rôle des modifications épigénétiques chez <i>Ralstonia solanacearum</i> dans l'adaptation à l'hôte ...	87
4.1. Laboratoire.....	87
4.2. Contexte.....	87
4.2.1. Rôle de la Méthylation de l'ADN chez les bactéries.....	87
4.2.2. Variation du profil de méthylation de l'ADN et adaptation à un nouvel environnement.....	91
4.2.3. Nouvelles méthodes de détection de la méthylation de l'ADN chez les bactéries.....	91

4.3. Objectifs	92
Données préliminaires importantes pour le projet	93
4.4. Méthodologie et résultats attendus.....	94
4.4.1. Méthylome et méthyltransférases de la souche de référence GMI1000	94
4.4.2. Comparaison des méthylomes et des répertoires de méthyltransférases entre différentes souches de <i>R. solanacearum</i>	96
4.4.3. Variation des méthylomes et des transcriptomes entre le clone ancestral GMI1000 et ses clones dérivés obtenus par évolution expérimentale.....	99
4.4.4. Caractérisation des modifications du méthylome conférant des traits adaptatifs sur plante.....	100
4.5. Conclusion.....	101
Références.....	102

1. CURRICULUM VITAE

1.1. ETAT CIVIL

Alice GUIDOT

Née le 29 avril 1974 à Lyon 04
Chargée de Recherche CRCN INRA

Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM)

UMR CNRS-INRA 2594/441
Chemin de Borde-Rouge - Auzeville
BP 52627
31326 Castanet Tolosan Cedex
FRANCE
Tel: (+33) 05 61 28 55 92
Email: alice.guidot@toulouse.inra.fr

1.2. FORMATION UNIVERSITAIRE

2000	Doctorat spécialité <i>Biologie et Génétique des Populations</i>	Université Lyon 1
1997	DEA <i>Ecologie Microbienne</i>	Université Lyon 1
1996	MST <i>Chimie et biologie Végétale</i>	Université Lyon 1
1994	DUT <i>Biologie Appliquée</i>	Université Lyon 1

1.3. PARCOURS PROFESSIONNEL

Depuis 2014	CR1 INRA (actuel CRCN) : Evolution expérimentale de la bactérie phytopathogène <i>Ralstonia solanacearum</i> - Bases moléculaires de l'adaptation à l'hôte. <i>LIPM, Castanet Tolosan.</i>
2010-2014	CR2 INRA : Evolution expérimentale de la bactérie phytopathogène <i>Ralstonia solanacearum</i> - Bases moléculaires de l'adaptation à l'hôte. <i>LIPM, Castanet Tolosan.</i>
2008-2010	POST-DOCTORAT (Contrat ANR) : Evolution expérimentale de la bactérie phytopathogène <i>Ralstonia solanacearum</i> - Bases moléculaires de l'adaptation à l'hôte. <i>LIPM, Castanet Tolosan.</i>
2004-2007	POST-DOCTORAT (CDD 18 mois au CIRAD puis Contrat de Chercheur associé à l'Université de La Réunion) : Génomique évolutive chez la bactérie phytopathogène <i>Ralstonia solanacearum</i> . <i>Pôle de Protection des Plantes, UMR CIRAD Université, Saint-Pierre, La Réunion.</i>
2001-2003	POST-DOCTORAT (Bourse de la fondation suédoise Carl Trygger) : Localisation des mycéliums parents dans une population de l'Ascomycète décomposeur du bois brûlé <i>Daldinia loculata</i> . Influence de la fréquence des feux de forêt sur la structure génétique et la dynamique des populations du champignon ectomycorhizien <i>Lactarius mammosus</i> . <i>Département de Mycologie et Pathologie Forestière, Uppsala, SUÈDE.</i>

- 2000-2001 **ATER** : Répartition spatiale du mycélium du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* dans le sol. *Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM), UMR CNRS Université, Lyon.*
- 1997-2000 **THÈSE** (Bourse MENRT et Monitorat): Effet de l'environnement sur la structure génétique et la dynamique des populations du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*. *LEM, Lyon.*
- 1996-1997 **DEA** : Analyse du polymorphisme de l'espaceur intergénique de l'ADN ribosomique du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*. *LEM, Lyon.*

1.4. DIRECTION DE PROJETS SOUS CONTRAT

- 2017-2021 **ANR PRC (484 k€)** EPI-PATH - Role of Epigenetic Modifications in a Plant Pathogen during Host Jump and Adaptation.
- 2017 **FRAIB - LabEx TULIP InterUnités (19 k€)** HAWAI - Epigenetic modifications in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* during experimental evolution on resistant tomato.
- 2016-2017 **INRA - SPE (40 k€)** DiscrIMet - Discrimination of bacterial subpopulation by their DNA-methylation pattern.
- 2015-2016 **INRA - SPE (20 k€)** Rôle du régulateur de transcription, *efpR*, dans la transmission de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*.
- 2011-2012 **INRA - SPE (40 k€)** Analyse fonctionnelle d'un gène candidat impliqué dans l'adaptation de la bactérie *Ralstonia solanacearum* à sa gamme d'hôtes.
- 2011 **FRAIB (10 k€)** Compromis évolutifs dans l'adaptation à l'hôte chez la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*.

1.5. RESPONSABILITES COLLECTIVES

- 2016 Co-responsable du Comité d'Organisation du congrès international « *International Bacterial Wilt Symposium* », Toulouse, 3-7 juillet 2016.
- Depuis 2015 Membre du Comité Scientifique du LabEx TULIP, Toulouse.
- Depuis 2014 Membre du Comité Scientifique du congrès national « *Rencontres Plantes-Bactéries* » d'Aussois.
- 2014-2016 Membre du groupe d'Animation de l'axe IPPE (Interactions Plantes-Pathogènes-Environnement), LIPM Castanet Tolosan.
- Depuis 2010 Membre du groupe de Formation des utilisateurs du L2, LIPM Castanet Tolosan.
- 2009-2010 Représentant hygiène et sécurité des non-permanents, LIPM Castanet Tolosan.

1.6. ACTIVITE D'EXPERTISE

Jury de Doctorats

- 2018 **Amaury Payelleville** - Étude de la méthylation de l'ADN chez *Photobacterium luminescens* TT01 – DGIMI, Montpellier.
- 2018 **Thibault Meyer** - La dégradation des acides hydroxycinnamiques comme signal de perception de la plante : régulation et rôle dans l'écologie d'*Agrobacterium fabrum* – LEM, Lyon.

Comités de Thèse

- 2019-2021 **Manon Paineau** - Adaptation du mildiou face aux résistances partielles de la vigne : apports croisés de l'évolution expérimentale et de la génomique des populations - Laboratoire Santé et Agroécologie du Vignoble, Bordeaux.
- 2013-2015 **Jérémy Guinard** - Dynamique évolutive du contournement de la résistance de l'aubergine par *Ralstonia solanacearum* - Approches globale et locale de la durabilité de résistance – UMR PVBMT, Saint Pierre de La Réunion.

Evaluation de Manuscrits

Noms des journaux: *Journal of Environmental Science and Health, Molecular Plant Pathology, Molecular Ecology, National Science Foundation, International Microbiology, BMC Microbiology, Soil Biology and Biochemistry, Molecular Plant Microbe Interaction, Phytopathology, Environmental Microbiology, Canadian Journal of Plant-Pathology.*

Evaluation de Projets de Recherche

- 2018 Appel à projet scientifique INRA département SPE
- 2017 ANSES Grant evaluation
- 2007 National Science Foundation

Activité d'Édition

- 2018 Nemo Peeters, Caitlylin Allen, Philippe Prior, Boshou Liao, Carlos Alberto Lopes & Alice Guidot - Research Topic editors for *Frontiers in Microbiology*, section Plant Microbe Interactions "Plant Pathogenic *Ralstonia* spp. From the Field to the Lab and Back Again: mechanisms of pathogen virulence and host resistance, population biology, community ecology and strategies for bacterial wilt disease management".

1.7. BILAN DES PUBLICATIONS

Articles scientifiques

1. Jiang G, Peyraud R, Remigi P, **Guidot A**, Berthomé R, Ding W, Jousset A, Genin S, Peeters N. The population dynamics of a bacterial pathogen after host re-infection affects the founding population size. *bioRxiv*, 061408; doi: <https://doi.org/10.1101/061408>.

2. Perrier A, Barlet X, Rengel D, Prior P, Poussier S, Genin S, **Guidot A** (2019) Spontaneous mutations in a regulatory gene induce phenotypic heterogeneity and adaptation of *Ralstonia solanacearum* to changing environments. **Environmental Microbiology**, 21:3140-3152.
3. Perrier A, Barlet X, Peyraud R, Rengel D, **Guidot A**, Genin S (2018) Comparative transcriptomic studies identify specific expression patterns of virulence factors under the control of the master regulator PhcA in the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Microbial Pathogenesis**, 116:273-278.
4. Erill I, Puigvert M, Legrand L, Guarischi-Sousa R, Vandecasteele C, Setubal JC, Genin S, **Guidot A**, Valls M (2017) Comparative analysis of *Ralstonia solanacearum* methylomes. **Frontiers in Plant Science**, 8:504. doi: 10.3389/fpls.2017.00504.
5. Perrier A, Peyraud R, Rengel D, Barlet X, Lucasson E, Gouzy J, Peeters N, Genin S, **Guidot A** (2016) Enhanced *in planta* fitness through adaptive mutations in EfpR, a dual regulator of virulence and metabolic functions in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **PLoS Pathogens**, 12(12): e1006044. doi:10.1371/journal.ppat.1006044.
6. Pensec F, Lebeau A, Daunay MC, Chiroleu F, **Guidot A**, Wicker E (2015) Towards the identification of Type III effectors associated with *Ralstonia solanacearum* virulence on tomato and eggplant. **Phytopathology**, 105:1529-1544.
7. **Guidot A**, Jiang W, Ferdy JB, Thébaud C, Barberis P, Gouzy J, Genin S (2014) Multihost experimental evolution of the pathogen *Ralstonia solanacearum* unveils genes involved in adaptation to plants. **Molecular Biology & Evolution**, 31:2913-2928.
8. Peeters N, **Guidot A**, Vaillieu F, Valls M (2013) *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. **Molecular Plant Pathology**, 14, 651-662.
9. Remigi P, Anisimova M, **Guidot A**, Genin S, Peeters N (2011) Functional diversification of the **GALA** type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. **New Phytologist**, 192, 976–987.
10. Coupat-Goutaland B, Bernillon D, **Guidot A**, Prior P, Nesme X, Bertolla F (2011) *Ralstonia solanacearum* virulence increased following large interstrain gene transfers by natural transformation. **Molecular Plant Microbe Interaction**, 24, 497-505.
11. Macho* AP, **Guidot A***, Barberis P, Beuzón CR, Genin S (2010) A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* Type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. **Molecular Plant Microbe Interaction**, 23, 1197-1205. *Both authors contributed equally to this work
12. Remenant B, Coupat-Goutaland B*, **Guidot A***, Cellier G, Wicker E, Allen C, Fegan M, Pruvost O, Elbaz M, Calteau A, Salvignol G, Mornico D, Mangenot S, Barbe V, Medigue C, Prior P (2010) Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. : three original genome sequences for new insights of the species complex. **BMC Genomics**, 11, 379-395. *Both authors contributed equally to this work
13. **Guidot A**, Elbaz M, Carrère S, Siri MI, Pianzola MJ, Prior P, Boucher C (2009) Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. **Phytopathology**, 99, 1105-1112.

14. **Guidot A**, Coupat B, Fall S, Prior P, Bertolla F (2009) Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. **The ISME Journal**, 3:549-562.
15. Högberg N, **Guidot A**, Jonsson M, Dahlberg A (2009) Microsatellite markers for the ectomycorrhizal basidiomycete *Lactarius mammosus*. **Molecular Ecology Resources**, 9:1008-1010.
16. **Guidot A**, Prior P, Schoenfeld J, Carrère S, Genin S, Boucher C (2007) Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. **Journal of Bacteriology**, 189:377-387.
17. **Guidot A**, Verner MC, Debaud JC, Marmeisse R (2005) Intraspecific variation in use of different organic nitrogen sources by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **Mycorrhiza**, 15:67-177.
18. Marmeisse R, **Guidot A**, Gay G, Lambilliotte R, Sentenac H, Combier JP, Melayah D, Fraissinet-Tachet L, Debaud JC (2004) *Hebeloma cylindrosporum* - a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. **New Phytologist**, 163:481-498.
19. **Guidot A**, Johannesson H, Dahlberg A, Stenlid J (2003) Parental tracking in the postfire wood decay ascomycete *Daldinia loculata* using highly variable nuclear gene loci. **Molecular Ecology**, 12:1717-1730.
20. **Guidot A**, Debaud JC, Marmeisse R (2002) Spatial distribution of the below-ground mycelia of an ectomycorrhizal fungus inferred from specific quantification of its DNA in soil samples. **FEMS Microbiology Ecology**, 42:477-486.
21. **Guidot A**, Debaud JC, Effosse A, Marmeisse R (2004) Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. **New Phytologist**, 161:539-547.
22. **Guidot A**, Gryta H, Gourbière F, Debaud JC, Marmeisse R (2002) Forest habitat characteristics affect balance between sexual reproduction and clonal propagation of the ectomycorrhizal mushroom *Hebeloma cylindrosporum*. **Oikos**, 99:25-36.
23. **Guidot A**, Debaud JC, Marmeisse R (2001) Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **Molecular Ecology**, 10:1121-1131.
24. **Guidot A**, Lumini E, Debaud JC, Marmeisse R (1999) The nuclear ribosomal DNA intergenic spacer as a target sequence to study intraspecific diversity of the ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* directly on *Pinus* root systems. **Applied and Environmental Microbiology**, 65:903-909.

Chapitres d'ouvrage

1. **Guidot A** (2019) Comment un pathogène bactérien change d'hôte ? In : **101 Secrets du Vivant**, CNRS Editions, in press.
2. Morel A, Peeters N, Vailliau F, Barberis P, Jiang G, Berthomé R, **Guidot A** (2018) Plant pathogenicity phenotyping of *Ralstonia solanacearum* strains. **Methods in Molecular Biology**, 1734:223-239.

3. Reboud X, Sicar, D, Bataillon T, Bedhomme S, Dillmann C, Gaba S, Gallet R, **Guidot A**, Goldringer I, Jasmin JN, Kaltz O, Méry F, Nidelet T, Schneider D, Spor A (2016). Evolution expérimentale. In: Thomas F., Raymond M., Lefevre T., **Biologie évolutive** (p. 755-790). De Boeck Supérieur Sciences (DBS Sciences). 1000 p.
4. **Guidot A**, Debaud JC, Marmeisse R (2003) Nouvelles approches pour l'étude des populations de champignons ectomycorhiziens: typage génétique des mycorhizes et analyse de l'ADN du sol. *Les Actes du BRG*, 4, 479-489.

1.8. COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

Communications orale

- Perrier A, Barlet X, Rengel D, Prior P, Poussier S, Genin S, **Guidot A**. Spontaneous mutations in a regulatory gene induce phenotypic heterogeneity and adaptation of *Ralstonia solanacearum* to changing environments. **REID-IMMUNINV, Montpellier, 20-22 mai 2019.**
- Perrier A, Peyraud R, Rengel D, Barlet X, Gouzy J, Peeters N, Genin S, **Guidot A**. Experimental evolution of the GMI1000 strain of *Ralstonia pseudosolanacearum* unveils a new transcription regulator involved in adaptation to plants. **International Bacterial Wilt Symposium, Toulouse, France 3-7 juillet 2016.**
- Guidot A**, Jliang W, Ferdy JB, Thébaud C, Barberis P, Gouzy J, Genin S. Multihost experimental evolution of the pathogen *Ralstonia solanacearum* unveils genes involved in adaptation to plants. **COST action Sustain, Workshop: Evolutionary Genomics of plant pathogens, Kiel, Allemagne, 26-28 août 2015**
- Guidot A**, Jiang W, Ferdy JB, Thébaud C, Barberis P, Gouzy J, Genin S. Experimental evolution of *Ralstonia solanacearum* : molecular bases of adaptation to plants. **11^{ème} Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, 3-7 février 2014.**
- Guidot A**, Jiang W, Barberis P, Ferdy JB, Andalo C, Carrère S, Crouo-Roy B, Lecompte E, Boucher C, Gouzy J, Thébaud C, Genin S. Experimental evolution of *Ralstonia solanacearum* : molecular bases of adaptation to plants. **International Bacterial Wilt Symposium, Wuhan, Chine, 20-24 juin 2011.**
- Guidot A**, Jiang W, Barberis P, Ferdy JB, Andalo C, Carrère S, Crouo-Roy B, Lecompte E, Boucher C, Gouzy J, Thébaud C, Genin S. Evolution expérimentale de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* : bases moléculaires de l'adaptation a ses plantes hôtes. **Ecologie, Montpellier, 2-4 septembre 2010.**
- Guidot A**, Barberis P, Crouau-Roy B, Lecompte E, Andalo C, Carrère S, Boucher C, Gouzy J, Thébaud C, Génin S. Evolution expérimentale de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* : bases moléculaires de l'adaptation à ses plantes hôtes. **7^{ème} Colloque National de la Société Française de Phytopathologie, Lyon, 8-11 juin 2009.**
- Guidot A**, Prior P, Génin S, Boucher C. Exploring distribution of accessory genes reveals patterns of evolution within the *Ralstonia solanacearum* species complex. **The 4th International Bacterial Wilt Symposium, York, UK, 17-21 juillet 2006.**

Guidot A, Boucher C, Genin S, Prior P. Génome accessoire et diversité phylogénétique chez *Ralstonia solanacearum* révélés par génomique comparative. **7^{ème} Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, 20-24 mars 2006.**

Guidot A, Debaud JC, Marmeisse R. Répartition spatiale et temporelle des mycéliums d'un champignon symbiotique dans un site forestier de pins maritimes. **Colloque d'Ecologie Microbienne, Carry Le Rouet, 25-28 mai 2003.**

Johannesson H, **Guidot A**, Dahlberg A, Stenlid J. Genetic structure of *Daldinia loculata* populations. **The 7th International Mycological Congress, Oslo, Norvège, 11-17 Août 2002.**

Guidot A, Debaud JC, Marmeisse R. Analyse de la répartition spatiale et de la persistance du mycélium du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* dans le sol. Détection et quantification spécifique par PCR compétitive de l'ADN extrait du sol. **Réunion du Réseau de Mycologie, Toulouse, 18-19 janvier 2001.**

Guidot A, Gryta H, Debaud JC, Marmeisse R. Maintien des populations du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* dans différents écosystèmes forestiers selon deux types de stratégies. **XXII^{ème} réunion annuelle du groupe de Biologie et Génétique des Populations, Dijon, 27-31 août 2000.**

Guidot A, Gryta H, Debaud JC, Marmeisse R. Deux stratégies écologiques différentes pour les populations du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* dans des écosystèmes naturels ou anthropisés. **Réseau Biodiversité et Ecologie Microbienne - Fonctions de la Biodiversité Microbienne : comprendre pour gérer, Aussois, 2-5 mai 2000.**

