



HAL
open science

Etude des Soft Rot Pectobacteriaceae (SRP) associées aux eaux de surface : de leur répartition et diversité dans cet environnement à l'analyse de leurs génomes

Hajar Ben Moussa

► To cite this version:

Hajar Ben Moussa. Etude des Soft Rot Pectobacteriaceae (SRP) associées aux eaux de surface : de leur répartition et diversité dans cet environnement à l'analyse de leurs génomes. Biodiversité et Ecologie. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS315 . tel-04792228

HAL Id: tel-04792228

<https://theses.hal.science/tel-04792228v1>

Submitted on 20 Nov 2024

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.

Sorbonne Université

École doctorale ED227 *Sciences de la nature et de l'Homme : évolution et écologie*

Institut d'Écologie et des Sciences de L'Environnement de Paris

Département Diversité des Communautés et Fonctionnement des Écosystèmes (DCFE)

Équipe Communautés Microbiennes dans les Écosystèmes Continentaux (COMIC)

Étude des Soft Rot *Pectobacteriaceae* (SRP) associées aux eaux de surface : de leur répartition et diversité dans cet environnement à l'analyse de leurs génomes.

Par **Hajar BEN MOUSSA**

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par Marie-Anne BARNY et Jacques PÉDRON

Présentée et soutenue publiquement le 20 Novembre 2023

Devant un jury composé de :

Mme. Marie-Agnès JACQUES	Directrice de recherche, INRAE	Rapportrice
M. Denis FAURE	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
Mme. Ingrid LAFONTAINE	Professeur, Sorbonne université	Présidente du jury
M. Mohieddine MOUMNI	Professeur, Université Moulay Ismaïl	Examineur
Mme Marie-Anne BARNY	Directrice de recherche, INRAE	Directrice de thèse
M. Jacques PÉDRON	Maître de conférences, Sorbonne université	Co-Encadrant



Remerciements

Je remercie ma chère directrice de thèse, Marie-Anne Barny, qui m'a aidé à développer mon esprit critique, ma curiosité pour la recherche et mes capacités rédactionnelles, pour sa patience et son soutien tout au long de mon doctorat. Marie-Anne Barny n'a pas seulement été ma directrice de thèse, mais aussi une personne très sympathique, agréable et bienveillante avec qui j'ai partagé de très beaux moments. Je voudrais également remercier mon encadrant de thèse Jacques Pédron qui m'a aidé à développer mes compétences en bio-informatique, à structurer mes idées et mon travail, et qui a toujours été encourageant et prêt à m'apporter son aide. Je vous remercie tous les deux d'avoir lu et corrigé ce manuscrit. C'est grâce à votre aide et à votre soutien que ce travail a pu aboutir.

Je voudrais également remercier les membres de mon jury de thèse, Mme Marie-Agnès Jacques, et M. Denis Faure, d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. Je remercie Mme Ingrid Lafontaine, pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinatrice. Je remercie M. Mohieddine MOUMNI, pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant qu'examineur et aussi pour m'avoir soutenu et avoir été un très bon professeur pendant mes études de licence et de master et mon stage de M2.

Merci à nos collaborateurs du projet l'ANR TNPHYTO : Guy Condemine, Erwan Gueguen et Julie Baltenneck de l'Unité de Microbiologie, Adaptation et Pathogénèse de Lyon, ainsi qu'Odile Berge et Cindy Morris de l'Unité de Recherche en Pathologie Végétale d'Avignon. Je remercie également nos collaborateurs de la Plateforme Bioinformatique de Lille. Travailler avec vous a été une expérience enrichissante et agréable. Un grand merci à vous tous !

Je tiens à remercier Julien Gasparini et Sophie Pasek, membres du comité de suivi thèse, pour le temps qu'ils m'ont consacré et les suggestions qu'ils m'ont faites afin d'améliorer mon travail.

Je suis très reconnaissant envers les membres de mon équipe Communautés Microbiennes dans les Écosystèmes Continentaux (COMIC) d'avoir été attentifs et encourageants. Je remercie également nos chefs du Département Diversité des Communautés et Fonctionnement des Écosystèmes (DCFE), Jean-Christophe Lata et Lise Dupont, pour leur attention et pour avoir supporté la charge de la formation bio-informatique très enrichissante. Merci également au personnel administratif très efficace et agréable.

J'aimerais également remercier tous mes anciens professeurs qui m'ont transmis tant de connaissances au cours de ma licence et mon master et à la faculté des sciences de l'Université Moulay Ismaïl de Meknès au Maroc. Ces connaissances sont devenues la fondation sur laquelle j'ai construit et développé mes compétences actuelles.

Un grand merci à mes collègues doctorants et post-doctorants avec qui j'ai partagé de beaux moments à l'intérieur et à l'extérieur du laboratoire pendant mon doctorat.

Et, enfin, un grand merci à ma chère famille qui me manque beaucoup, à ma maman qui m'a encouragé et motivé pendant mon doctorat, à mon père qui n'a jamais cessé de croire en moi, à mes chers frères et sœurs ainsi qu'à mes tantes et oncles exceptionnels à qui je serai toujours reconnaissante. À ma grande, belle et généreuse famille, Je vous souhaite santé, bonheur et prospérité. *Je vous aime de tout mon cœur !*

Sommaire

Table des illustrations.....	1
Table des Tableaux.....	1
Table des abréviations.....	2
Avant-propos.....	3
Chapitre 1 : Introduction générale	7
1. Symptômes et infection	8
2. Méthodes de détection, d'isolement et de phénotypage	10
2.1. Les méthodes phénotypiques.....	11
2.1.1. Approche culturale.....	11
2.1.2. Les analyses des métabolites et des capacités métaboliques	13
2.2. Les méthodes moléculaires	15
2.2.1. Détection des bactéries d'intérêt dans des échantillons environnementaux.....	15
2.2.2. Les différentes méthodes de typage moléculaire de bactéries isolées.....	16
3. Taxonomie des SRP : historique et première classification	22
4. Plantes hôtes des SRP.....	26
5. Épidémiologie des SRP sur la pomme de terre.....	31
6. Les facteurs de virulence	34
6.1. Les systèmes de sécrétion.....	34
6.1.1. Le système de sécrétion de type I.....	34
6.1.2. Le système de sécrétion de type II.....	35
6.1.3. Le système de sécrétion de type III	36
6.2. Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire végétale	36
6.3. L'assimilation du fer	37
6.4. Régulation de l'expression des facteurs de virulence	38
7. Les méthodes de lutte.....	40
8. Les SRP dans l'environnement	44
8.1. Recherche des SRP dans l'eau	44
8.2. Recherche des SRP dans le sol.....	48
8.3. Associations des SRP avec des vecteurs (insectes et nématodes).....	51
9. L'évolution réductive chez les bactéries	55

9.1.	Réduction de génomes chez les bactéries symbiontes	55
9.2.	Réduction de génome chez les bactéries libres	58
9.2.1.	L'hypothèse Streamlining.....	60
9.2.2.	Fort taux de mutations	61
9.2.3.	L'hypothèse de la reine noire	62
Objectifs de thèse		63
Chapitre 2 : « description d'une nouvelle espèce <i>P. quasიაquaticum</i>, isolée d'eaux de surface en France »		65
1.	Chapeau introductif	66
2.	Article 1 : « <i>Pectobacterium quasიაquaticum</i> sp. nov., isolated from waterways »	69
3.	Chapeau conclusif.....	79
Chapitre 3 : « étude de la diversité et de l'abondance des SRP dans la rivière Durance »		81
1.	Chapeau introductif	82
2.	Article 2 : « The Diversity and Abundance of Soft Rot <i>Pectobacteriaceae</i> Along the Durance River Stream in the Southeast of France Revealed by Multiple Seasonal Surveys »	85
3.	Chapeau conclusif.....	96
Chapitre 4 : « études des caractéristiques génomiques, fonctionnelles et des traits évolutifs de deux espèces de <i>Pectobacterium</i> : <i>P. aquaticum</i> et <i>P. quasიაquaticum</i> exclusivement isolées dans l'eau ».....		97
1.	Chapeau introductif	98
2.	Article 3 : « Two species with a peculiar evolution within the genus <i>Pectobacterium</i> suggest adaptation to a new environmental niche»	99
3.	Chapeau conclusif :	116
Chapitre 5 : « Identification des déterminants génétiques nécessaires à la survie dans l'eau de trois groupes bactériens (<i>Pseudomonas</i>, <i>Dickeya</i> et <i>Pectobacterium</i>) par une analyse Tn-Seq ».....		119
1.	Introduction	120

2. Matériels et Méthodes	125
2.1. Milieux de cultures	125
2.2. Souches analysées	126
2.3. Estimation de la concentration des banques	126
2.4. Inoculation des banques dans l'eau	128
2.5. Conditions de culture des mutants Tn-Seq dans l'eau de rivière	128
2.6. Extraction de l'ADN	129
3. Résultats	129
3.1. Suivi de croissance en eau	129
3.2. Résultats préliminaires du Tn-Seq « eau » : Les gènes essentiels pour la survie et la croissance dans l'eau de deux souches de <i>Pectobacterium</i>	131
Conclusions et perspectives.....	135
Références bibliographiques.....	144
Annexes.....	163
1. Données supplémentaires - Article 1	163
2. Données supplémentaires - Article 2	183
3. Données supplémentaires – Article 3.....	187
4. Données supplémentaires - Chapitre 5.....	199
Résumé.....	202
Abstract	204

Table des illustrations (Hors articles et Annexe)

Figure 1 : Arbre phylogénétique de 121 souches représentatives de l'ordre des <i>Enterobacterales</i> , avec un focus sur la famille des <i>Pectobacteriaceae</i>	4
Figure 2 : a) Symptômes de la pourriture molle sur tubercule de pomme de terre. b) Symptômes de jambe noire sur tige de pomme de terre (Charkowski, 2018).....	9
Figure 3 : Isolement des SRP sur milieu CVP.....	12
Figure 4 : Schéma simplifié des étapes nécessaires à l'inférence d'un arbre MLSA.....	20
Figure 5 : Évolution de la taxonomie de <i>Pectobacterium</i> spp.....	23
Figure 6 : Le réseau de régulation de l'expression des gènes de virulence a) chez les <i>Pectobacterium</i> spp. et b) chez les <i>Dickeya</i>	39
Figure 7 : Grille des interactions entre organismes.....	56
Figure 8 : les différentes étapes de l'évolution réductive des bactéries libres vers les symbiontes intracellulaires obligatoires (McCutcheon and Moran, 2012).....	59
Figure 9 : Schéma de la méthode TIS (Cain et al., 2020).....	121
Figure 10 : Courbes de croissance en eau des mutants de a) <i>Pectobacterium</i> , b) <i>Dickeya</i> et c) <i>Pseudomonas</i>	130
Figure 11 : Les gènes essentiels à la survie et la croissance dans l'eau de rivière, qui sont commune et spécifiques à <i>Pectobacterium versatile</i> A73-S18-O15 et <i>Pectobacterium aquaticum</i> A212-S19-A16.....	133
Figure 12 : Distribution des catégories fonctionnelles COG des gènes essentiels à la survie dans l'eau chez <i>Pectobacterium versatile</i> A73-S18-O15 et <i>Pectobacterium aquaticum</i> A212-S19-A16.....	133

Table des Tableaux (Hors articles et Annexe)

Tableau 1 : Site et pays d'isolement pour chacune des espèces de <i>Pectobacterium</i> déposées à la collection CIRM-CFBP (Portier et al. 2020).....	28
Tableau 2 : Description des souches testées	127
Tableau 3 : Les concentrations de référence des inocula de banques de mutants après ajustement à $DO_{600} = 1$	128
Tableau 4 : Nombre de générations (doublement de l'effectif) des bactéries lors de la culture en eau avant et après enrichissement.....	131

Table des abréviations

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AHL	N-Acyl Homosérine Lactone
AMPc	Adénosine Monophosphate Cyclique
ANI	Average Nucleotide Identity
COG	Clusters Of Orthologous Groups
CRP	Cyclic AMP Receptor Protein
CVP	Crystal Violet Pectate
dDDH	Digital DNA-DNA Hybridization
DDH	DNA-DNA Hybridization
DO	Densité Optique
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
HITS	Insertion Tracking by Deep Sequencing
INSeq	Insertion Sequencing
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification
MFP	Membrane Fusion Protein
MLSA	Multilocus Sequence Analysis
MSP	Miller-Schroth-Pectate
NGS	Next-Generation Sequencing
OGM	Organismes Génétiquement Modifiés
OMF	Outer Membrane Factor
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCWDE	Plant Cell Wall Degrading Enzymes
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PG	Phylogroup
PT	Milieu différentiel Pour Isolement Des Srp Du Sol Et Des Plantes (Burr et Schroth, 1977)
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
r.p.m.	Rotation par minutes
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rep-PCR	repetitive element sequence-Based PCR
SRP	Soft Rot <i>Pectobacteriaceae</i>
SST1	Système de sécrétion de type 1 en anglais T3SS
SST2	Système de sécrétion de type 2 en anglais T2SS
SST3	Système de sécrétion de type 3 en anglais T3SS
TIS	Transposon Insertion Sequencing
Tn-Seq	Transposon Sequencing
TraDIS	Transposon Directed Insertion Site Sequencing
UFC	Unité Formant Colonie
VNC	Viable mais Non Cultivable

Avant-propos

La santé des plantes est un sujet crucial, en particulier lorsqu'il s'agit de plantes cultivées d'importance agronomique, qui contribuent à la sécurité alimentaire. Les plantes sont exposées à divers facteurs de stress, tels que les conditions environnementales défavorables (par exemple température ou stress hydrique), ainsi qu'aux attaques biotiques causées par des ravageurs (nématodes, insectes, acariens) ou des microorganismes pathogènes tels que les oomycètes, les champignons, les bactéries et les virus. Historiquement, les maladies des plantes causées par les microorganismes étaient principalement associées aux champignons, qui demeurent les pathogènes les plus dévastateurs sur le plan économique (Doehlemann et al. 2017). Les oomycètes, microorganismes eucaryotes autrefois confondus avec les champignons, comprennent plusieurs espèces pathogènes de plantes. Par exemple, l'oomycète *Phytophthora infestans*, responsable de la maladie du mildiou chez la pomme de terre, a causé d'importants dégâts sur la culture de la pomme de terre en Europe au 19^{ème} siècle. Ce pathogène a notamment conduit à la grande famine irlandaise en 1845 où des millions de personnes sont mortes de faim (McGowan et Fitzpatrick 2020). Les virus sont également des pathogènes importants de plantes. Par exemple, le virus de la mosaïque du maïs provoque la maladie virale la plus dévastatrice des cultures de maïs en Afrique, entraînant des pertes pouvant atteindre 480 millions de dollars américains (Rybicki 2015).

La découverte des maladies des plantes d'origine bactérienne remonte à la fin du 19^{ème} siècle (Paulin et al. 2001). Parmi les bactéries les plus dévastatrices pour les cultures, on trouve des espèces à large spectre d'hôte et à large distribution géographique, telles que *Ralstonia solanacearum*, qui est capable d'infecter plus de 50 familles de plantes, ainsi que des espèces à spectre d'hôte restreint, telles que *Xanthomonas oryzae*, responsable d'une maladie du riz appelée flétrissement bactérien (Mansfield et al. 2012). La plupart des bactéries pathogènes de plantes sont de type à Gram négatif et appartiennent au groupe des *Proteobacteria*. Il existe néanmoins aussi des bactéries Gram positif pathogènes de plantes qui sont moins étudiées et dont la plupart appartiennent au groupe des actinomycètes (Eichenlaub et Gartemann 2011).

Les symptômes causés par toutes ces bactéries sont variés : nécroses, flétrissements, pourritures ou tumeurs. Les déterminants de virulence varient également selon les groupes bactériens. Par exemple, le système de sécrétion de type III et ses effecteurs jouent un rôle clé dans la virulence chez plusieurs bactéries pathogènes de plantes appartenant aux genres *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* et *Erwinia*.

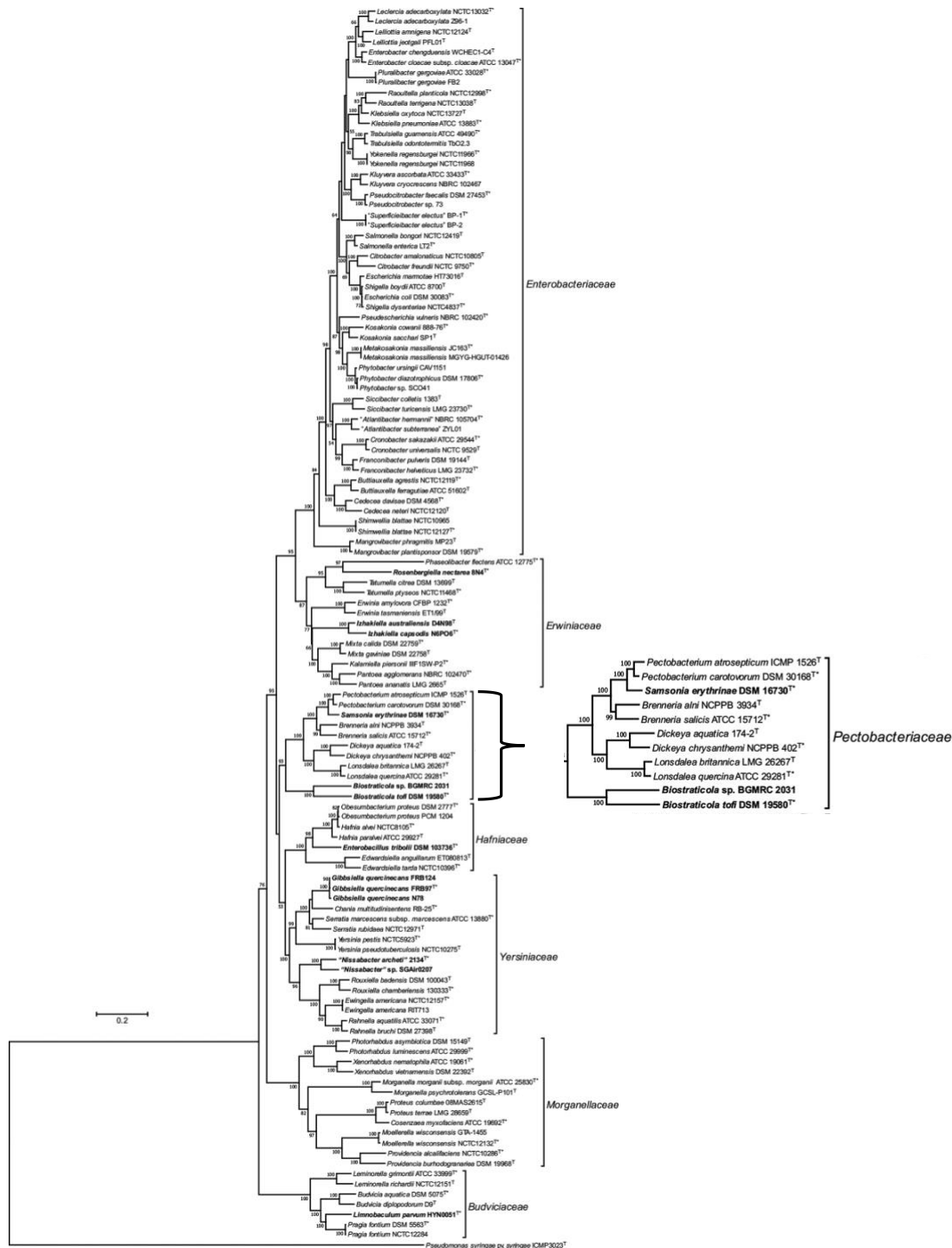


Figure 1 : Arbre phylogénétique de 121 souches représentatives de l'ordre des *Enterobacteriales*, avec un focus sur la famille des *Pectobacteriaceae*. Inféré par la méthode du maximum de vraisemblance à partir des séquences d'acides aminés de 32 protéines à copie unique et qui font partie du core génome (Soutar et Stavrinos, 2020). Cet arbre a été construit avant que les genres *Acerihabitans* et *Symbiopectobacterium* ne soient décrits. En outre, Soutar et Stavrinos (2020) suggèrent que les genres *Biostraticola* et *Samsonia* sont incorrectement assignés à la famille des *Pectobacteriaceae*. Cinq cent bootstraps ont été réalisés pour évaluer le rapport statistique de chaque nœud et seuls les bootstraps supérieurs à 50% sont présentés. La barre d'échelle indique 0.02 substitution par position d'acide aminé.

D'autres espèces, comme celles inféodées aux genres *Pectobacterium*, *Dickeya* et *Musicola*, qui font l'objet de ce travail, utilisent principalement un système de sécrétion de type II et seront présentées en détail dans le chapitre suivant. Ces 3 genres bactériens appartiennent à la famille des *Pectobacteriaceae*, elle-même située dans l'ordre des *Enterobacterales* qui rassemble des espèces bactériennes associées à différents écosystèmes, notamment des agents pathogènes humains et animaux (*E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*), des espèces entomopathogènes (*Xenorhabdus*, *Photorhabdus*) et des espèces ubiquistes isolées de différents échantillons environnementaux et cliniques (*Rahnella aquatilis*) (voir Figure 1) (Adeolu et al. 2016; Brady et al. 2014; Janda et Abbott 2021).

La famille des *Pectobacteriaceae*, rassemble 8 genres bactériens, *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Musicola*, *Affibrenneria*, *Brenneria*, *Lonsdalea*, *Samsonia*, *Acerihabitans* et *Symbiopectobacterium*, avec différents modes de vie, notamment des agents pathogènes de plantes ligneuses (*Lonsdalea*, *Brenneria*), de plantes annuelles (*Pectobacterium*, *Dickeya*) ou des symbiontes d'insectes (*Acerihabitans* et *Symbiopectobacterium*) (Adeolu et al. 2016; Lee et al. 2021; Nadal-Jimenez et al. 2022; Soutar et Stavrinides 2020). Le chapitre suivant présente un état de l'art sur les bactéries appartenant aux genres *Pectobacterium*, *Dickeya* et *Musicola*, en mettant l'accent sur le genre *Pectobacterium* qui est plus particulièrement l'objet de ce travail.

Chapitre 1 : Introduction générale

1. Symptômes et infection

Dans la famille des *Pectobacteriaceae*, les genres *Pectobacterium*, *Dickeya* et *Musicola* regroupent des espèces pectinolytiques qui provoquent des pourritures sur les plantes infectées. Ces pourritures caractéristiques expliquent pourquoi ces trois genres sont communément regroupés sous l'acronyme SRP qui signifie « Soft Rot *Pectobacteriaceae* », « soft rot » signifiant pourriture en anglais.

La pourriture peut se manifester sur différents organes de la plante hôte, tels que les racines, les tiges, les tubercules ou les fruits (Figure 2). Cette pourriture est due à la macération des tissus de la plante hôte provoquée par un ensemble d'enzymes sécrétées par les SRP, dont l'action collective conduit à la dégradation de la paroi cellulaire végétale. Toutes ces enzymes sont regroupées sous l'acronyme PCWDE qui signifie « Plant Cell Wall Degrading Enzymes ». Des symptômes de flétrissement, d'enroulement et de jaunissement des feuilles sont souvent associés aux symptômes. Les symptômes de pourriture molle provoquée par les différentes espèces de SRP sont similaires. Le même type de symptômes peut également être causés par d'autres bactéries pectinolytiques à l'extérieur de la famille des *Pectobacteriaceae*, telles que *Bacillus pumilus* et *Paenibacillus amyloliticus* (Yahyaoui et al. 2023).

Les SRP peuvent également provoquer des maladies spécifiques à des plantes données, telles que la jambe noire sur pomme de terre, la pourriture du pied de riz ou le chancre bactérien du pois (Charkowski 2018). La culture de pomme de terre, de par son importance économique, est la culture agronomique la plus affectée par les SRP et par conséquent la plus étudiée. Chez la pomme de terre, la pourriture peut se développer dans les différentes parties de la plante au niveau des lenticelles, des stolons, de la partie aérienne ou basale de la tige. L'infection peut se propager du tubercule mère vers la tige et/ou vers les tubercules fils via les stolons. L'infection précoce du tubercule mère après la plantation provoque un manque de levée (Pérombelon et Kelman 1987).

Dans les champs de pomme de terre, la maladie de la jambe noire survient généralement suite à la propagation de l'infection du tubercule vers la tige. Le symptôme caractéristique de la jambe noire est un noircissement de la base de la tige (voir Figure 2.b), ainsi qu'un flétrissement généralisé du plant associé à un jaunissement des feuilles (Toth et al. 2021). Les symptômes de jambe noire sont généralement observés en été ou à la fin de la période de végétation. Ils peuvent varier selon les conditions environnementales, telles que la température et l'humidité (Toth et al. 2021).

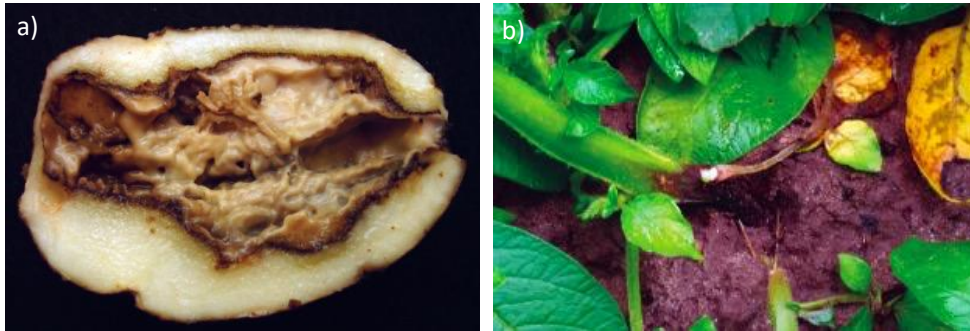


Figure 2: a) Symptômes de la pourriture molle sur tubercule de pomme de terre. b) Symptômes de jambe noire sur tige de pomme de terre (Charkowski, 2018).

Les SRP peuvent également provoquer des pourritures sur les pommes de terre en stockage. Cette maladie post-récolte est appelée « pourriture molle ».

Les SRP infectent également des plantes ornementales, en particulier les plantes à fleurs bulbeuses ou tubéreuses. L'infection commence souvent à la base des feuilles ou au niveau des pétioles et se manifeste par un jaunissement ou brunissement des feuilles, suivi par un flétrissement ou par l'apparition de lésions à aspect aqueux (Toth et al. 2021). L'infection peut se propager à la plante entière et la tuer si les conditions de température et d'humidité sont favorables.

Les SRP peuvent être présentes dans le matériel végétal à l'état de latence (asymptomatique) (tubercule de pomme de terre) (Pérombelon et Kelman 1980). Elles peuvent également provenir de l'environnement (le sol, l'eau, les insectes ou les nématodes voir chapitre 1 section 8 : SRP dans l'environnement) et s'introduire dans la plante via des ouvertures naturelles telles que les lenticelles, les stomates, les blessures accidentelles provoquées par exemple suite à des épisodes orageux (vent ou grêle) (Pérombelon et Kelman 1980). L'infection peut survenir à différentes étapes de production : au champ, lors de la récolte, du transit ou du stockage. Plusieurs espèces de SRP peuvent être présentes dans le même champ, voire sur la même plante (Motyka-Pomagruk et al. 2021). Généralement, les SRP persistent dans les espaces intracellulaires et les tissus vasculaires à l'état de latence pendant une longue période sans provoquer de symptômes (Aremu et Babalola 2015; Hayward 1974). Les symptômes ne se manifestent que lorsque les conditions deviennent favorables pour la croissance des SRP, en condition de faibles teneurs en oxygène et de forte humidité (Pérombelon et Kelman 1980).

