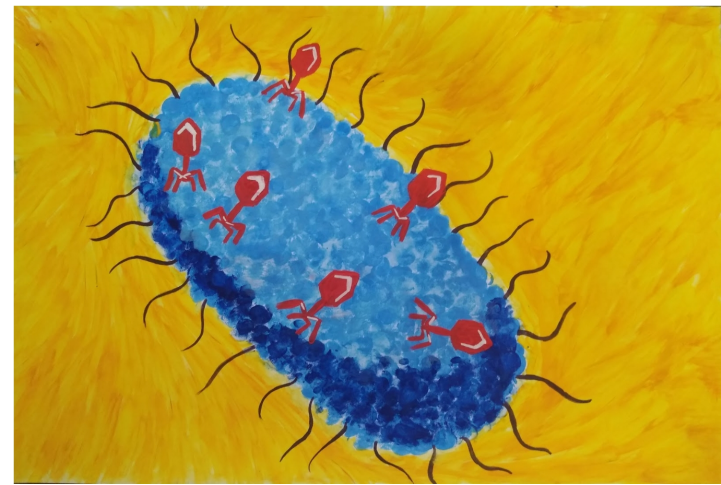


Caractérisation d'un nouveau bactériophage dirigé contre *Erwinia amylovora* dans une perspective de biocontrôle.



Master réalisé par : **Romain Delattre**

Encadré par : **Clara Torres-Barceló**



Rencontres du GIS Fruits - 28 octobre 2020

Le feu bactérien

- Le feu bactérien est une maladie causée par la bactérie *Erwinia amylovora* qui affecte les arbres fruitiers à pépins et arbustes d'ornement.
- En France, des épidémies de feu bactérien sont régulièrement constatées dans les grands bassins de production de pommes et poires : PACA, Occitanie, Nouvelle Aquitaine, AURA, Pays de la Loire. Maladie en constante progression depuis 2017 en France.

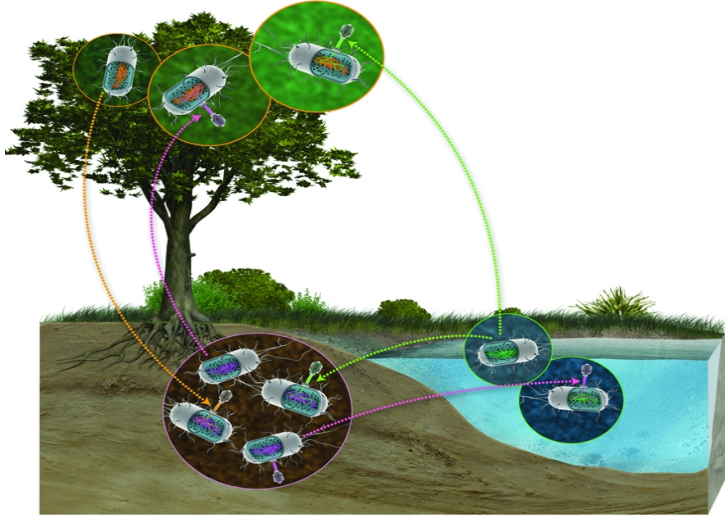


Le feu bactérien

- Les bactéries pénètrent dans les arbres fruitiers par les fleurs et les jeunes pousses
- Symptômes : nécroses, exsudats et dessèchements.
- Aujourd'hui, les variétés tolérantes et l'assainissement des vergers présentant des symptômes restent les seules stratégies de lutte de choix contre le feu bactérien.
- Le développement d'une stratégie innovante de contrôle efficace du feu bactérien, économiquement abordable et respectueuse avec l'environnement, est un défi prioritaire pour la production de fruits en France et dans le monde.

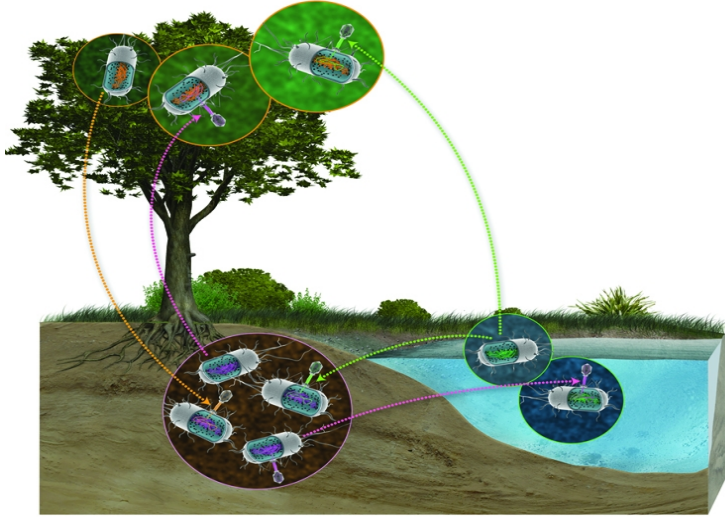


Les **phages** font partie du **microbiote** plante-sol-eau, d'importants moteurs de l'écologie et de l'évolution bactériennes...