Guidot A, Gryta H, Debaud JC, Marmeisse R. Influence de la nature de l'écosystème forestier sur la structuration des populations du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*. **XXI^{ème} réunion annuelle du groupe de Biologie et Génétique des Populations, Rennes, 6-7 septembre 1999.**

Posters

Guidot A, Barlet X, Peyraud R, Peeters N, Perrier A, Genin S. A single natural nucleotide mutation in the *efpR* gene enhance the *in planta* fitness of the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum*. **12^{èmes} Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, 11 - 15 janvier 2016.**

Coupat-Goutaland B, **Guidot A**, Prior P, Nesme X, Bertolla F. Emergence de nouveaux pathotypes chez la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* : rôle des transferts de gènes. **9^{ème} Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, 18-22 janvier 2010.**

Guidot A, Jiand W, Barberis P, Crouau-Roy B, Lecompte E, Andalo C, Carrère S, Boucher C, Gouzy J, Thébaud C, Génin S. Evolution expérimentale de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* : bases moléculaires de l'adaptation à ses plantes hôtes. **9^{ème} Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, 18-22 janvier 2010.**

Guidot A, Debaud JC, Marmeisse R. Comparaison de la diversité du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* au niveau des carpophores et au niveau des mycorhizes. **Journées Jean Chevaugéon - Rencontres de Mycologie-Phytopathologie, Aussois, 27 septembre-1er octobre 1998.**

2. ENSEIGNEMENT ET ENCADREMENT

2.1. ENSEIGNEMENT

- 2017-2018 **TD M1 Microbio** « Evolution expérimentale des bactéries » (2 h éq. TD / an). *Université Paul Sabatier Toulouse III.*
- 2014-2015 **Atelier Biblio M2R Microbio** « Evolution des génomes microbiens » (8 h éq. TD / an). *Université Paul Sabatier Toulouse III.*
- 2000-2001 **TP DEUG 1** « Biologie des organismes végétaux et Microbiologie » (96 h éq. TD en tant qu'ATER). *Université Lyon 1.*
- 1997-2000 **TP DEUG 1** « Biologie cellulaire et Microbiologie » (64 h. éq. TD / an en tant que Monitrice). *Université Lyon 1.*

2.2. ENCADREMENT D'ETUDIANTS EN STAGE

- 2019 Boris TAILLEFER, stage **M2 Interactions Microorganismes / Hôtes, Environnements - Université de Montpellier (6 mois)** :
Comparaison des méthylomes et des ADN méthyltransférases entre souches de *Ralstonia solanacearum*.
- 2018 Juliette PRIOR, stage **L3 Biodiversité des Organismes, des Populations et des Écosystèmes - Université Paul Sabatier Toulouse III (2 mois)** :
Génotypage et phénotypage d'une collection mondiale de souches de *Ralstonia solanacearum*.
- 2017 Léa CASAGRANDE, stage **M2R Chimie et Sciences du Vivant – Université de Pau (6 mois)** :
Importance des méthyltransférases dans la virulence de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*.
- 2015 Marie-Anne VEDY-ZECCHINI, stage **M2R Microbiologie - Université Paul Sabatier Toulouse III (6 mois)** :
Compromis évolutifs dans l'adaptation à *Solanum lycopersicum* chez la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*.
- 2014 Emmanuel LUCASSON, stage **M2R Microbiologie - Université Paul Sabatier Toulouse III (6 mois)** :
Rôle du gène *efpR* dans le métabolisme et la physiologie de *Ralstonia solanacearum*.
- 2014 Maxime DE RONNE, stage **M1 MABS - Université Paul Sabatier Toulouse III (2 mois)** :
Etude de la régulation de l'expression du gène *efpR*, un régulateur de transcription important dans la multiplication *in planta* chez la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*.

- 2014 Geoffrey KARAKACHIAN, stage **L2 Biologie** - *Université Paris Sud, Orsay (2 mois)* :
Rôle des variants phénotypiques dans la réalisation du cycle biologique de la bactérie *Ralstonia solanacearum*
- 2014 Cyril LIBOUREL, stage **M1 Ecologie** - *Université Paul Sabatier Toulouse III (2 mois)* :
Compromis évolutifs dans l'adaptation à l'hôte chez la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*
- 2013 Audrey GAURE, stage **M1 MABS** - *Université Paul Sabatier Toulouse III (2 mois)* :
Etude du compromis évolutif dans l'adaptation à l'hôte.
- 2012 Ihsane LAHLOU, stage **M2R Biodiversité, Ecologie et Evolution** - *Université Paul Sabatier Toulouse III (6 mois)* :
Specialist VS Generalist Trade-Off in Evolutionary Adaptation to the Host in *Ralstonia solanacearum*, a Phytopathogenic Bacterium.
- 2011 Emmanuel LUCASSON, stage **M1 MABS** - *Université Paul Sabatier Toulouse III (2 mois)* :
Mesure de l'adaptation de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* à différentes plantes hôtes.
- 2011 Charline CARZOLA, stage **IUT Génie Biologique** - *Université Paul Sabatier Toulouse III (3 mois)* :
Identification de clones dérivés de la souche GMI1000 de la bactérie *Ralstonia solanacearum* présentant des gains adaptatifs sur plante

2.3. ENCADREMENT DOCTORAL

Anthony PERRIER

Financement INRA SPE/ Région Occitanie.

1er octobre 2015 – 31 décembre 2018.

Encadrement en co-direction avec Stéphane GENIN (HDR).

Soutenance de thèse : le 14 décembre 2018.

Titre de la thèse : *efpR*, un gène stabilisateur des fonctions de virulence et de métabolisme de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum*.

Résumé :

Ralstonia solanacearum est une bactérie phytopathogène responsable du flétrissement bactérien chez plus de 250 espèces de plantes, dont des plantes à intérêt agronomique telles que la pomme de terre, la tomate ou encore l'arachide. Il a été observé à plusieurs reprises l'apparition de souches virulentes sur des hôtes précédemment décrits comme résistants. Afin de comprendre les bases moléculaires de l'adaptation à ses hôtes, une expérience d'évolution *in planta* a été réalisée dans mon équipe d'accueil. Pour cela, la souche GMI1000 de *R. solanacearum* a été maintenue dans la tige

de plantes (variétés résistantes, sensibles ou tolérantes) pendant plus de 300 générations bactériennes. A la suite de cette expérience, il a été montré que plus de 80% des clones évolués présentaient un gain de fitness *in planta* par rapport à la souche ancestrale. Parmi 50 clones reséquencés, 6 mutations indépendantes dans un même gène de fonction inconnue (renommé *efpR*) ont été observées, suggérant un fort parallélisme évolutif. L'implication de ces mutations dans le gain de fitness de la bactérie a été validée. Les objectifs de ma thèse ont été (1) de caractériser la fonction du gène *efpR* et (2) de mieux comprendre son implication dans le gain de fitness *in planta* de la bactérie. Des approches transcriptomiques et d'analyses métaboliques à haut débit (Biolog), couplées à des validations phénotypiques, ont permis de mettre en évidence que le gène *efpR* est un régulateur global à l'interface entre le métabolisme et la virulence. Nous avons aussi démontré que toutes les mutations apparues dans le gène *efpR* étaient des mutations 'pertes de fonction' et que ces mutations induisaient un phénomène d'hétérogénéité phénotypique observable sur boîte de pétri (2 types de colonies – 1 type sauvage et 1 type mutant). Nous avons mis en évidence un second gène RSc3149, homologue d'*efpR*, impliqué dans ce switch phénotypique. Le double mutant *efpR*-RSc3149 étant « verrouillé » dans la forme mutante, nous avons pu étudier l'avantage adaptatif pour la bactérie de générer de l'hétérogénéité phénotypique. Enfin, les caractéristiques phénotypiques liées au gène *efpR* étant semblables à un autre régulateur majeur de la bactérie identifié en 1993 (*PhcA*), nous avons réalisé des analyses transcriptomiques de ces deux régulateurs ainsi que des analyses gènes rapporteurs (β -galactosidase) afin de tenter de replacer *efpR* dans le réseau de régulation de la bactérie et mieux comprendre son lien avec le gène *phcA*. A ce jour, la position d'*efpR* dans le réseau de régulation reste malheureusement encore inconnue.

Liste des travaux co-publiés :

1. **Perrier A**, Barlet X, Rengel D, Prior P, Poussier S, Genin S, **Guidot A** (2019) Spontaneous mutations in a regulatory gene induce phenotypic heterogeneity and adaptation of *Ralstonia solanacearum* to changing environments. **Environmental Microbiology**, 21:3140-3152.
2. **Perrier A**, Barlet X, Peyraud R, Rengel D, **Guidot A**, Genin S (2018) Comparative transcriptomic studies identify specific expression patterns of virulence factors under the control of the master regulator PhcA in the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Microbial Pathogenesis**, 116:273-278.
3. **Perrier A**, Peyraud R, Rengel D, Barlet X, Lucasson E, Gouzy J, Peeters N, Genin S, **Guidot A** (2016) Enhanced *in planta* fitness through adaptive mutations in EfpR, a dual regulator of virulence and metabolic functions in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **PLoS Pathogens**, 12(12): e1006044.doi:10.1371/journal.ppat.1006044.

3. SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE

3.1. STRUCTURE ET DYNAMIQUE DES POPULATIONS DE CHAMPIGNONS

3.1.1. ANALYSE DES POPULATIONS DU CHAMPIGNON ECTOMYCORHIZIEN *HEBELOMA CYLINDROSPORUM* ASSOCIÉES AU PIN MARITIME

Ce travail a été réalisé dans le cadre de mon stage de DEA, de ma thèse puis d'un contrat ATER dans l'équipe Symbiose Mycorhizienne de l'UMR Ecologie Microbienne à l'Université Lyon 1 sous la direction de Jean-Claude Debaud et Roland Marmeisse.

Parmi la communauté microbienne du sol, les champignons ectomycorhiziens vivant en symbiose avec la plupart des arbres jouent un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers naturels. Cette symbiose durable, à intérêts nutritionnels pour les deux partenaires, concerne plusieurs milliers d'espèces fongiques appartenant aux Basidiomycètes (Bolets, Chanterelles, Lactaires, Amanites...) et aux Ascomycètes (Truffes...).

Les communautés et surtout les populations de ces champignons sont dans la plupart des cas encore mal connues. Les études de populations ont été menées sur seulement une quinzaine d'espèces et le plus souvent uniquement par échantillonnage des carpophores (ou fructifications), ceci en général dans un seul type d'habitat et souvent au cours d'une seule année. Il en résulte que la structure génétique et spatiale ainsi que la dynamique des parties souterraines de ces individus (mycélium dans le sol et mycorhizes formées lors de son association avec les racines) sont très mal connues. De plus, l'effet de l'habitat sur les caractéristiques de ces populations est le plus souvent totalement inconnu.

En prenant comme modèle le Basidiomycètes ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*, les principaux objectifs de mes travaux ont été :

- de caractériser la structure et la dynamique des populations de ces champignons,
- de préciser la correspondance entre les structures des populations déduites de l'échantillonnage des appareils reproducteurs épigés (carpophores) et les structures des populations « totales » déduites de l'échantillonnage des appareils végétatifs souterrains (mycéliums et mycorhizes),
- de préciser l'effet des conditions du milieu et des perturbations naturelles ou anthropiques sur la structure et la dynamique de ces populations.

3.1.1.1. Comparaison des populations épigées (fructifications) et des populations souterraines (mycorhizes et mycéliums)

Afin de comparer la structure et la dynamique des « populations épigées » (représentées par les seuls mycéliums ayant fructifié) à celle des « populations souterraines » (ensemble des mycéliums fructifiant ou non), j'ai développé de nouveaux outils moléculaires qui permettent la caractérisation intraspécifique de toutes les mycorhizes et des mycéliums de *H. cylindrosporum* présents dans le sol :

- J'ai ainsi mis au point une méthode de PCR-RFLP d'une portion réduite hypervariable de l'IGS de l'ADN ribosomique nucléaire amplifiée à l'aide d'amorces spécifiques, méthode qui a permis de distinguer la quasi-totalité des individus formant des mycorhizes.
- Pour l'analyse directe des mycéliums dans le sol, j'ai aussi mis au point une méthode de PCR compétitive de quantification spécifique de l'ADN de *H. cylindrosporum*. Cette méthode a permis de préciser la répartition des mycéliums de cette espèce dans le sol.

J'ai ainsi pu montrer que, chez le champignon symbiotique *H. cylindrosporum*, la diversité, la répartition spatiale et la durée de vie des génotypes formant les carpophores reflètent celles de l'ensemble des génotypes présents dans le sol.

Pour cette espèce – contrairement à d'autres - le seul échantillonnage des carpophores est donc suffisant pour donner une bonne représentation de la structure et de la dynamique des populations naturelles.

Ce travail représente la première étude sur la comparaison des populations épigées et souterraines d'un champignon ectomycorhizien.

Ces travaux ont fait l'objet de quatre publications dans les revues Applied and Environmental Microbiology, Molecular Ecology, FEMS Microbiology Ecology et New Phytologist.

3.1.1.2. Influence des caractéristiques de l'habitat sur la structure et la dynamique des populations

Les carpophores de *H. cylindrosporum* se trouvent naturellement dans deux habitats bien distincts de la bordure dunaire de la forêt landaise de pins maritimes: l'habitat dunaire, à la limite de la dune boisée et l'habitat forestier, dans la forêt littorale plus âgée mais uniquement dans des zones à forte fréquentation humaine telles que des campings.

Afin de préciser l'effet de la nature de l'habitat sur la structure et la dynamique des populations de *H. cylindrosporum*, j'ai cartographié, échantillonné et déterminé les génotypes de centaines de carpophores dans ces 2 habitats, ceci sur 3 sites géographiques différents sur lesquels les populations de cette espèce sont suivies depuis 1990.

J'ai ainsi pu montrer un effet important de la nature de l'habitat sur la diversité génétique, la structure génétique et spatiale ainsi que sur la dynamique des populations de cette espèce (Figure 1):

- Dans l'habitat dunaire, les populations sont représentées par un faible nombre de grands mycéliums pérennes qui s'étendent par croissance végétative (50 cm/an).
- Dans l'habitat forestier, ces populations sont au contraire représentées par un nombre important de petits mycéliums annuels.

D'après ces résultats, *H. cylindrosporum* semble se comporter comme une espèce fugitive (Hutchinson, 1951). Elle est capable de se maintenir à l'état végétatif uniquement dans l'habitat dunaire où la compétition interspécifique est faible. En forêt âgée, les populations de *H. cylindrosporum* n'existent que dans des sites caractérisés par une forte fréquentation humaine. Cette fréquentation est probablement à l'origine de micro-perturbations répétées créant des niches favorables à l'implantation transitoire des mycéliums dans un milieu qui leur est globalement hostile. Ces observations suggèrent que les populations de l'habitat forestier pourraient être des "populations puits" subsistant dans un habitat défavorable et qui doivent être régulièrement renouvelées par l'arrivée de propagules (spores sexuées) venant d'un autre habitat favorable à la croissance et à la reproduction ("populations sources" de l'habitat dunaire).

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Oikos*.

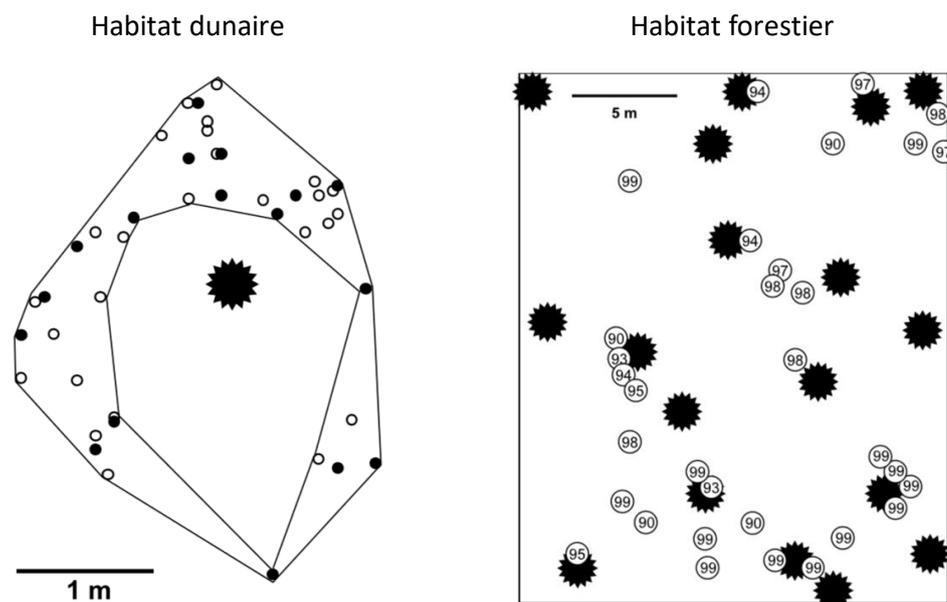


Figure 1 : Effet de la nature de l'habitat sur la diversité génétique, la structure génétique et spatiale et la dynamique des populations du champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*.

Les étoiles représentent les pins maritimes. Dans l'habitat dunaire, les cercles pleins représentent les carpophores génotypés et les cercles vides les carpophores cartographiés mais non génotypés. Tous ces carpophores sont issus du même génotype. Dans l'habitat forestier, les patches cartographiés de 1990 à 1999 sont indiqués. Les carpophores identifiés dans ces patches étaient tous de génotypes différents.

3.1.1.3. Variabilité intraspécifique de la capacité à utiliser différentes sources d'azote organique *in vitro*

Pour une meilleure appréciation de l'impact potentiel de la diversité génotypique des populations de *H. cylindrosporum* sur le fonctionnement de la symbiose, j'ai mené une étude préliminaire visant à estimer *in vitro* la variabilité fonctionnelle intraspécifique. J'ai retenu pour cette analyse une fonction caractéristique des champignons ectomycorrhiziens : leur capacité à utiliser, à la différence des plantes, l'azote organique du sol.

Les biomasses mycéliennes formées sur milieu stérile contenant comme seule source d'azote l'un des 20 acides aminés protéiques, l'urée, l'albumine ou la gélatine ont été comparées. Parmi 22 génotypes sauvages haploïdes étudiés, j'ai révélé une importante variabilité intraspécifique de la capacité à utiliser quatre acides aminés : l'alanine, la glycine, la phénylalanine et la sérine ainsi que les deux protéines testées. L'incapacité à utiliser l'une ou l'autre de ces sources d'azote est un caractère récessif mais qui s'observe aussi parmi des génotypes sauvages diploïdes.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue Mycorrhiza.

3.1.2. LOCALISATION DES MYCELIUMS PARENTS CHEZ L'ASCOMYCETE DECOMPOSEUR DU BOIS BRULE *DALDINIA LOCULATA* PAR ANALYSE DU POLYMORPHISME DE GENES NUCLEAIRES

Ce travail a été réalisé dans la cadre d'un contrat post-doctoral dans le Département de Mycologie et Pathologie Forestière à l'Université d'Uppsala (Suède) sous la direction de Jan Stenlid et Anders Dahlberg.