2. Méthodes de détection, d'isolement et de phénotypage

Afin de contrôler les foyers épidémiques des SRP et éviter leurs propagations, la détection et l'identification de ces pathogènes sont nécessaires. Les méthodes de détection doivent être à la fois sensibles et spécifiques afin de détecter et de caractériser les SRP dans les plantes symptomatiques ou asymptomatiques et dans les échantillons environnementaux (eau, sol, insectes ou nématodes). Ces méthodes doivent également être rapides, fiables et économiques. La suite de ce chapitre décrit différentes méthodes de détection et d'identification des SRP les plus utilisées, leurs avantages et leurs limites.

2.1. Les méthodes phénotypiques

Les premières méthodes utilisées pour identifier les SRP consistaient en une évaluation visuelle des symptômes, suivie d'une culture microbiologique sur un milieu semi-sélectif ou différentiel. Les bactéries isolées peuvent ensuite être soumises à des tests phénotypiques, notamment leur caractère pathogène, pour vérifier le postulat de Koch. Cependant, la simple évaluation visuelle des symptômes ne permet pas de distinguer l'agent pathogène, car les symptômes causés par les différentes SRP au champ ou lors du stockage sont similaires.

2.1.1. Approche culturale

La plupart des tests phénotypiques (observation microscopique, tests biochimiques et sérologiques) nécessitent des cultures bactériennes viables. L'isolement et la purification des bactéries sont donc des étapes nécessaires. Généralement, les échantillons sont prélevés des zones infectées les plus récentes afin d'éviter la contamination par des saprophytes, qui peuvent inhiber la croissance des SRP dans le milieu d'isolement (Czajkowski et al. 2015). Différents milieux différentiels ont été développés afin d'isoler les SRP, comme les milieux Miller-Schroth-Pectate (MSP), PT ou Crystal Violet Pectate (CVP) (Burr et Schroth, 1977; Cuppels et Kelman 1974; Pierce 1992). Ces milieux sont basés sur la capacité des SRP à produire des enzymes qui dégradent la pectine. Bien que le milieu modifié MSP (Pierce 1992) ait montré un meilleur taux de récupération que le milieu CVP, il n'est que rarement utilisé, le milieu (CVP) étant le milieu le plus couramment utilisé pour isoler des bactéries pectinolytiques (Cuppels et Kelman 1974). Plusieurs variations du milieu CVP existent, la plus utilisée étant celle décrite par Valérie Hélias (Hélias et al. 2012). Ce milieu est composé de sodium polypectate comme source principale de carbone et contient du crystal violet permettant d'inhiber la croissance des bactéries Gram positives. Les bactéries dégradant la pectine forment sur ce milieu des dépressions, ce qui permet leur détection visuelle et leur numération (Figure 3). Plusieurs facteurs peuvent affecter la sélectivité du milieu CVP, notamment la source de pectine utilisée, car les SRP ne peuvent pas dégrader tous les types de pectine. Peu de sources de pectine sont convenables à la préparation du milieu CVP et très peu sont commercialisées. Il est recommandé d'utiliser la pectine AG366 distribuée par Agdia Biofords SARL, qui a montré un bon taux de récupération et une faible toxicité (Hélias et al. 2012).

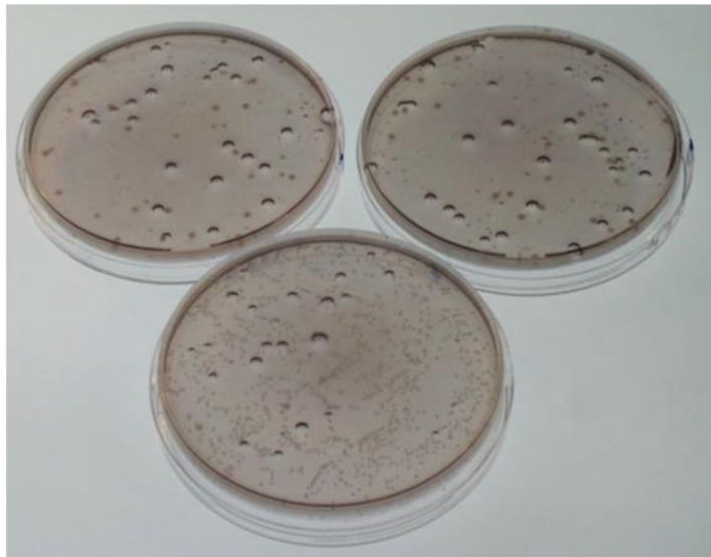


Figure 3: Isolement des SRP sur milieu CVP. Les cavités formées par les SRP sont aisément repérables (crédit image : Valérie Hélias).

L'un des inconvénients d'utilisation des milieux différentiels tels que CVP est qu'ils ne permettent pas d'isoler les SRP si leur activité pectinolytique est nulle ou très faible. De plus, ces milieux pourraient ne pas détecter les SRP dans un état viable mais non cultivable (VNC). Cela peut conduire à une sous-estimation de la taille de la population de SRP. En outre, le milieu CVP ne permet pas toujours de détecter les SRP dans les échantillons environnementaux en présence de saprophytes secondaires. En effet, certains saprophytes peuvent se multiplier sur le milieu CVP et inhiber la croissance des SRP (Cuppels et Kelman 1974). Dans de tels cas, un enrichissement sélectif est recommandé, de préférence dans des conditions anaérobies (Burr et Schroth, 1977). Cependant, l'enrichissement ne permet pas d'estimer la population des SRP dans les échantillons analysés.

Par ailleurs, les isolements effectués sur des milieux sélectifs ne permettent pas de distinguer les bactéries du genre *Pectobacterium* de celles des genres *Dickeya* ou *Musicola*. Il existe un milieu sélectif spécifique au genre *Dickeya*, basé sur la capacité des souches de *Dickeya* à produire un pigment bleu, l'indigoidine (Lee et Yu 2006). Cependant, ce milieu est peu performant dans le cas d'échantillons de plantes ou d'échantillons environnementaux (eau et sol) en présence de saprophytes secondaires (Hélias et al. 2012). En outre, certaines souches de *Dickeya* ne produisent pas ce pigment bleu lorsqu'elles sont cultivées sur ce milieu (R. Czajkowski, observations non publiées).

2.1.2. Les analyses des métabolites et des capacités métaboliques

Après l'isolement des bactéries, des tests biochimiques peuvent être effectués pour les caractériser. Une série de tests biochimiques peut être employée pour distinguer les bactéries du genre *Pectobacterium* de celles du genre *Dickeya*. Par exemple, les souches appartenant au genre *Dickeya* peuvent être distinguées des souches appartenant au genre *Pectobacterium* grâce à leur sensibilité à l'érythromycine, la production de phosphatase, la production d'indole ou l'utilisation de malonate (Perombelon et Van Der Wolf 2002). La discrimination entre les espèces et sous-espèces de SRP était basée sur leurs réactions différentielles à une combinaison de tests biochimiques (Perombelon et Van Der Wolf 2002). Cependant, en général, la discrimination entre espèces de *Pectobacterium* à l'aide des tests biochimiques s'avère difficile, en raison de la grande proximité taxonomique des espèces (Nabhan et al. 2012). La discrimination des espèces du genre *Dickeya* est plus facile en raison des propriétés biochimiques distinctes observées entre les différentes espèces. Ces différences phénotypiques

ont permis de subdiviser le genre *Dickeya* en neuf biovars (Samson et al. 2005). Cette classification en biovars des *Dickeya* correspondait en grande partie à la classification en pathovars, basée sur la capacité des espèces à infecter une ou plusieurs plantes hôtes précédemment décrite (Lelliott et Dickey 1984). De nos jours, le système de biovars est rarement utilisé pour la classification des SRP car les progrès des techniques de détection et de discrimination moléculaire permettent une identification plus précise (Czajkowski et al. 2015). Les tests biochimiques sont cependant toujours utilisés pour discriminer les espèces de SRP, mais ils ne sont que secondaires par rapport aux méthodes d'analyses phylogénétiques (voir Chapitre 1 section 2.2.2).

D'autres méthodes, telles que l'analyse sérologique (immunologique) basée sur l'interaction anticorps-antigènes, étaient également précédemment utilisées pour détecter et caractériser des bactéries pathogènes. Cependant, ces méthodes se sont révélées difficiles à appliquer chez les SRP, en particulier chez le genre *Pectobacterium*, en raison de l'hétérogénéité sérologique importante observée chez ce genre bactérien (De Boer 1979). Une autre limitation des méthodes sérologiques est qu'elles dépendent de la spécificité de l'anticorps utilisé. Les anticorps polyclonaux, qui réagissent à plusieurs épitopes manquent de spécificité et peuvent réagir avec d'autres pathogènes non ciblés qui présentent des épitopes communs avec les SRP. En revanche, les anticorps monoclonaux sont très spécifiques, car ils ne réagissent qu'avec un épitope spécifique, mais ils présentent un risque élevé de faux négatifs en cas de variation sérologique du pathogène cible. De plus, leur coût de production est élevé (Czajkowski et al. 2015).

Par ailleurs, les classifications sérologiques et biochimiques aboutissent parfois à des résultats contradictoires. Par exemple, une souche dont les caractéristiques biochimiques sont identiques à une espèce donnée peut réagir à un anticorps spécifique d'une autre espèce, suggérant une possible instabilité de l'une ou l'autre de ces méthodes de classification (De Boer 1979).

L'analyse des acides gras ou FAME (Fatty Acid Methyl Ester) est également utilisée pour la caractérisation et l'identification des bactéries. Elle permet de classer les espèces bactériennes selon leur composition en acides gras. Les acides gras sont les principaux constituants des lipides cellulaires, et leurs caractéristiques structurelles peuvent varier en fonction de l'espèce bactérienne. Cette méthode est capable de différencier les bactéries du genre *Pectobacterium* de celles du genre *Dickeya*. Elle distingue également certaines espèces du genre *Pectobacterium*. Cependant, elle ne permet pas de distinguer les espèces ou sous-espèces de *Dickeya* (Czajkowski et al. 2015).

2.2. Les méthodes moléculaires

Les méthodes basées sur des approches culturales ne sont pas toujours applicables pour différentes raisons. Par exemple, lorsqu'aucun milieu semi-sélectif ou différentiel n'est développé ou disponible. De plus, dans le cas des échantillons environnementaux, la croissance de la bactérie ciblée peut être inhibée par la présence d'autres communautés bactériennes. En outre, la bactérie ciblée ne sera pas détectée si elle est dans un état viable mais non cultivable. Pour surmonter ces limitations, des méthodes de détection moléculaire ont été développées. Ces méthodes permettent une détection plus précise, fiable et rapide, mais nécessitent souvent des équipements spécifiques coûteux. Le chapitre suivant décrit les méthodes de typage moléculaire les plus couramment appliquées chez les SRP, en soulignant leurs avantages et leurs limites.

2.2.1. Détection des bactéries d'intérêt dans des échantillons environnementaux

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est une méthode d'amplification très largement utilisée pour le diagnostic et le typage moléculaire. Elle consiste à amplifier un fragment d'ADN de l'agent pathogène au moyen d'amorces spécifiques. Différentes variantes de la PCR existent, notamment la PCR multiplex, qui utilise un set d'amorces pour amplifier simultanément plusieurs séquences d'ADN, ce qui permet d'identifier simultanément plusieurs espèces. L'agent pathogène peut également être quantifié en utilisant la PCR en temps réel (appelé aussi qPCR, pour quantitative PCR). La PCR et ses variantes permettent de réaliser des diagnostics rapides et ont une sensibilité élevée. Toutefois, la spécificité (au niveau du genre, de l'espèce ou de la sous-espèce) de ces méthodes varie en fonction des amorces utilisées. Il convient de noter que les diagnostics par PCR sont souvent réalisés avec des amorces spécifiques développées pour détecter les espèces de SRP les plus virulentes, telles que *P. atrosepticum* ou *P. carotovorum*. Elles ne sont donc pas informatives de la diversité au sein de l'échantillon analysé. Ceci peut être problématique, car des SRP appartenant à des espèces différentes sont souvent présentes au sein d'un même symptôme (Motyka-Pomagruk et al. 2021; Smoktunowicz et al. 2022). Les méthodes précitées nécessitent d'être réalisées par des personnels formés dans des laboratoires équipés (avec un thermocycleur) et avec des produits qui sont parfois coûteux (fluorochromes nécessaires pour la PCR en temps réel). La Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) a été développée afin de remédier à ce problème. Cette méthode relativement simple permet d'amplifier une séquence cible avec 4 à 6 amorces spécifiques à température constante et ne nécessite ni thermocycleur, ni sondes fluorescentes. Son protocole est simple et peut être utilisé pour des diagnostics directement en champ. Jusqu'à présent, des protocoles LAMP ont été développés pour l'identification de 5 espèces du genre

Pectobacterium (*P. atrosepticum*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri*, *P. aroidearum*) et pour l'identification du genre *Dickeya* et deux de ses espèces (*D. dianthicola* et *D. fangzhongdai*) (Chandrashekar et al. 2022; DeLude et al. 2022; Domingo et al. 2021; Hu et al. 2016; Ocenar et al. 2019; Sun et al. 2019; Yasuhara-Bell et al. 2017).

2.2.2. Les différentes méthodes de typage moléculaire de bactéries isolées

Une fois les bactéries isolées sur des milieux semi-sélectifs ou différentiels à partir d'échantillons environnementaux, plusieurs méthodes de typage moléculaire permettent de les caractériser. Parmi ces méthodes, on trouve celles basées sur la digestion de l'ADN, telle que la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Cette méthode consiste à digérer l'ADN total de la bactérie avec des enzymes de restrictions rares suivie d'une électrophorèse en champ pulsé. La PFGE s'est révélée efficace et reproductible pour comparer la diversité des populations des souches de *Dickeya* isolées de l'eau et de plantes (Potrykus et al. 2016).

D'autres méthodes sont basées sur l'amplification d'un fragment d'ADN répété, comme la repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR), qui utilise des amorces ciblant des séquences répétées non codantes. Cette méthode permet de mettre en évidence le polymorphisme du nombre de séquences répétées. La rep-PCR a été appliquée pour étudier la diversité des souches de *P. brasiliense*, responsable de la maladie de jambe noire en Serbie (Marković et al. 2021). Elle a également été utilisée pour caractériser et identifier l'origine des souches de *Dickeya* responsables de foyers de la maladie de pourriture du cœur de la plante d'ananas, en les comparant à d'autres souches de *Dickeya* issues de différentes sources (plantes d'ananas importées, eau d'irrigation locale, collection bactérienne locale) (Sueno et al. 2014).

La méthode Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) utilise des amorces courtes et aléatoires pour amplifier des fragments ADN aléatoires. Cette méthode est particulièrement utile pour étudier la diversité des organismes pour lesquels peu d'informations sont disponibles. Elle ne nécessite pas non plus une grande quantité d'ADN, ni d'ADN de haute qualité. Cependant, la RAPD manque de reproductibilité en raison du choix arbitraire des amorces.

D'autres méthodes combinent à la fois l'amplification et la digestion de l'ADN comme la méthode Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Cette méthode est basée sur la digestion de l'ADN total par des enzymes de restriction suivie d'une amplification sélective des fragments de restriction. L'AFLP permet de mettre en évidence un polymorphisme au niveau des sites de restriction tout le long du génome et a un grand pouvoir résolutif. L'AFLP

a permis de différencier les souches de l'espèce *P. parvum* de celles de l'espèce très proche *P. polaris* (Pasanen et al. 2020).

Toutes ces méthodes de typage présentent des limites. Leur résolution varie selon la méthode utilisée et selon l'espèce ou la sous espèce que l'on cherche à identifier, les amorces, le choix des enzymes de restriction et du matériel expérimental. De plus, elles nécessitent souvent d'analyser en parallèle les souches type représentatives des espèces afin d'avoir une base de comparaison. Cependant, ces souches de référence ne sont pas forcément représentatives de la diversité intra-espèce.

La méthode d'hybridation ADN-ADN (DDH) permet de mesurer de la distance génomique globale entre deux souches en mesurant le degré d'hybridation de leurs ADN. L'intérêt de cette méthode dans la classification des procaryotes remonte aux années 1960 (McCarthy et Bolton 1963; Schildkraut et al. 1961), et elle a été appliquée pour la taxonomie des bactéries du genre *Erwinia* dans les années 1970 (Brenner et al. 1972; Murata et Starr 1974). Depuis 1987, cette méthode est devenue une norme de référence obligatoire pour la classification taxonomique et la description des bactéries. Deux souches appartiennent à la même espèce si elle présentent une valeur d'hybridation supérieure ou égale à 70 % et/ou si leur différence de température de fusion est inférieure ou égale à 5 °C (Wayne et al. 1987). Cependant, cette méthode expérimentale est longue, fastidieuse et difficile à reproduire (Schleifer 2009). Grâce aux avancées technologiques de séquençage d'ADN, de nombreuses méthodes bio-informatiques ont été développées et peuvent servir d'alternatives, telles que l'analyse dDDH (digital DNA-DNA hybridation). La dDDH, qui est une méthode *in silico* de comparaison de séquences génomiques, nécessite d'avoir accès à un séquençage du génome. La dDDH se rapproche le plus possible la DDH expérimentale réalisée en laboratoire (Meier-Kolthoff et al. 2013). Une autre méthode utilisable sur des génomes bactériens pour mesurer la distance génomique entre les génomes est l'analyse ANI (Average Nucleotide Identity). Elle a été proposée comme nouvelle métrique pour la définition et la classification des espèces bactériennes (Goris et al. 2007; Konstantinidis et Tiedje 2005). Cette méthode consiste à mesurer l'identité moyenne de séquences nucléotidiques homologues entre les génomes de deux souches, et les souches sont considérées comme appartenant à la même espèce, si leur ANI est supérieur à 95 %. La valeur de l'ANI des deux souches doit être interprétée en parallèle avec leur valeur de "couverture", qui indique la proportion de séquences homologues alignées par rapport à la taille de leurs génomes (Richter et Rosselló-Móra 2009).

Le séquençage de génomes entiers, grâce aux technologies de séquençage à haut débit (NGS), a donc considérablement facilité l'étude des variations génétiques entre organismes. De plus, la comparaison de séquences nucléotidiques ou protéiques de bactéries permet de construire des arbres phylogénétiques qui permettent d'étudier les relations de parenté entre organismes. En fonction de la longueur, du degré de conservation et du nombre de séquences analysées, l'analyse des séquences du génome offre un pouvoir discriminant supérieur aux méthodes mentionnées précédemment.

Analyse des séquences du gène de l'ARN ribosomal 16S

Les travaux révolutionnaires de Carl Woese en phylogénie et en taxonomie des procaryotes ont démontré l'utilité et les avantages de l'ARN ribosomal 16S dans la classification des microorganismes. Les gènes de l'opéron ribosomique (5S, 16S, 23S et la séquence intergénique 23S-5S) sont considérés comme de bons « chronomètres moléculaires » en raison de leur universalité (présents chez tous les organismes procaryotes), de leur fonction constante et de la structure du gène composée de régions ayant différents niveaux de conservation (Woese et Fox 1977). L'analyse de la séquence du gène codant l'ARN ribosomal 16S est une méthode de référence pour l'identification et la classification des organismes et constitue un standard obligatoire pour la description de nouvelles espèces. En se basant sur les séquences de l'ARN ribosomal 16S, deux organismes appartiennent à la même espèce si le pourcentage d'identité des séquences d'ARN ribosomal 16S des deux organismes est supérieur ou égal à 97 % (Stackebrandt et Goebel 1994). Ce seuil a ensuite été augmenté à 98.7 - 99 % de similarité (Stackebrandt et Ebers 2006). Cependant, l'utilisation du gène de l'ARNr 16S présente certaines limites. Tout d'abord, un organisme peut avoir plusieurs copies du gène de l'ARNr 16S, et les variations génétiques entre les copies peuvent parfois conduire à une classification erronée de l'organisme dans plus d'une espèce (Pei et al. 2010). En outre, les gènes de l'ARNr 16S évoluent à des rythmes différents, mais le seuil de définition des espèces (98.7 - 99 %) est relativement strict. Par conséquent, selon ce seuil, les espèces très proches seront regroupées en une seule espèce. De plus, le gène codant l'ARNr 16S ne représentant pas la totalité des données génomiques, des différences significatives dans la composition du génome peuvent être détectées chez des espèces bactériennes dont les gènes codant de l'ARNr 16S sont identiques ou présentent peu de variations (Pei et al. 2010). Chez les SRP, la phylogénie de l'ARN ribosomal 16S est suffisante pour discriminer les genres *Pectobacterium* et *Dickeya* (Samson et al. 2005). Cette méthode est cependant trop peu résolutive pour discriminer les différentes

espèces au sein de ces deux genres, et plus largement pour discriminer les différents genres au sein de l'ordre des *Enterobacterales* (Adeolu et al. 2016).

Les gènes codant l'ARNr 16S sont également utilisés pour étudier à grande échelle la diversité et l'abondance relative des organismes dans différents environnements, ce que l'on appelle l'analyse metabarcoding par l'ARNr 16S. De plus, cette méthode permet d'identifier des organismes difficiles à cultiver en laboratoire. Bien que l'analyse metabarcoding par l'ARNr 16S permet de discriminer la diversité des genres bactériens associés à un environnement, elle est cependant peu résolutive pour caractériser finement les espèces présentes (Johnson et al. 2019). De plus, cette méthode ne permet pas toujours de détecter des espèces bactériennes présentes mais rares dans un environnement donné. Par exemple, le metabarcoding 16S ne permet pas de détecter les SRP directement à partir d'échantillons d'eau de rivière, alors que ces SRP sont isolées sur le milieu CVP dans les mêmes échantillons d'eau (Pédron et al. 2020).

L'analyse MLSA (Multi Locus Sequence Analysis)

La phylogénie d'un seul gène ne reflète pas nécessairement la phylogénie de l'organisme, car non seulement les gènes peuvent évoluer à des vitesses différentes mais, ils peuvent aussi être acquis par transfert horizontal (Coenye et al. 2005). Comme alternative, des analyses phylogénétiques basées sur des *loci* multiples ou MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) ont été développées (Figure 4). Cette analyse, comme l'indique son nom, est basée sur l'analyse de variations génétiques de plusieurs gènes. Les gènes choisis pour ce type d'analyse sont des gènes dits de ménage, qui assurent des fonctions essentielles à la survie de l'organisme, ce qui garantit leur présence dans les génomes. Les gènes de ménage choisis doivent comporter suffisamment de variations discriminantes et doivent être présents en une copie unique dans le génome.

Pour obtenir les séquences nucléotidiques ou protéiques nécessaires à l'analyse MLSA, les gènes cibles peuvent être amplifiés par PCR au moyen d'amorces spécifiques, puis séquencés. Les gènes ciblés peuvent alternativement être extraits du génome s'il est disponible dans les bases de données génomiques telles que GenBank (URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Sayers et al. 2022). Les séquences des gènes cibles sont ensuite alignées et concaténées pour construire un arbre MLSA en utilisant des méthodes d'inférence phylogénétiques telles que des méthodes de maximum de vraisemblance ou des méthodes de distance (Figure 4).

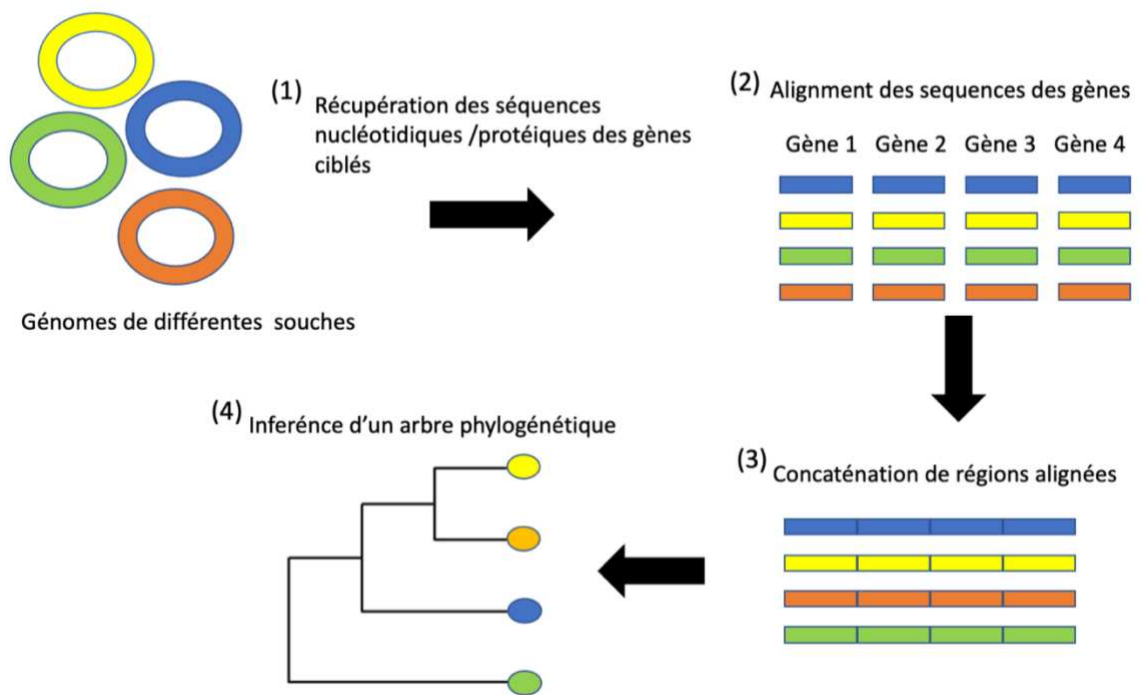


Figure 4: Schéma simplifié des étapes nécessaires à l'inférence d'un arbre MLSA.

Trois à sept gènes de ménage différents sont généralement utilisés lors d'une analyse MLSA. L'augmentation du nombre de gènes analysés permet d'augmenter la longueur de la séquence analysée et augmente donc le pouvoir discriminant de la méthode. Cette méthode permet donc de distinguer des espèces très proches. De nos jours, l'analyse MLSA est devenue une étape essentielle pour l'identification et la taxonomie chez les bactéries. Chez les SRP, l'analyse MLSA basée sur quatre gènes de ménages *gyrB*, *rpoB*, *atpD* et *infB*, réalisée sur plusieurs bactéries pathogènes de plantes de l'ordre des *Enterobacterales*, a permis de discriminer non seulement les différents genres bactériens, mais elle est suffisamment résolutive pour discriminer les différentes espèces (Brady et al. 2012). Toute une gamme de gènes de ménage a été utilisée pour étudier la diversité des espèces de SRP : *recA*, *gapA*, *atpD*, *gyrB*, *rpoB*, *fusA*, *rpoD*, *rpoS*, *glyA*, *purA*, *groEL*, *rplB*, *leuS*, *infB* et *secY* (Oulghazi, Cigna, et al. 2019; Parkinson et al. 2014). Parmi ces gènes, certains ont un pouvoir résolutif important. Par exemple, le gène de ménage *gapA*, qui code pour la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase, s'est avéré efficace et fiable pour discriminer toutes les espèces et sous-espèces des deux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* (Cigna et al. 2017). Chez le genre *Dickeya*, le gène de ménage *recA*, qui code pour la recombinaise A, s'est également avéré très efficace pour différencier les 3 espèces du 'complexe *D. zea*', *D. parazeae*, *D. oryzae* et *D. zea* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Van Gijsegem 2021).