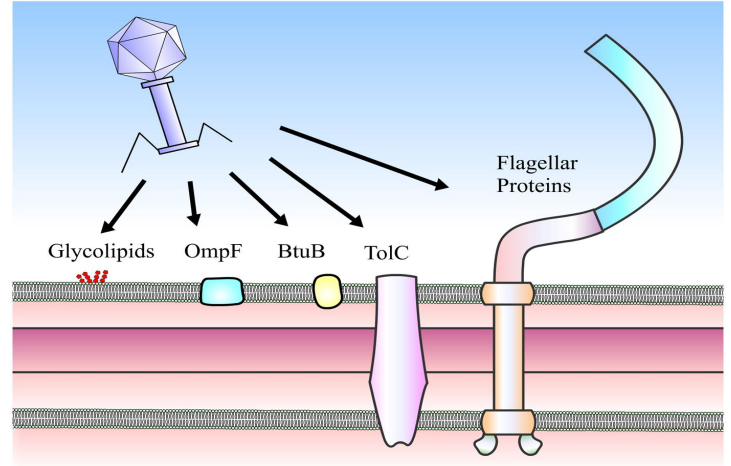
Très abondantes et
diversifiées dans la nature

Les **phages** font partie du **microbiote** plante-sol-eau, d'importants moteurs de l'écologie et de l'évolution bactériennes...

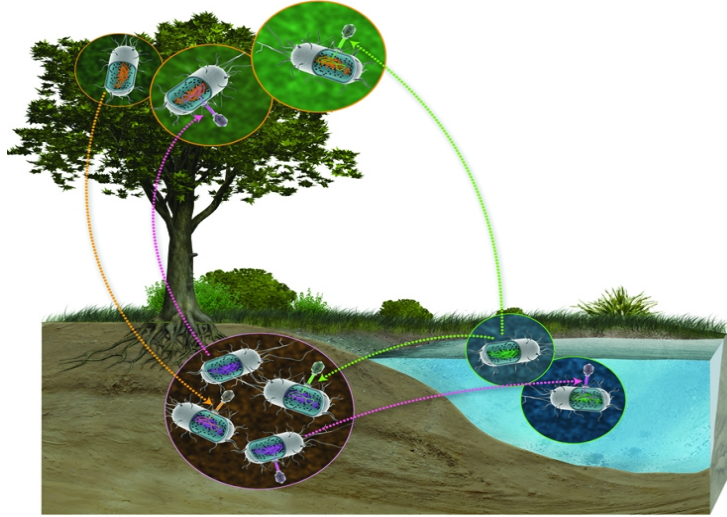


Très abondantes et diversifiées dans la nature

Très spécifiques (sous-espèces)

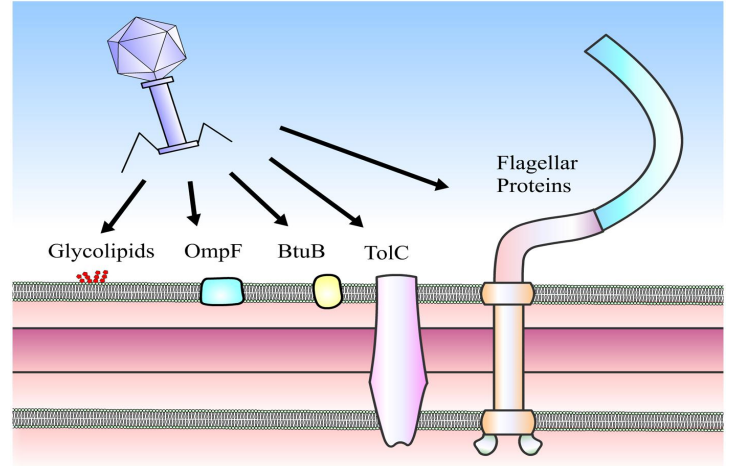


Les **phages** font partie du **microbiote** plante-sol-eau, d'importants moteurs de l'écologie et de l'évolution bactériennes...