La problématique générale de cette étude était l'analyse des flux de gènes au sein des populations de champignons. J'ai mené cette étude par localisation de l'origine des « gamètes mâles » impliqués dans des événements de fertilisation au sein d'une population locale de l'Ascomycète *Daldinia loculata*. Pour cela, j'ai comparé les allèles des mycéliums parents (mycéliums haploïdes se développant dans les tissus d'arbres brûlés) à ceux de leurs descendants (ascospores haploïdes libérées par les organes sexuels) sur trois marqueurs moléculaires indépendants. Cette étude a été menée dans un site forestier brûlé très isolé des autres sites.

J'ai ainsi pu montrer que la majorité des fertilisations résulte d'un croisement entre une conidie (spore asexuée) agissant comme gamète mâle et un mycélium haploïde vivant dans les tissus d'un arbre et représentant le gamète femelle. Ces conidies étaient issues de huit mycéliums pères différents. La majorité (cinq) de ces mycéliums a pu être localisée dans la même population locale que les mycéliums mères, une fois dans le même arbre mais le plus souvent dans d'autres arbres situés à des distances de 0,5 à 36 m de l'arbre du mycélium mère (Figure 2). Les trois autres mycéliums pères, n'ayant pas pu être retrouvés parmi les mycéliums échantillonnés, pouvaient être issus soit de la même population locale soit d'une autre population. Les conidies étant produites sous l'écorce des branches et les ascospores résultant de cette fertilisation n'apparaissant qu'un an ou deux après le feu de forêt, nous supposons que les insectes pyrophiles vivant spécifiquement en

association avec les mycéliums et conidies de *D. loculata* (Wikars, 2001) pourraient être des vecteurs essentiels de la réalisation du cycle sexuel de cette espèce en permettant le transport des conidies et donc la rencontre des partenaires sexuels de types opposés.

Ce travail représente la première étude sur les flux de gènes réels par localisation des mycéliums parents dans une population d'Ascomycète.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Molecular Ecology*.

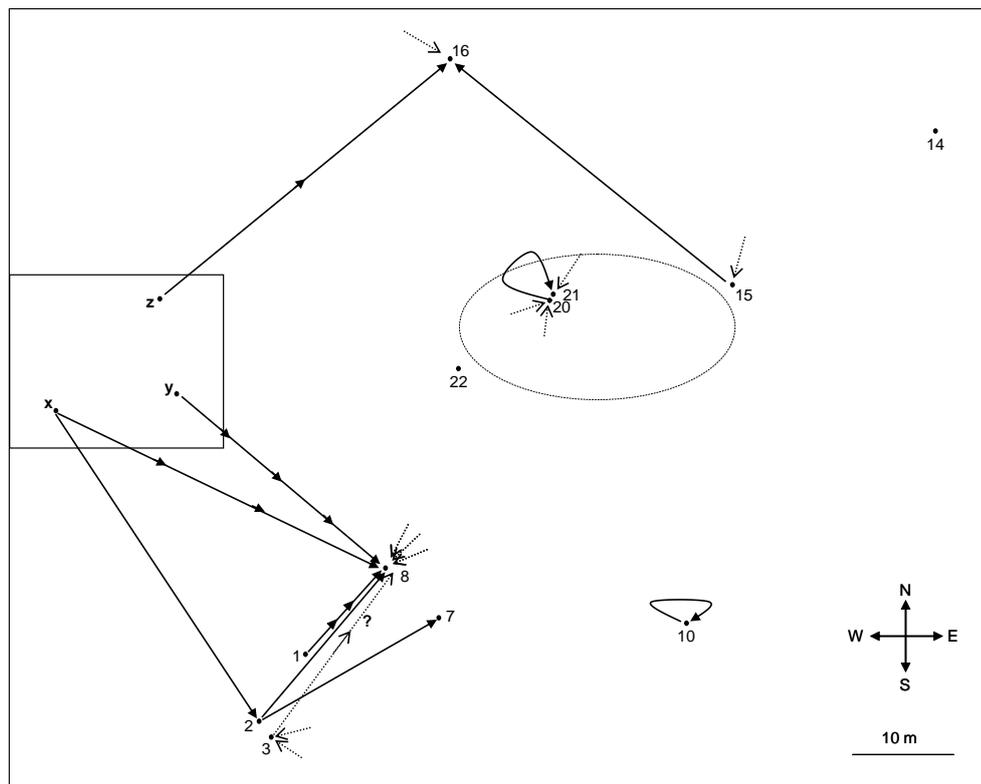


Figure 2 : Trajets des gamètes mâles dans une population locale de *Daldinia loculata* précédant des fertilisations avec les gamètes femelles.

Chaque point avec un numéro représente un arbre brûlé contenant du mycélium de *D. loculata*. Les points avec les lettres x, y et z représentent des mycéliums producteurs de gamètes mâles mais non détectés dans le site échantillonné. Ces mycéliums pouvaient être localisés soit dans la même population locale soit dans une autre population. Les flèches représentent les trajets des gamètes mâles précédant des fertilisations avec les gamètes femelles. Les flèches pleines indiquent la distance et la direction du transfert de conidies (spores asexuées) d'un parent mâle vers un parent femelle. Les flèches pointillées représentent les trajets de conidies ou ascospores (spores sexuées) avec la même probabilité. L'ellipse pointillée au centre de la figure représente un monticule dans le site échantillonné.

3.2. GENOMIQUE EVOLUTIVE CHEZ LA BACTERIE PHYTOPATHOGENE *RALSTONIA SOLANACEARUM*

J'ai débuté ces travaux en décembre 2004 dans le cadre d'un CDD de 18 mois au CIRAD dans l'UMR Pôle de Protection des Plantes de Saint-Pierre à La Réunion. Ces travaux ont été menés sous la direction de Philippe Prior en collaboration avec Franck Bertolla de l'UMR Ecologie Microbienne de Lyon et Christian Boucher de l'UMR Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM) de Toulouse. J'ai poursuivi ces travaux dans le cadre d'un contrat post-doctoral de 3 ans financé par l'ANR au LIPM sous la direction de Stéphane Génin et Christian Boucher. En 2010, j'ai été recrutée comme CR2 INRA pour continuer ce projet de recherche au LIPM.

La bactérie *Ralstonia solanacearum*, qui appartient au groupe des beta-protéobactéries, est considérée comme un complexe d'espèces bactériennes phytopathogènes responsables de l'une des premières bactérioses mondiales : le flétrissement bactérien. Ce complexe d'espèces regroupe des souches très diverses capables d'attaquer plus de 200 espèces végétales différentes d'intérêts agronomique et vivrier (Allen *et al.*, 2005).

Plusieurs critères font de *R. solanacearum* un pathogène à fort potentiel évolutif :

- *sa forte diversité phénotypique* : Les souches de *R. solanacearum* varient dans leur pouvoir pathogène. Sur la base de la spécificité parasitaire des souches, cinq races ont été distinguées. Les souches de race 1 ont un large spectre d'hôte tandis que les souches de races 2 à 5 ont un spectre d'hôte plus étroit (Buddenhagen, 1962 ; He *et al.* 1983).
- *sa forte diversité génotypique* : Des analyses phylogénétiques ont démontré que le complexe d'espèces *R. solanacearum* pouvait se diviser en quatre groupes monophylétiques nommés phylotypes (Fegan, M. and Prior, P., 2005). Cette répartition en phylotypes est plus ou moins reliée à l'origine géographique des souches mais ne reflète pas leur spécificité parasitaire.
- *son fort potentiel adaptatif* : Les souches de *R. solanacearum* sont capables de contourner rapidement les résistances variétales (Hanson *et al.*, 1996). L'émergence de nouveaux pathotypes est régulièrement rapportée comme récemment sur le melon (Wicker *et al.*, 2007, 2009).
- *son instabilité génétique* : *R. solanacearum* forme spontanément des mutants PC (Phenotypic Conversion) (Kelman, 1954) résultant de mutations dans le gène *phcA* (Poussier *et al.*, 2003).
- *sa capacité à échanger du matériel génétique* : les souches de *R. solanacearum* sont capables d'échanger du matériel génétique par transformation naturelle *in vitro* comme *in planta* (Bertolla *et al.*, 1997, 1999; Coupat *et al.*, 2008). L'analyse de la séquence du génome de la souche GM11000 (phylotype I) a détecté des régions variant dans l'usage des codons et le pourcentage en bases G et C (Salanoubat *et al.*, 2002). L'hypothèse est que ces régions, nommées ACURs (Alternative Codon Usage Regions), ont été acquises par transferts horizontaux de gènes.
- *un génome mosaïque* : L'analyse du génome GM11000 a démontré l'existence de deux réplicons, un chromosome de 3,7 Mb et un megaplasmide de 2.1 Mb, ainsi que la structure en mosaïque du génome (ACURs). Cette analyse a également permis d'identifier de nombreuses séquences d'insertion et régions dupliquées (Salanoubat *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces critères font de la bactérie *R. solanacearum* une menace importante pour l'agriculture. Des travaux visant à mieux comprendre les mécanismes d'évolution et d'adaptation du pathogène à de nouveaux hôtes constituent aujourd'hui une priorité pour identifier des méthodes de lutte durable contre le flétrissement bactérien.

Les principaux objectifs de mes travaux ont donc été de caractériser les mécanismes d'évolution adaptative du génome de *R. solanacearum*. Pour cela, trois approches ont été développées :

- Analyse de la biodiversité naturelle des génomes de *R. solanacearum*,
- Détermination de la nature et des fonctions des gènes qui peuvent être échangés entre les souches par transferts horizontaux,
- Evolution expérimentale d'une souche à large spectre d'hôtes.

3.2.1. BIODIVERSITE NATURELLE DES GENOMES DE R. SOLANACEARUM

3.2.1.1. Comparaison des génomes par hybridation sur puce à ADN

Mon objectif ici a été de déterminer la distribution des gènes variables (génome accessoire) dans une collection de souches de *R. solanacearum* représentatives de la diversité de cette bactérie par hybridation génomique comparative (HGC) sur une puce à ADN couvrant l'ensemble des gènes de la souche GMI1000 (Occhialini *et al.*, 2005).

La première étape du travail a consisté à mettre au point la méthode HGC sur la puce à ADN GMI1000. Pour cela, j'ai utilisé la séquence génomique de la deuxième souche entièrement séquencée à cette époque (la souche IPO1609 de phylotype II). La comparaison des rapports d'hybridation des ADNs génomiques des souches GMI1000 et IPO1609 sur la puce et des scores de Blastn entre ces deux ADNs m'a permis de déterminer une valeur seuil du rapport d'hybridation en dessous de laquelle un gène GMI1000 peut être considéré comme absent ou très divergent dans la souche testée.

Dans une deuxième étape du travail, j'ai utilisé cette méthode pour comparer les génomes de 18 souches représentatives de la diversité génétique de *R. solanacearum*. Cette analyse m'a permis d'identifier une liste de 2690 gènes présents dans toutes les souches de cette bactérie (« core génome »). La présence de nombreux gènes associés au pouvoir pathogène dans le core génome suppose que *R. solanacearum* est un pathogène ancestral. Parallèlement, j'ai pu définir une liste de 2338 gènes variables. L'analyse phylogénétique basée sur la distribution de ces gènes variables correspond à la classification en quatre phylotypes précédemment décrite (Figure 3). Nombreux de ces gènes variables sont regroupés en clusters génomiques correspondant pour la plupart à des ACURs. Ce résultat suggère l'acquisition probable de ces clusters dans le génome de *R. solanacearum* par transferts horizontaux de gènes. La distribution des ACURs reliées à la distribution en phylotypes suggère une acquisition ancestrale de ces ACURs. Par ailleurs, certains gènes variables ont une

structure proche des gènes du core génome. L'hypothèse est que ces gènes auraient été perdus dans certaines souches.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Bacteriology*.

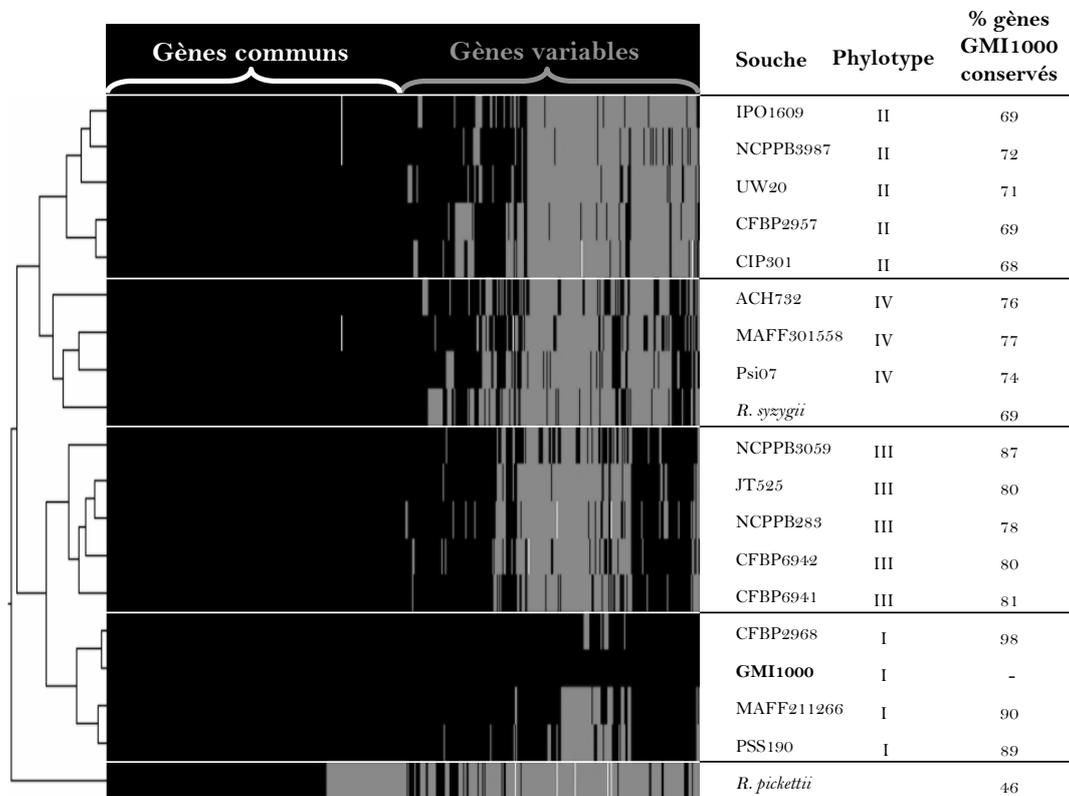


Figure 3 : Répartition des gènes variables dans 18 souches de *Ralstonia solanacearum* appartenant aux quatre phylotypes décrits dans ce complexe d'espèces.

La figure illustre des résultats d'hybridation génomique comparative sur une puce à ADN couvrant tous les gènes de la souche GMI1000. Les gènes présents sont représentés en noir et les gènes absents en gris. L'analyse phylogénétique basée sur la distribution des gènes variables correspond à la classification en quatre phylotypes précédemment décrite.

3.2.1.2. Comparaison des génomes par séquençage de génomes complets

Les génomes complets de trois nouvelles souches de *R. solanacearum* appartenant aux phylotypes IIA (souche CFBP2957), III (souche CMR15) et IV (souche Psi07) ont été entièrement séquencés. Ce projet a été mené au CIRAD de La Réunion sous la direction de Philippe Prior en collaboration avec Claudine Médigue de la plateforme MaGe d'annotation des génomes (Evry). Une équipe de 10 chercheurs dont je faisais partie a été définie pour l'annotation experte de ces trois nouveaux génomes.

L'analyse de ces séquences, en comparaison avec les trois autres séquences déjà existantes de souches de phylotypes I (souche GMI1000) et IIB (souches IPO1609 et Molk2), a permis en particulier (i) d'identifier 9093 gènes constituant le pangéome de *R. solanacearum*, (ii) d'allonger la liste des gènes variables au sein du complexe d'espèces à 6550 gènes, (iii) de montrer que 93% des gènes du core génome se situaient sur le chromosome suggérant ainsi le caractère ancestral de ce réplicon, (iv) de démontrer une divergence nucléotidique entre les souches suffisamment grande pour suggérer l'existence de trois espèces différentes, et (v) d'identifier la présence de petits plasmides dans les souches CMR15 et Psi07. Parmi les gènes du plasmide de CMR15, 65% sont en parfaite synténie avec les gènes de plasmides d'autres bactéries phytopathogènes et 14 codent pour le système de sécrétion de type IV. L'hypothèse ici est que la souche CMR15 aurait acquis ce plasmide par conjugaison.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue BMC Genomics.

Plus récemment, des travaux ont confirmé l'hypothèse de l'existence de 3 espèces différentes parmi les souches de *R. solanacearum* et ont proposé une nouvelle taxonomie en renommant les espèces : *R. solanacearum* pour les souches de phylotype II, *R. pseudosolanacearum* pour les souches de phylotype I et III, et *R. syzygii* pour les souches de phylotype IV (Safni *et al.*, 2014).

3.2.2. TRANSFERTS HORIZONTAUX DE GENES CHEZ R. SOLANACEARUM

Dans cette analyse, mon premier objectif a été de déterminer le nombre et les fonctions des gènes qui peuvent être échangés entre phylotypes de *R. solanacearum* et de savoir si un ou plusieurs événements de recombinaison pouvaient avoir lieu.

Pour cela, j'ai analysé les génomes de clones recombinants obtenus *in vitro* par transformation naturelle en prenant l'ADN génomique total de la souche GMI1000 comme ADN donneur et trois souches des phylotype I (la souche CFBP2968), II (la souche CFBP2957) et III (la souche NCPPB332) comme souches réceptrices. Cette analyse a été faite par comparaison des génomes des clones sauvages et recombinants par hybridation génomique comparative sur la puce à ADN GMI1000.

Ces travaux m'ont permis (i) de confirmer que des fragments d'ADN de 30 kb et 33 gènes pouvaient être échangés entre phylotypes de *R. solanacearum*, (ii) d'identifier les fonctions des gènes acquis ou perdus par transformation naturelle et (iii) de démontrer que des acquisitions multiples le long du génome pouvaient avoir lieu lors d'un seul événement de transformation dans un même clone recombinant.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue The ISME Journal, présentée ci-après.

Article HGT ISME (14 pages)

Parallèlement à ces analyses *in vitro*, mon deuxième objectif a été d'identifier l'impact de la plante hôte sur la fréquence et la nature des transferts de gènes. Ces travaux ont été menés en collaboration avec Bénédicte Coupat, étudiante en thèse dans le Laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon sous la direction de Franck Bertolla.

Pour cette étude, différentes espèces de Solanacées (tomate, aubergine, piment) ont été co-inoculées par dix couples de souches différents. Cependant, un seul transformant a été obtenu. L'hybridation de son ADN génomique sur la puce GMI1000 m'a permis de montrer que ce transformant correspondait à la souche Psi07 ayant intégré dans son génome un cluster de 21 gènes de la souche GMI1000. Parmi ces gènes, trois codaient pour des effecteurs de type III. De manière intéressante, ce transfert de gènes a modifié le pouvoir pathogène de la souche Psi07, le transformant étant significativement plus agressif sur tomate que la souche sauvage. Ces travaux démontrent l'importance des transferts horizontaux de gènes dans l'émergence de nouveaux pathotypes de *R. solanacearum*.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue Molecular Plant Microbe Interaction.