Le coût du séquençage intégral des génomes bactériens ayant grandement diminué ces 10 dernières années, les génomes complets deviennent de plus en plus disponibles dans les bases de données. Cela permet de réaliser des analyses MLSA à partir des gènes communs à tous les génomes des organismes étudiés, également appelée MLSA du core génome. Ces analyses MLSA, basées sur un très grand nombre de gènes, sont très discriminantes et très robustes. De plus, la disponibilité des génomes complets permet de comparer les répertoires de gènes, d'identifier et de classer les espèces en fonction de leur contenu génétique. Ces approches génomiques ont, par exemple, été utilisées pour distinguer l'espèce *P. parvum* de l'espèce très proche *P. polaris* (Pasanen et al. 2020)

3. Taxonomie des SRP : historique et première classification

Les différentes espèces ou sous-espèces de bactéries phytopathogènes peuvent présenter des caractéristiques biologiques, pathologiques et de gamme d'hôte différentes. La taxonomie est importante, car elle vise à identifier, classer et nommer avec précision les organismes afin d'éviter toute confusion dans les études épidémiologiques et toxicologiques, garantissant ainsi des stratégies de lutte plus appropriées.

La taxonomie bactérienne a été sujette à de nombreux défis en raison des limites des méthodes d'identification et de caractérisation utilisées dans le passé. Toutefois, le développement des techniques de séquençage de moins en moins coûteuses et la disponibilité croissante de données génomiques ont permis de mettre au point des systèmes de classification plus robustes. Parmi ceux-ci figure une approche polyphasique, qui combine les résultats de divers tests phénotypiques et moléculaires, y compris l'analyse des séquences d'ADN, qui est appliquée aujourd'hui. Étant donné que ma thèse se focalise sur le genre *Pectobacterium*, et que ce genre a subi plusieurs révisions taxonomiques, j'ai choisi de présenter essentiellement les révisions taxonomiques du genre *Pectobacterium*.

Les premières observations de pourritures de végétaux d'origine non-fongique ont été faites en 1868 (Paulin et al. 2001). En 1901, Jones a décrit une nouvelle espèce, *Bacillus carotovorus*, responsable de la pourriture molle sur la carotte et d'autres plantes (Jones 1901). Un an plus tard, une nouvelle espèce, *Bacillus atrosepticus*, responsable de la jambe noire sur la pomme de terre, a été décrite (Van Hall 1902) (voir Figure 5).

En 1920, suivant les recommandations du comité de classification des bactéries de la société américaine des bactériologistes, il a été décidé de regrouper toutes les bactéries phytopathogènes dans une même tribu, *Erwinia*. Ainsi les bactéries pectinolytiques ont été renommées *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* et *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Winslow et al. 1920). La classification de Winslow et collaborateurs (1920) était basée sur des caractéristiques morphologiques et des structures cellulaires (production de spores, ciliature...) et des caractéristiques biochimiques (oxydation de l'azote ou de l'hydrogène...). Ainsi, les bactéries pectinolytiques ont été classées dans la tribu des *Erwinia* sur la base des caractéristiques suivantes : elles ont une forme de bacille, ne produisent pas de spores, ont une ciliature pérित्रiche, n'oxydent pas le carbone ou l'hydrogène et ne fixent pas l'azote, ne sont pas parasites, ne produisent pas de pigments rouges ou violets et sont des pathogènes des plantes (Figure 5).

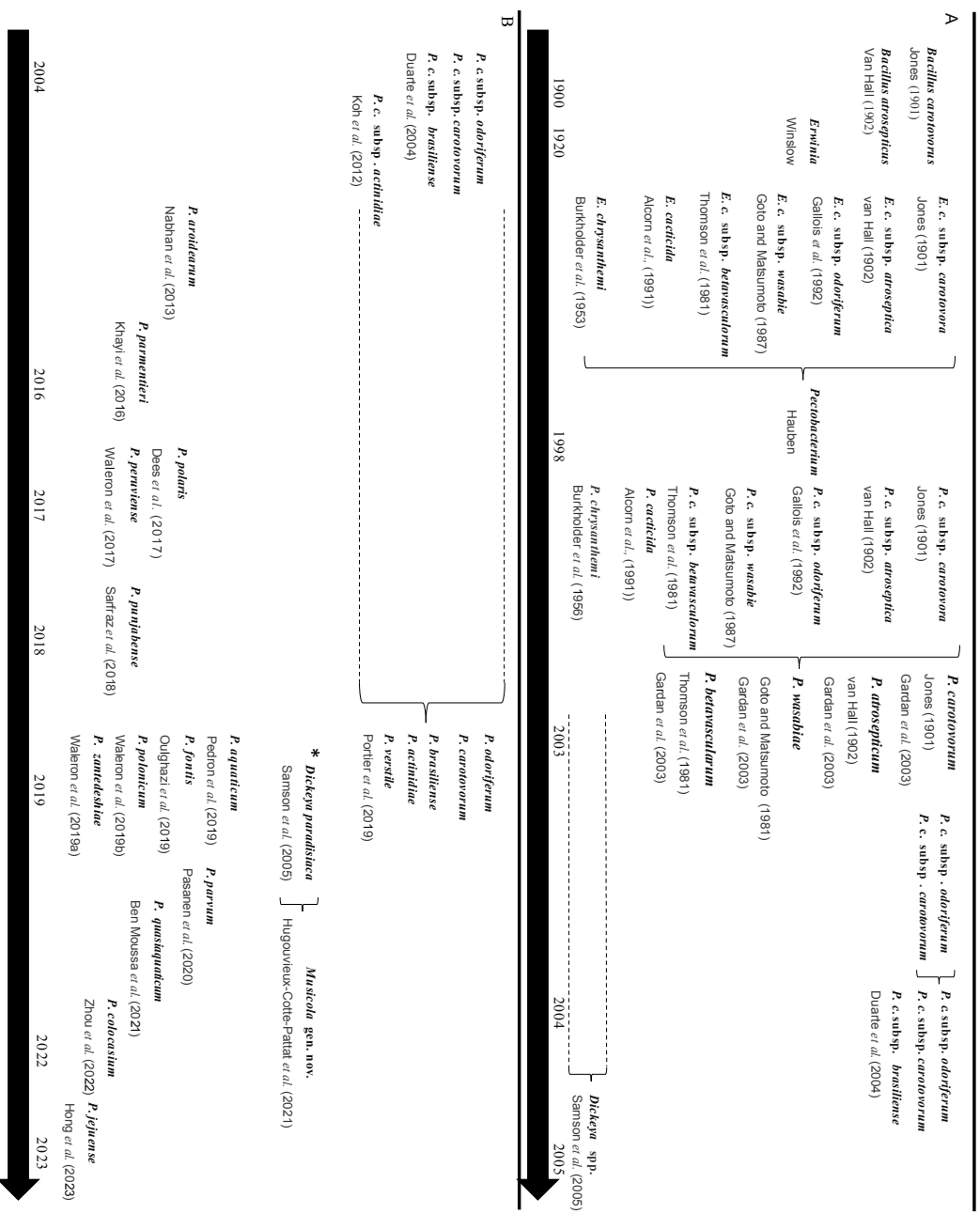


Figure 5: Évolution de la taxonomie de *Pectobacterium* spp.. (A) Première description et évolution de la taxonomie jusqu'à la description des genres *Pectobacterium* et *Dickeya*. (B) Évolution de la taxonomie depuis 2004 : clarification des espèces au sein du complexe *P. carotovorum*, description de nouvelles espèces et description du genre *Muscola*, à partir de l'ancienne espèce *D. paradisiaca*, marquée d'un astérisque (Modifiée d'après (Oulghazi *et al.*, 2021a)).

En 1953, une nouvelle espèce pectinolytique, *Erwinia chrysanthemi*, isolée de chrysanthèmes, a été décrite (Burkholder et al. 1953). Par la suite, plusieurs sous-espèces d'*E. carotovora* ont été décrites : *E. carotovora* subsp. *betavasculorum*, responsable de nécrose vasculaire sur la betterave (Thomson et al. 1981), *E. carotovora* subsp. *wasabiae*, responsable de la décoloration du rhizome du raifort japonais (wasabi) (Goto et Matsumoto 1987), *E. carotovora* subsp. *odorifera*, responsable de la pourriture sur endives (Gallois et al. 1992) et *E. cacticida*, responsable de la pourriture sur le cactus (Alcorn et al. 1991). Comme dans les études précédentes, toutes les espèces et sous-espèces mentionnées ci-dessus ont été classées sur la base de caractéristiques pathologiques, morphologiques, physiologiques et biochimiques. Dans le cas de la sous-espèce *E. carotovora* subsp. *odorifera* et de l'espèce *E. cacticidum*, l'hybridation ADN-ADN (DDH) a également été utilisée pour la classification des deux espèces.

En 1998, sur la base d'analyses d'ADN ribosomal S16 de plusieurs *Enterobacteriaceae* pathogènes des plantes, Hauben et ses collaborateurs ont regroupé les bactéries pectinolytiques pathogènes de plantes dans un seul genre *Pectobacterium* (Hauben et al. 1998). Comme l'avait précédemment suggéré Waldee (Waldee 1942).

En 2003, suivant les résultats de tests phénotypiques et moléculaires (biochimiques, sérologiques, phylogénie de l'ARN ribosomal 16S et la méthode DDH), Gardan et ses collaborateurs ont élevé trois des cinq sous-espèces de *P. carotovorum* (*P. carotovora* subsp. *atrosepticum*, *P. carotovora* subsp. *betavasculorum*, *P. carotovora* subsp. *wasabiae*) au rang d'espèce (Gardan et al. 2003). Ainsi, seules deux sous-espèces ont été maintenues au sein de l'espèce *P. carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* et *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*. Deux ans plus tard, Samson et ses collaborateurs (2005) ont décrit un nouveau genre appelé *Dickeya* qui recouvre l'ancienne espèce *E. chrysanthemi*. A cette occasion, 6 espèces de *Dickeya*, correspondant aux anciens pathovars d'*E. chrysanthemi*, ont été décrites (Samson et al. 2005).

Par la suite, deux nouvelles sous-espèces de *P. carotovorum* ont été décrites : *P. carotovora* subsp. *brasiliense*, responsable de la jambe noire sur pomme de terre isolée au Brésil (Duarte et al. 2004), *P. carotovora* subsp. *actinidiae*, responsable des symptômes de type chancre sur les kiwis jaunes (Koh et al. 2012)

En raison des limites des méthodes de classification utilisées dans le passé, de nombreuses souches de *Pectobacterium*, dont les caractéristiques phénotypiques ou moléculaires ne

correspondaient pas à celles des espèces ou sous-espèces de *Pectobacterium* précédemment décrites, ont été classées comme souches atypiques de *P. carotovorum* ou comme *Pectobacterium* spp. Dans les années 2010-2020, la disponibilité des génomes et l'adoption d'une approche polyphasique combinant les résultats des tests phénotypiques et moléculaires pour la classification des SRP, a permis la description de plusieurs nouvelles espèces à partir des souches précédemment mal assignées à *P. carotovorum*, notamment *P. aroidearum* (Nabhan et al. 2013), *P. polaris* (Dees et al. 2017), *P. peruvienne* (Waleron et al. 2018). De même, une réévaluation taxonomique de souches de *P. wasabiae*, isolées de pomme de terre par rapport aux souches initialement isolées de raifort japonais, a révélé que les isolats de pomme de terre formaient une nouvelle espèce distincte, *P. parmentieri*, proche de l'espèce *P. wasabiae* (Khayati et al. 2016). Une nouvelle espèce, *P. punjabense*, a également été décrite à partir de souches isolées de symptômes de jambe noire au Pakistan (Sarfraz et al. 2018).

En 2019, suite à une réévaluation taxonomique des sous-espèces de *P. carotovorum*, Portier et ses collaborateurs ont élevé toutes les sous-espèces de *P. carotovorum* (*P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, *P. carotovorum* subsp. *actinidiae*) au rang d'espèce. Cette étude a également conduit à la description d'une nouvelle espèce *P. versatile*, dont les souches ont longtemps été confondues avec celles de l'espèce *P. carotovorum* (Portier et al. 2019). De même, une nouvelle espèce, *P. zantedeshiae*, précédemment confondue avec l'espèce *P. atroscopicum*, a été décrite à partir de souches isolées d'Arum (*Zantedeschia aethiopica*) (Waleron, Misztak, Waleron, Franczuk, et al. 2019). La même année, trois nouvelles espèces isolées de différentes sources d'eau ont été décrites : *P. fontis*, décrite à partir d'une seule souche isolée d'une cascade en Malaisie (Oulghazi, Cigna, et al. 2019), *P. aquaticum* isolée d'eau douce en France (Pédron et al. 2019) et *P. polonicum* isolée des eaux souterraines d'un champ de légumes en Pologne (Waleron, Misztak, Waleron, Jonca, et al. 2019).

Enfin, quatre nouvelles espèces ont été décrites : *P. parvum*, espèce proche et précédemment confondue avec l'espèce *P. polaris*, a été décrite à partir de souches faiblement virulentes (Pasanen et al. 2020), *P. quasiaquaticum*, isolée d'eau douce en France, très proche de l'espèce *P. aquaticum* (Ben Moussa et al. 2021), *P. colocasium*, responsable de la pourriture molle sur taro (*Colocasia esculenta*) (Zhou et al. 2022) et *Pectobacterium jejuense* isolée de concombre en Corée du sud (Hong et al. 2023).

Un nouveau genre, *Musicola*, correspondant à l'ancienne espèce *Dickeya paradisiaca*, a également été décrit (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2021).

À l'heure actuelle, 36 espèces de SRP sont décrites et regroupées dans trois genres différents : *Pectobacterium* avec 22 espèces, *Dickeya* avec 12 espèces (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2023) et *Musicola* avec 2 espèces (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2021)

4. Plantes hôtes des SRP

Les genres *Pectobacterium* et *Dickeya* peuvent collectivement causer des infections dans 50% des plantes angiospermes, infectant à la fois des dicotylédones et des monocotylédones (21 et 16 familles de plantes, respectivement). Cependant, ces deux genres ne possèdent pas un spectre d'hôte complètement superposé. Seules 6 familles de plantes dicotylédones et 4 familles de plantes monocotylédones ont été signalées comme étant des hôtes communs aux deux genres (Ma et al. 2007). Les genres *Pectobacterium* et *Dickeya* ont tous les deux été décrits comme des pathogènes à large gamme d'hôte, d'une part parce qu'ils contiennent des souches isolées de différentes plantes, et d'autre part parce qu'une seule souche peut, en conditions expérimentales de laboratoire, infecter plusieurs espèces botaniques (Ma et al. 2007). Lors de l'étude de Ma et de ses collaborateurs, seules deux espèces de *Pectobacterium* avaient une gamme d'hôte restreinte : *P. atrosepticum*, isolé presque exclusivement sur la pomme de terre, et *P. betavasculorum*, isolé presque exclusivement sur la betterave (Gardan et al. 2003). Contrairement à *Dickeya* et *Pectobacterium*, le spectre d'hôte du genre *Musicola* est limité au bananier (*Musa paradisiaca*) dans la région tropicale ou sub-tropicale (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2021).

Suite à la description des nouvelles espèces de *Pectobacterium* et de *Dickeya* présentées dans la section précédente, il est désormais clair que la gamme d'hôte varie de manière importante selon les espèces de SRP. Une étude rétrospective des souches assignées au genre *Pectobacterium* dans la collection française de bactéries associées aux plantes (collection CIRM-CFBP qui héberge des souches de SRP depuis 1944, montre que la gamme d'hôte varie considérablement selon les espèces (Portier et al. 2020). Ainsi, *P. versatile*, récemment décrite, est une espèce à large spectre d'hôte très représentée au sein de cette collection avec 12 plantes hôtes différentes représentant 9 familles (Portier et al. 2020) (Table 1). En comparaison, l'espèce *P. carotovorum*, avec laquelle *P. versatile* a longtemps été confondue, n'est représentée au sein de cette collection que par des souches isolées à partir de 6 plantes hôtes représentant cinq familles (Portier et al. 2020). *P. versatile* semble donc avoir un spectre d'hôte plus large que *P. carotovorum*.

Une autre espèce de *Pectobacterium* à large spectre d'hôtes est *P. brasiliense*. Les souches déposées au CIRM-CFBP ont été isolées à partir de 7 plantes hôtes appartenant chacune à des familles différentes (Portier et al. 2020). Par ailleurs, il a été rapporté que *P. brasiliense* a été isolé à partir de 5 autres familles de plantes hôtes (*Brassicaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cactaceae*, *Nepenthaceae*), soit un total de 12 familles (Oulghazi et al. 2021).

Les espèces *P. odoriferum* et *P. aroidearum*, ont toutes les deux été isolées à partir de 6 familles de plantes différentes (Charkowski 2018; Portier et al. 2020). L'espèce *P. aroidearum* a une préférence pour les plantes monocotylédones (Nabhan et al. 2013).

Les autres espèces de *Pectobacterium* ont une gamme d'hôtes plus limitée : *P. atrosepticum*, *P. parmentieri*, *P. peruviense*, *P. polaris*, *P. punjabense* et *P. parvum* ont été isolées principalement à partir de pommes de terre (Charkowski 2018; Portier et al. 2020). D'autres espèces ont été isolées presque exclusivement à partir d'une plante hôte autre que la pomme de terre : *P. wasabiae*, isolée de raifort japonais (Gardan et al. 2003), *P. cacticida*, isolée du cactus (Alcorn et al. 1991), *P. actinidiae*, isolée du kiwi (Koh et al. 2012), *P. zantedeshiae*, isolée de d'Arum (Waleron, Misztak, Waleron, Franczuk, et al. 2019), *P. betavascularum* isolée principalement de betteraves (Gardan et al. 2003) et *P. colocasium* isolée du taro (Zhou et al. 2022).

Quatre espèces de *Pectobacterium* ont été isolées initialement d'eau douce : *P. aquaticum* et *P. quasiquaticum*, isolées d'eau douce en France, *P. fontis*, isolée d'une cascade en Malaisie et *P. polonicum*, isolée d'eaux souterraines d'un champ de légumes en Pologne (Ben Moussa et al. 2021; Oulghazi, Cigna, et al. 2019; Pédrón et al. 2019; Waleron, Misztak, Waleron, Jonca, et al. 2019). Si *P. polonicum* a également été récemment isolée de pommes de terre symptomatiques en Chine (Han et al. 2023), il n'existe pas actuellement de plante hôte connue pour les 3 autres espèces. De plus, concernant l'espèce *P. fontis*, la seule souche identifiée est la souche type, aucune autre souche appartenant à cette espèce n'est identifiée pour l'instant.

Tableau 1 : Site et pays d'isolement pour chacune des espèces de *Pectobacterium* déposées à la collection CIRM-CFBP (Portier et al. 2020)

Species	nb of strains	Isolated from (number of strains)	Country of isolation (nb of strains)
<i>P. versatile</i> *	72	<i>Solanum tuberosum</i> (42) <i>Cyclamen</i> sp. (4) <i>Chrysanthemum</i> sp. (3) <i>Cichorium intybus</i> (3) <i>Iris</i> (3) <i>Primula</i> sp. (3) <i>Allium porrum</i> (2) <i>Brassica oleracea</i> (2) <i>Cynara scolymus</i> L. (1) <i>Daucus carota</i> (1) <i>Hyacinthus orientalis</i>, (1) Rhizosphere of <i>Solanum dulcamara</i> (1) fresh water (6)	Algeria (3) Canada (3) Finland (1) France (35) La Réunion island (France) (1) Morocco (3) Netherland (8) Spain (1) Syria (6) UK (7) USA (4)
<i>P. carotovorum</i>	38	<i>Aloe arborescens</i> (1) <i>Apium graveolens</i> (1) <i>Brassica oleracea</i> (1) <i>Capsicum annuum</i> (1) <i>Cyclamen</i> sp. (5) <i>Solanum tuberosum</i> (26) fresh water (3)	Algeria (3) Canada (4) Denmark (1) France (5) Greece (2) Spain (2) Syria (11) USA (7) Yugoslavia (3)
<i>P. brasiliense</i>	34	<i>Carica papaya</i> (1) <i>Chrysanthemum morifolium</i> (2) <i>Cucurbita pepo</i> (1) <i>Cyclamen</i> sp. (1) <i>Gossypium</i> sp. (1) <i>Musa</i> sp. (1) <i>Solanum tuberosum</i> (23) Rhizosphere of <i>Solanum dulcamara</i> (1) Fresch water (2) Unknown (1)	Algeria (7) Brazil (13) France (3) Italy (1) La Réunion island (France) (1) Martinique island (France) (1) Spain (2) Syria(3) USA (2) unknown (1)
<i>P. atrosepticum</i>	30	<i>Lycopersicon esculentum</i> (2)	Algeria (6)

		<i>Solanum tuberosum</i> (27) soil (1)	Canada (1) France (11) Italy (1) Syria (1) UK (7) USA (3)
<i>P. betavascularum</i>	19	<i>Beta vulgaris</i> (15) <i>Helianthus annuus</i> (2) <i>Opuntia phaeacantha</i> (1) <i>Solanum tuberosum</i> (1)	France (9) Mexico (1) Romania (1) USA (7) Unknown (1)
<i>P. odoriferum</i>	19	<i>Allium porrum</i> (3) <i>Apium graveolens</i> (1) <i>Beta vulgaris</i> (1) <i>Cichorium intybus</i> (11) <i>Hyacinthus</i> sp. (2) fresh water (1)	France (17) Unknown (2)
<i>P. aroidearum</i>	10	<i>Dieffenbachia</i> sp. (1) <i>Lycopersicon esculentum</i> (1) <i>Musa</i> sp. (1) <i>Nicotiana tabacum</i> (1) <i>Philodendron floridi</i> (1) <i>Zantedeschiae</i> (3) fresh water (2)	France (5) Guadeloupe island (France) (2) South Africa (1) USA (2)
<i>P. aquaticum</i>	8	fresh water (8)	France (8)
<i>P. cacticida</i>	6	<i>Acanthocereus pentagonus</i> (1) <i>Carnegiea gigantea</i> (3) <i>Lemaireocereus thurberi</i> (1) <i>Opuntia fulgida</i> (1)	USA (6)
<i>P. parmentieri</i>	5	<i>Solanum tuberosum</i> (5)	UK (2) Netherlands (1) France (1) Finland (1)
<i>P. wasabiae</i>	5	<i>Eutrema wasabi</i> (syn <i>Eutrema japonicum</i>) (5)	Japan (5)
<i>P. parvum</i>	4	<i>Solanum tuberosum</i> (3) <i>Helianthus annuus</i> (1)	Yugoslavia (1) Netherlands (1)

			Finland (2)
<i>P. sp.</i>	4	<i>Solanum tuberosum</i> (3) fresh water (1)	Netherland (1) USA (2) France (1)
<i>P. peruvienne</i>	3	<i>Solanum tuberosum</i> (1) fresh water (2)	France (2) Peru (1)
<i>P. zantedeschiae</i>	3	<i>Zantedeschia sp</i> (2) Arum sp. (1)	France (3)
<i>P. polaris</i>	2	<i>Solanum tuberosum</i> (2)	Syria (1) Norway (1)
<i>P. actinidiae</i>	1	<i>Solanum tuberosum</i> (1)	Syria (1)
<i>P. fontis</i>	1	fresh water (1)	Malaysia (1)
<i>P. punjabense</i>	1	<i>Solanum tuberosum</i> (1)	Pakistan (1)

* *P. carotovorum* et *P. versatile* étant souvent confondus, les nouvelles plantes hôtes indiquées en gras correspondent à des plantes hôte non décrites comme plante hôte de *P. carotovorum* par Charkowski (2018). Le nombre de souches isolées de chaque hôte ou pays est indiqué entre parenthèses.

5. Épidémiologie des SRP sur la pomme de terre

Dans la suite de cette introduction, je me limiterai à la description de l'épidémiologie des SRP sur la pomme de terre, car c'est l'hôte d'importance économique majeure affecté par les SRP.

En raison des différentes modifications apportées à la taxonomie des SRP et des limitations des méthodes d'isolement et d'identification antérieurement utilisées, il n'est pas possible d'identifier de manière précise les différentes espèces de SRP responsables des foyers de maladie historiquement décrits. Par exemple, l'espèce anciennement appelée *P. carotovora subsp. carotovora* dans les articles antérieurs aux années 2000 correspond en fait à un complexe d'espèces regroupant toutes les espèces appartenant au genre *Pectobacterium*, à l'exception de *P. atrosepticum*. Par soucis de cohérence avec la taxonomie actuelle, les souches appelées *P. carotovora subsp. carotovora* dans les articles anciens seront citées dans la suite de cette introduction comme appartenant au genre *Pectobacterium*.

Dans la plupart des pays européens, la jambe noire est actuellement la principale cause de perte de récolte et de déclassement des cultures de pommes de terre de semences destinées à la certification (Toth et al. 2011). Les espèces de SRP responsables des foyers de pourriture molle des tubercules en conditions de stockage et de jambe noire dans les champs de pommes de terre ont varié au fil du temps et selon le climat dans les différents pays. Les principaux agents responsables de foyers de pourriture molle et jambe noire sont *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. brasiliense*, *D. solani* et *D. dianthicola* (de Werra et al. 2021; van der Wolf et al. 2017).

Depuis plus d'un siècle, les espèces communément associées dans le monde aux foyers de jambe noire sur la pomme de terre en champ ou aux pourritures molles sur tubercules appartiennent principalement au genre *Pectobacterium* (Charkowski 2018). L'espèce *P. atrosepticum* est particulièrement associée à la maladie de jambe noire en région tempérée (Pérombelon 2002). Les espèces du genre *Dickeya*, originellement isolées de régions tropicales et sub-tropicales sur plantes à fleurs (Pérombelon 1992), ont également été décrites sur des cultures de pommes de terre en Europe et en Israël à partir des années 1980 (Cazelles et Schwaerzel 1992; Janse 1988; Lumb et al. 1986). Parmi les *Dickeya*, plusieurs analyses de collections bactériennes ont montré que *D. dianthicola* était l'espèce de *Dickeya* la plus fréquemment isolée de la pomme de terre en Europe (Pédron et al. 2021; Sławiak et al. 2009; Toth et al. 2011)

A partir des années 2000, l'espèce *D. solani* devient prédominante et commence à causer des dégâts importants dans différents pays européens et en Israël (Toth et al. 2011; van der Wolf et al. 2017). Les autres espèces de *Dickeya*, comme *D. dadantii*, *D. chrysanthemi* et *D. dieffenbachiae*, sont rarement isolées sur pomme de terre (Pédron et al. 2021; Sławiak et al. 2009). Il est estimé que l'émergence de *D. solani* dans les pays européens est probablement due à la hausse des températures suite au réchauffement climatique (de Werra et al. 2021; van der Wolf et al. 2017). Par exemple en Finlande, une augmentation de l'abondance de *Dickeya* a été observée lors des années où l'été était chaud et sec (Degefu et al. 2013). Ceci a été également constaté en Serbie (Marković et al. 2021). Malgré la circulation des *Dickeya* en Europe, en Écosse, elles sont très rarement isolées de la pomme de terre. Les espèces de *Pectobacterium* demeurent les plus fréquemment isolées de la pomme de terre (Zaczek-Moczydłowska et al. 2019). Cette exception pourrait être due à la réglementation stricte des semences en Écosse, couplée à l'absence d'importation de semences (le Royaume Uni produit ses propres semences), ce qui joue également un rôle pour limiter l'introduction de *Dickeya* (Zaczek-Moczydłowska et al. 2019).

Étonnamment, comparé aux autres pays d'Europe, en Suisse, pays importateur de semences, le genre *Dickeya* était présent depuis 1986 (Cazelles et Schwaerzel 1992; Dupuis et al. 2010). Les prospections réalisées entre 1986 et 2012 ont montré que l'abondance relative du genre *Dickeya* était généralement plus de 50%, suivie par d'autres espèces non caractérisées appartenant au genre *Pectobacterium* et l'espèce *P. atrosepticum* (Cazelles et Schwaerzel 1992; Dupuis et al. 2010; van der Wolf et al. 2021).