Très abondantes et diversifiées dans la nature

Très spécifiques (sous-espèces)

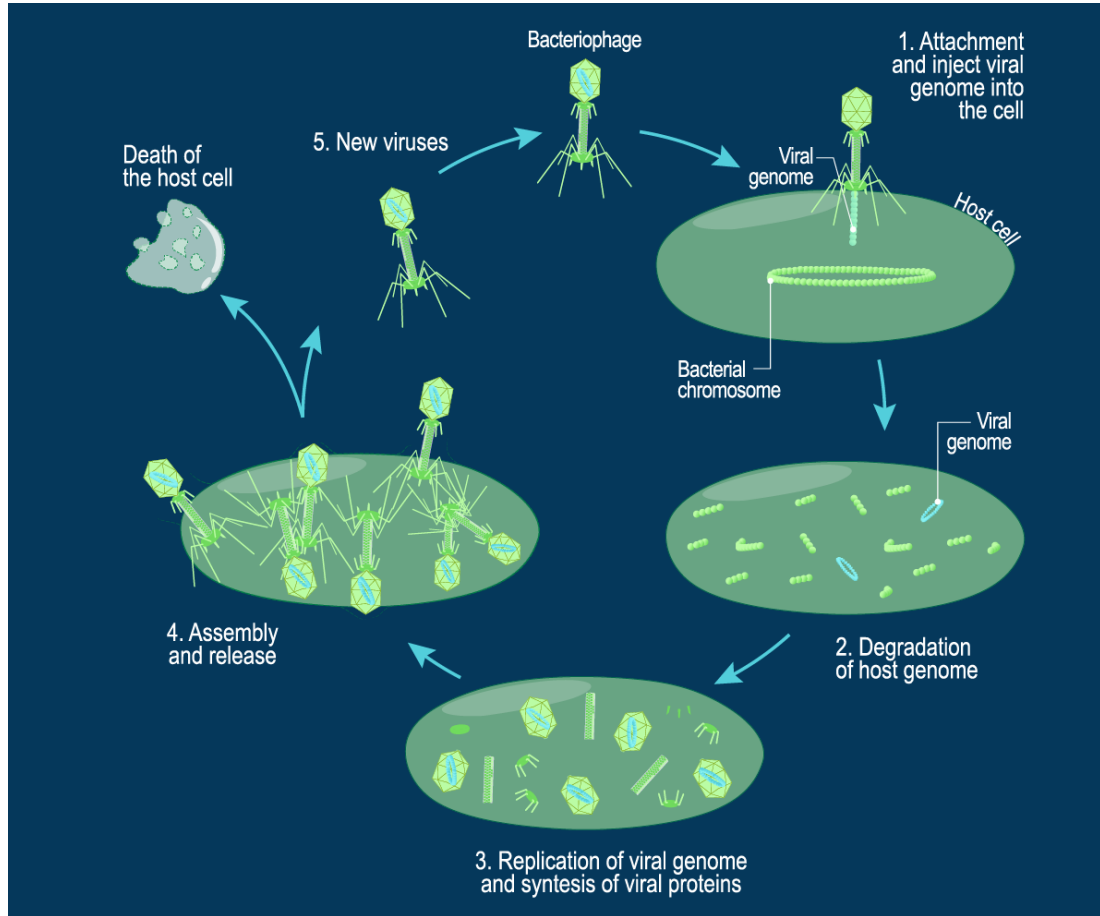
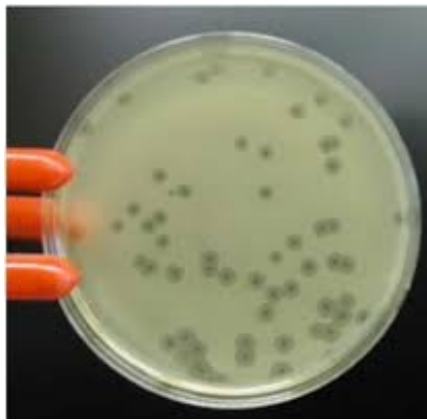