3.2.3. EVOLUTION EXPERIMENTALE

Dans ce projet, toujours en cours, mon objectif est d'élucider les bases génétiques de l'adaptation de *R. solanacearum* à différentes plantes.

Pour cela, j'ai mis en place des expériences d'évolution de la souche GMI1000 sur différentes plantes. Le principe a été (1) de générer des populations de clones dérivés de GMI1000 par des expériences de passages en série (SPE) sur plantes, (2) d'identifier les clones présentant des gains adaptatifs sur ces plantes, (3) de séquencer le génome complet de ces clones afin d'identifier l'ensemble des remaniements génomiques ayant eu lieu durant le processus de sélection sur plante puis (4) de démontrer le caractère adaptatif des mutations détectées par des expériences de mutagenèse dirigée du clone ancestral (GMI1000).

Cette approche est complémentaire des travaux précédents car elle étudie l'évolution en temps réel et permet de montrer l'importance de mutations ponctuelles dans l'évolution de *R. solanacearum*.

3.2.3.1. Génération des populations de clones dérivés de la souche GMI1000

Dans cette 1^{ère} étape du projet, mon objectif a été de générer des populations de clones dérivés de la souche GMI1000 maintenue sur différentes plantes pendant plusieurs centaines de générations. Pour cela, j'ai mené des expériences de passages en série (SPE) sur plantes. Une représentation schématique des SPE sur plantes est donnée dans la figure 4.

Afin d'analyser l'impact de la plante hôte sur les mécanismes d'évolution adaptative de *R. solanacearum*, j'ai mené ces SPE sur 8 espèces de plantes variant dans leur sensibilité au

flétrissement bactérien (Tableau 1). Cinq répétitions par plante ont été faites. Au départ des SPE, j'ai ainsi inoculé un même clone de la souche GMI1000 (clone ancestral) dans ces 8 espèces de plantes par injection dans la tige puis je l'ai maintenu par repiquages successifs sur plantes saines jusqu'à atteindre 300 générations bactériennes. Afin de pouvoir retracer la chronologie de l'apparition des mutations, les populations récupérées à chaque SPE ont été stockées à -80°C .

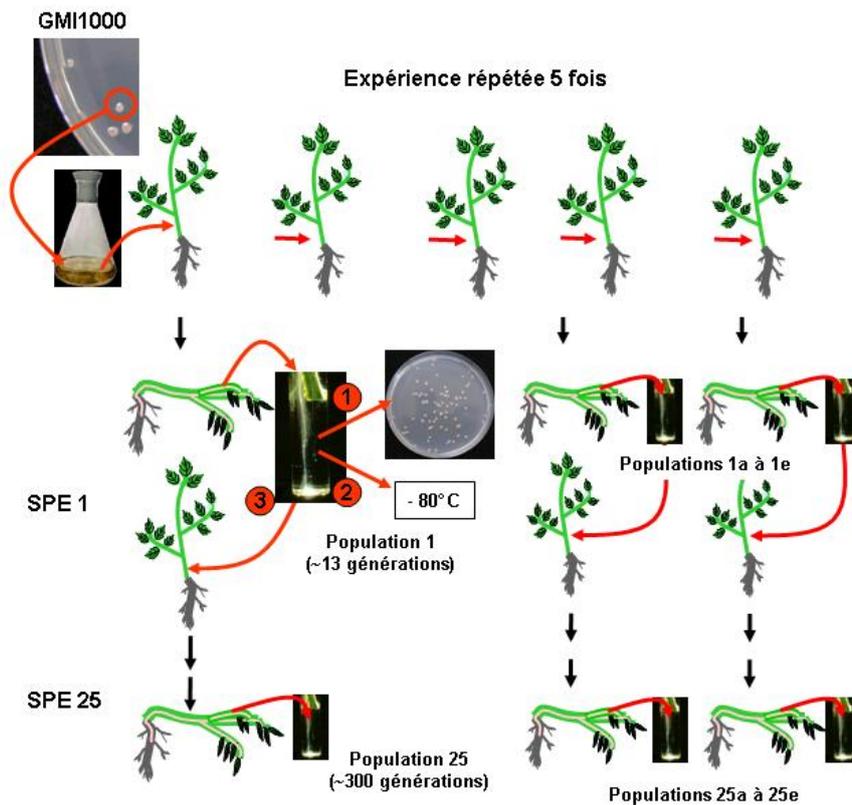


Figure 4 : Représentation schématique des SPE (Expériences de Passages en Série) sur plantes.

A chaque SPE, les populations développées dans la plante sont récupérées dans un tube à essai contenant 3 ml d'eau stérile. Un premier volume de 100 μl de cette suspension bactérienne est étalé sur un milieu de culture pour visualiser 48 h après la présence de *R. solanacearum*. Un deuxième volume de 1 ml de cette suspension est stocké à -80°C . Un troisième volume de 10 μl de cette suspension (diluée 100 fois si la maladie s'est développée) est injecté dans la tige d'une plante saine de la même espèce. Cinq répétitions par espèce de plante ont été faites. Ces SPE ont été effectuées autant de fois que nécessaire pour atteindre 300-350 générations.

Tableau 1 : Liste des espèces de plantes sélectionnées pour l'évolution expérimentale de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum*

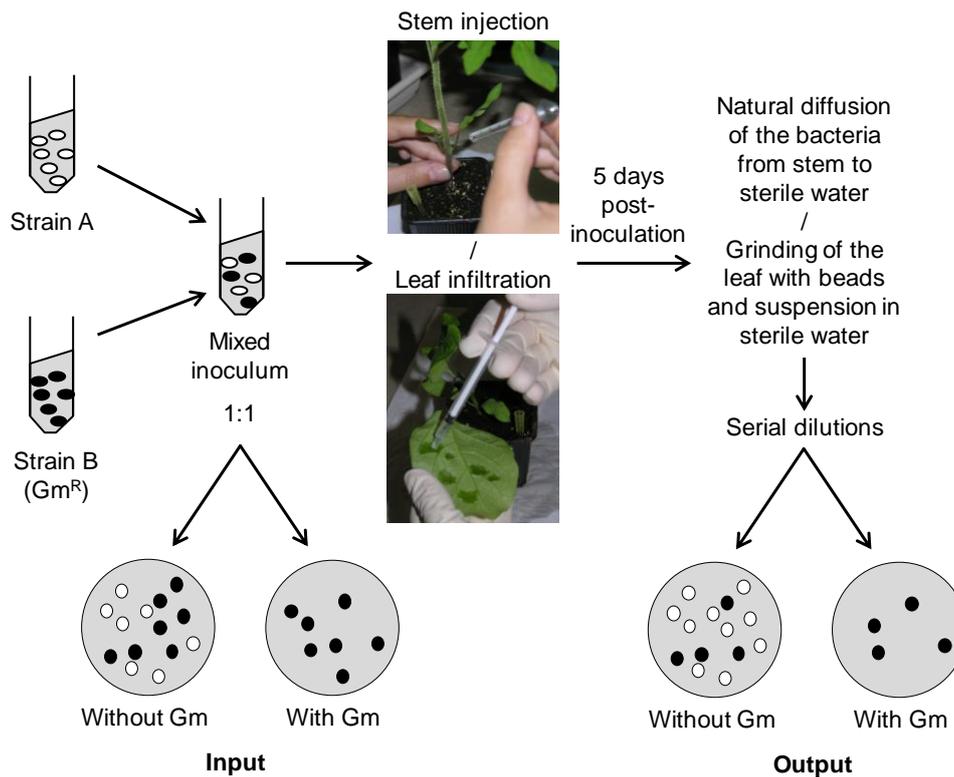
Espèce	Variété	Famille	Sensibilité à GMI1000	Question associée
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Marmande	Solanacées	Sensible	Spécialisation
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Hawaï7996	Solanacées	Tolérante*	Contournement des résistances
Aubergine (<i>Solanum melongena</i>)	Zebrina	Solanacées	Sensible	Spécialisation
Aubergine (<i>Solanum aethiopicum</i>)	MM134	Solanacées	Résistante	Contournement des résistances
Pelargonium (<i>Geranium sanguineum</i>)	Maverick rouge écarlate	Geraniacées	Sensible	Spécialisation, Impact de l'hôte
Haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Blanc précoce	Légumineuses	Tolérante*	Adaptation à un nouvel hôte
Choux (<i>Brassica oleracea</i>)	Bartolo	Brassicacées	Tolérante*	Adaptation à un nouvel hôte
Melon (<i>Cucumis melo</i>)	Vedrantais	Cucurbitacées	Non-hôte	Adaptation à un nouvel hôte distant

* une plante tolérante à GMI1000 est une plante dans laquelle la bactérie peut se développer mais sans produire la maladie.

3.2.3.2. Mesure de la fitness *in planta* des clones dérivés de GMI1000

La méthode de mesure de la fitness *in planta* utilisée fait référence à la méthode mise au point pour *Pseudomonas syringae* par Macho *et al.* (2007). Nous l'avons adaptée à *R. solanacearum* en collaboration avec Alberto Macho. Il s'agit d'une méthode de co-inoculation des deux clones à comparer en proportions égales dans la feuille ou dans la tige de la plante, puis détermination de la multiplication cellulaire *in planta* pour chaque clone. Un indice de compétitivité (CI) est alors calculé (Figure 5). Un CI=1 indique que les deux clones ont la même fitness, un CI>1 indique que le clone dérivé a une meilleure fitness que le clone ancestral et un CI<1 indique que le clone dérivé a une fitness moins bonne que le clone ancestral.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Molecular Plant Microbe Interaction*.



$$\text{Competitive Index (CI)} = \frac{\text{Strain B CFU / Strain A CFU (output)}}{\text{Strain B CFU / Strain A CFU (input)}}$$

- CI = 1 : B fitness = A fitness
- CI < 1 : B fitness < A fitness
- CI > 1 : B fitness > A fitness

Figure 5 : Représentation schématique du protocole de mesure comparative de la fitness *in planta* de deux clones.

Une cassette de résistance à la gentamycine (Gm) est intégrée dans un des deux clones afin de le distinguer de l'autre clone sur milieu de culture solide.

A partir des données issues de cette expérience, un indice de compétitivité (CI) est calculé.

Ce test de compétitivité a été appliqué sur 125 clones dérivés (25 clones dérivés sur tomate sensible, 25 sur aubergine sensible, 25 sur Pelargonium, 25 sur haricot et 25 sur chou). Les valeurs de CI obtenues étaient significativement supérieures à 1 pour 93% des clones dérivés sur tomate, aubergine, haricot et chou. Par contre, seuls 6 clones dérivés sur Pelargonium parmi les 25 testés avaient des CI significativement supérieurs à 1. En moyenne, les valeurs de CI obtenues sur plantes sensibles étaient inférieures aux valeurs de CI obtenues sur plantes tolérantes. Ces résultats ont montré que le pathogène pouvait adapter sa croissance à la fois sur plante sensible et sur plante tolérante mais que le saut adaptatif était plus fort sur plante tolérante.

3.2.3.3. Polymorphismes génomiques apparues durant l'évolution expérimentale de GMI1000

Les génomes complets de 50 clones évolués ont été entièrement séquencés. L'analyse comparative de ces séquences avec la séquence du clone ancestral GMI1000 a révélé entre 0 et 9 polymorphismes génomiques par clone évolué (Figure 6). Ces polymorphismes étaient pour la plupart des mutations ponctuelles non synonymes, mais des insertions d'IS (Séquences d'Insertion) ou de petites InDels (Insertions-Délétions) ont également été détectées.

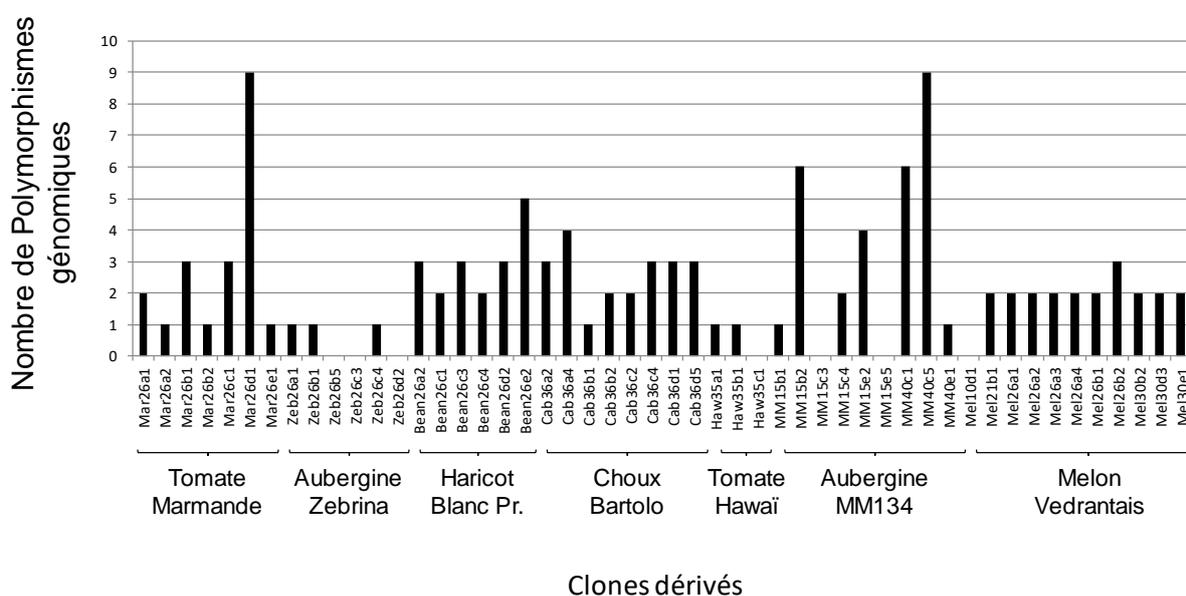


Figure 6: Nombre de polymorphismes génomiques apparus durant l'évolution expérimentale de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum* sur différentes plantes.

Les clones dérivés de la souche GMI1000 ont été obtenus par des expériences de passages en série sur une plante hôte fixée. Le nom de clone dérivé (ex : Mar26a1) porte le nom de la plante expérimentale (ex : Marmande), le nombre de passages en série (ex : 26), le réplikat biologique (ex : A) et le numéro du clone isolé (ex : 1).

Des mutations parallèles ont pu être détectées dans des populations indépendantes de clones dérivés sur 2 gènes, le gène *RSc2508* codant pour une protéine hypothétique et le gène *RSc1097* (renommé *efpR*), codant pour un régulateur de transcription de fonction inconnue. Les mutations dans le gène *RSc2508* ont été détectées dans les populations A, D et E évoluées sur tomate Marmande, les populations A et B évoluées sur chou et la population C évoluée sur Aubergine MM134. Les mutations dans le gène *efpR* ont été détectées dans la population C évoluée sur tomate Marmande, la population A évoluée sur aubergine Zebrina, les populations C, D et E évoluées sur haricot et la population B évoluée sur melon (Figure 7).

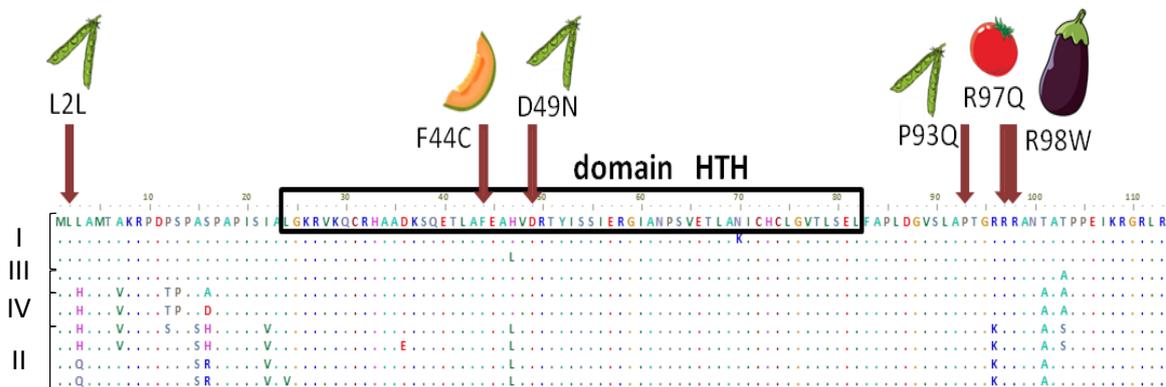


Figure 7: Position des mutations sur la séquence protéique du gène *efpR* apparues durant l'évolution expérimentale de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum*.

Les mutations ponctuelles apparues sur chaque hôte expérimental sont indiquées par des flèches. La figure représente un alignement des 10 séquences protéiques d'EfpR détectées parmi 87 souches représentatives des 4 phylotypes (I, II, III et IV) de *R. solanacearum*.

Le gène *efpR* code pour un régulateur de transcription de 113 acides aminés appartenant à la famille des régulateurs HTH-XRE (Helix-Turn-Helix_Xenobiotic-Response-Element). Ce gène est très conservé parmi les différentes souches de *R. solanacearum*. Seuls 10 variants protéiques ont pu être identifiés parmi 87 souches représentatives des 4 phylotypes (Figure 7). Ce gène est aussi présent chez d'autres beta-protéobactéries telles que *Burkholderia*, *Pandoraea* et *Bordetella* avec plus de 80% d'identité protéique. Cependant, la fonction de la protéine EfpR était totalement inconnue.

Afin de mesurer la valeur adaptative des mutations apparues dans le gène *efpR*, nous les avons reconstruites dans le clone ancestral GMI1000. Nous avons également généré le mutant GMI1000 délété du gène *efpR*. Des tests de compétitivité dans le haricot, la tomate Marmande et le chou entre la souche sauvage GMI1000 et ces différents mutants a permis de montrer qu'à la fois les mutations ponctuelles et la délétion conféraient à la souche GMI1000 un gain de fitness *in planta* significatif.

La plupart de ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue Molecular Biology and Evolution, présentée ci-après.

Papier MBE (16 pages)

3.2.4. CARACTERISATION FONCTIONNELLE D'EFPR

3.2.4.1. EfpR est un régulateur central de la virulence et du métabolisme chez *R. solanacearum*

Au cours de l'évolution expérimentale de la souche GMI1000, des mutations ponctuelles sont apparues dans le gène *efpR* pour 6 lignées indépendantes d'évolution. Ce gène code pour un régulateur de transcription mais sa fonction était totalement inconnue. Nous avons donc mis en place des expérimentations afin de mieux comprendre son rôle dans la biologie de *R. solanacearum*.