À partir de 2010, l'espèce *P. brasiliense* a émergé et est devenue rapidement prédominante dans plusieurs pays d'Europe, d'Afrique, en Nouvelle-Zélande et aux États-Unis (Marković et al. 2021; van der Merwe et al. 2010; Nunes et al. 2014; Onkendi et al. 2014; Panda et al. 2012; van der Wolf et al. 2017). Dans les pays d'Afrique méditerranéenne comme l'Algérie, la Tunisie et le Maroc, *Pectobacterium* est toujours le principal agent de la pourriture molle sur tubercules en conservation et de la jambe noire en champs de pommes de terre (Hibar et al. 2007; Terta et al. 2010; Yahiaoui-Zaidi et al. 2003). L'analyse de la diversité des SRP isolées de pommes de terre de semences symptomatiques et asymptomatiques en Algérie entre 1994 et 2000 a révélé une prédominance du genre *Pectobacterium* (99 % des isolats) (Yahiaoui-Zaidi et al. 2003). En 2012 et 2014, l'espèce *P. brasiliense* a été observée au Maroc et en Algérie respectivement, mais avec une faible occurrence (Faquihi et al. 2015; Naas et al. 2018). Plus récemment, des prospections menées dans les champs de pomme de terre dans différentes

régions au Maroc entre 2017 et 2018 ont révélé que l'espèce *P. brasiliense* est désormais l'espèce dominante dans deux régions voisines, Fès et Meknès, où elle représente respectivement 94 % et 100 % des infections. Une troisième région située sur le littoral présente néanmoins une population de SRP beaucoup plus diversifiée : *P. versatile* (39 %), *D. dianthicola* (34 %), *P. brasiliense* (17 %) et *P. polaris* (10 %). Cette grande diversité est statistiquement associée à plusieurs facteurs, comme l'utilisation d'eau de surface pour l'irrigation, la localisation géographique et l'utilisation ou non de semences importées (Oulghazi et al. 2020). Ce dernier facteur joue probablement un rôle prépondérant pour expliquer la diversité de la population de SRP dans la région située sur le littoral où la majorité des semences de tubercules de terre sont importées. La large répartition géographique de *P. brasiliense* et son abondance montrent sa grande capacité d'adaptation à différentes conditions environnementales. Ceci pourrait être dû à la grande diversité génétique observée au sein de cette espèce ainsi qu'à sa forte virulence comparée à d'autres espèces de *Pectobacterium*, et son large spectre d'hôte qui pourrait lui faciliter l'adaptation dans différentes conditions en parasitant des plantes alternatives (Oulghazi et al. 2020, 2021). Toutefois, il est possible que les souches virulentes de *P. brasiliense*, isolées lors des épidémies dans les champs de pomme de terre, représentent un seul clone épidémique. Une analyse génomique comparative de 87 génomes de *P. brasiliense* a révélé que, malgré la grande diversité observée au sein de cette espèce, les souches de *P. brasiliense*, qui sont virulentes sur la pomme de terre, forment un clade distinct et très homogène (valeurs ANI $\geq 99,96$) comparé aux souches avirulentes de *P. brasiliense* (Jonkheer et al. 2021).

Il est évident que les espèces de SRP responsables des foyers épidémiques dans les champs varient dans le temps et dans les différentes régions géographiques et climatiques. Toutefois, les déterminants de cette dynamique et de l'émergence de souches SRP virulentes ne sont pas clairs. Les efforts visant à détecter et à caractériser les SRP dans les champs sont essentiels pour suivre et étudier cette dynamique. En outre, une meilleure compréhension de l'écologie des SRP et de leurs réponses aux différentes conditions environnementales, en particulier au vu de l'augmentation des températures mondiales due au réchauffement climatique, pourrait aider à anticiper et à contrôler les futures épidémies.

6. Les facteurs de virulence

Les pathogènes humains, animaux ou végétaux ont besoin d'un ensemble d'armes qui leur permettent de pénétrer, de survivre, de coloniser et d'échapper aux défenses de l'organisme hôte. Chez les bactéries pathogènes de plantes, la virulence d'une souche donnée se traduit par la gravité des dégâts qu'elle peut causer. L'étude des facteurs responsables de la virulence est donc essentielle pour comprendre les interactions bactérie-hôte et développer des méthodes de lutte appropriées.

6.1. Les systèmes de sécrétion

Chez les bactéries Gram négatives, les systèmes de sécrétion permet l'export de facteurs du milieu interne à travers les deux membranes vers le milieu externe. Les SRP possèdent les six systèmes de sécrétion décrits chez les *Enterobacterales* (I, II, III, IV, V et VI). Chez les SRP, les systèmes de sécrétions IV et VI sont impliqués respectivement dans l'adhésion et dans la compétition bactérienne, alors que le rôle du système de sécrétion V reste encore mal appréhendé (Charkowski et al. 2012). Dans la sous-section suivante, je me limiterai à décrire le rôle des systèmes de sécrétion de type I, II et III dans la virulence des SRP sur les plantes.

6.1.1. Le système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I (SST1) présente une structure simple composé de trois protéines : une protéine ABC et une protéine appelée MFP (Membrane Fusion Protein), toutes deux situées au niveau de la membrane interne, et une troisième protéine enchâssée dans la membrane externe appelée OMF (Outer Membrane Factor). Une récente analyse génomique comparative montre que les bactéries du genre *Pectobacterium* peuvent avoir jusqu'à quatre SST1, dont chacun a une fonction différente (Zhou et al. 2022) : Le SST1 *lapBCDE*, permet de sécréter des protéines de type adhésines, qui pourraient faciliter l'attachement aux cellules végétales, le SST1 *hasDEF* est impliqué dans l'absorption de fer, le SST1 *lssBEF* permet d'exporter des bactériocines et le système SST1 *prtDEF* permet la sécrétion de métalloprotéases. Seul les SST1 *lss* et *prt* sont présents chez toutes les espèces de *Pectobacterium* (Zhou et al. 2022).

Il a été démontré que le système SST1 *prt* joue un rôle dans le pouvoir pathogène des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* via la sécrétion de métalloprotéases (Hommais et al. 2008; Marits et al. 1999). Les métalloprotéases sont des protéines caractérisées par la présence d'un ion métallique au niveau de leur site actif, qui participe à la catalyse de la dégradation des liaisons

peptidiques des protéines. Ces métalloprotéases pourraient catalyser la dégradation des protéines structurales de la paroi cellulaire végétale ou modifier la structure des enzymes secrétées par les SRP (Charkowski et al. 2012). L'importance des protéases pour la pathogénicité sur les plantes varie selon l'espèce bactérienne. Par exemple, chez les *Pseudomonas* 'macergènes', la capacité à macérer les tissus végétaux est plus fortement corrélée à la production des protéases qu'à celle des enzymes pectinolytiques (Sands et Hankin 1975). Chez les bactéries appartenant au genre *Dickeya*, le rôle des métalloprotéases dans la virulence n'est pas clair. Il a été montré que la mutation d'un ou de tous les gènes codant pour les trois métalloprotéases (PrtA, PrtB, PrtC) secrétées par le SST1 *prt* n'avait pas d'effet sur la virulence chez les plantes (Dahler et al. 1990). Une quatrième métalloprotéase PrtG a été détectée par la suite, mais son rôle dans la virulence n'a pas été étudié (Ghigo et Wandersman 1992). Cependant, une étude plus récente montre qu'une souche du genre *Dickeya* mutée au niveau du gène *prtE* était moins virulente sur plante que la souche sauvage (Hommais et al. 2008). Chez les bactéries appartenant au genre *Pectobacterium* peu de métalloprotéases ont été identifiées, mais leur rôle dans la virulence a été mis en évidence. Ainsi, le gène *prt1* est fortement exprimé chez *Pectobacterium sp.* EC14 lors de l'infection *in planta* et une mutation dans ce gène entraîne une réduction significative de la virulence des souches mutantes sur tubercules de pomme de terre (Kyöstiö 1990; Kyöstiö et al. 1991). De même, la métalloprotéase PrtW détectée chez *Pectobacterium sp.* SCC3193, est un facteur de virulence puisque qu'une mutation réduit la virulence de 40% sur pomme de terre comparée à la souche sauvage (Marits et al. 1999).

6.1.2. Le système de sécrétion de type II

Le système de sécrétion de type II (SST2) est un système de sécrétion des bactéries Gram négatives qui permet l'export de protéines se trouvant dans le périplasme vers le milieu extérieur. Ce système de sécrétion n'est pas universel chez les bactéries Gram négatives, mais limité à certains genres du phylum *Proteobacteria* (Cianciotto et White 2017). Le SST2 est impliqué dans la survie et l'adaptation des bactéries à différents écosystèmes, dans différents hôtes (humain, animal et végétal) et dans l'environnement (eau, sol). Ce système est composé de 12 protéines conservées qui sont essentielles à son fonctionnement (Cianciotto et White 2017). Le SST2 est présent chez plusieurs pathogènes de plantes tels que *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae* ou *xylella fastidiosa* (Cianciotto et White 2017). Chez les SRP, le SST2, appelé *out*, joue un rôle central dans le pouvoir pathogène puisqu'une mutation dans un gène conservé codant le SST2 rend les souches

non pathogènes (Reverchon et Nasser 2013). Certaines souches de *Dickeya*, possèdent un second SST2 fonctionnel appelé *stt* qui secrète une pectinase PnlH (Ferrandez et Condemine 2008). Le SST2 *out* permet la sécrétion de plus de 15 protéines, notamment des pectinases et des cellulases qui sont les facteurs principaux de la virulence des SRP, car elles forment un cocktail enzymatique permettant la dégradation de la paroi des cellules végétales. Le SST2 *out* permet également la sécrétion plusieurs autres protéines impliquées dans la virulence, telles que NipE, une toxine qui induit la mort cellulaire chez les plantes et SvX, un homologue de la protéine d'avirulence AvrL de *Xanthomonas campestris* (Condemine et Le Derout 2022).

6.1.3. Le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type 3 (SST3) est le principal déterminant de la virulence chez de nombreux pathogènes végétaux et animaux à Gram négatif. Le SST3 a une structure en forme de seringue avec plus de 20 composants codés par un cluster de gènes appelés chez les pathogènes de plantes le cluster *hrp* (Hyper Sensitivity and Pathogenicity). Le SST3 injecte des protéines appelés effecteurs dans les cellules de l'hôte pour manipuler les mécanismes de défense de l'hôte ou pour obtenir des nutriments, favorisant ainsi la croissance du pathogène et le développement de la maladie (Kim et al. 2009). Une mutation de ce système de sécrétion rend de nombreuses espèces (*Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*) non pathogènes et incapables de déclencher une réponse hypersensible sur tabac (HR) (Barny 1990; Gürlebeck et al. 2006; Mohr et al. 2008). Ce système en revanche n'est pas essentiel au pouvoir pathogène chez les SRP. Les souches de *Pectobacterium* dont le SST3 est défectueux sont toujours capables de provoquer des pourritures sur les tubercules et les tiges de pomme de terre. Elles perdent cependant leur capacité à induire une réaction hypersensible, à provoquer la mort cellulaire et la macération des feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*) (Kim et al. 2009, 2011). En outre, plusieurs espèces de *Pectobacterium*, telles que *P. parmentieri* et *P. wazabiae*, sont naturellement déficientes en SST3 (Kim et al. 2009; Zhou et al. 2022).

6.2. Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire végétale

Le déterminant de virulence majeur des SRP est leur capacité à secréter via le SST2 une grande quantité d'enzymes qui dégradent les composants des parois cellulaires végétales, regroupées sous l'acronyme PCWDE (Plant Cell Wall Degrading Enzymes). Les PCWDE regroupent des pectinases, des cellulases (Cel) des protéases (Prt) et des rhamnogalacturonases lyases (Rhi). Les pectinases sont des enzymes qui dégradent la pectine et ses dérivés. Toutes ces enzymes

jouent collectivement un rôle central dans la macération des tissus végétaux. En fonction de leurs substrats pectinolytiques préférés et de leurs mécanismes d'action, les pectinases sont classées en pectine lyases (Pnl), pectine méthylesterases (Pem), endo- et exo- pectate lyases (Pel), polygalacturonases (Pel), exo-polygalacturonases (Peh) et oligogalacturonide lyases (Ogl).

Les différentes espèces de *Dickeya* et de *Pectobacterium* possèdent un nombre variable de pectinases, dont certaines sont spécifiques à un groupe de bactéries. Par exemple, les gènes *pelA*, *pelD*, *pelE* sont présents chez les *Dickeya*, alors que les gènes *pel* et *pnl* sont présents uniquement chez les *Pectobacterium*. Étant donné la redondance de ces activités de dégradation, la mutation d'une seule enzyme de dégradation n'entraîne pas de perte de capacité de macération des tissus végétaux (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 1996; Van Gijsegem, Hugouvieux-Cotte-Pattat, et al. 2021). Comme nous l'avons vu plus haut, seul un blocage général du SST2 empêche la sécrétion de la majorité de ces enzymes de dégradation des parois et entraîne une perte de virulence.

6.3. L'assimilation du fer

Le fer est un élément indispensable à la survie des cellules. Il est le catalyseur de nombreuses réactions biologiques d'oxydoréduction. Le fer est le quatrième élément le plus abondant dans la croûte terrestre, mais il n'est pas biodisponible pour les organismes dans les conditions aérobies, en raison de l'oxydation du fer ferrique (Fe^{3+} , forme oxydée) en hydroxyde ferrique ($\text{FeO}(\text{OH})$), qui est peu soluble à pH neutre. Dans les interactions plantes-bactéries, la plante hôte est la principale source de fer pour les bactéries et plantes et bactéries sont en compétition constante pour son acquisition (Liu et al. 2021). Les mécanismes d'acquisition du fer et leurs rôles dans le pouvoir pathogène ont été principalement étudiés chez la souche modèle *Dickeya dadantii* 3937. Durant le processus d'invasion de la plante, la souche *Dickeya dadantii* 3937 se trouve dans différentes conditions où la disponibilité en fer et la production d'espèces réactives de l'oxygène par la plante sont des facteurs limitants sa propagation (Boughammoura et al. 2007). Pour surmonter ces limitations, *Dickeya dadantii* 3937 a recours à des systèmes d'assimilation du fer à haute affinité médiés par des molécules à faible poids moléculaire appelées sidérophores. *Dickeya dadantii* 3937 est capable de produire deux sidérophores, la chrysobactine et l'achromobactine. Ces deux sidérophores sont nécessaires à la progression des symptômes de macération dans la plante l'hôte (Franza et Expert 2013). Selon Gorshkov et collaborateurs (2021), les bactéries du genre *Pectobacterium*, contrairement à *Dickeya*, ne produisent pas de chrysobactine ou d'achromobactine, mais un autre sidérophore,

l'entérobactine, qui joue un rôle dans la résistance au stress, y compris le stress oxydatif, et favorise également la virulence chez les plantes dont l'immunité a été induite (Gorshkov et al. 2021). Les SRP peuvent internaliser le complexe fer-sidérophore exogène à l'aide de récepteurs spécifiques de la membrane externe appelés récepteurs dépendants de TonB (TBDR), du complexe TonB (tonB-exbD-exbB) et d'une perméase ABC (Charkowski *et al.*, 2012). Dans la plante, le fer peut également être séquestré dans des protéines liées au fer (hème ou ferritine), localisées dans les plastes (Liu et al. 2021). Chez les bactéries Gram négatives, une protéine appelée hémophore HasA, sécrétée via le SST1 *has*, capture l'hème et le transmet à un TBDR spécifique appelé HasR. Une fois transporté dans le périplasme, l'hème est acheminé dans le cytoplasme par le transporteur ABC *hasDEF* (Cescau et al. 2007). Le SST1 *has* est présent chez certaines espèces de *Pectobacterium* (Zhou et al. 2022). Des études du transcriptome de *Dickeya dadantii* 3937, suite à l'infection de différentes plantes (feuilles d'épinard et *Saintpaulia ionantha*), ont révélé l'induction des gènes impliqués dans le transport de fer, notamment les gènes *hmuSTU*, impliqués dans le transport de l'hémine (une porphyrine, contenant du fer et du chlore), suggérant leurs rôles dans l'acquisition du fer et la virulence sur plante (Okinaka et al. 2002; Yang et al. 2007). Par ailleurs, l'expression des gènes impliqués dans l'absorption du fer et ceux codant pour les pectate lyases essentielles à la virulence est régulée par la protéine sensorielle/régulatrice Fur, en réponse à la disponibilité en fer (Franza et Expert 2013). Ainsi, les bactéries sont capables d'exprimer leurs facteurs de virulence en fonction de leurs besoins en fer dans l'hôte (Boughammoura et al. 2007).

6.4. Régulation de l'expression des facteurs de virulence

L'expression des enzymes pectinolytiques, principaux déterminants de la virulence chez les SRP, est finement régulée par un certain nombre de conditions environnementales, notamment la présence de la pectine ou de produits de dégradation de la pectine, la présence d'extraits végétaux, la température, l'osmolarité, la disponibilité en fer (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 1996). La régulation de l'expression des gènes codant les enzymes pectinolytiques est complexe et implique de nombreux régulateurs, mais seuls quelques-uns sont communs aux deux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* (Matsumoto et al. 2003; Van Gijsegem, Hugouvieux-Cotte-Pattat, et al. 2021) (Figure 6 a et b). La régulation de l'expression des facteurs de virulence chez les SRP dépend à la fois des systèmes de quorum sensing (QS) et de l'état métabolique de la cellule. Le système de quorum sensing régule l'expression de gènes en fonction de la densité des cellules bactériennes par le biais d'une signalisation moléculaire.

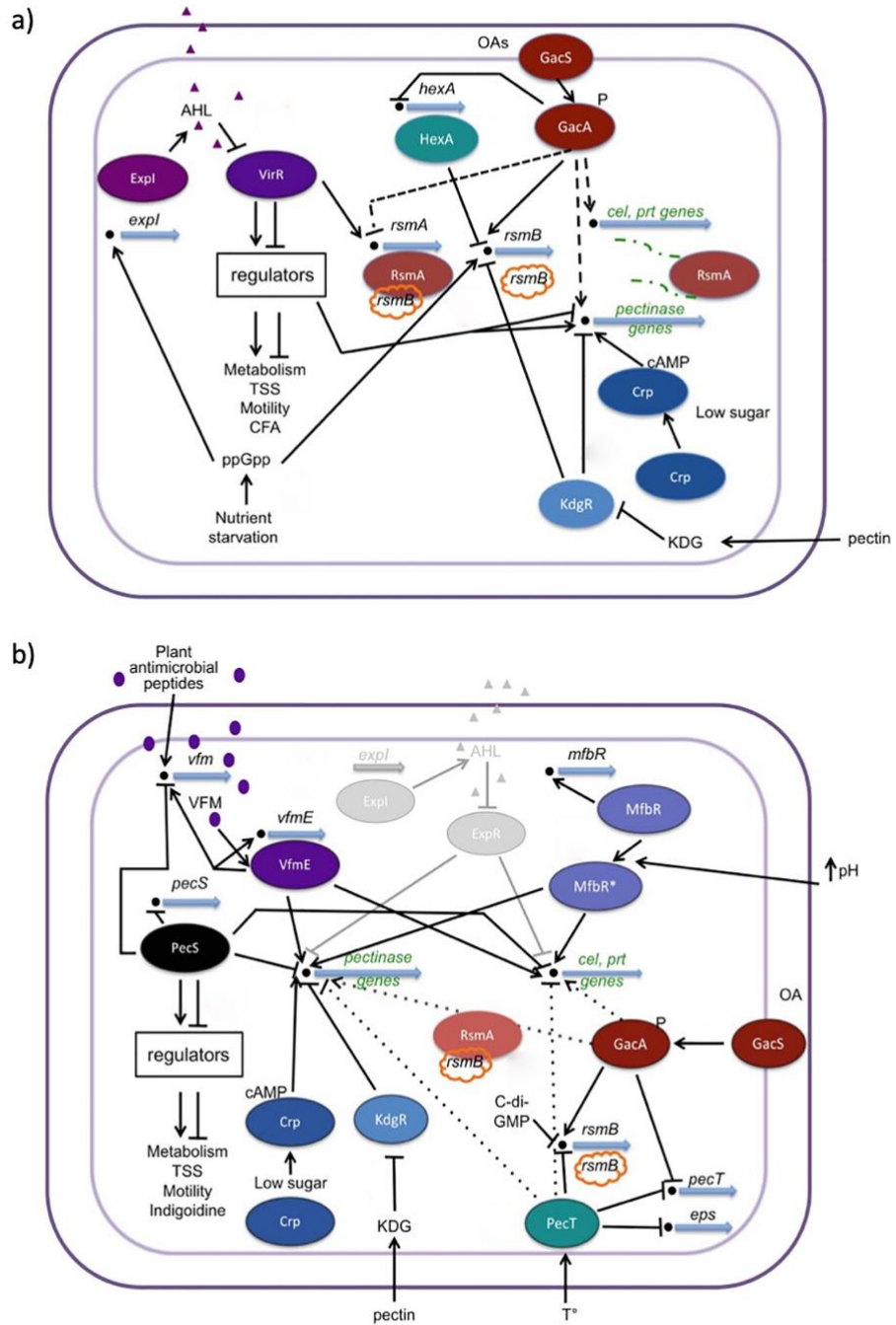


Figure 6: Le réseau de régulation de l'expression des gènes de virulence a) chez les *Pectobacterium* spp. et b) chez les *Dickeya* spp. (Van Gijsegem *et al.*, 2021).

Ce mécanisme joue un rôle important dans la virulence de plusieurs bactéries pathogènes de l'homme, d'animaux ou de plantes (Azimi et al. 2020; Von Bodman et al. 2003). Les bactéries du genre *Pectobacterium* possèdent un système de QS qui utilise la N-acyl homosérine lactone (AHL) comme signal cellulaire. Ce système est impliqué dans la régulation des PCWDE et d'autres facteurs de virulence (Van Gijsegem, Hugouvieux-Cotte-Pattat, et al. 2021). Cependant, chez les bactéries du genre *Dickeya*, l'AHL ne joue qu'un rôle mineur dans la virulence, car les bactéries du genre *Dickeya* possèdent un second système de QS, le système VFM, qui est conservé dans toutes les espèces et qui joue un rôle majeur dans la production des PCWDE (Van Gijsegem, Hugouvieux-Cotte-Pattat, et al. 2021). La régulation des facteurs de virulence dépend également de la disponibilité en nutriments, en particulier des sources de carbone, via des régulateurs tels que KdgR et CRP, qui sont des régulateurs globaux communs aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya*. KdgR est un régulateur transcriptionnel négatif qui réprime l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de la pectine. Cette répression est levée en présence de pectine et/ou de produits de dégradation de la pectine (PGA et galacturonate) (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 1996). La protéine réceptrice de l'AMPC, CRP, est le régulateur global des gènes d'utilisation des sources de carbone en l'absence de glucose. Le complexe CRP-AMPC active le catabolisme de la pectine en l'absence d'une source de carbone facilement métabolisable (Van Gijsegem, Hugouvieux-Cotte-Pattat, et al. 2021). Un autre système de régulation important est le système post-transcriptionnel RsmA-rsmB. La protéine RsmA réprime la production des PCWDE en se liant aux ARNm des PCWDE et en les dégradant. Lorsque l'ARN rsmB est présent, il séquestre la protéine RsmA, empêchant ainsi la dégradation des ARNm PCWDE (Van Gijsegem, Hugouvieux-Cotte-Pattat, et al. 2021). Le rapport RsmA/rsmB est modulé par d'autres régulateurs globaux chez les *Pectobacterium*. Ce système n'a pas été bien étudié chez *Dickeya* car la mutation du gène codant *RsmA* est létale. Chez *Dickeya*, seul le système à deux composants GacA/GacS, commun à *Pectobacterium* et *Dickeya*, a été décrit pour réguler RsmA/rsmB (Van Gijsegem, Hugouvieux-Cotte-Pattat, et al. 2021). Tous ces différents systèmes de régulation reflètent la complexité de la régulation de l'expression des gènes de virulence des deux genres SRP.

7. Les méthodes de lutte

Une fois la maladie causée par les SRP déclenchée sur la plante, aucun moyen ne permet l'arrêt de la progression de la maladie. La plupart des méthodes de lutte contre les SRP visent donc à

réduire le risque d'infection ou à empêcher une augmentation de la charge d'inoculum pendant la phase de latence dans les tubercules. Dans cette section, je décrirai brièvement différentes méthodes de lutte utilisées contre les SRP sur la pomme de terre.

Dans les pays européens producteurs de semences de pomme de terre, l'une des méthodes conventionnelles de lutte contre les pathogènes de pomme de terre est la mise en place du système de certification des semences (Czajkowski et al. 2011). Ce système consiste à suivre un règlement technique national de la production, du contrôle et de la certification des plants qui prend en compte les directives phytosanitaires européennes 2000/29/CE. L'intérêt de cette certification est d'assurer une production de plants de pomme de terre la plus saine possible. Cependant, les contrôles réalisés n'incluent pas obligatoirement des tests moléculaires ou sérologiques. Par conséquent, ces contrôles ne peuvent détecter les SRP lors de la phase de latence asymptomatique. De plus, contrairement à d'autres pathogènes de pomme de terre pour lesquels aucune tolérance n'est admise, des semences infectées par les SRP peuvent être admises avec un pourcentage donné pour les semences bas de gamme (Czajkowski et al. 2011).

Différents produits chimiques ont été testés pour lutter contre les SRP. Par exemple, il a été démontré que le traitement avec un antibiotique comme la streptomycine ou un mélange d'antibiotiques tels que la streptomycine et l'hydrochloride de tetracycline avant la plantation de pomme de terre réduisait l'incidence de la jambe noire en champ et la pourriture molle en stockage (Bonde et De Souza 1954). L'utilisation d'antibiotiques pour lutter contre les infections bactériennes en agriculture est autorisée en Amérique et certains pays asiatiques, mais pas en Europe, en raison des risques associés à l'apparition de résistances chez les bactéries pathogènes pour l'homme ou l'animal (Czajkowski et al. 2011; Verhaegen et al. 2023). L'emploi de sels inorganiques et organiques tels que (8-)hydroxyquinoline ou l'acétate d'aluminium, représente une alternative pour inhiber la croissance de certaines espèces de *Pectobacterium* (Harris 1979; Mills et al. 2006). L'action inhibitrice de ces sels peut être attribuée à la libération d'ions cationiques qui perturbent les fonctions des protéines présentes dans les membranes cellulaires bactériennes ou en modulant le pH de l'environnement (Mills et al. 2006).

Différentes méthodes physiques de lutte contre le SRP ont été également développées, dont le traitement des tubercules de pomme de terre à l'eau chaude. Cette méthode consiste à tremper les tubercules de pomme de terre pendant quelques minutes (5-10 minutes) dans de l'eau à une température d'environ 55°C. Ce traitement a été testé en champ et s'est révélé très efficace dans la lutte contre la jambe noire (Mackay et Shipton 1983). Les inconvénients de cette méthode sont, qu'après le traitement à l'eau, les tubercules doivent être séchés, ce qui est particulièrement

difficile lorsque de grandes quantités de pommes de terre sont traitées. En outre, la physiologie du tubercule peut être modifiée et affecter la germination, ce qui peut entraîner une réduction des rendements (Robinson et Foster 1987). D'autres méthodes physiques, comme le traitement à l'air chaud ou aux UV, éliminent efficacement les pathogènes en surface, mais pour éliminer les pathogènes à l'intérieur, un temps de traitement plus long est nécessaire, ce qui peut altérer la physiologie du tubercule. En outre, le coût de ces méthodes et la difficulté de les appliquer à grande échelle constituent des inconvénients majeurs (Czajkowski et al. 2011).