Potentiel d'évolution pour faire face à la résistance bactérienne



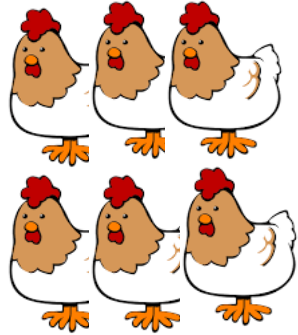
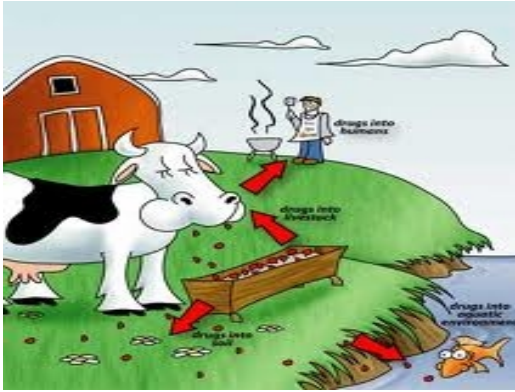
... qui pourraient aider à contrôler les maladies des plantes.

Le cycle de vie des phages

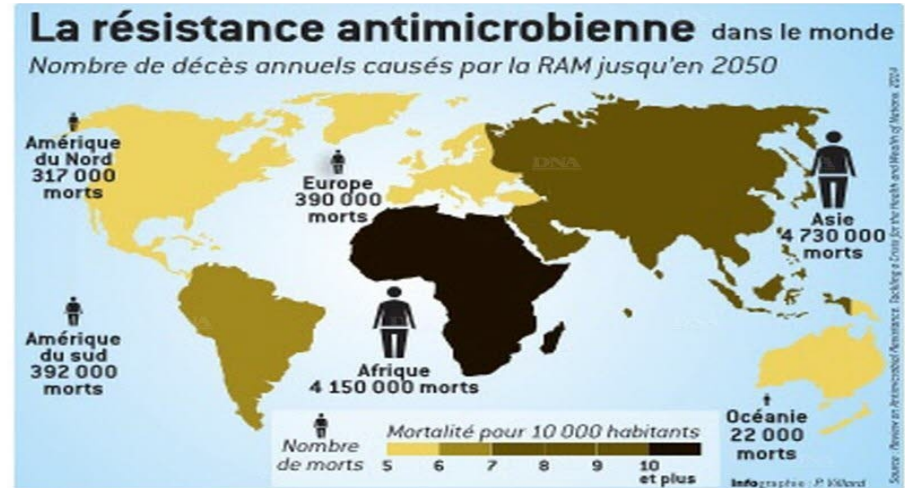
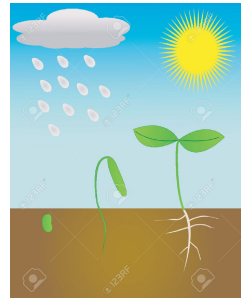


CYCLE LYTIQUE → Phages virulents

La résistance aux antibiotiques : une crise mondiale



+ problèmes environnementales



Des applications des phages en dehors de la médecine AUJOURD'HUI

VETERINAIRE



INDUSTRIE DES ALIMENTS



AGRICULTURE



Potentielles applications des phages dans l'agriculture



Traitement de l'eau d'irrigation (sous serre ou plein champ)



Blessures ouvertes



Stérilisation de tubercules ou semences



Injection de phages dans les vignes contre *Xylella fastidiosa* (Texas A&M AgriLife's Center for Phage Technology)

Produits de protection de plantes basés sur des bactériophages approuvés actuellement :

Registering authority	Product name/producer	Target diseases	Target species	Registration details
EPA	Agriphage (Omnilytics Inc., USA)	Bacterial spot of tomatoes & peppers Bacterial speck of tomatoes	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria & <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	67986-1 (December 2005, amended June 2006 & October 2011)
EPA	Agriphage CMM (Omnilytics Inc., USA)	Bacterial canker of tomatoes	<i>Clavibacter michiganensis</i> sub sp. <i>michiganensis</i>	67986-6 (September 2011)
PMRA Canada	Agriphage CMM (Omnilytics Inc., USA)	Bacterial canker of tomatoes	<i>Clavibacter michiganensis</i> sub sp. <i>michiganensis</i>	RD2012-21 (January 2012)
EPA	AgriPhage-Citrus canker OmniLytics Inc.	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	67986-9 (September 2018)
EPA	AgriPhage-Fire Blight OmniLytics Inc	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	67986-8 (February 2020)
EPA	XylPhi-PD Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>	92918-1 (April 2019)

L'étude des phages d'*Erwinia amylovora*



ÉCHANTILLONNAGE
(région PACA)