Des analyses transcriptomiques et phénotypiques du mutant GMI1000 délété du gène *efpR* (Δ efpR) ont montré que EfpR agit comme un répresseur catabolique global, réprimant directement ou indirectement l'expression de nombreuses voies métaboliques ainsi que certaines fonctions de virulence. L'analyse de données RNAseq a montré que plus de 800 gènes étaient différentiellement exprimés dans le mutants Δ efpR, dont de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et la virulence de la bactérie. Un ensemencement de plaques BIOLOG a confirmé ce résultat, montrant que le mutant Δ efpR était capable d'un catabolisme significativement amélioré par rapport à la souche sauvage pour 65 substrats. EfpR contrôle également des déterminants de virulence tels que la production d'EPS et la mobilité. Un mutants Δ efpR produit moins d'EPS mais est plus mobile que la souche sauvage, et son pouvoir pathogène sur tomate est légèrement réduit.

Nous avons également montré que les mutants ponctuels apparus par évolution expérimentale se comportaient comme des mutant Δ efpR, ce qui nous a permis de conclure que ces mutations ponctuelles étaient des mutations « perte de fonction ».

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue PloS Pathogens, présentée ci-après.

Papier PLOS Path (23 pages)

3.2.4.2. Les mutations dans le gène *efpR* induisent un phénomène d'hétérogénéité phénotypique dans les populations de *R. solanacearum*

Au cours de nos études avec les mutants *efpR*, nous avons observé que ces mutants génèrent systématiquement 2 types de colonies sur boîte, le type S (« Sauvage », similaire aux colonies formées par la souche sauvage) et le type EV (« EfpR Variant ») (Figure 8). Nous avons observé que le gène *efpH*, un homologue d'*efpR* présent dans tous les génomes de *R. solanacearum*, jouait un rôle clé dans ce phénomène, le double mutant *efpR-efpH* étant « verrouillé » en type EV (figure 8).

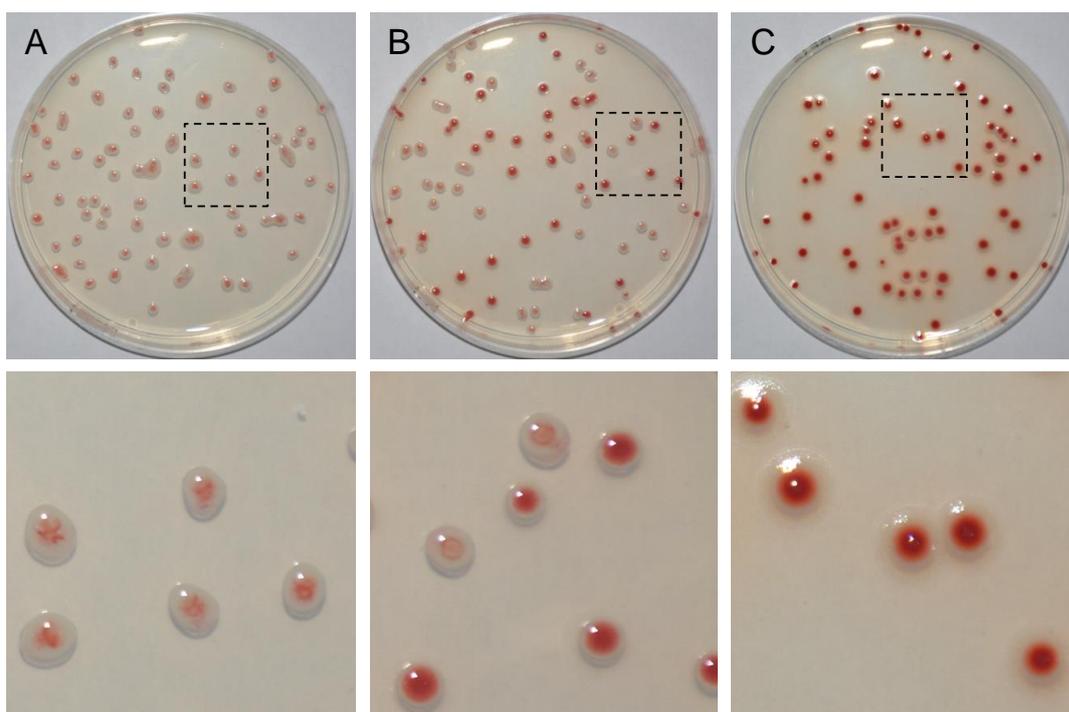


Figure 8: Hétérogénéité phénotypique des mutants $\Delta efpR$ de la souche GMI1000 de *R. solanacearum*.

(A) Colonies de type S formées par la souche sauvage, (B) colonies de types S et EV formées par le mutant $\Delta efpR$, (C) colonies de type EV formées par le double mutant $\Delta efpR-\Delta efpH$, après 52h à 28°C sur milieu riche additionné de D-glucose et de triphenyl tetrazolium chloride. Les colonies de type S sont muqueuses et rosées tandis que les colonies de type EV sont plus rouges et moins muqueuses.

Ce phénomène d'hétérogénéité phénotypique a été confirmé par une approche de gènes rapporteurs régulés par EfpR, le gène *RSc3148* qui code pour une protéine transmembranaire et le gène *fliC*, qui code pour une protéine de structure du filament flagellaire nécessaire à la mobilité bactérienne. La fusion des promoteurs de ces gènes avec la protéine fluorescente mCherry a révélé l'expression différentielle de ces 2 gènes dans les 2 types de colonies, ces gènes étant exprimés dans les types EV mais ne l'étant pas dans les types S (Figure 9).

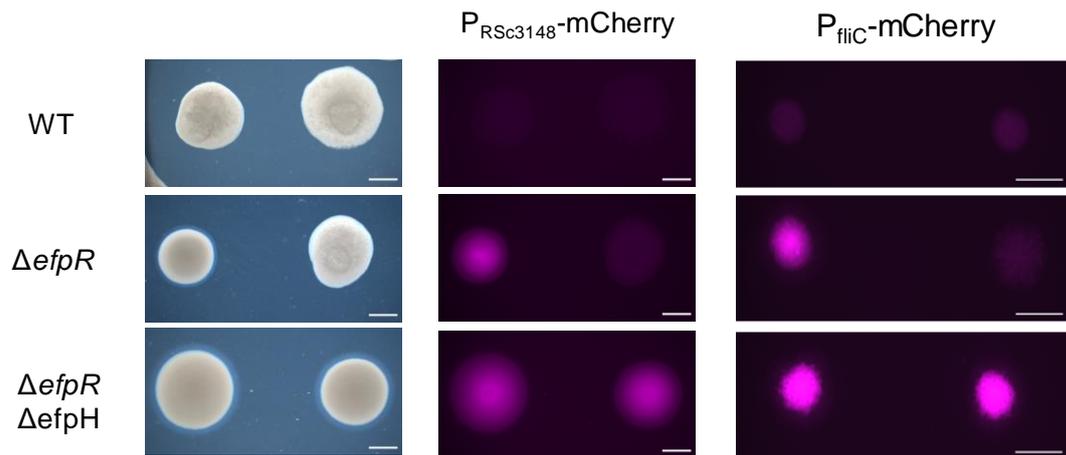


Figure 9: Expression différentielle des gènes *RSc3148* et *fliC* dans les colonies de type S et EV.

Les colonies bactériennes ont été obtenues après croissance sur milieu riche pendant 52h à 28°C. A droite, observation des colonies à la lumière du jour. A gauche, observation des mêmes colonies à la lumière fluorescente. L'expression des rapporteurs $P_{RSc3148}$ -mCherry et P_{fliC} -mCherry est observable dans les colonies de type EV. Barre d'échelle = 2 mm.

Des tests de pouvoir pathogène sur tomate ont mis en évidence une forte réduction de l'agressivité du type EV (double mutant $\Delta efpR$ - $\Delta efpH$) comparée au type S (souche sauvage) (Figure 10). Le mutant $\Delta efpR$, qui génère à la fois des types S et des types EV ne voit son agressivité sur tomate que légèrement réduite. Des mesures de la croissance bactérienne *in planta* ont ensuite révélé que le type S possédait une meilleure fitness *in planta* que le type EV (Figure 11).

Des expériences de co-inoculation en proportions égales entre les types S (souche sauvage) et EV (double mutant $\Delta efpR$ - $\Delta efpH$) ont été menée *in planta* dans la tige de tomate et *in vitro*, en milieu riche et milieu minimum supplémenté de différentes sources de carbone (histidine, glutamine, asparagine ou proline). Ces expériences ont permis de montrer que la présence du type EV affectait légèrement la croissance du type S *in planta*, par contre la présence du type S favorisait fortement la croissance du type EV *in planta* (Figure 11). En revanche, le type EV est métaboliquement plus efficace que le type S et présente une meilleure fitness *in vitro* en milieu minimum (Figure 12).

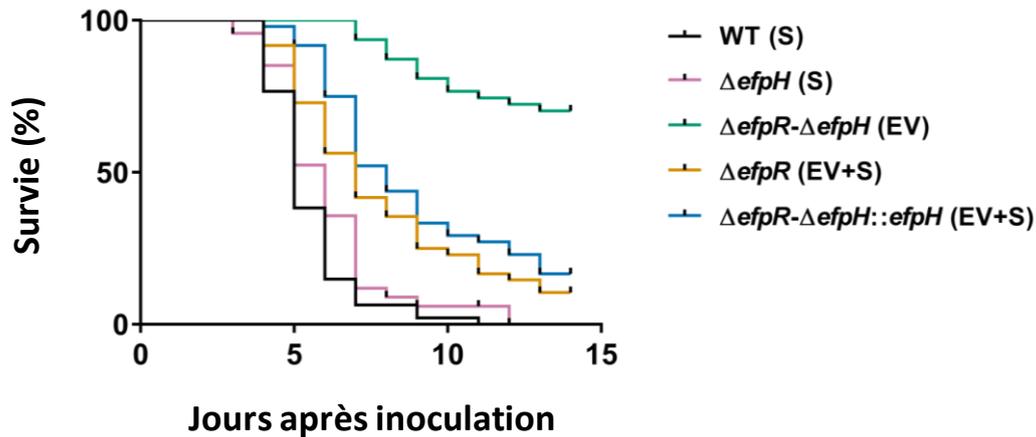


Figure 10: L'agressivité du type EV sur tomate est fortement réduite comparée au type S.

Tests de survie de plants de tomate inoculés avec la souche sauvage GMI1000, le mutant $\Delta efpR$, le mutant $\Delta efpH$, le double mutant $\Delta efpR-\Delta efpH$ ou la souche complétée $\Delta efpR-\Delta efpH::\Delta efpH$. Les types S ou EV trouvés dans les différents génotypes sont indiqués entre parenthèses. Les courbes représentent 3 répétitions biologiques de 15-16 plants inoculés par arrosage des racines. Toutes les courbes de survie (sauf celle avec le mutant simple $\Delta efpH$) sont significativement différentes de la courbe de survie avec la souche sauvage (Gehan-Breslow-Wilcoxon test, p -value < 0.0001).

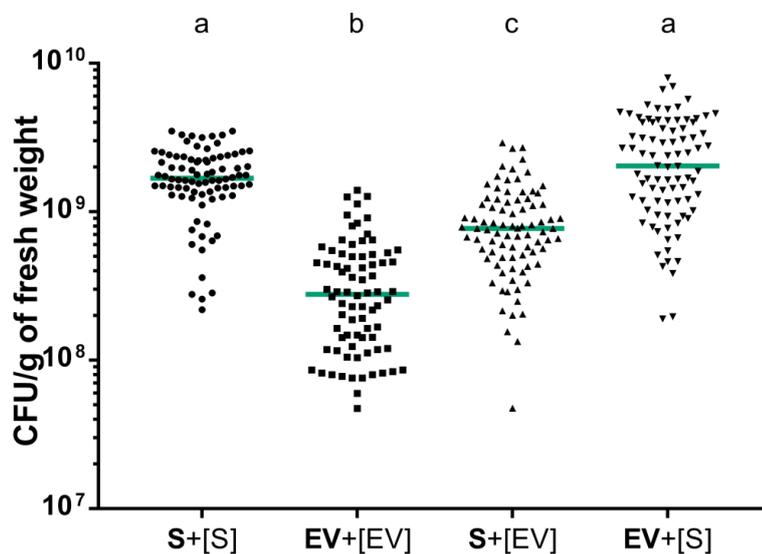


Figure 11: Fitness *in planta* des types S et EV durant la co-infection.

Les bactéries ont été co-inoculées en proportion égale dans la tige de tomate puis récupérées 3 jours après inoculation. Chaque point représente la taille de la population du type indiqué en gras (S ou EV) dans la tige d'une plante. Les barres vertes représentent la médiane. Les résultats ont été comparés par un test statistique de Kruskal-Wallis (différents groupes statistiques si p -value < 0.001). S = souche sauvage ; EV = double mutant $\Delta efpR-\Delta efpH$.

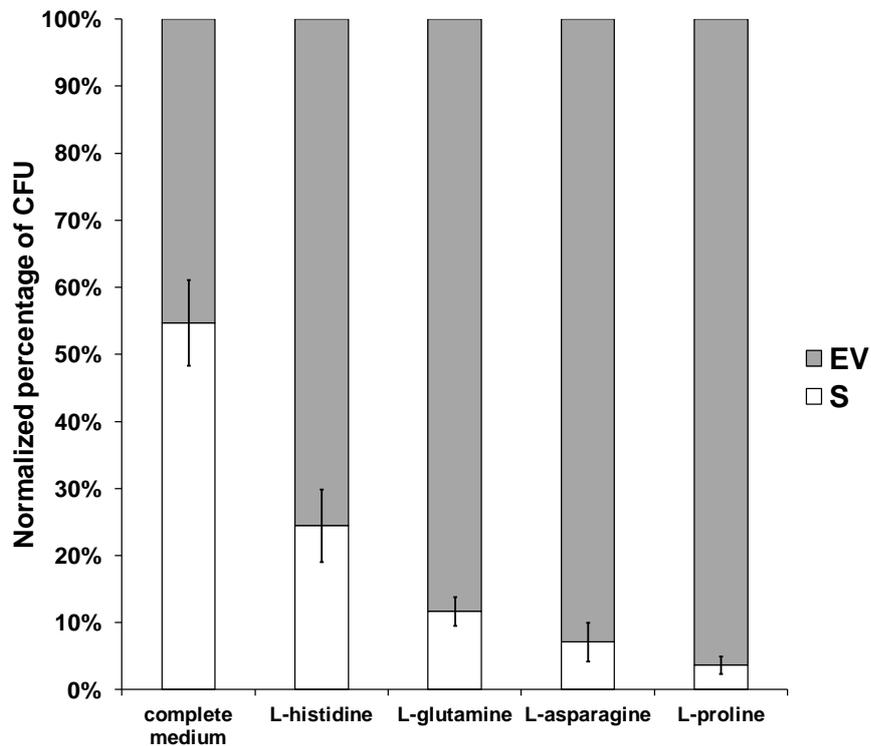


Figure 12: Le type EV présente une meilleure fitness que le type S en milieu minimum.

Tests de compétition *in vitro* entre les types EV ($\Delta efpR$ - $\Delta efpH$) et S (souche sauvage) inoculés en proportions égales soit en milieu riche soit en milieu minimum supplémenté de différentes sources de carbone. Les tests de compétition ont débuté à $\sim 5 \cdot 10^5$ CFU/ml et ont été stoppés à 10^9 CFU/ml. Le pourcentage de CFU récupérés a été normalisé par le pourcentage de CFU présents dans l'inoculum de départ. Deux répétitions biologiques ont été réalisées, chacune comprenant trois répétitions techniques.

Enfin, nous avons testé l'hypothèse de l'existence de variants *efpR* dans la nature. Pour cela, nous avons analysé une collection de 41 souches représentatives des 4 phylotypes de *R. solanacearum*. Nous avons identifié une souche, la souche CMR34 du phylotype IIB, générant sur boîte les types S et EV. Afin de vérifier si cette hétérogénéité phénotypique était liée au gène *efpR*, nous avons transformé la souche CMR34 avec le système rapporteur $P_{RSc3148}$ -GFP. Comme pour la souche GMI1000, nous avons observé que les types CMR34-EV exprimaient fortement le système rapporteur alors que les types CMR34-S ne l'exprimaient pas. Ce résultat a ainsi validé l'hypothèse que le phénomène d'hétérogénéité phénotypique lié à *efpR* pouvait exister chez différentes souches de *R. solanacearum*.

Ces travaux ont mis en évidence l'importance potentielle de générer de l'hétérogénéité phénotypique dans les populations isogéniques de *R. solanacearum* comme trait adaptatif à des environnements changeants. Cette hétérogénéité phénotypique est apparue suite à des

mutations spontanées dans le régulateur central EfpR. Chez *R. solanacearum*, des mutations spontanées dans un autre régulateur central, PhcA, ont déjà été reportées comme générant des variants avirulents mais à croissance rapide (Peyraud *et al.*, 2016; Khokhani *et al.*, 2017; Perrier *et al.*, 2018). Cependant, les mutations dans *phcA* ne génèrent qu'un seul phénotype et la réversion des mutants *phcA* vers la forme sauvage n'apparaît certainement qu'à faible fréquence vue la nature des mutations identifiées (Poussier *et al.*, 2003). Au contraire, les mutations dans *efpR* assurent la co-existence de deux phénotypes, maintenant ainsi dans la population une proportion de types virulents nécessaires pour la réalisation du cycle de vie complet du pathogène. Une perspective intéressante de ce travail serait l'échantillonnage de nouvelles souches de *R. solanacearum* dans différents compartiments (sol, eau, différentes plantes hôtes) afin d'étudier la fréquence de variants *efpR* dans la nature et leur rôle potentiel dans la dynamique des populations de *R. solanacearum*.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue Environmental Microbiology.

4. PROJET DE RECHERCHE

ROLE DES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES CHEZ *RALSTONIA SOLANACEARUM* DANS L'ADAPTATION A L'HOTE

4.1. LABORATOIRE

Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM)

UMR CNRS-INRA 2594/441

Equipe de Stéphane Genin : Pouvoir Pathogène de *Ralstonia* et adaptation à son environnement.

4.2. CONTEXTE

Dans ce projet, je propose de considérer un nouveau champ de recherche chez les bactéries phytopathogènes : le rôle des modifications épigénétiques dans l'évolution et l'adaptation à l'hôte.

Les modifications épigénétiques sont des modifications héritables qui entraînent des changements dans l'expression des gènes sans modifier la séquence d'ADN. Elles sont responsables d'importantes variations phénotypiques chez tous les êtres vivants y compris les bactéries. Le rôle des modifications épigénétiques dans différents phénotypes a surtout été démontré chez les bactéries pathogènes de l'homme et des animaux, par exemple dans la résistance aux antibiotiques et la virulence (Balaban *et al.*, 2004; Casadesús and Low, 2006; Fang *et al.*, 2012; Shell *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2018). Cependant, le rôle des modifications épigénétiques dans l'interaction hôte-pathogène n'a pratiquement pas été étudiée chez les pathogènes de plante.