La résistance des plantes est aussi cruciale face aux pathogènes. Elle peut être améliorée physiologiquement grâce à des amendements du sol avec des nutriments tels que le calcium ou l'azote. Le rôle du calcium dans la résistance des plantes contre plusieurs pathogènes a été documenté (Jiang et al. 2013; Volpin et Elad 1991). Chez les SRP, il a montré que l'augmentation de la concentration en calcium dans le sol réduit la sévérité de pourriture causée par *P. atrosepticum* sur tubercules de pomme de terre (McGuire 1984). En ce qui concerne l'azote, son effet sur la résistance des plantes aux SRP n'a pas été suffisamment étudié ; seule l'étude de Graham & Harper (1966) a montré une incidence plus faible de la jambe noire causée par *P. atrosepticum* dans les champs traités avec des fertilisants riches en azote par rapport à ceux traités avec des fertilisants pauvres en azote (Graham et Harper 1966). Cependant cette méthode, bien qu'elle améliore la résistance, n'est pas suffisante pour lutter contre les SRP lorsque les conditions environnementales sont favorables (Czajkowski et al. 2011).

L'amélioration génétique peut également être déployée. Cependant, jusqu'à présent, aucune variété de pomme de terre naturellement résistante aux SRP n'est commercialisée. Les tentatives de sélection de variétés résistantes aux SRP n'ont connu qu'un succès partiel et n'ont jamais abouti à l'obtention de cultivars résistants, probablement en raison de la faible diversité génétique du matériel génétique parental (Czajkowski et al. 2011). De plus, ces processus de sélection sont longs et nécessitent souvent plus de 10 ans après la sélection des loci de résistance, afin d'éliminer par croisements successifs les traits indésirables.

La modification génétique des plantes par des méthodes moléculaires offre une alternative rapide à la sélection variétale classique. Ces méthodes, basées sur la création d'organismes génétiquement modifiés (OGM) en introduisant des gènes provenant d'autres organismes ont longtemps fait l'objet d'une contestation en Europe. Actuellement, seule une variété d'OGM est autorisée à la plantation en Europe, le maïs MON810 modifié pour acquérir une résistance à certaines insectes ravageurs (trait Bt) (URL : https://www.ecologie.gouv.fr/organismes-genetiquement-modifies-ogm-0#scroll-nav__1). Dans le contexte spécifique de la plante de

pomme de terre, l'introduction de protéines bactéricides à large spectre, telles que le lysozyme de poulet, une enzyme qui lyse la paroi cellulaire bactérienne, a montré une augmentation de la résistance contre les SRP (Serrano et al. 2000). Cependant, il a été constaté que les plantes transgéniques de pomme de terre qui exprime le lysozyme et qui sont résistants à *Pectobacterium* spp., libèrent le lysozyme dans la rhizosphère via les racines des plantes, ce qui tue les bactéries du sol non pathogènes, telle que l'espèce *Bacillus subtilis*. Ceci montre que le lysozyme peut avoir des conséquences néfastes sur les communautés bactériennes bénéfiques présentes naturellement dans la rhizosphère (Ahrenholtz et al. 2000). Ainsi, il est important d'étudier l'effet des plantes transgéniques sur la microflore avant d'autoriser leur plantation.

Des efforts ont également été déployés pour développer des plants de pomme de terre résistants aux SRP en utilisant une approche cisgénique. Cette approche présente l'avantage d'utiliser un gène d'intérêt déjà présent dans l'espèce depuis des siècles, sans altérer le pool génétique ni introduire de traits supplémentaires (Schouten et al. 2006). Cependant, jusqu'à présent, aucun gène de résistance spécifique n'a été identifié pour contrôler les SRP. Il est probable que plusieurs gènes soient impliqués, ce qui complique davantage la tâche (Czajkowski et al. 2011).

Une alternative aux méthodes de lutte chimique et physique est l'utilisation d'agents de biocontrôle. L'utilisation de bactéries antagonistes, telles que les *Pseudomonas*, les *Bacillus* ou des bactéries lactiques, inhibent les SRP, mais également d'autres pathogènes de plantes en produisant des composants antimicrobiens comme des sidérophores, des phénols, des antibiotiques, de l'hydrogène de peroxyde (Cronin et al. 2006; Raoul Des Essarts et al. 2016; Sharga et Lyon 1998; Trias et Bañeras 2008). Les bactéries prédatrices, telles que *Bdellovibrio*, sont également utilisées pour la lutte contre les SRP. Cependant, l'efficacité de ce type de traitement est influencée par la dynamique des populations de proies et de prédateurs. Pour que le prédateur agisse, les SRP doivent être présentes en concentration élevée, de l'ordre de 10^6 UFC/mL (Varon et Zeigler 1978). Cependant, de telles concentrations pourraient également provoquer une infection chez la plante si les conditions sont favorables. Une nouvelle approche prometteuse contre les SRP est l'utilisation des bactéries qui produisent des molécules qui dégradent les molécules signal du système Quorum Sensing, un système qui joue un rôle important de la régulation de l'expression de plusieurs facteurs de virulence chez les SRP, pour prévenir une production importante d'enzymes pectinolytiques et réduire la virulence du pathogène (Zhang et al. 2020). La thérapie par bactériophages pour le contrôle des SRP a récemment suscité un intérêt croissant. Les bactériophages sont des virus qui infectent et lysent uniquement les cellules bactériennes. Leurs avantages sont qu'ils peuvent persister dans

l'environnement et sont spécifiques de leur hôte. Cependant, leur limitation réside dans leur manque de mobilité et la capacité rapide des bactéries à développer une résistance (Czajkowski et al. 2011). Bien que les stratégies de biocontrôle montrent leur efficacité *in vitro* et en serre, leur mise en œuvre en champ nécessite des ajustements. Les agents de biocontrôle doivent répondre à plusieurs critères, notamment une formule stable, une capacité à atteindre les lenticelles et les blessures par lesquelles les SRP peuvent infecter la plante, ainsi que la capacité à survivre au sein de la microflore de la rhizosphère (Czajkowski et al. 2011).

Jusqu'à présent, les méthodes prophylactiques sont les méthodes les plus utilisées pour réduire le risque d'infection des cultures de pomme de terre exemptes de pathogènes. Elles consistent à mettre en œuvre des pratiques culturales qui limitent le risque d'infection. Par exemple, cultiver les pommes de terre dans des champs bien drainés permet de réduire le risque que les tubercules se retrouvent entourés par un film d'eau qui pourrait favoriser la croissance des SRP. Les tubercules pourris doivent être éliminés lors de la récolte et du triage, et les machines utilisées pour la plantation, la pulvérisation, l'écimage, la récolte et le triage doivent être désinfectées. Après la récolte, il est recommandé de stocker les pommes de terre en vrac dans des entrepôts bien ventilés et à basse température afin d'éviter la multiplication des SRP sur les tubercules (Czajkowski et al. 2011).

8. Les SRP dans l'environnement

Dans cette section, nous nous concentrerons sur différents environnements en dehors du contexte de la plante malade où la majorité des SRP a été isolée. Nous analyserons les connaissances acquises sur la capacité des SRP à survivre et à se développer dans ces environnements alternatifs, ainsi que sur le rôle de ces environnements en tant que sources potentielles sources d'inoculum.

8.1. Recherche des SRP dans l'eau

L'eau est un réservoir naturel de certains agents pathogènes humains et animaux. Dans le contexte agricole, l'eau douce est depuis longtemps utilisée pour l'irrigation des cultures, il est donc important d'étudier si les SRP peuvent survivre dans l'eau et le rôle de l'eau dans la dissémination des SRP.

Plusieurs études montrent que les bactéries SRP peuvent être isolées à partir de différentes sources d'eau telles que des étangs, des rivières, des lacs et des eaux souterraines dans différents

pays, notamment en Pologne, en Malaisie, en France, en Ecosse, en Australie et aux États-Unis (Cothier et Gilbert 1990; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2019; McCarter-Zorner et al. 1984; Oulghazi, Cigna, et al. 2019; Potrykus et al. 2016). Les premières études ont révélé une large distribution géographique et une prédominance du genre *Pectobacterium*, avec une faible incidence de l'espèce *P. atrosepticum*. Les bactéries du genre *Dickeya* n'ont généralement pas été détectées (Maddox et Harrison 1988; McCarter-Zorner et al. 1984; Perombelon et Hyman 1987). Lors d'échantillonnages réalisés dans différentes sources d'eau (lacs, fossés/canaux, rivières, pluie, neige et eau de mer) aux États-Unis et en Écosse, les bactéries du genre *Pectobacterium* étaient présentes dans la majorité des sites échantillonnés (40 sur 42) (McCarter-Zorner et al. 1984).

Néanmoins, Les bactéries du genre *Dickeya* ont été isolées de l'eau en 1985 lors d'un échantillonnage d'eaux de surface utilisées pour l'irrigation dans l'Oregon et le Colorado aux États-Unis (Cappaert 1988). Dans cette étude, l'abondance relative du genre *Dickeya* dans les eaux de surface était inférieure à celle du genre *Pectobacterium*, qui représentait plus de 90% des souches isolées. La faible abondance du genre *Dickeya* dans l'eau comparée à celle du genre *Pectobacterium* a également été rapportée par Norman et collaborateurs (Norman et al. 2003). Par ailleurs, dans les eaux souterraines, l'incidence du genre *Pectobacterium* est rare et le genre *Dickeya* n'est pas détecté (Cappaert 1988; McCarter-Zorner et al. 1984). Ceci incite à privilégier l'utilisation des eaux souterraines pour l'irrigation.

Des études ultérieures menées en Australie et en Finlande se sont focalisées sur la diversité des *Dickeya* dans les eaux de rivière. De manière intéressante, les isolats du genre *Dickeya* ont été isolés en été ou lorsque la température de l'eau était supérieure ou égale à 16,2 °C (Cothier et Gilbert 1990; Laurila et al. 2008). Ceci diffère du genre *Pectobacterium*, qui peut être isolé dans l'eau à des températures bien plus faibles, notamment en hiver lorsque la température de l'eau s'approche de 0 °C (McCarter-Zorner et al. 1984). Toutefois, dans cette étude, l'isolement de souches appartenant au genre *Pectobacterium* était plus fréquent en fin de printemps et en été, lorsque la température de l'eau se situait généralement entre 11 °C et 15 °C (Cappaert 1988; McCarter-Zorner et al. 1984).

En laboratoire, il a été montré que les bactéries du genre *Dickeya* pouvaient survivre jusqu'à 211 jours à 16 °C dans de l'eau distillée stérile (Cothier et Gilbert 1990). Ceci n'est apparemment pas spécifique aux *Dickeya*, car de nombreuses bactéries pathogènes de plantes restent viables dans de l'eau distillée stérile à 20 °C pendant plusieurs années (Liao et Shollenberger 2003). La survie de *Pectobacterium* est affectée par sa concentration initiale et le type d'eau (Perombelon

et Hyman 1987). *Pectobacterium* survit plus longtemps dans l'eau à pH 5,7 qu'à pH 7,7 (Perombelon et Hyman 1987).

Plusieurs études suggèrent que la présence des SRP dans l'eau pourrait être due une contamination par l'environnement adjacent. Un suivi mensuel des SRP le long de la rivière d'Alyth burn en Écosse pendant plus de 2 ans a révélé que la fréquence du genre *Pectobacterium* était significativement plus forte à faible altitude (environ 100 m) à proximité de terres agricoles, qu'en moyenne altitude (environ 250 m) à proximité de prairies. De plus, les bactéries du genre *Pectobacterium* étaient extrêmement rares à une altitude plus élevée (environ 350 m) à proximité des landes et de la source de la rivière (Perombelon et Hyman 1987). Par ailleurs, le genre *Pectobacterium* s'est révélé rare dans les eaux de drainage de terres non-arables alors qu'il pouvait être détecté à une concentration de 10^3 UFC/mL dans les eaux de drainage de terres arables (Perombelon et Hyman 1987). Enfin, la concentration du genre *Pectobacterium* est plus importante dans l'eau de drainage de cultures de pomme de terre que dans celle d'autres cultures (Perombelon et Hyman 1987). Toutes ces observations suggèrent que la présence des SRP en rivière pourrait être liée au lessivage des sols agricoles par la pluie (Perombelon et Hyman 1987). Il a également été suggéré que l'eau pouvait être contaminée par des SRP provenant de pommes de terre pourries, qui auraient pu être rejetées dans la rivière (Perombelon et Hyman 1987).

Néanmoins, ces résultats sont contredits par d'autres études montrant une large distribution et une présence quasi-systématique de bactéries de type SRP dans différentes sources d'eau (lac, fossé, courant d'eau, rivière, neige et pluie), même celles éloignées de zones arables (McCarter-Zorner et al. 1984). Alternativement, les aérosols pourraient également jouer un rôle. En effet, il a été montré que les bactéries du genre *Pectobacterium* pouvaient être transportées en grand nombre par aérosol, même si leur viabilité n'est que de quelques minutes dans ces aérosols (Perombelon et al. 1979). Ainsi certains auteurs pensent que l'eau de mer pourrait être une source de propagation des SRP vers les cultures via les aérosols qui se forment sous l'effet des vents sur les crêtes de vagues (McCarter-Zorner et al. 1984). La circulation élargie de ces aérosols pourrait être à l'origine de présence de SRP dans l'eau de pluie ou dans la neige. Ceci conduirait une circulation très importante des SRP et pourrait expliquer leur présence dans les sources d'eau éloignées de terres arables (McCarter-Zorner et al. 1984).

En Australie, un échantillonnage sur deux rivières éloignées a révélé la présence de *Dickeya* dans l'eau des rivières, mais pas dans les sols environnants ou dans les fèces des animaux locaux vivant à proximité des sites d'échantillonnage, suggérant que la présence des bactéries du genre

Dickeya dans la source des rivières n'était pas due à une contamination par l'environnement voisin (Cother et Gilbert 1990). Les analyses phénotypiques et l'analyse de l'empreinte de l'ADN génomique des souches de *Dickeya* isolées lors de cet échantillonnage indiquent que les populations de *Dickeya* à la source de chacune des deux rivières échantillonnées étaient différentes. De plus, certaines populations isolées dans l'eau étaient différentes des populations de *Dickeya* isolées à partir de pommes de terre symptomatiques. Ceci suggère, en contradiction avec les autres études, que ces *Dickeya* pourraient faire partie de la microflore naturelle de ces rivières (Cother et al. 1992).

La virulence des SRP présentes dans l'eau a également été étudiée. Par exemple, il a été constaté qu'il n'y avait pas de différence d'incidence de pourriture molle entre les parcelles irriguées par l'eau de rivière où les SRP se trouvent en abondance et celles irriguées par de l'eau souterraine où les SRP sont rares voir absentes (Cappaert 1988). Plus récemment, l'échantillonnage de différentes sources d'eau adjacentes aux champs agricoles, en Pologne, a révélé que les espèces de *Dickeya* isolées dans l'eau (*D. zeae* et *D. chrysanthemi*) étaient différentes des espèces isolées de tubercules de pomme de terre symptomatiques (*D. dianthicola* et *D. solani*), et que la diversité des populations de *Dickeya* isolées de l'eau était plus importante comparée à celle de populations de *Dickeya* isolées de cultures de pomme de terre (Potrykus et al. 2016). Cependant, dans les tests de virulence réalisés sur des tubercules de pomme de terre, certaines souches du complexe *D. zeae* isolées à partir d'eau de rivière se sont révélées plus virulentes que la souche de référence de *D. zeae* isolée à partir de plantes (Potrykus et al. 2016). Ceci souligne l'importance de la surveillance et de la caractérisation d'espèces ou de souches présentes dans les cours d'eau utilisés pour l'irrigation.

Les recherches récentes des SRP dans l'eau ont également mis en évidence la circulation de SRP à large échelle. Ainsi, l'espèce *P. peruvienne*, originellement isolée de pommes de terre à haute altitude (2400-3800 m) au Pérou, a été également isolée d'eau de rivière en France (Faye et al. 2018). De plus la recherche des SRP dans l'eau a mis en évidence de nouvelles espèces non décrites sur plantes. Ainsi, *D. aquatica* a été isolée de cours d'eau aux États-Unis et en Finlande et de lacs en France (Parkinson et al. 2014), *D. lacustris* a été isolée d'un lac eutrophe en France (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2019), *D. undicola*, été isolée de différentes sources d'eau en Malaisie et en France (Oulghazi, Pédrón, et al. 2019), l'unique souche de *P. fontis* a été isolée d'eau de cascade en Malaisie (Oulghazi, Cigna, et al. 2019), *P. polonicum* a été isolée d'eau souterraine à proximité d'un champ de légumes en Pologne (Waleron, Misztak, Waleron,

Jonca, et al. 2019) et *P. aquaticum* a été isolée de différentes sources d'eau en France et dans un lac en Pologne (Babinska et al. 2021; Pédrón et al. 2019).

Deux de ces espèces ont été retrouvées ultérieurement sur plantes : *P. polonicum* a été isolée de plants de pomme de terre symptomatiques en Chine, mais elle était moins virulente que les autres espèces de *Pectobacterium* isolées (Han et al. 2023), et l'espèce *D. aquatica* a été isolée sur carottes en Irlande (Zaczek-Moczyłowska et al. 2019). Parmi ces espèces, certaines ont une virulence réduite, telles que *P. aquaticum* (Babinska et al. 2021) et *P. fontis* (Oulghazi, Cigna, et al. 2019).

En résumé, ces travaux anciens et actuels montrent une grande circulation des SRP dans différentes sources d'eau, leur diversité pouvant être différente de celle observée sur les plantes. L'étude de cette diversité, de l'abondance et de la répartition des SRP dans l'eau est essentielle pour évaluer les risques potentiels de ce réservoir sur les cultures. Enfin, certains continents (Afrique, Amérique du Sud, Asie à l'exception de la Chine) sont notoirement sous-échantillonnés et devraient faire l'objet d'études pour préciser si les résultats observés sont restreints aux pays tempérés ou ont une portée plus générale.

8.2. Recherche des SRP dans le sol

La question de la persistance des SRP dans les sols et de leur rôle en tant qu'inoculum primaire a fait l'objet de controverses. Certaines études indiquent que la concentration des SRP dans le sol diminue rapidement dans le temps et donc que le sol ne peut pas être une source d'inoculum primaire importante (Graham 1958; Lazâr et Bucur 1964). En revanche, d'autres études montrent que les SRP peuvent persister pendant longtemps, dans le sol lorsqu'elles sont en association avec du matériel végétal (Kikumoto et Sakamoto 1969; Mendonca et Stanghellini 1979). Ces contradictions sont probablement dues à des variations de sensibilité des méthodes d'isolement employées. En effet, la concentration des SRP dans le sol est généralement faible et elles ne sont généralement pas détectables par étalement sur un milieu différentiel (De Boer et al. 1979). Il a été démontré que les SRP ne peuvent être détectées par culture sur le milieu CVP à partir d'un échantillon de sol que lorsque la concentration de SRP est égale ou supérieure à 10^3 cellules par gramme. Si la concentration des SRP est plus faible que cette valeur, les bactéries du sol envahissent le milieu CVP et empêchent l'isolement des SRP (Cuppels et Kelman 1974). Il est donc important de faire un enrichissement dans un milieu pectate en condition de faible teneur en oxygène avant d'étaler l'échantillon de sol sur un milieu différentiel. L'enrichissement en condition de faible teneur en oxygène stimule la croissance

des SRP tout en inhibant la croissance des autres bactéries pectinolytiques aérobies présentes dans le sol (Burr et Schroth, 1977; Meneley et Stanghellini 1976). L'inconvénient d'un enrichissement préalable est que cela ne permet pas d'estimer l'abondance des SRP dans le sol. De plus, la distribution des SRP dans le sol peut également être hétérogène, ce qui peut compliquer leur détection et nécessite de réaliser plusieurs prélèvements à plusieurs endroits différents (Meneley et Stanghellini 1976) .

Malgré ces difficultés, le genre *Pectobacterium* est plus fréquemment détecté dans le sol nu que le genre *Dickeya* (98,1 % et 1,9 % pour *Pectobacterium* et *Dickeya* respectivement) (Peltze et Sivasithamparam, 1988). En Écosse, un échantillonnage de sol réalisé dans 17 champs a montré que les bactéries du genre *Pectobacterium* étaient présentes dans le sol de tous les champs échantillonnés, y compris ceux où la pomme de terre n'a pas été cultivée, mais à une faible fréquence (Perombelon et Hyman 1989). Dans les sols cultivés avec des pommes de terre, les *Pectobacterium* sont plus facilement détectables dans les trois à quatre mois suivant la récolte de pommes de terre (septembre, octobre et novembre) qu'en début d'été, indiquant une décroissance de leur concentration dans le sol au cours du temps (Perombelon et Hyman 1989). Apparemment, les SRP sont plus fréquents dans les sols cultivés avec des pommes de terre par rapport à d'autres plantes cultivées. Une étude réalisée dans le Wisconsin a montré que la fréquence de détection des *Pectobacterium* était plus importante dans des sols où les pommes de terre avaient été cultivées la saison précédente, comparée à des sols cultivés avec d'autres plantes, telles que le haricot et le maïs (De Boer 1979). Également, la fréquence de détection des *Pectobacterium* diminue et passe sous la limite de détection dans les champs préalablement infectés par des SRP après 2 à 3 ans de rotation avec d'autres cultures (De Boer 1979). De plus, Burr et Schroth (1977) ont rapporté que les SRP n'ont pas été détectés dans des champs de pommes de terre après quatre mois de jachère (sol nu). Cependant, ils ont été isolés dans des champs récemment cultivés ou dans des champs où des résidus végétaux étaient présents (Burr et Schroth, 1977). Toutes ces études indiquent donc que le maintien des bactéries du genre *Pectobacterium* dans le sol nu est provisoire.

Les SRP étaient également isolées de la rhizosphère de plantes cultivées ou non cultivées ainsi que des sols contenant des débris végétaux (Burr et Schroth, 1977; Mendonca et Stanghellini 1979; Perombelon et Hyman 1989). Par exemple, des bactéries du genre *Pectobacterium* ont été isolées de la rhizosphère de betteraves à une profondeur supérieure à 12 cm, les bactéries étaient distribuées tout au long de la racine de betterave (Mendonça et Stanghellini, 1979). L'association des SRP avec la rhizosphère permet de prolonger leur survie dans le sol. La survie

des SRP est meilleure dans la rhizosphère des brassicacées comparée à celle des graminées ou des céréales, et étonnement plus faible dans la rhizosphère de pommes de terre (Perombelon et Hyman 1989). Les SRP peuvent également survivre en association avec des débris végétaux. Notamment, *Pectobacterium* est capable de survivre l'hiver dans le sol, au sein de tiges et de tubercules de pomme de terre décomposés (De Boer, 1979). Ces résultats de recherche ont conduit à la préconisation de pratiques culturales pour prévenir la dissémination et l'occurrence des SRP dans le sol : respecter une période de 4 à 5 mois de jachère avant la culture de pommes de terre suivante, éliminer les résidus de culture, veiller à ce que les mauvaises herbes soient absentes des sols prévus pour la culture de pommes de terre. Les rotations culturales sont également importantes à prendre en compte avant de mettre en place une culture de pommes de terre (De Boer et al. 1979).

Plusieurs facteurs abiotiques peuvent influencer la survie des SRP dans le sol. *Pectobacterium* survie plus longtemps dans le sol à pH neutre (Anilkumar et Chakravarti 1970). En ce qui concerne l'humidité du sol, il a été constaté que *Pectobacterium* survie un peu plus longtemps dans les sols secs (10 % d'humidité) comparé aux sols humides/détrempés (21 % d'humidité) (Perombelon et Hyman 1989). Cependant, par rapport à l'humidité, la température semble être un facteur plus important pour la survie des *Pectobacterium* dans le sol (Anilkumar et Chakravarti 1970). Globalement, les *Pectobacterium* peuvent survivre des centaines de jours dans le sol lorsque la température est entre 0 et 10 °C. Au-delà de 10 °C, la durée de vie des *Pectobacterium* dans le sol diminue (Ficke et al. 1973; Mendonca et Stanghellini 1979; Perombelon et Hyman 1989). Les *Pectobacterium* survivent plus longtemps dans les sols que les *Dickeya* à faible température. A 6 °C, la concentration des *Dickeya* diminue fortement à 7 jours, alors que dans les mêmes conditions, la concentration des *Pectobacterium* ne diminue de manière significative qu'après 42 jours. (Van der Wolf et al. 2009). De plus, les variations de température ou d'humidité réduisent la survie des SRP dans le sol, ce qui pourrait expliquer la faible fréquence des SRP dans les sols en surface, où les facteurs abiotiques varient plus fortement, comparé à des niveaux plus profonds.

La survie des SRP dans le sol peut également être affectée par les microorganismes indigène/ autochtones du sol, des bactériophages lytiques ou des bactéries prédatrices tel que les bactéries du genre *Bdellovibrio*, présentes en abondance dans les sols (Czajkowski et al. 2011). De plus, les SRP peuvent être en concurrence pour les ressources nutritives avec d'autres bactéries du sol. Il a été constaté que les SRP survivent plus longtemps dans un sol stérile que dans un sol non stérile (Anilkumar et Chakravarti 1970; Ficke et al. 1973), ce qui montre l'effet antagoniste

de la microflore du sol sur la survie des SRP. Les bactéries antagonistes pourraient employer plusieurs mécanismes pour inhiber la croissance des SRP, tels que la production de composés antimicrobiens, de sidérophores ou encore la dégradation de molécules de signalisation du quorum sensing impliquées dans la régulation des facteurs de virulence des SRP (Czajkowski et al. 2011). Toutefois cet effet antagoniste n'est pas de grande ampleur et les *Pectobacterium* sont plus résistantes à l'action antibiotique des bactéries antagonistes présentes dans le sol que d'autres pathogènes de plantes, comme *Xanthomonas translucens*, *Agrobacterium tumefaciens* ou *Erwinia tracheiphila* (Patrick 1954). L'addition de glucose dans le sol prolonge la survie de *Pectobacterium* et également celle d'autres bactéries du sol (Perombelon et Hyman 1989), ce qui suggère que la disponibilité de ressources nutritives dans le sol est un facteur limitant. De même, l'amendement de sols stériles avec de la luzerne, de la paille ou du glucose permet de prolonger la survie de *Pectobacterium* dans le sol (Ficke *et al.*, 1973). Le besoin de ressources nutritives pourrait probablement expliquer l'association des SRP avec la rhizosphère de plantes ou avec résidus végétaux.

En conclusion, même si la concentration des SRP dans les sols est faible, ceux-ci peuvent contaminer les semences exemptes de pathogènes (De Boer et al. 1979). En effet, des symptômes de jambe noire peuvent apparaître même si la semence initiale est issue de cultures axéniques *in vitro*, donc indemne de toute contamination, en raison d'une recontamination ultérieure après la culture (Van Gijsegem, van der Wolf, et al. 2021). Néanmoins, la présence asymptomatique des SRP sur les semences non axéniques peut être importante et constitue la principale source d'inoculum (Pérombelon 1974).