ISOLEMENT et
PURIFICATION

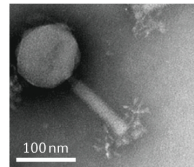
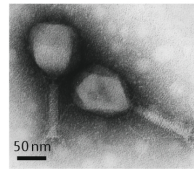
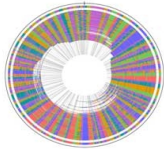


GAMME D'HÔTES
(36 souches, locales et
internationales)

ANALYSIS des
GENOMES

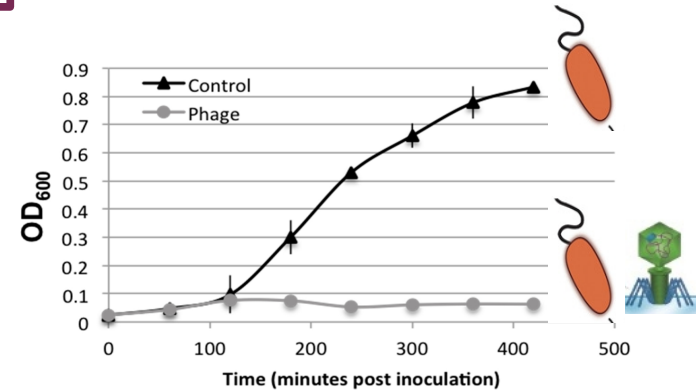
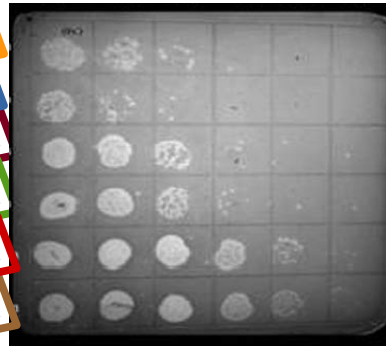
MICROSCOPIE
ELECTRONIQUE

ÉFFICACITÉ
(effet inhibitoire)



PHAGE CONCENTRATION

P
H
A
G
E
S



Échantillonnages des phages d'*Erwinia amylovora*

- 1^{er} échantillonnage : Hautes Alpes 2017 → 3 souches de la **bactérie**
- 2^e échantillonnage : Vaucluse mars 2019 → 1 **phage**
- 3^e échantillonnage : Vaucluse juin 2019 → 15 **phages**
- 4^e échantillonnage : PACA juin 2020 → 100 **échantillons**



2019 ⇒ Résultats préliminaires



Romain Delattre (Master 2 Montpellier)

- Collection international de souches d'*E. amylovora*
- Isolement et séquençage de 3 souches d'*E. amylovora* françaises actuelles
- Première collection de 15 phages d'Erwinia en France (échantillonnés en juin 2019 Vaucluse)



Analyses des phages d'*Erwinia amylovora*

- 15 phages → gamme d'hôtes

origin	souche <i>Erwinia</i>	ph1	ph2	ph3	ph4	ph5	ph6	ph7	ph9	ph10	ph11	ph12	ph13	ph14	ph15
France	Ea-1	0	7	7	0	0	0	0	6	0	8	7	6	8	8
France	Ea-3	6	7	9	0	8	6	6	6	6	7	6	6	8	6
France	Ea-4	6	9	7	7	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6
USA	AFRS2	8	8	7	0	8	6	7	6	8	7	8	6	8	6
Germany	3056	0	8	7	0	8	6	7	6	0	8	7	6	7	8
USA	JL1185	6	7	7	7	8	6	6	6	7	7	7	6	8	6
UK	1252	6	9	8	8	7	6	6	7	6	6	7	7	6	6
UK	1232T	6	8	7	7	8	6	8	6	6	6	6	7	6	6
Spain	UPN527	6	9	7	7	9	6	6	7	6	6	7	7	6	6
USA	UTRJ2	6	7	7	0	0	0	0	6	8	7	7	6	8	7
France	7249	6	7	8	7	7	6	8	6	6	6	6	7	6	6
France	1430	7	7	8	7	7	6	6	6	6	6	6	7	6	6
France	1367	6	7	6	6	7	6	6	6	6	6	6	7	6	6
Lebanon	Leb B66	6	7	7	7	8	6	7	6	8	8	8	7	6	6
Lebanon	Leb A3	6	7	6	5	7	6	6	6	6	6	6	7	6	6
USA	3792	6	7	7	0	7	7	7	6	8	8	7	6	8	8
Italia	CFBP7284	7	9	8	7	9	6	6	6	6	6	6	6	6	6
USA	MO-E-101B	0	7	7	0	0	0	0	6	0	8	7	6	8	8