4.2.1. ROLE DE LA METHYLATION DE L'ADN CHEZ LES BACTERIES

La méthylation de l'ADN est la forme la plus connue de modifications épigénétiques dans les génomes eucaryotes et procaryotes (Clark *et al.*, 2012). Elle consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (CH₃) sur une base adénine ou cytosine de la molécule d'ADN, catalysé par les ADN méthyltransférases (MTases). Chez les bactéries, il existe trois types de méthylation : 6mA (6-méthyladenine), 4mC (4-méthylcytosine) et 5mC (5-méthylcytosine) (Figure 13).

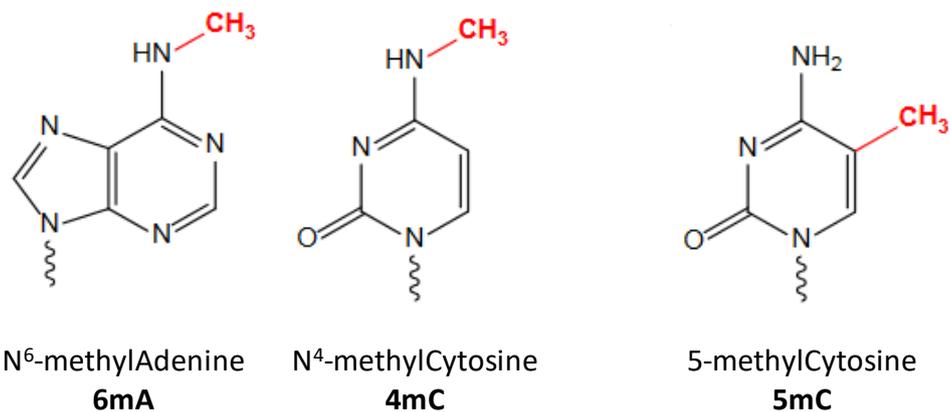


Figure 13 : Trois types de méthylation des adénines et des cytosines décrites chez les bactéries

De nombreuses MTases sont des composantes d'un système de restriction-modification (RM). Ces systèmes protègent la bactérie contre l'invasion par des bactériophages à ADN. Ils comprennent une enzyme de restriction et une MTase ciblant le même motif d'ADN. Pendant que l'enzyme de restriction dégrade l'ADN étranger, la MTase méthyle le motif de l'ADN bactérien pour le protéger de la restriction. D'autres MTases ne sont pas associées à un système RM et sont classées comme 'orphelines'. Les MTases orphelines les mieux caractérisées chez les bactéries sont la Mtase Dam, d'abord décrites chez *Escherichia coli* puis chez de nombreuses gamma-protéobactéries, et la MTases CcrM, d'abord décrite chez *Caulobacter crescentus* puis chez de nombreuses alpha-protéobactéries (Casadesús and Low, 2006). Cependant, des travaux récents ont mis en évidence l'existence d'une grande diversité des MTases chez les bactéries, révélant 620 nouvelles MTases (Blow *et al.*, 2016).

Le rôle de la méthylation de l'ADN a bien été décrite chez les bactéries *E. coli* et *C. crescentus* (Fang *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2014). Chez ces bactéries, la méthylation de l'ADN a été démontrée comme jouant un rôle majeur dans le control de la réplication du chromosome, la réparation de l'ADN, l'expression de gènes, l'hétérogénéité phénotypique et la virulence (Encadré 1). L'impact de la méthylation de l'ADN sur la virulence a également été démontrée pour d'autres bactéries pathogènes de l'homme et des animaux (Watson *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2005; Casadesús and Low, 2006; Wu *et al.*, 2006; Mehling *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Giacomodonato *et al.*, 2009; Shell *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2018; Nye *et al.*, 2019) et plus récemment sur la virulence d'un pathogène d'insectes *Photorhabdus luminescens* (Payelleville *et al.*, 2018) (Tableau 2). Cependant, le rôle de la méthylation de l'ADN dans la virulence des bactéries phytopathogènes est encore très mal connu.

Encadré 1: Exemple du rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression de gènes et l'hétérogénéité phénotypique : l'opéron *pap* chez *E. coli* (Casadesús and Low, 2006, 2013)

La méthylation de l'ADN catalysée par une MTase, lorsqu'elle est située dans la région promotrice d'un gène, peut modifier l'affinité des protéines régulatrices pour leur site de fixation. Il existe plusieurs exemples de gènes dont l'expression dépend de cette compétition entre fixation de la protéine régulatrice ou de la MTase mais l'exemple le plus étudié est celui de l'expression des gènes du pilus Pap.

Le pilus Pap est un facteur de virulence important chez les *E. coli* uropathogènes car il permet l'adhésion à l'urètre. Il est codé par l'opéron *pap* composé de 11 gènes dont 9 impliqués dans la fabrication du pilus et 2 (*papB* et *papI*) codant pour des protéines régulatrices. L'expression du pilus Pap est régulé par un mécanisme de variation de phase impliquant la coexistence de 2 sous-populations, l'une exprimant le pilus (phase ON) et l'autre ne l'exprimant pas (phase OFF).

Dans la région promotrice de *papBA*, 6 sites de liaison du régulateur Lrp (leucine responsive regulatory protein) sont présents dont 2 contiennent un motif GATC, cible de la MTase Dam (Figure 1.1A). Le mécanisme de variation de phase régulant l'expression du pilus Pap implique une compétition entre la MTase Dam et les protéines régulatrices Lrp et PapI. En phase OFF, GATC^{dist} est méthylé et GATC^{prox} ne l'est pas (Figure 1.1A). En phase ON, l'état de méthylation de ces deux sites est inversé (Figure 1.1D). La fixation de la protéine Lrp sur les sites 1, 2 et 3 assure la protection du site GATC^{prox} contre la méthylation et bloque la transcription de *papBA* (phase OFF). En phase ON, le complexe PapI/Lrp est fixé sur les sites 4, 5 et 6 et assure la protection du site GATC^{dist} contre cette méthylation.

La transition de la phase OFF vers ON peut se faire au moment de la réplication de l'ADN. Au moment de la réplication de l'ADN, la protéine Lrp est détachée et le site GATC^{dist} est hémiméthylé (Figure 1.1B). La protéine PapB est produite et active la transcription de *papI*. Le complexe PapI/Lrp va alors se fixer sur les sites 4, 5 et 6 avec une meilleure affinité que sur les sites 1, 2 et 3 (Figure 1.1C). Les sites 1, 2 et 3 sont alors méthylés par la MTase Dam bloquant ainsi la population en phase ON (Figure 1.1D).

La transition de la phase ON vers OFF se fait beaucoup plus fréquemment même si le mécanisme est encore mal connu. L'hypothèse est qu'au moment de la réplication de l'ADN, le complexe PapI/Lrp est dissocié des sites 4, 5 et 6 permettant à la MTase Dam de rentrer en compétition pour ces sites. L'observation que la protéine Lrp a une meilleure affinité pour les sites 1, 2 et 3 que pour les sites 4, 5 et 6 pourrait expliquer pourquoi la transition de la phase ON vers OFF se fait à plus forte fréquence.

Ainsi, l'état de méthylation des sites GATC^{dist} et GATC^{prox} va orchestrer la variation de phase du pilus Pap générant un phénomène d'hétérogénéité phénotypique avec 2 sous-populations, l'une exprimant le pilus et l'autre ne l'exprimant pas.

Encadré 1 (suite)

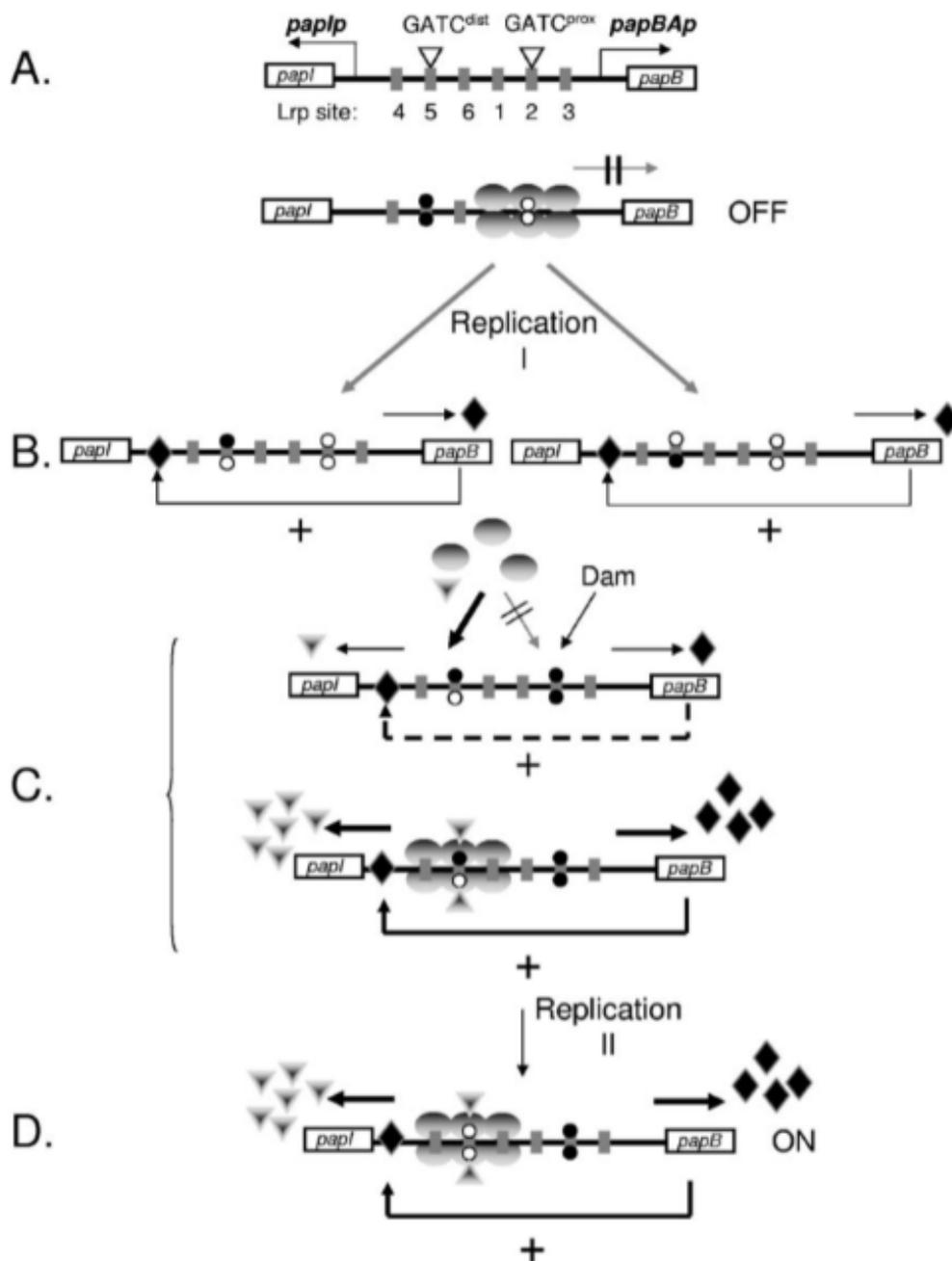


Figure 1.1 : Transition de l'opéron *pap* de la phase OFF vers ON (d'après Casadesús and Low, 2006). Les sites de fixation de la protéine Lrp sont représentés par des rectangles gris, la protéine Lrp par un ovale gris, la protéine PapI par un triangle gris et la protéine PapB par un losange noir. Les sites GATC méthylés sont représentés par des ronds noirs et non méthylés par des ronds blancs.

Tableau 2: Exemples de bactéries pathogènes pour lesquelles l'impact de la méthylation de l'ADN sur la virulence a été démontré

Espèce	Hôte	Type de méthylation	Méthyltransférase	Motif	Référence
<i>Haemophilus influenzae</i>	homme	6mA	Dam	GATC	Watson et al., 2004
<i>Yersinia pestis</i>	homme	6mA	Dam	GATC	Robinson et al., 2005
<i>Salmonella enterica</i>	homme	6mA	Dam	GATC	Giacomodonato et al., 2005
<i>Escherichia coli</i>	homme	6mA	Dam	GATC	Casadesus & Low, 2006
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	homme	6mA	Dam	GATC	Wu et al., 2006
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	homme	6mA	Dam	GATC	Mehling et al., 2007
<i>Campylobacter jejuni</i>	homme	6mA	Cj1461	LYLDPPF	Kim et al., 2008
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	homme	6mA	MamA (M.MtuHIII)	CTGGAG	Shell et al., 2013
<i>Helicobacter pylori</i>	homme	4mC	M2.HpyAII	TCTTC	Kumar et al., 2018
<i>Streptococcus pyogenes</i>	homme	6mA	M.SpyMEW123I	GCANNNNTTYG	Nye et al., 2019
<i>Photobacterium luminescens</i>	insectes	6mA	Dam	GATC	Payelleville et al., 2018

4.2.2. VARIATION DU PROFIL DE METHYLATION DE L'ADN ET ADAPTATION A UN NOUVEL ENVIRONNEMENT

L'importance de la méthylation de l'ADN dans l'évolution et l'adaptation a fait l'objet de plusieurs travaux théoriques et expérimentaux chez les Eucaryotes. Ainsi, des phénotypes mieux adaptés ayant un nouveau profil de méthylation ont le potentiel d'apparaître dans un environnement donné avant la fixation de mutations adaptatives et peuvent être maintenus dans la population via le phénomène d'héritabilité épigénétique transgénérationnelle (Schmitz *et al.*, 2011; Kronholm and Collins, 2016).

Des travaux récents menés sur des bactéries des sédiments marins ont également suggéré un rôle probable de la méthylation de l'ADN dans l'adaptation à un nouvel environnement. Ces travaux ont montré une variation des profils de méthylation de gènes impliqués dans l'adaptation à l'environnement entre les communautés bactériennes occupant différentes profondeurs de sédiments (Rambo *et al.*, 2019). Cependant, la corrélation entre variation du profil de méthylation et adaptation à un nouvel environnement reste encore hypothétique chez les bactéries.

4.2.3. NOUVELLES METHODES DE DETECTION DE LA METHYLATION DE L'ADN CHEZ LES BACTERIES

Jusqu'à présent, la détection de la méthylation de l'ADN était très difficile, en particulier pour la détection des modifications 6mA et 4mC. Seules les modifications 5mC pouvaient être détectées à l'aide d'un traitement de l'ADN au bisulfite. Le bisulfite converti les cytosines non méthylées en uracile, ce qui permet la détection des cytosines méthylées en comparant les séquences génomiques avant et après traitement au bisulfite (Li and Tollefsbol, 2011; Kahramanoglou *et al.*, 2012).

Récemment, le développement de la technologie de séquençage PacBio a permis le séquençage de molécules d'ADN en temps réel ('Single Molecule in Real Time' SMRT sequencing) sans amplification préalable. Cette technologie a le potentiel de détecter des nucléotides modifiés tels que les nucléotides méthylés grâce à l'analyse de la cinétique de travail de l'ADN polymérase (Figure 14). Des outils bioinformatiques sont fournis par PacBio pour déterminer à partir d'un séquençage, le profil de méthylation complet (méthylome) du génome séquencé. Cette technologie a déjà permis l'analyse de nombreux méthylomes bactériens (Clark *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2015; Blow *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018; Payelleville *et al.*, 2018).

Cependant, si la technologie de séquençage PacBio s'est révélée très efficace pour la détection des modifications de type 6mA et 4mC pour les génomes bactériens, elle ne l'est pas pour la détection des modifications de type 5mC. Pour ce dernier type de modification, la méthode la plus adaptée reste le traitement au bisulfite, suivi d'un séquençage classique.

Exemple: N⁶-methyladenine

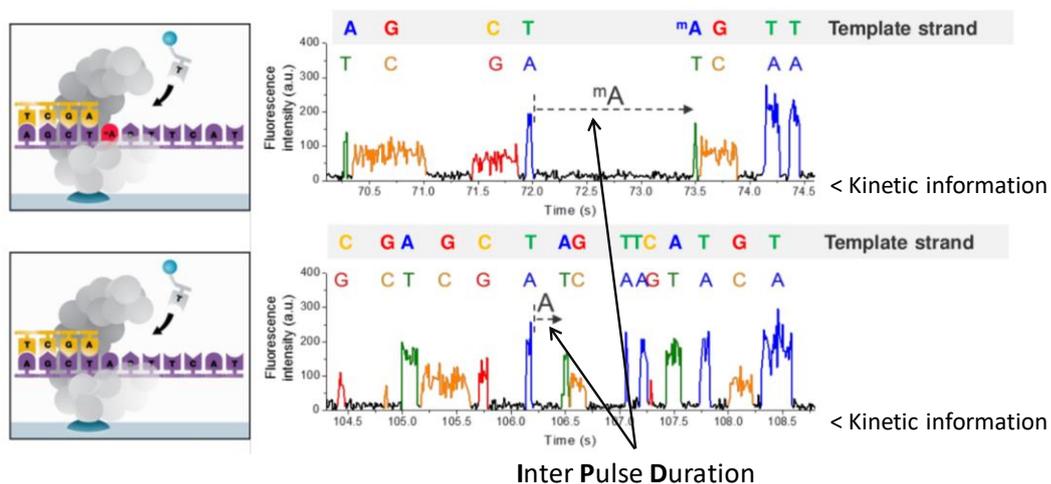


Figure 14 : La technologie de séquençage PacBio permet la détection des nucléotides méthylés. La détection des nucléotides méthylés se fait par l'analyse de la cinétique de travail de l'ADN polymérase lors de la synthèse du brin d'ADN (d'après Flusberg *et al.*, 2010).

4.3. OBJECTIFS

L'objectif de ce projet est d'analyser le rôle de la méthylation de l'ADN dans l'évolution et l'adaptation à l'hôte chez la bactérie phytopathogène *R. solanacearum*. Ce projet est dans la continuité directe de mes travaux sur *R. solanacearum* visant à mieux comprendre les mécanismes d'évolution et d'adaptation du pathogène à de nouveaux hôtes.

Une première étape du projet sera consacrée au développement méthodologique pour l'analyse du méthylome chez *R. solanacearum*. Les approches PacBio et bisulfite seront utilisées ainsi que d'autres approches complémentaires pour la validation de marques de méthylation (approche enzymatique).

Une deuxième étape du projet portera sur l'analyse du méthylome et des méthyltransférases chez la souche de référence GMI1000 et d'autres souches représentatives des 4 phylotypes du complexe d'espèce *R. solanacearum*.

Une dernière étape portera sur l'analyse de clones dérivés de la souche GMI1000, obtenus par évolution expérimentale sur une plante hôte fixée et révélant des caractères adaptatifs sur leur hôte expérimental.

DONNEES PRELIMINAIRES IMPORTANTES POUR LE PROJET

✓ **Présence de 7 méthyltransférases dans la souche GMI1000 de *R. solanacearum***

L'identification des MTases chez GMI1000 a été faite à partir de sa séquence génomique en utilisant la base de données REBASE (Roberts *et al.*, 2015). Cette analyse a révélé 7 MTases, dont 6 sur le chromosome / 1 sur le mégaplasmide et 6 orphelines / 1 associée à un système RM (Tableau 3). Un nouveau nom a été attribué à ces MTases selon la nomenclature décrite dans Roberts *et al.* (2003). La MTase M.RsoGVI présente un pourcentage de GC de 50%, très inférieur au reste du génome de la souche GMI1000 (en moyenne 67%). L'hypothèse est que cette MTase a été acquise par transfert horizontal de gènes.