8.3. Associations des SRP avec des vecteurs (insectes et nématodes)

Les premières observations d'association d'insectes avec des plantes pourries hébergeant potentiellement des SRP remontent aux années 1920. Les études menées par Leach entre 1925 et 1935 sur le rôle de *Delia platura* (anciennement *Hylemya cilicrura*) dans le développement de la jambe noire sur pomme de terre ont montré que cet insecte pondait ses œufs à côté de semences ou de jeunes plants de pomme de terre. Parfois, ces œufs portaient en surface des bactéries à leur surface qui causent des pourritures sur les plantes. Une fois écloses, les larves se déplacent vers les blessures de la plante et commencent à l'endommager, ce qui s'accompagne souvent de symptômes de pourriture (Leach 1925). Il a été suggéré que ces bactéries responsables de pourritures sur les plantes semblent avoir une relation symbiotique avec *Delia platura*, car elle étaient associées à tous les stades de développement de cet insecte à l'exception des œufs (Leach 1934). Ces bactéries macergènes semblent contribuer à la

digestion des insectes (Leach 1934). Des études ultérieures ont montré que divers insectes appartenant à l'ordres des diptères, des hyménoptères et des lépidoptères, pouvaient être porteurs de SRP à l'intérieur et ou en surface, et leur rôle de vecteurs a été suggéré (Chiu et al. 1958; Pérombelon et Kelman 1980).

Expérimentalement, les insectes peuvent effectivement transmettre les SRP des tubercules de pomme de terre macérés aux feuilles et pétioles blessés de jeunes plants de pomme de terre exempts de pathogènes. En champs, des méthodes de sérotypage ont révélé que des souches de *Pectobacterium* ayant le même sérotype pouvaient être isolées d'amoncellements de pommes de terre de rebut et d'insectes (particulièrement des diptères) et sur des plants de pomme de terre cultivés à proximité (Phillips et Kelman 1982), ce qui suggère que les insectes porteurs de SRP peuvent contaminer les plantes en champs.

Les conditions qui favorisent la transmission des SRP aux insectes ne sont pas encore comprises. Par exemple, une étude menée en Écosse a montré qu'environ 3 à 5% des mouches collectées sur des amoncellements de pommes de terre de rebut étaient porteuses des SRP du genre *Pectobacterium*. Ce pourcentage augmentait particulièrement en été et en automne. (Harrison et al. 1977). D'autre part, une étude menée dans le Colorado (États-Unis) a montré que le pourcentage d'insectes portant des souches de *Pectobacterium*, collectés à différents endroits (amoncellements de pommes de terre de rebut, champs de laitues et de pommes de terre, et décharges municipales), variait de 1,1 % à 6 %. Les déchets de pommes de terre étaient la source principale d'insectes porteurs des SRP. En outre, le pourcentage d'insectes portant des SRP était élevé au début du printemps et diminuait au fil de la saison, contrairement à ce qui a été observé en Écosse (Kloepper et al. 1979). Kloepper et collaborateurs (1979) ont supposé que le déclin rapide du pourcentage de SRP chez les insectes au début de l'été pourrait être dû à la faible survie des SRP dans les amoncellements de pomme de terre de rebut, en raison de la baisse de l'humidité résultant du climat aride de l'état du Colorado. Un point commun aux deux études est que l'espèce *P. atrosepticum* était prédominante dans les insectes au début du printemps, mais que son abondance diminuait au fil de la saison, tandis que d'autres espèces de *Pectobacterium* devenaient plus abondantes (Harrison et al. 1977; Kloepper et al. 1979). Dans ces deux études, les amoncellements de pomme de terre de rebut étaient la principale source de SRP transmis par les insectes, suggérant que l'élimination des déchets de pomme de terre ou de toute autre source potentielle de SRP des champs de culture pourrait limiter la transmission des SRP par les insectes (Kloepper et al. 1979).

Les souches de *Pectobacterium* peuvent parfois survivre jusqu'à 72 heures à l'intérieur d'insectes tels que *Drosophila melanogaster* meigen et *Drosophila busckii* Coquillett, et au moins 24 heures à la surface de ces insectes (Brewer et al. 1981). En comparaison, dans l'air, *Pectobacterium* ne survit pas plus de 2 heures dans des conditions de basse température et de forte humidité, et moins d'une demi-heure dans des conditions de température chaude et de faible humidité (Graham et al. 1979). Ceci indique que l'association entre ces bactéries et un vecteur peut prolonger leur survie en dehors de la plante en les protégeant de conditions environnementales défavorables. Une hypothèse précédente suggérait que les bactéries pathogènes des plantes associées à *Delia platura*, telles que les SRP, pourraient survivre à l'hiver dans les pupes de l'insecte enfouies dans le sol, ce qui pourrait favoriser la dissémination de ces pathogènes au printemps suivant (Leach 1934). De plus, compte tenu de la distance de vol des insectes, par exemple dans le cas de la Drosophile, les SRP peuvent être transportées sur de longues distances (d'environ 12 à 20 km du point d'origine), ce qui favoriserait leur dissémination (Brewer et al. 1981). En effet, une expérience menée en champs de pomme de terre a montré que les bactéries du genre *Pectobacterium* ont été isolées à plusieurs reprises sur des plantes blessées à 183 m d'amoncellements de pommes de terre de rebut infectées, qui ont servi de source de SRP, mais n'ont pas été trouvées dans un champ plus proche, où les plantes étaient protégées des insectes par des cages. Ceci suggère que les insectes étaient responsables de la transmission des SRP aux plantes blessées (Klopper et al. 1981).

Dans une étude récente en Norvège, des insectes potentiellement impliqués dans la dissémination des SRP ont été collectés dans 9 champs de pommes de terre en 2015 et 2016. Les espèces d'insectes portant les SRP ainsi que la composition et la quantité de SRP présentes dans les échantillons ont été analysées (Rossmann et al. 2018). Cette étude a révélé la présence de SRP, principalement du genre *Pectobacterium*, associées à plus de 80 espèces d'insectes différentes dans tous les champs étudiés, la majorité des insectes porteurs des SRP étant des diptères. Les familles *Anthomyiidae* et *Muscidae* étaient les familles d'insectes les plus représentées (46 % et 14 % des échantillons identifiés) et le genre *Delia* était prédominant, représentant plus de 30 % des échantillons positifs aux SRP au cours des 2 années de collecte. *Delia platura* était l'espèce la plus dominante, représentant plus de 19 % dans tous les échantillons positifs (Rossmann et al. 2018). Cela confirme les études anciennes réalisées par Leach et collaborateurs décrivant l'association des bactéries responsables de pourritures de plantes avec les espèces de *Delia* (Leach 1934). En outre, les SRP ont également été détectées à des densités élevées dans des *Delia* élevées en laboratoire, suggérant que les SRP font bien

partie du microbiome de cet insecte (Rossmann et al. 2018). Bien que les SRP soit présentes chez de nombreuses espèces d'insectes, pour bon nombre de ces espèces, seuls quelques individus ont été testés positifs. Ceci suggère un portage passif des SRP par ces espèces d'insectes (Rossmann et al. 2018). Néanmoins pour 10 espèces d'insectes, dont *Delia platura*, une association plus régulière avec les SRP a été observée. Par exemple, 50 % des individus de *Delia platura* ont été testés positifs aux SRP. Cela suggère que certaines familles d'insectes sont communément associées aux SRP, mais aussi que d'autres insectes peuvent transmettre les SRP de manière stochastique, car ils peuvent porter aléatoirement des quantités importantes de SRP à leur surface (Rossmann et al. 2018).

L'association symbiotique et/ou mutualiste des SRP avec différents insectes ou nématodes a également été suggérée récemment. Par exemple, dans une étude du microbiome du puceron *Pseudoregma bambucicola*, le genre *Pectobacterium* était constamment présent aux différents stades de développement de cet insecte (Liu et al. 2022). Le genre *Pectobacterium* a également été retrouvé dans le microbiome d'un mollusque gastéropode, *Arion ater* (Joynson et al. 2014). D'autres études montrent la capacité des SRP à survivre dans l'intestin de nématodes, ainsi que le rôle de ces nématodes dans la transmission des SRP aux plantes (Mongae et al. 2013; Nykyri et al. 2014).

Des mécanismes génétiques qui régissent l'interaction entre SRP et insectes ont été décrits. Ainsi, *D. dadantii* 3937 possède un groupe de 4 gènes codant pour une protéine homologue à la toxine cyt de *Bacillus thuringiensis* impliquée dans l'activité cytolytique sur les cellules d'insectes. Cette toxine permet de tuer certains insectes, tels que les aphides (pucerons) (Costechareyre et al. 2012). Le cluster de gènes *cyt* est présent dans la plupart des génomes de *Dickeya* et dans le genre *Musicola*, mais absent des génomes de *Pectobacterium*. Chez *Pectobacterium*, il a été démontré que le gène *evf* est impliqué dans la colonisation et la survie dans l'intestin de larves de drosophile (Acosta Muniz et al. 2007). Toutefois, ce gène n'est pas présent chez toutes les espèces de *Pectobacterium*. Il a récemment été rapporté que l'espèce *P. parvum* possède des gènes spécifiques qui pourraient être importants pour la survie chez les insectes ou les nématodes (Pasanen et al. 2020). Parmi ces gènes, on trouve le système de sécrétion SPI-1 de type III, connu pour être impliqué dans la survie ou la colonisation des insectes par des bactéries pathogènes pour l'homme ou les plantes, comme *Salmonella enterica* ou *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, ou encore des gènes codant pour des protéines nématocides (Pasanen et al. 2020). Toutes ces fonctions suggèrent que l'association d'au moins

certaines espèces de *Pectobacterium* avec les insectes pourrait être plus intime que précédemment évaluée.

9. L'évolution réductive chez les bactéries

Dans les sections précédentes, il a été démontré que les SRP sont présents dans différents environnements en dehors des plantes et qu'elles peuvent potentiellement former des associations symbiotiques avec des insectes ou des nématodes. De plus, la famille des *Pectobacteriaceae*, à laquelle les SRP appartiennent, comprend également un genre proche, *Symbiopectobacterium*, qui regroupe des symbiotes d'insectes. Par ailleurs, l'étude des traits évolutifs des espèces *P. aquaticum* et *P. quasiquaticum* (présentée dans le chapitre 4 de mes résultats) suggère que ces deux espèces ont subi une évolution réductive. La réduction du génome est un trait caractéristique des bactéries symbiotiques et des parasites intracellulaires, mais a également été observée chez certaines bactéries libres. Dans ce chapitre de l'introduction, j'explore les différentes hypothèses expliquant la réduction de taille de génomes qui peut être observée à la fois chez des bactéries symbiotiques et chez les bactéries libres.

9.1. Réduction de génomes chez les bactéries symbiontes

Dans la nature, les bactéries peuvent être en mode de vie libre, capables de survivre et de se reproduire dans l'environnement sans dépendre d'autres organismes, ou vivre en association (interdépendance) avec d'autres organismes distincts. Ces associations peuvent être de différentes natures (Figure 7). Le mutualisme désigne une interaction où les deux espèces tirent un bénéfice réciproque de leur interaction. Le commensalisme désigne une interaction bénéfique pour une des deux espèces tandis que l'autre n'en tire aucun avantage, mais aucun inconvénient non plus. Le mutualisme et le commensalisme constituent donc deux types d'interactions mutualistes (ou positives) bénéfiques pour au moins un des deux partenaires.

À l'inverse, il existe des interactions antagonistes négatives pour au moins un des deux associés : la prédation et le parasitisme sont des interactions où une espèce tire profit de l'autre tandis que l'autre est soit tuée (prédation) ou nettement affectée (parasitisme) ; la compétition est une interaction où les deux espèces souffrent de leurs interactions réciproques. Enfin l'amensalisme décrit une interaction où une espèce agit de manière négative sur une autre, mais sans pour autant en tirer aucun profit pour elle-même. Les associations peuvent aussi être décrites comme symbiotiques. Il existe 3 types d'associations symbiotiques : le mutualisme, le commensalisme et le parasitisme (Pérez-Brocal et al. 2011). L'association symbiotique est donc une association durable où une des espèces tire profit de l'autre.

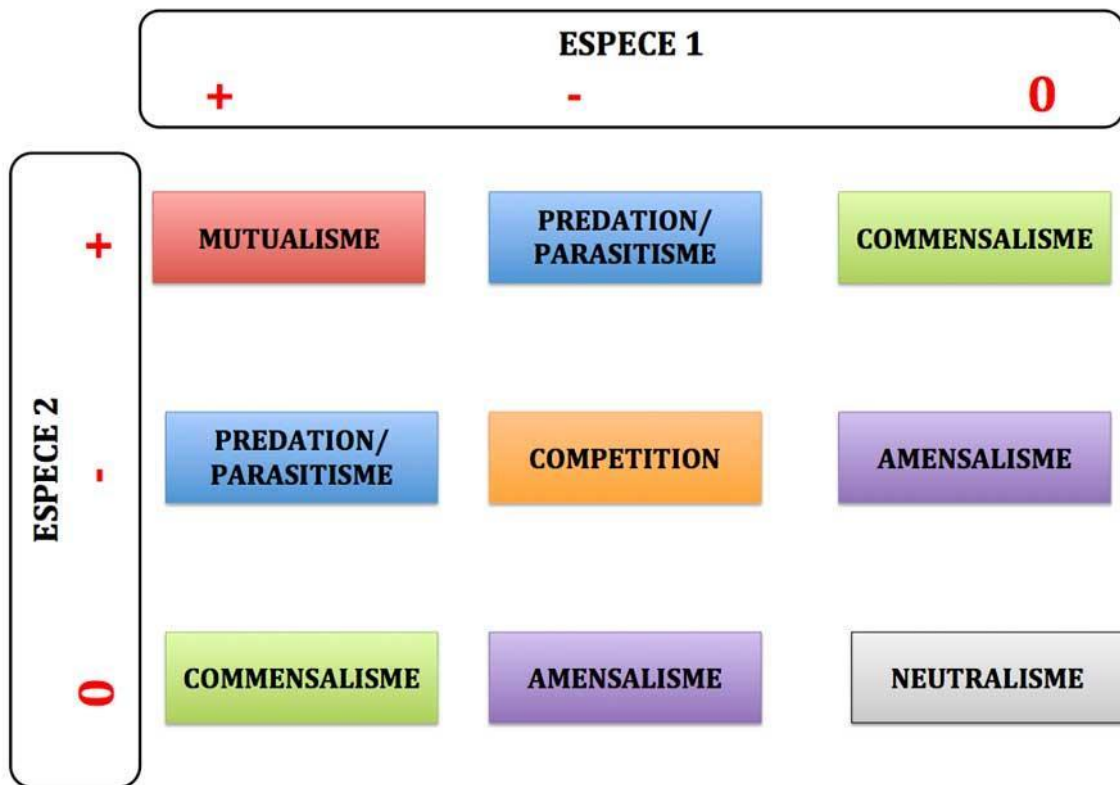


Figure 7 : Grille des interactions entre organismes. (URL: <https://www.zoom-nature.fr/classer-les-interactions-entre-especes-une-chimere/> ; Consulté le 28 aout 2023).

Les partenaires sont classés en tant qu'hôte et symbiote, où l'hôte est alors défini comme le fournisseur de ressources de base, tandis que le symbiote est consommateur de ces ressources et peut ou non fournir des services en retour. Si le symbiote fournit à son hôte une nouvelle capacité ou l'utilisation de nouvelles ressources qui permet à son hôte d'occuper et de survivre dans une nouvelle niche écologique, alors l'association est mutualiste (Pérez-Brocal et al. 2011). Selon le degré de dépendance entre le symbiote et l'hôte, l'association peut varier considérablement, allant d'une relation facultative à une association obligatoire.

Par exemple, dans l'association entre la bactérie *Rhizobium* et les plantes de la famille des légumineuses, l'une des symbioses bactérie-plante les plus étudiées, les bactéries associées à la racine de la plante fixent l'azote et le mettent à la disposition de la plante, qui à son tour fournit les nutriments nécessaires à la survie et à la croissance de la bactérie (White et al. 2007). La bactérie *rhizobium* peut néanmoins exister à l'état libre dans le sol en l'absence de légumineuse. Les associations symbiotiques peuvent également contribuer à d'autres fonctions ; par exemple les bactéries symbiotiques d'insectes peuvent manipuler la reproduction de l'insecte ou protéger l'insecte contre ses ennemis naturels (Vavre et Mavingui 2011). L'association symbiotique peut être obligatoire, ce qui signifie que la survie de l'un des partenaire (le symbiote ou l'hôte) ou des deux, dépendent de la présence de l'autre. Un exemple de symbiose obligatoire pour les deux partenaires est l'association entre *Buchnera aphidicola* et les aphides. Les aphides se nourrissent sur la sève, qui est particulièrement pauvre en acide aminés essentiels et ils dépendent de *Buchnera aphidicola* pour acquérir les acides aminés essentiels. *Buchnera aphidicola* ne peut pas se multiplier à l'extérieur des cellules des aphides et elle est strictement transmise verticalement d'une génération d'hôte à la génération suivante (Brinza et al. 2009).

L'association à long terme entre un symbiote et son hôte conduit à une co-évolution au cours de laquelle l'hôte et le symbiote développent de nouveaux traits génomiques. Des études de génomique comparative ont révélé que, en comparaison avec les bactéries libres, les génomes des bactéries symbiotiques obligatoires et des parasites intracellulaires sont caractérisés par des génomes de taille réduite, une diminution des événements de recombinaison, l'augmentation de nombre de substitutions non synonymes, un pourcentage A+T élevé, l'accumulation de mutations moyennement délétères, la perte d'éléments mobiles et une forte conservation de la synténie entre les génomes (conservation l'ordre des gènes entre différents génomes) (Latorre et Manzano-Marín 2017; McCutcheon et Moran 2012). Chez les symbiotiques d'insectes, les gènes impliqués dans des fonctions de base, telles que la réplication, la transcription et la production d'énergie, sont conservés. Cependant, un grand nombre de gènes de recombinaison et de

réparation de l'ADN, ainsi que de nombreux gènes impliqués dans la biogénèse de la membrane cellulaire, sont perdus (McCutcheon et Moran 2012; Pérez-Brocal et al. 2011). La perte des gènes de biosynthèse de métabolites et de gènes de métabolisme intermédiaire a également été observée lorsque les métabolites en question sont disponibles dans l'hôte (McCutcheon et Moran 2012; Pérez-Brocal et al. 2011). Les symbiotes obligatoires maintiennent cependant les voies de biosynthèse de métabolites nécessaires à la nutrition de leur hôte, telles que la synthèse d'acides aminés, de vitamines et de cofacteurs (Pérez-Brocal et al. 2011). L'évolution génomiques chez les symbiotes obligatoires intracellulaires est alimentée par deux forces : une faible taille efficace de la population et l'absence d'évènements de recombinaison détectables. Les symbiotes obligatoires occupent des habitats isolés et sont principalement transmis verticalement par leurs hôtes (la transmission horizontale entre hôtes étant rare), d'où l'absence d'évènements de recombinaison détectable (Pérez-Brocal et al. 2011). Ils subissent également des goulots d'étranglement dans la mesure où un faible nombre de bactéries est transmis verticalement à la génération suivante. Par conséquent, ces symbiotes subissent une forte dérive génétique. Ceci conduit à l'apparition du phénomène de cliquet de Muller, un processus dégénératif au cours duquel les mutations moyennement délétères s'accumulent, entraînant à terme une perte de fonction des gènes, qui deviennent des pseudogènes et qui seront éventuellement éliminés. L'architecture génomique des bactéries varie au cours de l'évolution, de bactéries libres potentiellement symbiotiques à des symbiotes intracellulaires obligatoires (Latorre et Manzano-Marín 2017; McCutcheon et Moran 2012). Dans les premiers stades de l'évolution, on observe des réarrangements génomiques, des pertes de gènes, l'accumulation d'un grand nombre d'éléments mobiles et la formation de pseudogènes, alors que dans les stades plus avancés de symbioses intracellulaires obligatoires, il y a peu de pseudogènes ou d'éléments mobiles (voir figure 8).

9.2. Réduction de génome chez les bactéries libres

Des études génomiques ont montré que la réduction du génome peut également se produire chez les bactéries libres, en particulier les bactéries marines. Par exemple, les bactéries marines du genre *Prochlorococcus* ont des génomes de taille réduite d'environ 2,4 Mbp (Dufresne et al. 2005) . Contrairement aux symbiotes intracellulaires obligatoires, la taille de leur population est importante et il n'y a pas de barrières physiques empêchant la recombinaison. Dans ce cas, les bactéries sont soumises à une forte sélection purificatrice (le biais de mutation a peu d'effet sur les séquences d'ADN, car il est éliminé par la sélection naturelle) et l'effet de la dérive génétique est négligeable (Dufresne et al. 2005). Le paragraphe suivant décrit les différentes

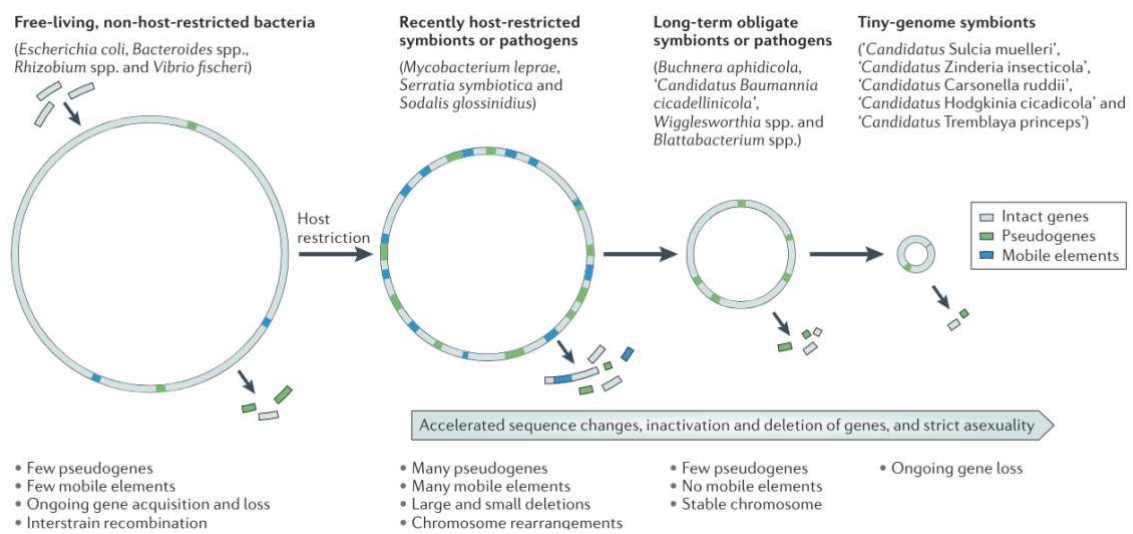


Figure 8 : les différentes étapes de l'évolution réductive des bactéries libres vers les symbiontes intracellulaires obligatoires (McCutcheon and Moran, 2012).

hypothèses qui ont été proposées pour expliquer l'évolution par réduction du génome chez les bactéries libres.

9.2.1. L'hypothèse Streamlining

Cette hypothèse stipule que les génomes plus petits sont favorisés par la sélection naturelle plus probablement pour réduire le coût énergétique des cellules bactériennes (Martínez-Cano et al. 2015). Elle part du principe que, dans les grandes populations, l'effet de la dérive génétique est négligeable et que la sélection naturelle prédomine.

Lorsque des délétions conférant un avantage sélectif se produisent, elles sont rapidement fixées dans la population, en particulier dans les environnements où la pression de sélection est élevée, comme dans les environnements pauvres en nutriments (Martínez-Cano et al. 2015).

Cette théorie de « streamlining » a été proposée pour expliquer la réduction de génome observée chez certaines cyanobactéries marines telles que *Prochlorococcus marinus* MED4, situé dans la partie haute de la colonne d'eau à une forte luminosité, et *Prochlorococcus marinus* SS120, situé en profondeurs à une faible luminosité. Chez ces deux bactéries, le faible pourcentage de G+C (~30 à 36 %), pourrait probablement réduire les besoins en azote étant donné que les paires de bases A+T contiennent un atome d'azote de moins que les paires de base G+C. Ceci pourrait avoir un avantage sélectif dans les niches écologiques de ces bactéries, en particulier pour *Prochlorococcus marinus* MED4, qui vit dans la partie haute de la colonne d'eau où l'azote est peu abondant (Dufresne et al. 2005). En outre, il a été suggéré que la petite taille des cellules de ces bactéries diminue le coût de la division cellulaire et favorise l'absorption des nutriments en augmentant le rapport surface/volume (Dufresne et al., 2005). (Dufresne et al. 2005). L'hypothèse de streamlining a été suggérée lors d'une étude *in vitro* d'évolution expérimentale, où il a été démontré que chez *Salmonella enterica*, certaines délétions ayant lieu dans des régions génomiques précises conduisent à une augmentation de fitness par rapport à la souche sauvage dans une ou plusieurs conditions de culture testées (Koskiniemi *et al.*, 2012).

Il a également été supposé que les petits génomes se répliquent plus rapidement à un coût énergétique moindre et possèdent donc un avantage sélectif. Cependant, une étude portant sur plusieurs groupes de bactéries montre que le temps de doublement des bactéries n'est pas corrélé à la taille du génome (Mira et al. 2001). En fait, le temps de division cellulaire dépend principalement de l'efficacité des ribosomes et de l'abondance des ARNt. En outre, jusqu'à 80 % de l'énergie de la cellule est consommé par le processus de traduction (Mira et al. 2001).

9.2.2. Fort taux de mutations

La perte de gènes pourrait être favorisée lorsque la bactérie colonise une nouvelle niche pour les bactéries ayant un fort taux de mutation (Batut et al. 2014; Martínez-Cano et al. 2015). Selon cette hypothèse, lorsque des changements environnementaux ont lieu, les bactéries ayant un fort taux de mutation pourraient acquérir rapidement des mutations bénéfiques dans ces nouvelles conditions. La sélection des allèles mutateur (qui augmentent le taux de mutation) ne se produit que si les avantages apportés par les mutations générées sont bénéfiques et compensent le coût d'autre mutation délétère que la bactérie est susceptible de porter (Denamur et Matic 2006). En absence de recombinaisons, la mutation bénéfique ainsi que le gène mutateur sont fixés dans la population. Un taux élevé de mutation peut mener à une évolution réductive, car il peut naturellement conduire à la perte de gènes non essentiels. En effet, un taux élevé de mutations va augmenter le nombre de gènes inactivés, qui deviennent des pseudogènes et qui seront éventuellement éliminés (Marais et al. 2008).-De plus, il a été également constaté que dans la majorité des bactéries présentant un taux élevé de mutations, les systèmes de réparation de l'ADN sont absents. La perte de gènes de réparation de l'ADN pourrait introduire un biais de composition de génome suite à l'enrichissement en bases A+T. Cet enrichissement conduit à la réduction de recombinaison avec la population ancestrale non porteuse de l'allèle mutateur, car celle-ci maintient son pourcentage G+C. À terme, cela conduit à l'isolement génétique de la population porteuse de l'allèle mutateur (Marais et al. 2008).

Cependant, les bactéries à fort taux de mutation perdent leur avantage sélectif si les mutations continuent à s'accumuler après l'adaptation à l'environnement, en particulier dans des environnements stables. Par conséquent, si la bactérie ne réduit pas son taux de mutation après adaptation à son environnement, elle sera éliminée et les gènes bénéfiques accumulés seront perdus, à moins que ces gènes ne soient récupérés par d'autres bactéries par transfert horizontal (Denamur et Matic 2006).

L'augmentation de taux de mutations pourrait également apporter une explication à l'évolution réductive, observée chez les souches de *Prochlorococcus*, des bactéries marines. En effet, ces souches présentent un taux de mutation élevé, une absence de gènes de réparation de l'ADN, ainsi qu'un faible pourcentage de bases G+C comparé à l'espèce proche *Synechococcus* (Marais et al. 2008).

Il est intéressant de noter que la plupart des lignées mutatrices isolées dans la nature sont des pathogènes humains, telles que *Salmonella enterica*, *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus*

influenzae. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les conditions de stress constantes auxquelles sont exposés les pathogènes à l'intérieur de l'hôte et les différents traitements antibiotiques favorisent la sélection des allèles mutateurs, accélérant ainsi l'évolution des souches pathogènes (Denamur et Matic 2006).