2020 ⇒ Continuation du projet

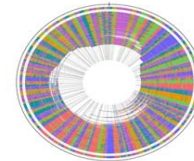
- Échantillons de parcelles infectées du Vaucluse, des Bouches du Rhône et des Hautes Alpes (Juin 2020, coordonné par Myriam Berud, La Pugère)
- 23 parcelles x 5 échantillons = 115 échantillons de sol



Projet Phages contre le feu bactérien

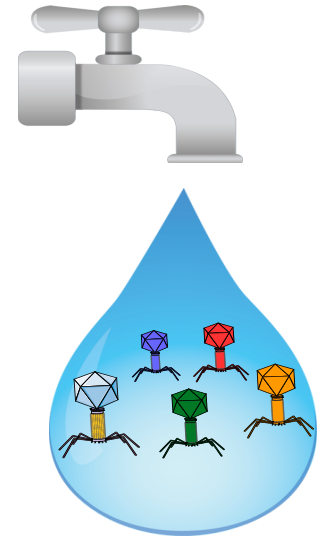
- Échantillonnage dans le milieu agricole
- Isolement et purification de phages d'*Erwinia*
- Caractérisation de la gamme d'hôtes des phages
- Microscopie électronique (morphologie)
- Analyse des génomes des phages
- Efficacité *in vitro* et *in vivo*

Fait/À faire	
2019	2020
✓	✓
✓	✗
✓	✗
✗	✗
✗	✗
✗	✗

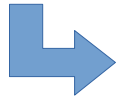


Continuation projet phages d'*Erwinia amylovora*...

- Collaborations :
 - Université de Sfax (Tunisie)
 - La Pugère, Chambres d'agriculture, CITFL, GRAB, Fredon, APPP,...
- Financement ?
- Développement produits commerciaux ?



besoin de pression pour faciliter la réglementation !



Merci !

clara.torresbarcelo@inrae.fr

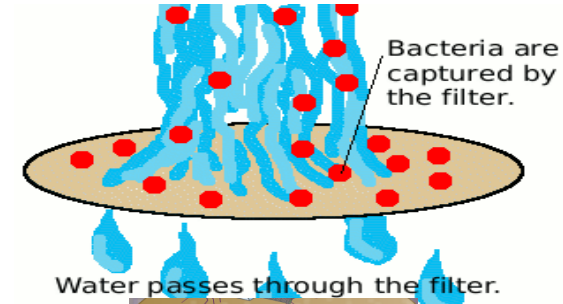
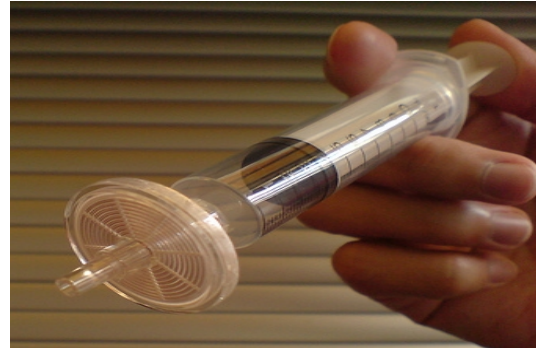


INRAE



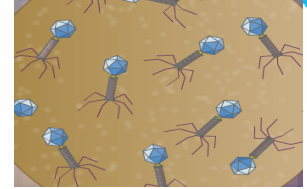
Phages.fr

(I) Isolément de phages à partir d'échantillons agricoles



1) Échantillonnage

2) Filtration

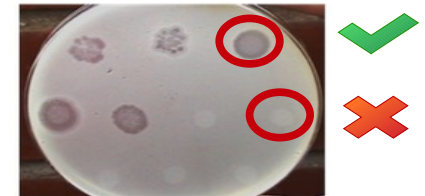
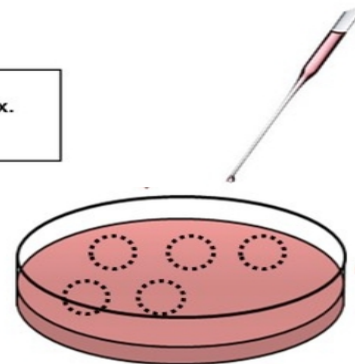


Phages



"Spot test"
(deposit a drop of approx.
10 μ l)

Confluent monolayer of
the host bacterium



3) Détection phages → Observation de la lyse de la bactérie