Tableau 3 : Caractéristiques des 7 méthyltransférases de la souche GMI1000

Gene				MTase Protein			
ID	Nom du gène	Localisation	GC%	Type	Nom de la protéine	Type de Modification	Motif ciblé
RSc0844	<i>rsoGIM</i>	Chromosome	68,7	orpheline	M.RsoGI	-	-
RSc0845	<i>rsoGIIM</i>	Chromosome	66,8	orpheline	M.RsoGII	-	-
RSc0869	<i>rsoGIIM</i>	Chromosome	63,5	orpheline	M.RsoGIII	m5C	
RSc1982	<i>rsoGIVM</i>	Chromosome	67,9	orpheline	M.RsoGIV	m6A	GTWWAC (Erill et al., 2017)
RSc3396	<i>rsoGVM</i>	Chromosome	70,1	RM	M.RsoGV	m6A	-
RSc3438	<i>rsoGVIM</i>	Chromosome	50,1	orpheline	M.RsoGVI	m5C	YGCCGGCR (Erill et al., 2017)
RSp0570-571	<i>rsoGVIM</i>	Mégaplasmide	66,7	orpheline	M.RsoGVII	-	-

✓ **Le séquençage PacBio des souches GMI1000 et UY031 permet l'analyse des méthylomes**

Les génomes des souches GMI1000 et UY031 (souche de phylotype IIB) ont été récemment séquencés avec la technologie PacBio. Ce séquençage a permis l'analyse comparative des profils de méthylation et a ainsi révélé deux motifs de type 6mA, le motif GTWWAC présent dans les

deux souches et le motif CAACRAC présent uniquement dans la souche UY031 (Erill *et al.*, 2017). L'analyse de la répartition des motifs GTWWAC dans les gènes, les promoteurs et les régions intergéniques a permis d'identifier des différences entre les souches GMI1000 et UY031, suggérant ainsi un rôle probable de la méthylation de l'ADN dans les phénotypes caractéristiques de ces 2 souches.

✓ **Des clones dérivés de la souches GMI1000 obtenus par évolution expérimentale présentent des gains adaptatifs sans polymorphisme génomique**

Comme décrit précédemment, au cours de mes travaux d'évolution expérimentale avec la souche GMI1000, j'ai pu générer des clones dérivés présentant des gains adaptatifs sur leur hôte expérimental. Le séquençage des génomes complets de 50 clones évolués a révélé entre 0 et 9 polymorphismes génomiques (Figure 6). Nous avons donc émis l'hypothèse que les gains de fitness *in planta* observés pour les clones évolués pourrait être aussi le résultat de modifications épigénétiques. Cette hypothèse pourrait être particulièrement vraie pour les clones adaptés ne présentant aucun polymorphisme génomique.

4.4. METHODOLOGIE ET RESULTATS ATTENDUS

4.4.1. METHYLOME ET METHYLTRANSFERASES DE LA SOUCHE DE REFERENCE GMI1000

4.4.1.1. Niveau d'expression des différentes méthyltransférases de GMI1000

Afin de mieux comprendre le rôle des 7 MTases identifiées dans le génome de la souche GMI1000, leur niveau d'expression sera comparé dans différentes conditions de croissance.

Des travaux récemment publiés sur la bactérie *Photorhabdus luminescens* (une gamma-proteobactérie) ont montré que les conditions de croissance de la bactérie (phase exponentielle ou phase stationnaire ; *in vitro* ou *in vivo*) n'avaient pas d'impact sur les niveaux d'expression des MTases (Payelleville *et al.*, 2018). Dans ce projet, je voudrais valider ce résultat avec *R. solanacearum*.

La souche GMI1000 sera cultivée *in vitro* en milieu riche et en milieu minimum supplémenté de glutamine et *in planta* après inoculation de tiges de tomate Marmande. Les ARNs seront extraits *in vitro* en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance. *In planta*, les ARN seront extraits 2 jours et 5 jours après inoculation. Les ARNm des 7 MTases seront alors quantifiés par une approche de RT-qPCR.

Cette analyse pourra permettre de prédire si le profil de méthylation est susceptible de varier entre les différentes conditions testées.

4.4.1.2. Rôle des méthyltransférases de GMI1000 dans différents phénotypes

Le rôle des MTases de la souche GMI1000 sera analysé en générant des mutants simples de délétion ainsi que des mutants multiples. La délétion de gènes chez GMI1000 est parfaitement maîtrisée dans l'équipe de Stéphane Genin.

Ces mutants de délétion pourront être générés uniquement si la MTase considérée n'est pas essentielle à la viabilité cellulaire, comme c'est le cas pour la MTase Dam de certaines espèces de *Yersinia* (Julio *et al.*, 2002; Fälker *et al.*, 2005). Par contre, si la MTase n'est pas essentielle à la viabilité cellulaire, sa délétion peut entraîner de fortes modifications phénotypiques associées à des changements majeurs dans l'expression de certains gènes comme décrits chez d'autres bactéries (Gonzalez *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014). Par exemple, l'analyse de mutants Dam de *Salmonella enterica* a mis en évidence le rôle de la MTase Dam dans le contrôle de fonctions de virulence (Heithoff *et al.*, 1999).

L'impact de la délétion des MTases dans la souche GMI1000 sera déterminé par l'analyse de différents phénotypes : la virulence sur tomate, la croissance *in vitro* et *in planta*, la mobilité, la formation de biofilm, le taux de mutations et les capacités métaboliques.

Dans le cas des MTases essentielles à la viabilité cellulaire de *R. solanacearum*, une autre approche envisageable pour étudier leur rôle dans différents phénotypes sera de générer des mutants surexprimant ces MTases. Ces mutants pourront être générés en clonant le gène derrière le promoteur d'un gène fortement exprimé tel que le promoteur des gènes *eps* (Monteiro *et al.*, 2012). Cette approche a déjà été utilisée par exemple chez les bactéries *Y. pseudotuberculosis* et *P. luminescens*, et a pu mettre en évidence un impact de la surexpression de la MTase Dam sur la virulence (Julio *et al.*, 2002; Payelleville *et al.*, 2017).

4.4.1.3. Optimisation de protocoles pour l'analyse du méthylome

Deux méthodes complémentaires vont être utilisées pour l'analyse du méthylome, le séquençage SMRT de PacBio pour la détection des modifications 6mA et 4mC et le traitement de l'ADN au bisulfite suivi d'un séquençage Illumina pour la détection des modifications 5mC.

Pour le séquençage PacBio, l'ADN doit avoir une grande pureté et une grande intégrité. Le protocole d'extraction d'ADN qui sera utilisé a récemment été mis au point au LIPM (Mayjonade *et al.*, 2016). Ce protocole a été optimisé pour l'extraction de l'ADN de *R. solanacearum* (Erill *et al.*, 2017). La construction des bibliothèques sera réalisée à la Plateforme GeT-PlaGe de Toulouse et le séquençage PacBio à la plateforme Gentyane de Clermont-Ferrand. Une optimisation pour la construction des bibliothèques et le séquençage devra être réalisée.

Le traitement de l'ADN au bisulfite suivi d'un séquençage Illumina est un protocole utilisé en routine à la plateforme GeT-PlaGe sur des ADN Eucaryote. Il a récemment été utilisé avec succès sur de l'ADN de la bactérie *P. luminescens* (Payelleville *et al.*, 2018). Ce protocole sera optimisé dans ce projet pour la bactérie *R. solanacearum* dont le génome est riche en GC. Pour cela, différents kits de traitement au bisulfite seront comparés ainsi que différents temps de traitement et différentes concentrations de bisulfite.

La validation des marques de méthylation différentielles se fera par la méthode de MSRE-qPCR pour « Methylation Sensitive Restriction Enzyme qPCR » (Beikircher *et al.*, 2018). Cette

approche consiste à digérer l'ADN par des enzymes de restriction sensibles à l'état de méthylation du motif ciblé puis quantification des fragments générés par une approche de qPCR.

4.4.1.4. Impact de la délétion des méthyltransférases sur le méthylome et le transcriptome

Les méthylomes et les transcriptomes des mutants de délétion des MTases de la souche GMI1000 seront comparés au méthylome et transcriptome de la souche sauvage dans différents environnements : *in vitro* en milieu riche et en milieu minimum, et *in planta*.

Les ADN et les ARN seront extraits à partir des mêmes cultures bactériennes, *in vitro* au début de la phase stationnaire de croissance et *in planta* 3 jours après inoculation dans la tige de tomate Marmande. Le protocole d'extraction de l'ADN sera celui décrit dans Mayjonade *et al.* (2016) et le protocole d'extraction des ARNs sera celui décrit dans Perrier *et al.* (2016).

Pour l'analyse des méthylomes, une partie des ADNs sera séquencée par la technologie PacBio et l'autre partie sera traitée au bisulfite puis séquencée par la technologie Illumina. La détection des bases méthylées à partir des séquences PacBio se fera à l'aide du protocole « RS_Modification_and_Motif_Analysis » SMRT portal 2.3.0p4 disponible sur le site de PacBio comme décrit dans (Payelleville *et al.*, 2018). Pour l'analyse comparative des méthylomes de *R. solanacearum*, une optimisation d'outils bio-informatiques par Ludovic Legrand, bioinformatique au LIPM, sera réalisée au cours de ce projet.

L'analyse des transcriptomes se fera par une approche RNAseq puis l'analyse des données par le package R « EdgeR ».

Cette analyse devrait permettre d'identifier les motifs ciblés par les différentes MTases de la souche GMI1000 et de déterminer l'impact de la méthylation par chacune de ces MTases sur l'expression de gènes chez cette bactérie.

4.4.2. COMPARAISON DES METHYLOMES ET DES REPERTOIRES DE METHYLTRANSFERASES ENTRE DIFFERENTES SOUCHES DE R. SOLANACEARUM

4.4.2.1. Comparaison des répertoires des MTases entre différentes souches

Les répertoires des MTases chez les bactéries sont spécifiques des espèces et peuvent même varier entre les différentes souches d'une même espèce bactérienne (Krebs *et al.*, 2013; Roberts *et al.*, 2015; Blow *et al.*, 2016). Chez *R. solanacearum*, la variabilité des répertoires des MTases semble aussi exister entre les différentes souches comme récemment montré par comparaison des méthylomes des deux souches GMI1000 et UY031 (Erill *et al.*, 2017).

Afin d'avoir une connaissance précise de la variabilité des répertoires des MTases chez *R. solanacearum*, une analyse comparative des MTases entre la souche GMI1000 et 26 autres

souches représentatives des 4 phylotypes de ce complexe d'espèce sera réalisée dans ce projet. La liste et les caractéristiques des souches qui seront analysées sont données dans le tableau 4.

Les séquences génomiques sont déjà disponibles pour 14 de ces souches, 13 séquencées avec la technologie Illumina et une avec la technologie PacBio (Guidot *et al.*, 2009; Remenant *et al.*, 2010, 2011, 2012; Lebeau *et al.*, 2011; Ailloud *et al.*, 2016). Ces séquences génomiques permettront de faire une première analyse comparative des répertoires des MTases à l'aide de la base de données REBASE (Roberts *et al.*, 2015). Les répertoires des MTases dans les 12 autres souches seront définis à partir des séquençages PacBio prévus dans ce projet. La base de données REBASE devrait nous permettre de définir à la fois les gènes codant pour des MTases dans les différents génomes ainsi que le type de MTase (orpheline ou associées à une système RM).

Tableau 4 : Liste des souches de *R. solanacearum* sélectionnées pour l'analyse comparative des répertoires des méthyltransférases et des méthylomes.

Souche	Phylotype	Sequevar	Pays d'origine	Plante d'origine	Séquence génomique	Référence
PSS4 (RUN0157)	I	15	Taiwan	<i>Solanum lycopersicum</i>	Illumina	Lebeau et al., 2011
ACH92 (RUN0044 ou 0158)	I	16	Australie	<i>Zingiber officinale</i>	-	
RUN0305 (Mad002)	I	18	Madagascar	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	
M2 (RUN343)	I	48	China	<i>Morus alba</i>	-	
BW-TM	I	I	Thaïlande	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	
TD1301 (RUN3012)	I	31	Reunion	<i>Solanum melongena</i>	Illumina	
CMR134 (RUN0215)	I	13	Cameroon	<i>Vaccinium membranaceum</i>	Illumina	Lebeau et al., 2011
CFBP2957 (RUN0036)	IIA	36	Martinique	<i>Solanum lycopersicum</i>	Illumina	Remenant et al., 2010
BA7 (RUN585)	IIA	6	Grenada	<i>Musa</i>	-	
K60 (RUN2047)	IIA	7	USA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Illumina	Remenant et al., 2012
CFBP6783	IIB	4NPB	Martinique	<i>Heliconia</i>	Illumina	
CMR34 (RUN0147)	IIB	1	Cameroon	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	Lebeau et al., 2011
MOLK2	IIB	3	Philippines	<i>Musa</i>	Illumina	Guidot et al., 2009
CIP240 (RUN482)	IIB	26	Brazil	<i>Solanum tuberosum</i>	-	
UW163 (RUN586)	IIB	4	Brazil	<i>Cucumis sativus</i>	PacBio	Ailloud et al., 2016
RUN3733	III	19	Reunion	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	
CFBP3059 (RUN0039)	III	23	Burkina Faso	<i>Solanum melongena</i>	Illumina	
CMR32 (RUN0145)	III	29	Cameroon	<i>Solanum scabrum</i>	-	
RUN2340	III	59	Madagascar	<i>Solanum tuberosum</i>	-	
CMR15 (RUN0133)	III	29	Cameroon	<i>Solanum lycopersicum</i>	Illumina	Remenant et al., 2010
R24 (RUN88)	IV		Indonesia	<i>Clove</i>	Illumina	Remenant et al., 2011
MAFF301552 (RUN70)	IV	8	Japan	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	
MAFF301558 (RUN71)	IV	8	Japan	<i>Solanum tuberosum</i>	-	
R229 (RUN62)	IV	10	BDB	<i>Musa</i>	Illumina	Remenant et al., 2011
UQRS91 (RUN1302)	IV	10	Indonesia	<i>Solanum lycopersicum</i>	Illumina	
PSI07 (RUN0083)	IV	10	Indonesia	<i>Solanum lycopersicum</i>	Illumina	Remenant et al., 2010

Quatre groupes monophylétiques (les phylotypes) sont distingués parmi les souches de *R. solanacearum* sur la base des séquences de l'ITS, du gène *hrpB* et du gène *egl* (endoglucanase). Le sequevar est défini sur la base de la séquence *egl* (Fegan, M. and Prior, P., 2005).

4.4.2.2. Importance des core MTases dans le phénotype

La comparaison des répertoires des MTases entre la souche GMI1000 et les 26 autres souches de *R. solanacearum* permettra d'identifier les core MTases (présentes dans tous les génomes) et les MTases spécifiques. Afin de mieux comprendre le rôle des core MTases dans le phénotype de la bactérie, une approche de génétique inverse par délétion de ces core MTases et analyse de l'impact de la délétion sur le phénotype sera utilisée.

La délétion de gènes est possible chez *R. solanacearum* par transformation naturelle pour de nombreuses souches. Par contre, certaines souches sont difficilement voire pas transformables (Coupat *et al.*, 2008). Pour ces dernières souches, une optimisation du protocole de délétion de gène devra être réalisée.

4.4.2.3. Niveau d'expression des différentes MTases

Des données récemment publiées sur la souche TT01 de la bactérie *P. luminescens* ont montré que seules 9 des 12 MTases présentes dans le génome étaient exprimées de manière significative (Payelleville *et al.*, 2018). Ceci laisse suggérer que toutes les MTases ne participent pas forcément au profil de méthylation du génome. Afin d'identifier les MTases potentiellement importantes dans le profil de méthylation de *R. solanacearum*, le niveau d'expression des différents gènes codant pour des MTases identifiés dans les 26 souches sera mesuré par une approche de RT-qPCR à partir d'ARN extrait de cultures bactériennes *in vitro*.

4.4.2.4. Comparaison des méthylomes et des transcriptomes de différentes souches

Les méthylomes des 26 souches seront analysés par séquençage PacBio et bisulfite/Illumina puis comparés afin d'identifier des marques de méthylation différentielles. Les ADNs seront extraits à partir de cultures bactériennes en milieu minimum supplémenté de glutamine et en début de phase stationnaire.

Les transcriptomes de ces souches seront également déterminés par RNAseq à partir des ARNs extraits de ces mêmes cultures bactériennes. L'analyse comparative des méthylomes et des transcriptomes devrait permettre d'identifier des marques de méthylation dans des promoteurs de gènes impactant leur expression.

L'ensemble de ces analyses devrait apporter une vision plus précise du rôle des MTases et du méthylome dans les phénotypes des différentes souches du complexe d'espèce *R. solanacearum*.

4.4.3. VARIATION DES METHYLOMES ET DES TRANSCRIPTOMES ENTRE LE CLONE ANCESTRAL GMI1000 ET SES CLONES DERIVES OBTENUS PAR EVOLUTION EXPERIMENTALE

4.4.3.1. Choix des clones évolués expérimentalement pour l'analyse des méthylomes

Dans ce projet, je propose d'analyser 40 clones dérivés de la souche GMI1000 et obtenus par évolution expérimentale sur 5 espèces de plantes différentes, 2 plantes sensibles au flétrissement bactérien (la tomate Marmande et l'aubergine Zebrina) et 3 plantes tolérantes (la tomate Hawaii, le haricot Blanc Précoce et le chou Bartolo) (Tableau 4).

Tableau 4 : Caractéristiques des clones évolués expérimentalement choisis pour l'analyse du méthylome

Hôte expérimental	Famille botanique	Sensible/ Tolérant à la maladie	Nombre de SPE pour atteindre 300 générations bactériennes	Nombre de lignées d'évolution expérimentale	nombre de clones évolués par lignée	nombre de polymorphismes génomiques d'après le séquençage Illumina
Tomate var. Marmande	Solanaceae	Sensible	26	5	1 - 2	1 - 3
Aubergine var. Zebrina	Solanaceae	Sensible	26	5	1 - 2	0 - 1
Tomate var. Hawaii	Solanaceae	Tolérant	35	5	2	0 - 2
Choux var. Bartolo	Brassicaceae	Tolérant	36	5	1 - 2	1 - 3
Haricot var. Blanc Précoce	Fabaceae	Tolérant	26	5	1 - 2	2 - 5

SPE : Expérience de passage en série

La plupart de ces clones dérivés, sauf 3 dérivés sur aubergine Zebrina, présentent un gain de fitness significatif par rapport au clone ancestral sur leur hôte expérimental. Les 3 clones dérivés sur aubergine Zebrina ne présentant pas de gain de fitness ont été choisis comme témoin négatif. Les génomes de 25 de ces clones dérivés ont été séquencés par la technologie Illumina et ont révélés entre 0 et 5 polymorphismes génomiques (Tableau 4). Parmi les clones ne présentant aucun polymorphisme génomique, 7 présentent pourtant un gain de fitness *in planta* significatif.