9.2.3. L'hypothèse de la reine noire

L'hypothèse de la reine noire suggère que la perte d'une fonction indispensable, qui a un coût élevé chez un individu, lui procure un avantage sélectif si cette fonction est assurée par d'autres organismes et mise à disposition par la communauté. La perte de cette fonction est favorisée tant que la communauté productrice fournit cette fonction indispensable en quantité suffisante (Morris et al. 2012). Cette hypothèse s'applique si la fonction en question remplit les conditions suivantes : 1) la fonction a un coût élevé sur le plan nutritionnel ou énergétique ; 2) la fonction est assurée par une fraction de la population ; 3) la fonction assurée est un bien public dont d'autres bactéries peuvent également bénéficier ; 4) la fonction/le bien public est indispensable pour la communauté et population productrice (Morris et al. 2012).

Morris et collaborateurs (2012) ont utilisé cette hypothèse pour expliquer l'absence du gène *katG* dans les génomes de *Prochlorococcus*. Chez les cyanobactéries, la catalase-peroxydase est le principal mécanisme de défense contre le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui est produit dans les océans par la photo-oxydation du carbone organique dissous. L'activité de la catalase-peroxydase nécessite la présence de fer. La perte de ce gène chez *Prochlorococcus* dans les eaux pauvres en fer confère un avantage sélectif en réduisant les besoins de ces bactéries en fer. En même temps, la production de catalase-peroxydase est conservée dans d'autres organismes de la communauté, et l'élimination du peroxyde d'hydrogène intracellulaire dans les organismes producteurs conduit simultanément à une réduction de la concentration de peroxyde d'hydrogène extracellulaire et assurant ainsi la protection des cellules voisines. L'hypothèse de la reine noire est similaire à la règle de Hamilton, les deux analysant le coût et le bénéfice associés à la production d'une fonction et à l'avantage sélectif qu'elle procure. Dans la théorie de Hamilton, le coût élevé de la fonction exercée par un individu est compensé par l'avantage sélectif des individus apparentés qui en bénéficient. Dans la théorie de la Reine noire, en revanche, le bien public est mis à la disposition de la communauté indépendamment de la relation entre le producteur et le bénéficiaire (Morris et al. 2012). Ces différentes hypothèses décrites, peuvent nous aider à analyser l'évolution réductive chez les bactéries libres, telle que *P. aquaticum* et *P. quasiquaticum*, et à déterminer les différents scénarios possibles qui ont conduit à ce type d'évolution.

Objectifs de thèse

Aujourd'hui, il est évident que les SRP ne sont pas limitées aux cultures économiquement importantes et qu'on les trouve également dans l'environnement (eau, sols, insectes). Ainsi, le suivi de l'abondance et de la diversité des SRP dans l'environnement est important pour évaluer le risque de contamination par les réservoirs environnementaux des champs agricoles et de prévoir des stratégies de lutte appropriées.

Avant mon arrivée en thèse, mes encadrants avaient réalisé une campagne d'échantillonnage d'eau entre 2015 et 2017, le long de la rivière Durance, en France. Le but de cet échantillonnage était de déterminer l'abondance, la distribution et la diversité des SRP à l'échelle d'un bassin versant. A l'issue de cet échantillonnage, environ 657 SRP ont été isolées, purifiées et mises en conservation et 598 ont été caractérisées par Mme Claire Bertrand, assistante ingénieure en CDD au sein de l'équipe. Les premières analyses ont permis de discriminer trois nouveaux clades ne correspondant pas à des espèces précédemment décrites. Deux de ces clades ont été analysés avant mon arrivée et leur analyse a conduit à décrire deux nouvelles espèces, *P. aquaticum* et *P. versatile* (Pédron et al. 2019; Portier et al. 2019). Le troisième nouveau clade, présent dans les eaux de la Durance, mais également isolé des lacs artificiels à CEREEP Ecotron, restait à analyser.

Sur la base des données issues de cet échantillonnage, j'ai essayé de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la diversité actuelle des SRP dans l'eau des rivières ?
- Quels facteurs environnementaux influencent l'abondance des SRP dans l'eau ?
- Quels risques l'eau représente-t-elle en tant que source d'inoculum ?
- Quelles sont les caractéristiques spécifiques des espèces isolées dans l'eau ?
- Quels déterminants génétiques favorisent la croissance et la survie des SRP dans l'eau ?

Les réponses à ces questions sont réparties en quatre chapitres :

- Dans le premier chapitre de mes résultats, j'ai caractérisé taxonomiquement le troisième clade de *Pectobacterium* isolé dans l'eau. L'analyse de ce clade a été entreprise lors de mon stage de Master 2, et cette analyse s'est poursuivie lors de ma première année de thèse. Ce travail a conduit à la description de la nouvelle espèce *Pectobacterium quasiquaticum* dans la revue de référence pour la taxonomie bactérienne

« International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology » (Ben Moussa *et al.*, 2021).

- Dans le deuxième chapitre de mes résultats, j'ai étudié la diversité, l'abondance et la répartition des SRP dans la rivière Durance. Ce travail a bénéficié des échantillonnages effectués tout au long du bassin versant de la Durance avant mon arrivée au laboratoire, comme mentionné précédemment. Lors de cette étude, j'ai participé à l'identification des groupes taxonomiques auxquels appartiennent les souches isolées d'eau en réalisant des analyses phylogénétiques avec trois méthodes différentes. Je suis co-premier auteur, avec C. Bertrand, des résultats présentés dans l'article "The Diversity and Abundance of Soft Rot *Pectobacteriaceae* Along the Durance River Stream in the Southeast of France Revealed by Multiple Seasonal Surveys" publié dans "Phytopathology" (Ben Moussa *et al.* 2022).
- Le troisième chapitre de mes résultats s'intéresse à l'analyse génomique et fonctionnelle des deux espèces proches *P. aquaticum* et *P. quasiquaticum*, isolées de l'eau, sans plante hôte connue. Ces deux espèces présentent une érosion génomique qui pourrait être liée à un changement de niche. Ce travail a donné lieu à un article récemment accepté et publié dans la revue « Environmental Microbiology » (Ben Moussa *et al.* 2023)
- Enfin, dans le quatrième chapitre, je présente la mise en place des expérimentations que j'ai menées dans le cadre de l'ANR TNPHYTO, dont l'objectif est d'identifier par la méthode Tn-Seq de nouveaux déterminants génétiques impliqués dans la pathogénicité sur les plantes et la survie et la croissance dans l'eau de trois groupes de bactéries : le complexe *Pseudomonas syringae* et les deux genres *Dickeya* et *Pectobacterium*. Plusieurs équipes de recherche, l'équipe MTSB (Unité de Microbiologie, Adaptation et Pathogénèse de Lyon), l'équipe MISTRAL (Unité de Recherche en Pathologie Végétale d'Avignon), Bilille (Plateforme Bioinformatique de Lille) et l'équipe Bioifx/Ptgx (Groupe Bioinformatique et Protéogénomique en Suisse) sont impliquées dans ce travail. Dans le cadre de ce projet, j'étais chargé de mettre en place un protocole pour cultiver les banques de mutants de trois groupes bactériens dans l'eau oligotrophe de la rivière, d'extraire l'ADN des mutants sélectionnés, puis d'analyser les données de séquençage des mutants afin d'identifier les gènes nécessaires à la survie et à la croissance des trois groupes bactériens dans l'eau oligotrophe.

Chapitre 2 : « description d'une nouvelle espèce *P. quasiaquaticum*, isolée d'eaux de surface en France »

1. Chapeau introductif

Comme présentée dans l'introduction générale, la taxonomie des SRP a été réévaluée plusieurs fois au cours des dernières décennies. Ces réévaluations étaient nécessaires au vu des limites des différentes méthodes de classification précédemment employées. En effet, jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle, la classification bactérienne reposait principalement sur des caractéristiques morphologiques, de croissance, ou sur le potentiel pathogène de l'organisme étudié. Au début du 20^{ème} siècle, l'étude des caractéristiques phénotypiques (physiologiques, biochimiques ou sérologiques) est devenue un critère essentiel pour l'identification et la classification des bactéries. Vers les années 1960, la méthode d'hybridation d'ADN-ADN (DDH) a été développée, cette méthode définit empiriquement des seuils (70% similarité et 5% de différence de température de fusion) pour la délimitation d'espèces. Cette méthode est devenue une méthode référence dans la taxonomie bactérienne (Wayne et al. 1987). De plus, suite aux travaux de Carl Woese (Woese et Fox 1977), l'analyse phylogénétique de l'ARN 16S est devenue importante pour la taxonomie des procaryotes. L'avènement des technologies de séquençage a permis le développement des méthodes phylogénétiques basées sur l'analyse de génomes, comme l'ANI et la digitale DDH (dDDH), comme alternative à la méthode DDH, chronophage et difficilement reproductible (Konstantinidis et Tiedje 2005; Meier-Kolthoff et al. 2013). Ces deux dernières méthodes définissent des seuils pour délimiter les espèces basées sur leur corrélation avec le seuil d'hybridation DDH empiriquement établi. Une analyse génomique effectuée sur 90 000 génomes procaryotes a confirmé l'existence d'une discontinuité génétique correspondant au seuil ANI déjà établi (Jain et al. 2018). Ces analyses de proximité génétique, ainsi que l'analyse MLSA, sont utilisées aujourd'hui, en appui des méthodes de phénotypage traditionnelles, et ont permis d'affiner la définition des espèces.

Bien qu'aucun protocole de classification officielle des procaryotes n'existe à présent (<https://lpsn.dsmz.de/text/introduction>), la revue de référence de taxonomie bactérienne « International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) » exige l'adoption d'une approche polyphasique, qui combine les résultats de tests phénotypiques et moléculaires pour classifier les bactéries. La phylogénie de l'ARN 16S est également requise, ainsi que le dépôt de la souche type dans deux collections internationales accessibles au public. L'acceptation d'un travail de taxonomie dans IJSEM permet de valider officiellement le nom de l'espèce décrite.

Avant le début de mon doctorat, une campagne d'échantillonnage a été menée, le long de la rivière Durance et dans les lacs artificiel Planaqua en France entre 2015-2017, ce qui avait permis l'isolement de centaines de souches de SRP. Ces souches isolées ont tout d'abord été caractérisées par l'amplification et le séquençage du gène de ménage *gapA*. L'arbre phylogénétique construit à l'aide des séquences *gapA* a révélé trois nouveaux clades qu'il convenait de caractériser plus précisément d'un point de vue taxonomique. Les deux premiers clades avaient déjà été analysés avant le début de mon doctorat et cela a permis de définir deux nouvelles espèces, *P. aquaticum* et *P. versatile* (Pédron et al. 2019; Portier et al. 2019). L'objectif de ce chapitre consiste à situer taxonomiquement le troisième clade '*P. quasiaquaticum*'.

Contribution :

Dans cet article, j'ai réalisé les différentes analyses phylogénétiques et les analyses de proximités génétiques, réalisé la mise en forme graphique des résultats, rédigé la première version du manuscrit et pris part aux corrections proposées lors de l'évaluation par les pairs.

2. Article 1 : « *Pectobacterium quasiaquaticum* sp. nov., isolated from waterways »

Pectobacterium quasiaoquaticum sp. nov., isolated from waterways

Hajar Ben Moussa, Jacques Pédrón, Claire Bertrand, Amandine Hecquet and Marie-Anne Barny*

Abstract

Through this study, we established the taxonomic status of seven strains belonging to the genus *Pectobacterium* (A477-S1-J17^T, A398-S21-F17, A535-S3-A17, A411-S4-F17, A113-S21-F16, FL63-S17 and FL60-S17) collected from four different river streams and an artificial lake in south-east France between 2016 and 2017. Ecological surveys in rivers and lakes pointed out different repartition of strains belonging to this clade compared to the closest species, *Pectobacterium aquaticum*. The main phenotypic difference observed between these strains and the *P. aquaticum* type strain was strongly impaired growth with rhamnose as the sole carbon source. This correlates with three different forms of pseudogenization of the L-rhamnose/proton symporter gene *rhaT* in the genomes of strains belonging to this clade. Phylogenetic analysis using *gapA* gene sequences and multi locus sequence analysis of the core genome showed that these strains formed a distinct clade within the genus *Pectobacterium* closely related to *P. aquaticum*. Digital DNA–DNA hybridization (dDDH) and average nucleotide identity (ANI) values showed a clear discontinuity between the new clade and *P. aquaticum*. However, the calculated values are potentially consistent with either splitting or merging of this new clade with *P. aquaticum*. In support of the split, ANI coverages were higher within this new clade than between this new clade and *P. aquaticum*. The split is also consistent with the range of observed ANI or dDDH values that currently separate several accepted species within the genus *Pectobacterium*. On the basis of these data, strains A477-S1-J17^T, A398-S21-F17, A535-S3-A17, A411-S4-F17, A113-S21-F16, FL63-S17 and FL60-S17 represent a novel species of the genus *Pectobacterium*, for which the name *Pectobacterium quasiaoquaticum* sp. nov. is proposed. The type strain is A477-S1-J17^T (=CFBP 8805^T=LMG 32181^T).

INTRODUCTION

The genus *Pectobacterium* belongs to the family *Pectobacteriaceae* of the order *Enterobacteriales* [1]. This genus groups bacteria that are well known for their ability to secrete a large cocktail of plant cell-wall degrading enzymes inducing soft rot symptoms in a large variety of plants around the world [2], which results in reduced yields and significant crop production losses. The genus *Pectobacterium* currently includes 17 described species: *Pectobacterium aquaticum* [3], *Pectobacterium actinidiae* [4], *Pectobacterium aroidearum* [5], *Pectobacterium atrosepticum* [6], *Pectobacterium betavascularum* [6], *Pectobacterium brasiliense* [4], *Pectobacterium carotovorum* [4], *Pectobacterium cacticidum* [7], *Pectobacterium fontis* [8], *Pectobacterium odoriferum* [4], *Pectobacterium parmentieri* [9], *Pectobacterium polaris* [10], *Pectobacterium polonicum* [11], *Pectobacterium punjabense* [12], *Pectobacterium versatile* [4], *Pectobacterium wasabiae* [6], *Pectobacterium parvum* [13] and two proposed species not yet validated by *ad hoc*

committees: '*Pectobacterium zantedeschiae*' [14] and '*Pectobacterium peruviense*' [15].

Several of the above-mentioned species are closely related and were previously grouped within the same species. Notably, *P. carotovorum* was previously highly heterogeneous and regrouped within the same clade with two species *P. aquaticum* and *P. polaris* that were embedded within accepted or proposed subspecies previously named *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*, '*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*' and '*Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae*'. To avoid incongruity between the taxonomic status of the species and subspecies within this large clade, all the subspecies were recently elevated at the species level [4]. This analysis also allowed to distinguish the new species, *P. versatile*, closely related to *P. carotovorum* [4]. Moreover, the *P. polaris* clade was also recently split into two closely related species, *P. polaris* and *P. parvum* [13].

Author affiliations: ¹Sorbonne Université, INRAE, Institute of Ecology and Environmental Sciences-Paris, 4 place 7 Jussieu, F-75 252 Paris, France.

***Correspondence:** Marie-Anne Barny, marie-anne.barny@sorbonne-universite.fr

Keywords: *Enterobacteriales*; plant pathogen; *Pectobacterium*; *Pectobacteriaceae*; soft rot.

Abbreviations: ANI, average nucleotide identity; CVP, crystal violet pectate; dDDH, digital DNA–DNA hybridization; MLSA, multi locus sequence analysis.

The seven genomes described in this manuscript have been deposited in the GenBank database under the bioproject number PRJNA662694. Four supplementary tables and four supplementary figures are available with the online version of this article.

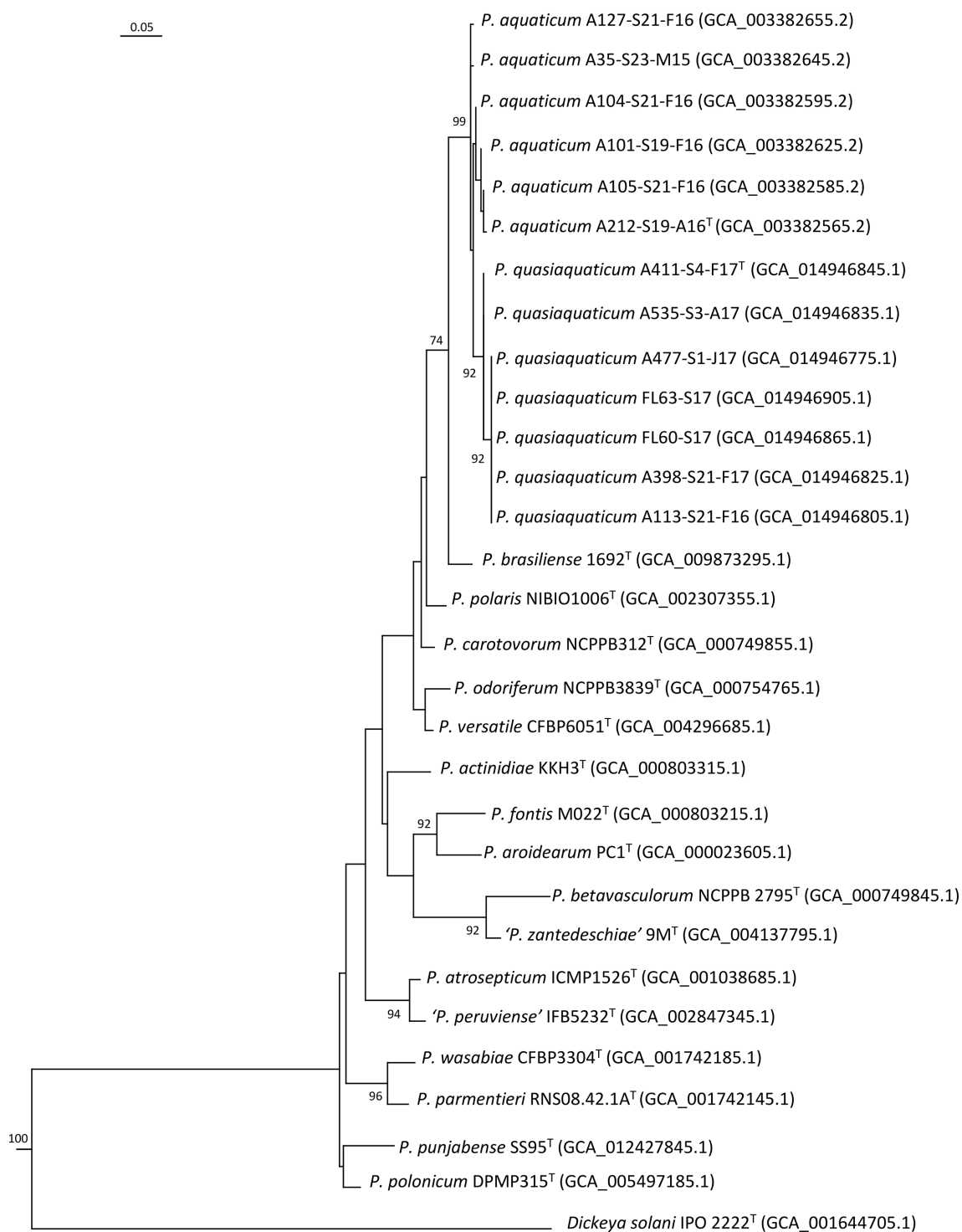


Fig. 1. *gapA* phylogenetic tree of *P. quasiaquaticum* sp. nov. strains and type strains of other *Pectobacterium* species. Phylogenetic tree reconstructed from the *gapA* nucleotide sequences. Accession numbers are indicated in brackets after the strain name. Only bootstrap support values above 70% are indicated. Bar, 0.05 changes per nucleotide position. *Dickeya solani* IPO2222^T was used as an outgroup.

To date, most *Pectobacterium* species have been described following sampling and isolation from diseased host plants during outbreaks or sustained epidemics and their descriptions outside the agricultural context are rare [16]. Nevertheless,

previous studies have indicated that *Pectobacterium* species could be isolated from a variety of non-host environments, such as water, soil or air [16–19]. Recently, several species isolated from fresh water have been described. *P. aquaticum*

Table 1. Descriptive table of the seven genomes of *P. quasиаquaticum*

Strain name	Isolation date	Isolation site*	Genome accessions	Genome coverage	no. of contigs	Genome size (pb)	G+C (mol%)	Protein coding genes
A113-S21-F16	02–2016	S21	JACYTG010000000	165	85	4421657	51.42	4345
A398-S21-F17	02–2017	S21	JACYTH010000000	204	81	4248246	51.73	4152
A411-S4-F17	02–2017	S4	JACYTI010000000	208	96	4301740	51.4	4210
A477-S1-J17 ^T	06–2017	S1	JACYTJ010000000	186	87	4398604	51.68	4293
A535-S3-A17	08–2017	S3	JACYTK010000000	233	95	4334305	51.41	4259
FL60-S17	09–2017	Sf	JACYTM010000000	156	141	4286319	51.51	4215
FL63-S17	09–2017	Sf	JACYTL010000000	205	92	4267445	51.53	4148

*Isolation sites: S21, River Grand-Anguillon at Nove; S4, River Durance at Sisteron; S1, Irrigation canal at Logis Neuf; S3, River Durance at Manosque; Sf, CEREEP Ecotron artificial lakes.

strains were isolated from river streams in France [3], *P. polonicum* strains were isolated from ground water in Poland [11] and the *P. fontis* strain was isolated from a waterfall in Malaysia [8]. Here, we describe a new *Pectobacterium* species *Pectobacterium quasиаquaticum* sp. nov. that was recovered between 2016 and 2017 from river and artificial lakes water in France.

ISOLATION AND ECOLOGY

In this study, we established the taxonomic position of seven strains (A477-S1-J17^T, A398-S21-F17, A535-S3-A17, A411-S4-F17, A113-S21-F16, FL63-S17 and FL60-S17) that were collected in 2016 and 2017 during two different freshwater surveys performed along a river stream in south-east France and from the CEREEP Ecotron artificial lakes located in the South of Paris. Water samples (150 or 500 ml) collected from the surface water were filtered through 0.2 µm pore filters (Sartorius cellulose acetate filter). The bacteria retained on the filter were resuspended in 1 ml sterile distilled water and 100 µl was spread over the CVP (crystal violet pectate) plates [20]. Colonies forming pits on CVP medium were isolated and characterized.

As described below, these seven strains formed a clade distinct from the closely related species *P. aquaticum*. No strain isolated from a host plant have been described for *P. aquaticum* or the new clade in the recent taxonomy update of 265 strains of *Pectobacterium* species hosted at the CIRM-CFBP collection that gathers strains isolated since 1944 from all over the world [21]. Potential host plants for each clade are currently unknown. Nevertheless, *P. aquaticum* has the capacity to macerate potato slices indicating its potential to infect plants or to degrade plant debris [3]. We therefore checked if strains of the new clade were able to macerate potato slices. The strains were grown overnight in LB medium devoid of NaCl (hereafter LB: 10 g l⁻¹ tryptone, 5 g l⁻¹ yeast extract, 15 g l⁻¹ agar) under agitation at 27.6 °C. The bacterial cultures (100 µl) were spread on a 10% TSA plate (14 g l⁻¹ agar, 3 g l⁻¹ tryptic soy broth) and placed at 27.6 °C for 24 h. The bacteria were then scraped off the plates and resuspended

in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8), adjusted to an OD_{600nm} of 1, and 10 µl was placed on the surface of the potato slices. As a negative control, a potato slice was inoculated with 10 µl of 50 mM phosphate buffer (pH 6.8). This test showed that strains of the new clade were also able to macerate potato tuber slices (Fig. S1, available in the online version of this article), indicating that strains of this new clade also potentially infect plants or degrade plant debris. Although both *P. aquaticum* and the new clade were isolated from water, their potential virulence in plants suggests that water may not be their primary habitat. This is reinforced by the fact that *Pectobacterium* species remains rare in water and are only isolated from water thanks to a very efficient selective medium [22]. Interestingly, our ecological survey of river and artificial lake water highlighted a differential repartition of *P. aquaticum* and strains of the new clade in surface water. An extensive 2-year survey of the river Durance watershed that covers 14280 km² allowed isolation of 219 *P. aquaticum* strains while only 13 isolates belonging to the new clade were identified. Conversely, during a 2-year survey at the CEREEP Ecotron artificial lakes, seven strains of the new clades were isolated while only one strain of *P. aquaticum* was found. The differential presence of *P. aquaticum* and the new clade in different places suggested a different ecological niche for the new clade and *P. aquaticum*. While the exact nature of these ecological niches remains to be determined, one could hypothesize that strains of *P. aquaticum* and strains of the new clade are likely associated with different plants. The differential presence of both clades in water prompted us to evaluate whether this new clade could represent a species distinct from *P. aquaticum*.

16S rRNA AND GAPA GENE PHYLOGENIES

The 16S rRNA gene phylogeny including the 16S rRNA genes from the seven studied strains, six *P. aquaticum* strains, 16 strains of other *Pectobacterium* species type strains and the outgroup 16S rRNA gene sequence of *Dickeya solani* was performed. The 16S rRNA gene nucleotide sequences were aligned using the MUSCLE software [23] and filtered using the gBlocks tool [24]. The alignments were used to build a

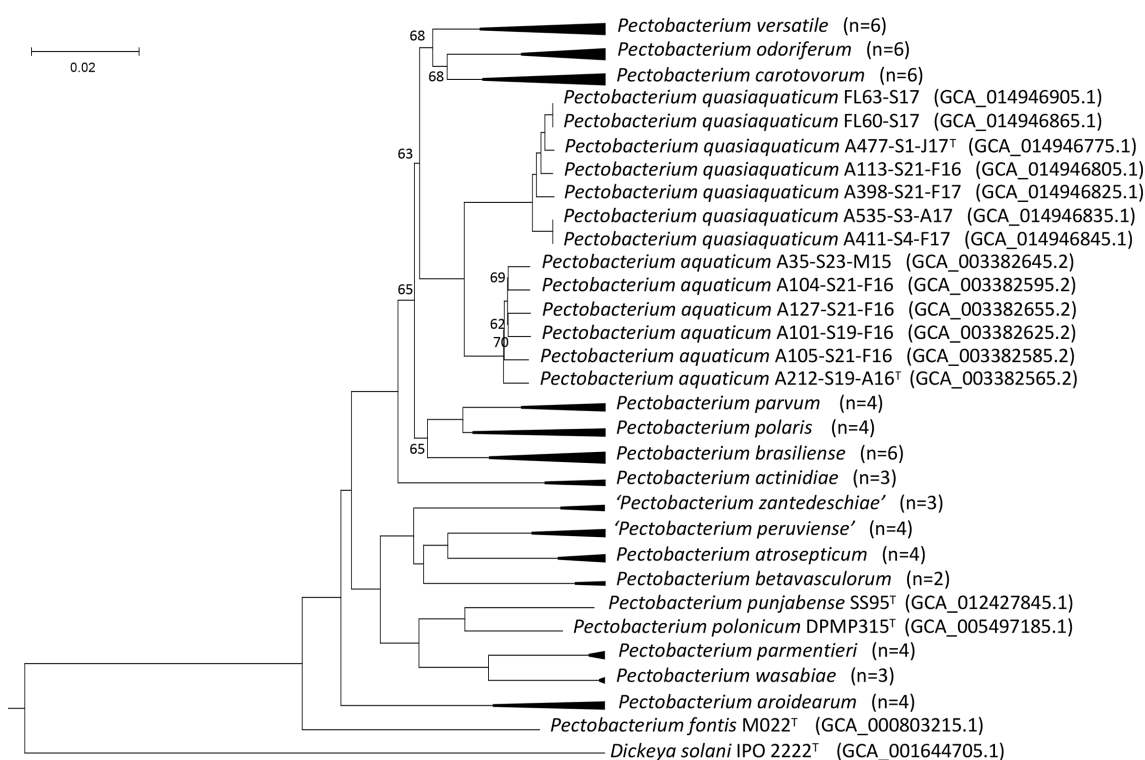


Fig. 2. MLSA phylogenetic tree of *P. quasiaquaticum* sp. nov. strains and strains of other *Pectobacterium* species. MLSA phylogenetic tree reconstructed from concatenated nucleotide sequences of 265 homologous gene sequences of 75 *Pectobacterium* genomes. The bootstrap support values are indicated if less than 100%. The number of analysed genomes per species is indicated in bracket after name of the species. *Dickeya solani* IPO2222^T was used as an outgroup. Bar, 0.02 changes per nucleotide position. For single strain branches, accession numbers are indicated in brackets after the strain name. Extended version of this phylogenetic tree is provided Fig. S3 with accession numbers of each genome.

phylogenetic tree using the PhyML algorithm [25] based on the Tamura–Nei model [26] with SeaView software [27] and 200 bootstrap replications. The generated 16S rRNA gene phylogeny separated the seven studied strains from the species *P. aquaticum* but the bootstrap at the separation node was less than 50% (Fig. S2). Furthermore, '*P. zantedeschiae*' and *P. fontis* grouped with the seven studied strains (Fig. S2).