4.4.3.2. Variation du méthylome durant l'évolution expérimentale

Les ADNs vont être extraits à partir de cultures bactériennes *in vitro* en milieu minimum supplémenté de glutamine en début de phase stationnaire à l'aide du protocole décrit par Mayjonade *et al.* (2016). L'analyse du méthylome se fera comme décrit dans le paragraphe 4.4.1.4, à la fois par séquençage PacBio pour la détection des modifications 6mA et 4mC et par traitement bisulfite/séquençage Illumina pour la détection des modifications 5mC.

Les outils bioinformatiques optimisés dans la partie 4.4.1.4 seront utilisés pour l'analyse comparative des méthylomes et la production d'un inventaire de toutes marques de méthylation différentielles entre clone dérivé et clone ancestral.

4.4.3.3. Comparaison des méthylomes et des transcriptomes des clones évolués expérimentalement

Afin de pouvoir corrélérer les variations du méthylome avec des variations potentielles du transcriptome des 40 clones dérivés, le profil transcriptomique de ces clones dérivés sera déterminé *in vitro* et *in planta* par une approche RNAseq.

Les ARNs seront extraits à partir des mêmes cultures bactériennes *in vitro* générées pour l'analyse du méthylome. Des ARNs seront également extraits à partir de tiges de plantes de tomate Marmande 3 jours après inoculation dans la tige. Trois réplicats biologiques par clone évolué seront préparés pour cette analyse RNAseq. Les ARNs seront extraits et séquencés comme décrit dans la paragraphe 4.4.1.4.

Les transcriptomes des clones dérivés seront comparés dans un premier temps au transcriptome du clone ancestral afin d'identifier la liste des gènes différentiellement exprimés. Une corrélation entre profil d'expression différentiel et marque de méthylation différentielle à un locus donné sera alors établie en portant une attention particulière sur les marques de méthylation dans les promoteurs de gènes.

4.4.4. CARACTERISATION DES MODIFICATIONS DU METHYLOME CONFERANT DES TRAITES ADAPTATIFS SUR PLANTE

4.4.4.1. Identification de gènes candidats caractérisés par des marques de méthylation différentielles entre souches

L'objectif ici est d'établir une liste de gènes candidats ciblés par des marques de méthylation différentielle entre clone ancestral et clone évolué expérimentalement et ainsi potentiellement impliqués dans l'adaptation à l'hôte.

Une attention particulière sera donnée pour :

- Les régions intergéniques incluant potentiellement des promoteurs de gènes.
- Les variations parallèles, c'est-à-dire les mêmes régions génomiques ciblées par des marques de méthylation différentielle dans plusieurs clones indépendants évolués expérimentalement.
- Les marques de méthylation différentielles touchant des déterminants du pouvoir pathogène.
- Les marques de méthylation différentielles trouvées à la fois entre clone ancestral et clone évolué expérimentalement et entre différentes souches sauvages de *R. solanacearum* (paragraphe 4.4.2.)

- Les marques de méthylation différentielles associées à des variations dans l'expression du gène ciblé, identifiées lors de la comparaison du méthylome et du transcriptome.

4.4.4.2. Validation du rôle des modifications épigénétiques dans l'adaptation à l'hôte

La contribution d'une marque de méthylation donnée dans l'adaptation à l'hôte chez *R. solanacearum* sera évaluée par introduction du polymorphisme dans le génome de la souche GMI1000 par substitution dirigée de base nucléotidique. Cette substitution sera faite de manière à remplacer le nucléotide méthylé par un nucléotide non-méthylable (tout en gardant l'identité du codon si cette marque de méthylation est dans la région codante du gène). Cette substitution sera générée par PCR puis introduite dans le génome de GMI1000 par transformation naturelle. Cette stratégie de substitution nucléotidique dirigée avec une base non méthylable a également été utilisée chez *Salmonella* et a permis de comprendre comment la variation de phase contrôle l'expression des gènes de modification des lipopolysaccharides (Broadbent *et al.*, 2010).

La délétion complète du gène candidat sera également utilisée comme approche complémentaire. Cette approche permettra de tester l'hypothèse d'une perte de fonction du gène suite à la modification de son profil de méthylation.

L'impact de ces mutations sur la fitness *in planta* sera mesuré par des expériences de compétition entre la souche sauvage GMI1000 et le mutant généré comme décrit précédemment (Macho *et al.*, 2010; Guidot *et al.*, 2014). Ces expériences seront menées en priorité avec les gènes candidats les plus prometteurs, c'est-à-dire ceux ayant des marques de méthylation différentielle dans plusieurs clones évolués expérimentalement ou ceux dont la marque de méthylation a pu être relié à un profil différentiel d'expression.

4.5. CONCLUSION

En prenant comme modèle la bactérie phytopathogène *R. solanacearum*, ces travaux permettront d'apporter dans une première étape du projet une meilleure vision sur l'importance de la méthylation de l'ADN dans différents phénotypes bactériens, en particulier la virulence.

Au-delà de l'importance du profil de méthylation dans la virulence, ces travaux devraient permettre de mettre en évidence la possibilité de variation du profil de méthylation pour une meilleure adaptation à de nouveaux hôtes. Dans ce projet, je propose de suivre la variation du profil de méthylation d'une souche de *R. solanacearum* au cours de son évolution expérimentale durant 300 générations bactériennes sur une plante hôte fixée. L'avantage dans ce projet est que les clones dérivés de cette souche obtenus par évolution expérimentale ont été générés dans un projet précédent et sont ainsi déjà disponibles et conservés à -80°C (Guidot *et al.*, 2014). De plus, la plupart de ces clones présentent des gains adaptatifs sur leur hôte

expérimental, ce qui offre la possibilité d'établir un lien éventuel entre variation du profil de méthylation et adaptation à l'hôte. Ce projet devrait ainsi permettre d'apporter des éléments nouveaux sur l'importance des variations épigénétiques dans l'adaptation à l'hôte chez les bactéries pathogènes.

RÉFÉRENCES

- Ailloud, F., Lowe, T.M., Robène, I., Cruveiller, S., Allen, C., and Prior, P. (2016) *In planta* comparative transcriptomics of host-adapted strains of *Ralstonia solanacearum*. *PeerJ* **4**: e1549.
- Allen, C., Prior, P., and Hayward, A.C. (2005) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex, Saint Paul: APS Press.
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**: 1622–1625.
- Beikircher, G., Pulverer, W., Hofner, M., Noehammer, C., and Weinhaeusel, A. (2018) Multiplexed and Sensitive DNA Methylation Testing Using Methylation-Sensitive Restriction Enzymes “MSRE-qPCR.” *Methods Mol Biol Clifton NJ* **1708**: 407–424.
- Bertolla, F., Frostegård, Å., Brito, B., Nesme, X., and Simonet, P. (1999) During Infection of Its Host, the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Naturally Develops a State of Competence and Exchanges Genetic Material. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 467–472.
- Bertolla, F., Van Gijsegem, F., Nesme, X., and Simonet, P. (1997) Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4965–4968.
- Blow, M.J., Clark, T.A., Daum, C.G., Deutschbauer, A.M., Fomenkov, A., Fries, R., et al. (2016) The Epigenomic Landscape of Prokaryotes. *PLoS Genet* **12**: e1005854.
- Broadbent, S.E., Davies, M.R., and van der Woude, M.W. (2010) Phase variation controls expression of *Salmonella* lipopolysaccharide modification genes by a DNA methylation-dependent mechanism. *Mol Microbiol* **77**: 337–353.
- Casadesús, J. and Low, D. (2006) Epigenetic Gene Regulation in the Bacterial World. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 830–856.
- Casadesús, J. and Low, D.A. (2013) Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *J Biol Chem* **288**: 13929–13935.
- Clark, T.A., Murray, I.A., Morgan, R.D., Kislyuk, A.O., Spittle, K.E., Boitano, M., et al. (2012) Characterization of DNA methyltransferase specificities using single-molecule, real-time DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* **40**: e29–e29.
- Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., Nesme, X., and Bertolla, F. (2008) Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiol Ecol* **66**: 14–24.
- Erill, I., Puigvert, M., Legrand, L., Guarischi-Sousa, R., Vandecasteele, C., Setubal, J.C., et al. (2017) Comparative analysis of *Ralstonia solanacearum* methylomes. *Front Plant Sci* **8**.
- Fälker, S., Schmidt, M.A., and Heusipp, G. (2005) DNA methylation in *Yersinia enterocolitica*: role of the DNA adenine methyltransferase in mismatch repair and regulation of virulence factors. *Microbiology* **151**: 2291–2299.
- Fang, G., Munera, D., Friedman, D.I., Mandlik, A., Chao, M.C., Banerjee, O., et al. (2012) Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic *Escherichia coli* using single-molecule real-time sequencing. *Nat Biotechnol* **30**: 1232–1239.

- Fegan, M. and Prior, P. (2005) How Complex is the “Ralstonia solanacearum Species Complex.” In, *Bacterial wilt Disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. St Paul, MN, USA: Allen, C. Prior, P. Hayward, A.C., pp. 449–461.
- Flusberg, B.A., Webster, D., Lee, J., Travers, K., Olivares, E., Clark, T.A., et al. (2010) Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat Methods* **7**: 461–465.
- Giacomodonato, M.N., Sarnacki, S.H., Llana, M.N., and Cerquetti, M.C. (2009) Dam and its role in pathogenicity of Salmonella enterica. *J Infect Dev Ctries* **3**: 484–490.
- Gonzalez, D., Kozdon, J.B., McAdams, H.H., Shapiro, L., and Collier, J. (2014) The functions of DNA methylation by CcrM in Caulobacter crescentus: a global approach. *Nucleic Acids Res* **42**: 1352.
- Guidot, A., Elbaz, M., Carrère, S., Siri, M.I., Pianzola, M.J., Prior, P., and Boucher, C. (2009) Specific genes from the potato brown rot strains of Ralstonia solanacearum and their potential use for strain detection. *Phytopathology* **99**: 1105–1112.
- Guidot, A., Jiang, W., Ferdy, J.-B., Thébaud, C., Barberis, P., Gouzy, J., and Genin, S. (2014) Multihost Experimental Evolution of the Pathogen Ralstonia solanacearum Unveils Genes Involved in Adaptation to Plants. *Mol Biol Evol* **31**: 2913–2928.
- Hanson, P.M., Wang, J.-F., Licardo, O., Hanudin, Mah, S.Y., Hartman, G.L., et al. (1996) Variable Reaction of Tomato Lines to Bacterial Wilt Evaluated at Several Locations in Southeast Asia. *HortScience* **31**: 143–146.
- Heithoff, D.M., Sinsheimer, R.L., Low, D.A., and Mahan, M.J. (1999) An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* **284**: 967–970.
- Hutchinson, G.E. (1951) Copepodology for the Onithologist. *Ecology* **32**: 571–577.
- Julio, S.M., Heithoff, D.M., Sinsheimer, R.L., Low, D.A., and Mahan, M.J. (2002) DNA Adenine Methylase Overproduction in Yersinia pseudotuberculosis Alters YopE Expression and Secretion and Host Immune Responses to Infection. *Infect Immun* **70**: 1006–1009.
- Kahramanoglou, C., Prieto, A.I., Khedkar, S., Haase, B., Gupta, A., Benes, V., et al. (2012) Genomics of DNA cytosine methylation in Escherichia coli reveals its role in stationary phase transcription. *Nat Commun* **3**: 886.
- Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity of Pseudomonas solanacearum to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* **44**: 1–4.
- Khokhani, D., Lowe-Power, T.M., Tran, T.M., and Allen, C. (2017) A Single Regulator Mediates Strategic Switching between Attachment/Spread and Growth/Virulence in the Plant Pathogen Ralstonia solanacearum. *mBio* **8**: e00895-17.
- Kim, J.-S., Li, J., Barnes, I.H.A., Baltzegar, D.A., Pajaniappan, M., Cullen, T.W., et al. (2008) Role of the Campylobacter jejuni Cj1461 DNA Methyltransferase in Regulating Virulence Characteristics. *J Bacteriol* **190**: 6524–6529.
- Krebes, J., Morgan, R.D., Bunk, B., Spröer, C., Luong, K., Parusel, R., et al. (2013) The complex methylome of the human gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nucleic Acids Res* **41**: 1201.
- Kronholm, I. and Collins, S. (2016) Epigenetic mutations can both help and hinder adaptive evolution. *Mol Ecol* **25**: 1856–1868.
- Kumar, S., Karmakar, B.C., Nagarajan, D., Mukhopadhyay, A.K., Morgan, R.D., and Rao, D.N. (2018) N4-cytosine DNA methylation regulates transcription and pathogenesis in Helicobacter pylori. *Nucleic Acids Res* **46**: 3429–3445.
- Lebeau, A., Daunay, M.-C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J.-F., Dintinger, J., et al. (2011) Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the Ralstonia solanacearum species complex. *Phytopathology* **101**: 154–165.
- Li, Y. and Tollefsbol, T.O. (2011) DNA methylation detection: Bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **791**: 11–21.

- Macho, A.P., Guidot, A., Barberis, P., Beuzón, C.R., and Genin, S. (2010) A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **23**: 1197–1205.
- Macho, A.P., Zumaquero, A., Ortiz-Martín, I., and Beuzón, C.R. (2007) Competitive index in mixed infections: a sensitive and accurate assay for the genetic analysis of *Pseudomonas syringae*-plant interactions. *Mol Plant Pathol* **8**: 437–450.
- Mayjonade, B., Gouzy, J., Donnadiou, C., Pouilly, N., Marande, W., Callot, C., et al. (2016) Extraction of high-molecular-weight genomic DNA for long-read sequencing of single molecules. *BioTechniques* **61**: 203–205.
- Mehling, J.S., Lavender, H., and Clegg, S. (2007) A Dam methylation mutant of *Klebsiella pneumoniae* is partially attenuated. *FEMS Microbiol Lett* **268**: 187–193.
- Miller, C.B., Pierlé, S.A., Brayton, K.A., Ochoa, J.N., Shah, D.H., and Lahmers, K.K. (2014) Transcriptional Profiling of a Cross-Protective *Salmonella enterica* serovar Typhimurium UK-1 dam Mutant Identifies a Set of Genes More Transcriptionally Active Compared to Wild-Type, and Stably Transcribed across Biologically Relevant Microenvironments. *Pathogens* **3**: 417–436.
- Monteiro, F., Genin, S., van Dijk, I., and Valls, M. (2012) A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia solanacearum* type III secretion system genes throughout plant infection. *Microbiol Read Engl* **158**: 2107–2116.
- Murray, I.A., Clark, T.A., Morgan, R.D., Boitano, M., Anton, B.P., Luong, K., et al. (2012) The methylomes of six bacteria. *Nucleic Acids Res* **40**: 11450–11462.
- Nye, T.M., Jacob, K.M., Holley, E.K., Nevarez, J.M., Dawid, S., Simmons, L.A., and Jr, M.E.W. (2019) DNA methylation from a Type I restriction modification system influences gene expression and virulence in *Streptococcus pyogenes*. *PLOS Pathog* **15**: e1007841.
- Occhialini, A., Cunnac, S., Reymond, N., Genin, S., and Boucher, C. (2005) Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **18**: 938–949.
- Payelleville, A., Lanois, A., Gislard, M., Dubois, E., Roche, D., Cruveiller, S., et al. (2017) DNA Adenine Methyltransferase (Dam) Overexpression Impairs *Photobacterium luminescens* Motility and Virulence. *Front Microbiol* **8**.
- Payelleville, A., Legrand, L., Ogier, J.-C., Roques, C., Roulet, A., Bouchez, O., et al. (2018) The complete methylome of an entomopathogenic bacterium reveals the existence of loci with unmethylated Adenines. *Sci Rep* **8**: 12091.
- Perrier, A., Barlet, X., Peyraud, R., Rengel, D., Guidot, A., and Genin, S. (2018) Comparative transcriptomic studies identify specific expression patterns of virulence factors under the control of the master regulator PhcA in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Microb Pathog* **116**: 273–278.
- Perrier, A., Peyraud, R., Rengel, D., Barlet, X., Lucasson, E., Gouzy, J., et al. (2016) Enhanced in planta Fitness through Adaptive Mutations in EfpR, a Dual Regulator of Virulence and Metabolic Functions in the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLOS Pathog* **12**: e1006044.
- Peyraud, R., Cottret, L., Marmiesse, L., Gouzy, J., and Genin, S. (2016) A Resource Allocation Trade-Off between Virulence and Proliferation Drives Metabolic Versatility in the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLOS Pathog* **12**: e1005939.
- Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet-Demery, D., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M., and Trigalet, A. (2003) Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Mol Microbiol* **49**: 991–1003.
- Rambo, I.M., Marsh, A., and Biddle, J.F. (2019) Cytosine Methylation Within Marine Sediment Microbial Communities: Potential Epigenetic Adaptation to the Environment. *Front Microbiol* **10**.

- Remenant, B., Babujee, L., Lajus, A., Médigue, C., Prior, P., and Allen, C. (2012) Sequencing of K60, type strain of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **194**: 2742–2743.
- Remenant, B., de Cambiaire, J.-C., Cellier, G., Jacobs, J.M., Mangenot, S., Barbe, V., et al. (2011) *Ralstonia syzygii*, the Blood Disease Bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *PLoS One* **6**: e24356.
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., et al. (2010) Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* **11**: 379.
- Roberts, R.J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A.S., Bickle, T.A., Bitinaite, J., et al. (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* **31**: 1805–1812.
- Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. (2015) REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **43**: D298-299.
- Robinson, V.L., Oyston, P.C.F., and Titball, R.W. (2005) A dam mutant of *Yersinia pestis* is attenuated and induces protection against plague. *FEMS Microbiol Lett* **252**: 251–256.
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., and Kappler, U. (2014) Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 3087–3103.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., et al. (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**: 497–502.
- Schmitz, R.J., Schultz, M.D., Lewsey, M.G., O'Malley, R.C., Urich, M.A., Libiger, O., et al. (2011) Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants. *Science* **334**: 369–373.
- Shell, S.S., Prestwich, E.G., Baek, S.-H., Shah, R.R., Sasseti, C.M., Dedon, P.C., and Fortune, S.M. (2013) DNA Methylation Impacts Gene Expression and Ensures Hypoxic Survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **9**: e1003419.
- Watson, M.E., Jarisch, J., and Smith, A.L. (2004) Inactivation of deoxyadenosine methyltransferase (dam) attenuates *Haemophilus influenzae* virulence. *Mol Microbiol* **53**: 651–664.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., and Prior, P. (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6790–6801.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., and Prior, P. (2009) Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant Pathol* **58**: 853–861.
- Wikars, L.-O. (2001) The Wood-Decaying Fungus *Daldinia loculata* (Xylariaceae) as an Indicator of Fire-Dependent Insects. *Ecol Bull* 263–268.
- Wu, H., Lippmann, J.E., Oza, J.P., Zeng, M., Fives-Taylor, P., and Reich, N.O. (2006) Inactivation of DNA adenine methyltransferase alters virulence factors in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* **21**: 238–244.