The poor discriminative resolution of 16S rRNA phylogeny within the order *Enterobacteriales* has been previously noted by Adeolu *et al.* [1]. We therefore decided to use the house-keeping gene *gapA* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) as an alternative to the 16S rRNA gene phylogeny. The *gapA* gene is present in each genome in a single copy and was described as appropriate for quickly characterizing the different *Pectobacterium* species [28]. The *gapA* genes were aligned using the MUSCLE [23] software and were filtered using the gBlocks tool [24]. The alignments were used for building a phylogenetic tree with the PhyML algorithm based on the Tamura–Nei model [26] with SeaView software [27] and 200 bootstrap replications. The *gapA* gene phylogeny showed that the seven studied strains grouped together and formed a new clade, close to the clade formed by the *P. aquaticum* species but clearly separated from it and from other *Pectobacterium* species (Fig. 1).

GENOME FEATURES

To further characterize this clade, genomes of the seven studied strains were sequenced. For genome sequencing, the genomic DNA was first prepared by growing the strains overnight at 28 °C on solid LB medium. A single colony was then picked up and grown overnight in 2 ml liquid LB medium at 28 °C with 120 r.p.m. shaking. Bacterial cells were harvested by centrifugation (5 min at 12000 r.p.m.) and DNA was extracted with the Genomic DNA Extraction Kit (Promega) according to the supplier's specifications. The DNA was suspended in 100 µl sterile distilled water and the quantity and quality of the DNA was assessed by nanodrop measurement, spectrophotometric analysis and gel analysis. Nextera DNA libraries were then prepared from 50 ng of high-quality genomic DNA. These libraries were sequenced at the next-generation sequencing core facilities at the Institute of Integrative Biology of the Cell (Avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France). Paired-end 2×75 pb sequencing was performed on an Illumina NextSeq500 instrument, with a High Output 150 cycle kit. The readings were assembled using the CLC Genomics Workbench (version 9.5.2, Qiagen Bioinformatics). Coding sequences were predicted and annotated using the PATRIC RASTtk genome annotation service [29]. Genome assembly statistics are indicated in Table 1.

Table 2. ANI (lower diagonal) and dDDH (top diagonal) values between *P. quasiquaticum* strains sp. nov. and *P. aquaticum* strains and *P. brasiliense* 1692^T

ANI values $\geq 96\%$ are indicated in red, ANI values between 96–95% are indicated in light purple and ANI values $\leq 95\%$ are indicated in blue, dDDH values $\geq 70\%$ are indicated in pale red and dDDH values below 70% are indicated in blue.

	<i>P. quasiquaticum</i> A411-S4-F17	<i>P. quasiquaticum</i> A535-S3-A17	<i>P. quasiquaticum</i> A398-S21-F17	<i>P. quasiquaticum</i> A113-S21-F16	<i>P. quasiquaticum</i> A477-S1-J17 ^T	<i>P. quasiquaticum</i> FL60-S17	<i>P. quasiquaticum</i> FL63-S17	<i>P. aquaticum</i> A127-S21-F16	<i>P. aquaticum</i> A35-S23-M15	<i>P. aquaticum</i> A104-S21-F16	<i>P. aquaticum</i> A101-S19-F16	<i>P. aquaticum</i> A105-S21-F16	<i>P. aquaticum</i> A212-S19-A16 ^T	<i>P. brasiliense</i> 1692 ^T
<i>P. quasiquaticum</i> A411-S4-F17	100.0	100.0	90.9	89.8	91.2	90.3	90.2	64.4	64.2	64.0	64.9	63.9	65.3	55.7
<i>P. quasiquaticum</i> A535-S3-A17	100.0	100.0	90.8	89.8	91.1	90.2	90.2	64.4	64.2	64.1	64.9	63.9	65.3	55.8
<i>P. quasiquaticum</i> A398-S21-F17	98.9	98.9	100.0	89.5	90.6	89.7	89.7	64.4	63.8	63.9	64.4	63.7	64.8	55.6
<i>P. quasiquaticum</i> A113-S21-F16	98.8	98.7	98.7	100.0	95.6	95.2	95.2	64.5	64.0	64.1	64.6	63.7	64.1	55.4
<i>P. quasiquaticum</i> A477-S1-J17 ^T	98.9	98.9	98.9	99.4	100.0	96.5	96.5	64.4	64.2	63.9	64.9	64.0	64.9	55.1
<i>P. quasiquaticum</i> FL60-S17	98.8	98.8	98.7	99.4	99.5	100.0	99.9	65.5	65.1	65.6	65.7	65.0	65.8	55.3
<i>P. quasiquaticum</i> FL63-S17	98.8	98.8	98.7	99.3	99.5	99.9	100.0	65.6	65.2	65.6	65.7	65.1	65.9	55.4
<i>P. aquaticum</i> A127-S21-F16	95.5	95.6	95.5	95.6	95.5	95.7	95.8	100.0	90.5	89.4	88.7	87.9	86.2	51.4
<i>P. aquaticum</i> A35-S23-M15	95.4	95.5	95.5	95.5	95.5	95.6	95.7	98.8	100.0	88.5	88.8	87.6	86.8	51.4
<i>P. aquaticum</i> A104-S21-F16	95.4	95.5	95.4	95.5	95.4	95.7	95.8	98.7	98.6	100.0	88.8	87.3	87.7	51.3
<i>P. aquaticum</i> A101-S19-F16	95.6	95.6	95.5	95.6	95.6	95.7	95.8	98.6	98.7	98.7	100.0	88.9	88.1	51.6
<i>P. aquaticum</i> A105-S21-F16	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.7	95.7	98.6	98.5	98.5	98.7	100.0	87.8	51.4
<i>P. aquaticum</i> A212-S19-A16 ^T	95.7	95.7	95.6	95.5	95.6	95.7	95.8	98.3	98.4	98.5	98.6	98.5	100.0	51.7
<i>P. brasiliense</i> 1692 ^T	94.0	94.0	94.0	94.0	93.8	93.9	94.0	93.1	93.1	93.1	93.2	93.1	93.2	100.0

Multilocus sequence analysis (MLSA) was performed using the concatenated nucleotide sequences of 265 homologous genes of the core genome (Table S1) of the seven studied strains as well as those of six strains of the *P. aquaticum* species and those 62 *Pectobacterium* genomes representative of the whole genus *Pectobacterium*. Multigenic homologous families were excluded to avoid confusion between orthologs and paralogs. The clustering of homologous nucleotide sequences was performed with SiLix [30] software with a 80% identity threshold. Homologous sequences of each gene were aligned using MUSCLE [23] software and then concatenated. The alignments were filtered using the gBlocks tool [24] resulting in a data set of 297907 sites (of which 67801 are informative). All the scripts used are available online (<https://zenodo.org/record/2639652>) as described in [4]. The tree was computed with SeaView software [27] using the BioNJ method [31]. Bootstrap percentages were calculated based on 200 replicates. This analysis confirmed that these seven strains constitute a well-separated clade (Figs 2 and S3 for extended tree) supporting the phylogenetic analysis previously performed with the *gapA* housekeeping gene.

To further define the genetic proximity of this new clade to the species *P. aquaticum* and the other species of the genus *Pectobacterium*, the average nucleotide identity (ANI) values were calculated using the python3s script pyani [32] (<https://github.com/widdowquinn/pyani>) with the BLAST algorithm (ANIb; Table 2, for pairwise ANI with all *Pectobacterium* species see Table S2). There is a clear discontinuity of ANI values between the new clade and *P. aquaticum* (Table 2). However, ANI values between this new clade and the *P. aquaticum* remains in the borderline to separate species (Tables 2 and 3). These observed ANI values are nevertheless in the same range as the one that currently separates *P. versatile* and *P. carotovorum* ([4] and Tables 3 and S2) and are slightly lower than the one that separates *P. parvum* from *P. polaris* ([13] and Tables 3 and S2). Furthermore, the range of coverage between *P. aquaticum* and the new clade (84.5–79.0%) is lower than the range of coverage within *P. aquaticum* (91.9–85.7%) or within the new clade (99.3–88.6%) further supporting the split rather than the merge of *P. aquaticum* and the new clade (Table 3).

We also calculated digital DNA–DNA hybridization (dddH) values. The dddH was proposed to resemble wet-lab DDH

Table 3. Range of ANIb (identity/coverage) and dDDH (excluding near identities –100 and 99.9%) within and between related species

The number of analysed genomes is indicated in brackets. Details of pairwise comparisons are presented in Fig. S2.

Analysed genomes*	ANIb identity (%)	ANIb coverage (%)	dDDH (%)
<i>P. quasiquaticum</i> – <i>P. quasiquaticum</i> (7×7)	99.5–98.7	99.8–88.6	96.5–89.5
<i>P. aquaticum</i> – <i>P. aquaticum</i> (6×6)	98.9–98.3	91.9–85.7	90.5–86.2
<i>P. aquaticum</i> – <i>P. quasiquaticum</i> (6×7)	95.8–95.4	84.5–79.0	65.9–63.7
<i>P. parvum</i> – <i>P. parvum</i> (3×3)*	99.5–99.3	99.5–93.2	99.6–95.2
<i>P. polaris</i> – <i>P. polaris</i> (4×4)	97.1–96.8	87.5–82.8	74.4–73.3
<i>P. polaris</i> – <i>P. parvum</i> (4×3)*	96.1–95.9	79.7–73.9	68.4–66.4
<i>P. versatile</i> – <i>P. versatile</i> (6×6)	98.2–97.4	90.6–83.2	83.8–78.4
<i>P. carotovorum</i> – <i>P. carotovorum</i> (6×6)	98.1–97.1	93.9–85.2	83.5–75.6
<i>P. versatile</i> – <i>P. carotovorum</i> (6×6)	95.6–95.3	88.2–79.3	64.6–62.6

*The genome of strain *P. parvum* Y1 used in MLSA (Fig. 2) was excluded from this table as sequence is short and may lack a substantial part of the genome [13].

as close as possible [33]. The lowest dDDH value between the seven studied genomes was 89.5% and dDDH values dropped to 65.9% when comparing these seven genomes to those of closest species *P. aquaticum* (Table 2). Again, the dDDH values between *P. aquaticum* and the new clade are at the borderline to separate species (Table 2). Nevertheless, one could observe that these dDDH values are lower than the one observed between the closely related species *P. parvum* and *P. polaris* ([13] Tables 3 and S2) further supporting the discrimination between this new clade and *P. aquaticum*.

PHYSIOLOGY AND CHEMOTAXONOMY

In order to determine the distinctive metabolic traits between *P. aquaticum* and the new clade, biochemical tests were performed with Biolog GENIII MicroPlates using the inoculation fluid IF-A following the supplier's recommendations. The MicroPlates were incubated at 28 °C and optical density at 595 nm was read after 24 h incubation with an i-Mark Bio-Rad microplate reader. The tested strains were the type strain of *P. aquaticum* A212-S19-A16^T and five strains of the new clade (A477-S1-J17^T, A113-S21-F16, A411-S4-F17, FL63-S17 and FL60-S17). These biochemical tests revealed a few differences (Tables 4 and S3 for complete

results). First, strains FL63-S17 and FL60-S17, both isolated from an artificial lake, were the only tested strains that could not grow in the presence of D-aspartic acid. In addition, the *P. aquaticum* type strain grew poorly in the presence of lithium chloride, while strains of the new clade grew well in its presence. Strains of the new clade were also unable or weakly able to use L-rhamnose as the only carbon source while the type strain of *P. aquaticum* can efficiently metabolize L-rhamnose. Further investigations confirmed strongly impaired growth in M63 medium with rhamnose as the sole carbon source (rhamnose 0.02%, KH₂PO₄ 13.6 g l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 2 g l⁻¹, FeSO₄ 10 mM 200 μl l⁻¹, NaCl 10 g l⁻¹; pH adjusted to 7 with KOH 10 M) at 28 °C, 170 r.p.m. (Fig. 3). This phenotypic difference is stronger than the phenotypic difference described between *P. punjabense* and *P. parmentieri* or between *P. polaris* and *P. carotovorum* [10, 12]. This impaired growth with rhamnose as the sole carbon source correlates with three different forms of pseudogenization of the L-rhamnose/proton symporter gene *rhaT* in the genomes of strains belonging to this new clade, while this gene was found intact in all the sequenced genomes of *P. aquaticum* (Fig. 3). In the genome of strain NAK:467 recently available in NCBI (accession GCA_016949085.1), the L-rhamnose/

Table 4. Biolog GENII main phenotypic differences between *P. quasiquaticum* and *P. aquaticum*

+, Positive; w, weakly positive; –, negative.

Test	<i>P. aquaticum</i> A212-S19-A16 ^T	<i>P. quasiquaticum</i> A113-S21-F16	<i>P. quasiquaticum</i> A411-S4-F17	<i>P. quasiquaticum</i> A477-S1-J17 ^T	<i>P. quasiquaticum</i> FL63-S17	<i>P. quasiquaticum</i> FL60-S17
D-Aspartic acid	+	+	+	+	–	–
L-Rhamnose	+	w	w	w	–	w
4% NaCl	w	–	–	–	–	–
Lithium chloride	w	+	+	+	+	+

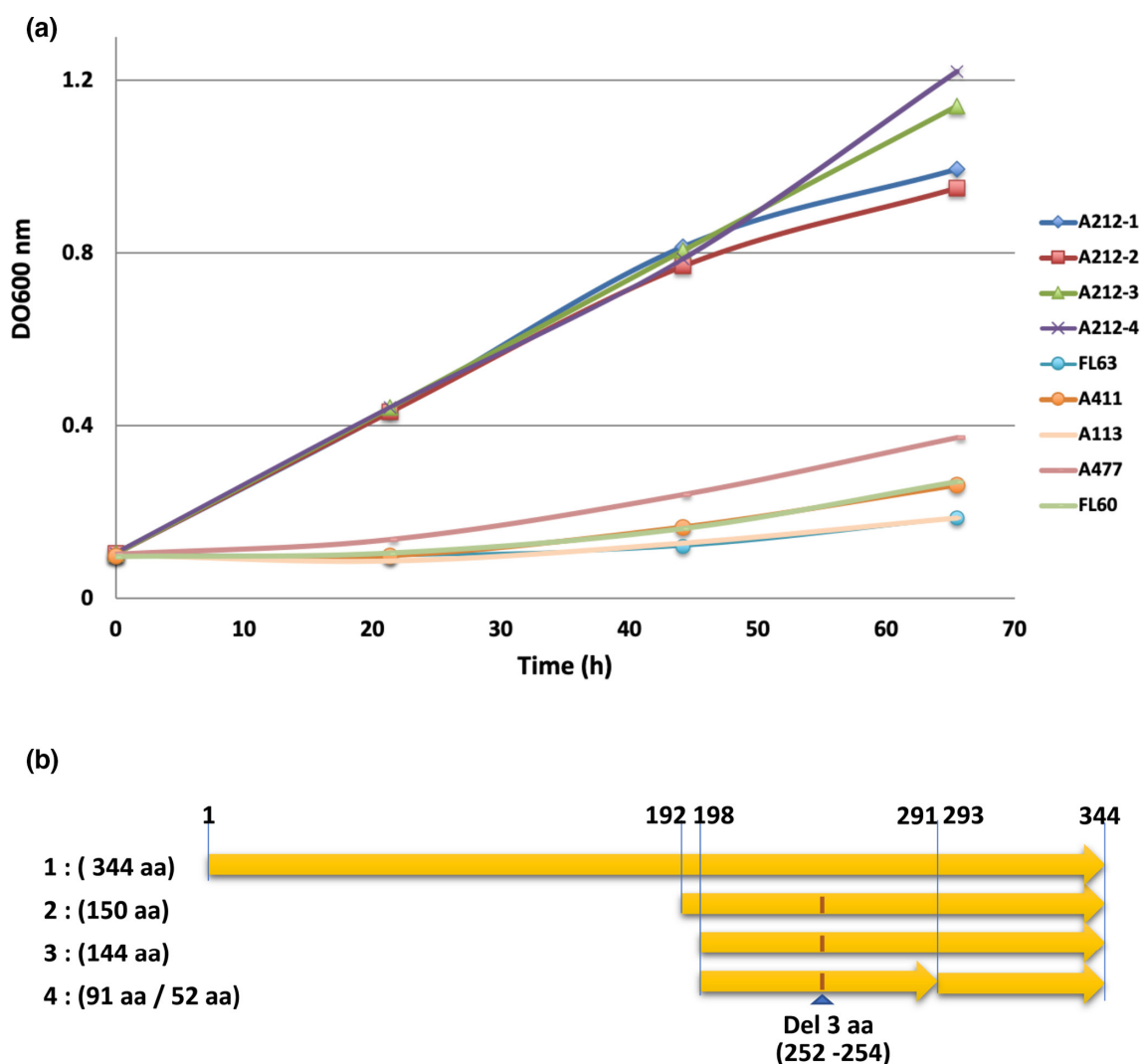


Fig. 3. Impaired growth of *P. quasiquaticum* strains in rhamnose M63 medium correlates with pseudogenization of the L-rhamnose/proton symporter RhaT. (a) Growth of *P. aquaticum* A212-S19-A16 (four replicates) and *P. quasiquaticum* strains A477-S1-J17^T, A411-S4-F17, A113-S21-F16, FL63-S17 and FL60-S17 in M63-rhamnose medium. (b) Alignment of the L-rhamnose/proton symporter RhaT. 1: genomes of *P. aquaticum* strains A212-S19-A16, A105-S21-F16, A35-S23_M15, A101-S19-F16, A104-S21-F16 and A127-S21-F16 code for a 344 amino acids long RhaT protein. 2: genomes of strain A398-S21-F17 code for a truncated version of 150 amino acids. 3: genomes of strains A113-S21-F16, A411-S4-F17, A535-S3-A17 code for a smaller truncated version of 144 amino acids. 4: genomes of strains FL60-S17, A477-S1-J17, FL63-S17 and NAK:467 code for a further truncated version where a tryptophan is replaced by a stop codon leading to two short open reading frames of 91 and 52 amino acids.

proton symporter gene *rhaT* was also truncated (Fig. 3). Accordingly, ANIm and MLSA analysis (Fig S4 and Table S4) indicated that strain NAK:467 belongs to the new clade. Interestingly, in plants, rhamnose is primarily found in the pectic matrix of the plant cell wall and rhamnose accumulation in the cell wall of grasses is significantly smaller than the amount of rhamnose in the cell wall of dicots [34]. As degradation of the plant cell wall is the main pathogenicity factor within the genus *Pectobacterium*, the pseudogenization of the L-rhamnose/proton symporter gene *rhaT* for strains of the new clade suggests that strains of the new clade may preferentially infect grasses while *P. aquaticum* retains the ability to infect dicots. This hypothesis remains

to be confirmed with identification of plants infected by strains of *P. aquaticum* and strains of the new clade. Given the differential amount of rhamnose in different plants [34], this pseudogenization may be interpreted as a sign of evolutionary divergence between the new clade and *P. aquaticum*.

DESCRIPTION OF *PECTOBACTERIUM QUASIAQUATICUM* SP. NOV.

Pectobacterium quasiquaticum (qua.si.a.qua'ti.cum. L. adv. quasi almost, nearly; L. neut. adj. *aquaticum* aquatic, and a

specific epithet in the genus *Pectobacterium*; N.L. neut. adj. *quasiaquaticum* referring to the fact that the species is most closely related to *Pectobacterium aquaticum*).

Gram-negative, motile bacterium, grows optimally at 28 °C in LB medium without NaCl (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 15 g agar per litre of medium). Forms pits within 48 h when grown at 28 °C on CVP medium [35]. Using GENIII Biolog MicroPlates, the *P. quasiaquaticum* strains were negative for 3-O-methyl-D-glucose, 4% NaCl, 8% NaCl, acetoacetic acid, aztreonam, D-arabitol, cellobiose, D-fucose, D-glucuronic acid, D-lactic acid methyl ester, D-malic acid, maltose, D-serine, D-sorbitol, trehalose, turanose, dextrin, gelatin, glucuronamide, Gly-Pro, inosine, L-alanine, L-arginine, L-fucose, L-histidine, L-lactic acid, L-pyroglytamic acid, minocycline, N-acetyl-neuraminic acid, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-β-D-mannosamine, nalidixic acid, potassium tellurite, propionic acid, quinic acid, sodium bromate, stachyose, Tween 40, α-hydroxy-butyric acid, α-keto-butyric acid, α-keto-glutaric acid, β-hydroxy-butyric acid, p-hydroxy-phenylacetic acid and γ-amino-n-butyric acid; weakly or variably reacting for D-aspartic acid, sodium formate, L-glutamic acid, L-rhamnose and at pH 5; and were positive for 1% NaCl, 1% sodium lactate, acetic acid, bromo-succinic acid, citric acid, D-fructose, D-fructose-6-phosphate, D-galactose, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucose 6-phosphate, D-mannitol, D-mannose, melibiose, raffinose, D-saccharic acid, D-salicin, fusidic acid, β-gentiobiose, glycerol, guanidine hydrochloride, L-aspartic acid, L-galactonic acid-γ-lactone, L-malic acid, L-serine, lincomycin, methyl pyruvate, mucic acid, myo-inositol, N-acetyl-D-glucosamine, niaproof, pectin, pH 6, tifamycin SV, butyric acid, sucrose, tetrazolium blue, tetrazolium violet, troleandomycin, vancomycin, D-glucose, lactose and methyl β-D-glucoside.

The type strain is A477-S1-J17^T (=CFBP 8805^T=LMG 32181^T), which was isolated in 2017 from the Durance river at Sisteron, France. The G+C content of the type strain DNA is 51.68mol%. A398-S21-F17, A535-S3-A17, A411-S4-F17, A113-S21-F16, FL63-S17, FL60-S17 and NAK:467 are additional strains of the species.

Funding information

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche ANR-17-CE32-0004 and the CNRS Ec2Co programme (EC2COBiohefect/Ecodyn/Dril/MicrobienCARTOBACTER). The sampling campaigns realized in the CEREEP-Ecotron Ile-De-France benefited from the support received by the infrastructure PLANAQUA under the programme 'Investissements d'Avenir' launched by the French government and implemented by ANR with the references ANR-10-EQPX-13-01 Plan aqua and ANR-11-INBS-0001 AnaEE France.

Acknowledgements

We thank Odile Berge and Frederique Van Gijsegem for their help during river samplings and Ariane Toussaint and Antoine Pourbaix for hosting us during the field samplings. We would also like to thank the 'Plateforme expérimentale nationale d'écologie aquatique' (PLANAQUA) of the CEREEP-Ecotron Ile-De-France for the access to the artificial lakes and associated facilities and the expertise of the high-throughput sequencing platform at I2BC, Gif sur Yvette, France for genome sequencing. The authors wish also to thank the reviewers for their useful comments.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Adeolu M, Alnajjar S, Naushad SS, Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacteriales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:5575–5599.
- Ma B, Hibbing ME, Kim H-S, Reedy RM, Yedidia I, et al. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* 2007;97:1150–1163.
- Pédron J, Bertrand C, Taghouti G, Portier P, Barny M-A. *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *Int J Syst Evol Microbiol* 2019;69:745–751.
- Portier P, Pédron J, Taghouti G, Fischer-Le Saux M, Caullireau E, et al. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 2019;69:3207–3216.
- Nabhan S, De Boer SH, Maiss E, Wydra K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;63:2520–2525.
- Gardan L, Gouy C, Richard C, Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53:381–391.
- Alcorn SM, Orum TV, Steigerwalt AG, Foster JLM, Fogleman JC, et al. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacticida* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:197–212.
- Oulghazi S, Cigna J, Lau YY, Moumni M, Chan KG, et al. Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus *Pectobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2019;69:470–475.
- Khayri S, Cigna J, Chong TM, Quétu-Laurent A, Chan KG, et al. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:5379–5383.
- Dees MW, Lysøe E, Rossmann S, Perminow J, Brurberg MB. *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2017;67:5222–5229.
- Waleron M, Misztak A, Waleron M, Jonca J, Furmaniak M, et al. *Pectobacterium polonicum* sp. nov. isolated from vegetable fields. *Int J Syst Evol Microbiol* 2019;69:1751–1759.
- Sarfraz S, Riaz K, Oulghazi S, Cigna J, Sahi ST, et al. *Pectobacterium punjabense* sp. nov., isolated from blackleg symptoms of potato plants in Pakistan. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018;68:3551–3556.
- Pasanen M, Waleron M, Schott T, Cleenwerck I, Misztak A, et al. *Pectobacterium parvum* sp. nov., having a *Salmonella* SPI-1-like Type III secretion system and low virulence. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020;70:2440–2448.
- Waleron M, Misztak A, Waleron M, Franczuk M, Jońca J, et al. *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Syst Appl Microbiol* 2019;42:S0723-2020(18)30219-4:275–283..
- Waleron M, Misztak A, Waleron M, Franczuk M, Wielgomas B, et al. Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium peruviense* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 2018;41:S0723-2020(17)30171-6:85–93..
- Perombelon MCM, Kelman A. Ecology of the soft rot erwinias. *Annu Rev Phytopathol* 1980;18:361–387.

17. Quinn CE, Sells IA, Graham DC. Soft rot erwinia bacteria in the atmospheric bacterial aerosol. *J Appl Bacteriol* 1980;49:175–181.
18. Burr TJ. Occurrence of soft-rot *Erwinia* spp. in soil and plant material. *Phytopathology* 1977;77:1382.
19. Jorge PE, Harrison MD. The association of *Erwinia carotovora* with surface water in Northeastern Colorado. I. The presence and population of the bacterium in relation to location, season and water temperature. *Am Potato J* 1986;63:517–531.
20. Faye P, Bertrand C, Pédrón J, Barny M-A. Draft genomes of “*Pectobacterium peruvienne*” strains isolated from fresh water in France. *Stand Genomic Sci* 2018;13:27.
21. Portier P, Pédrón J, Taghouti G, Dutrieux C, Barny M-A. Updated taxonomy of *Pectobacterium* genus in the CIRM-CFBP bacterial collection: when newly described species reveal “old” endemic population. *Microorganisms* 2020;8:1441.
22. Pédrón J, Guyon L, Lecomte A, Blottière L, Chandeysson C, et al. Comparison of environmental and culture-derived bacterial communities through 16S metabarcoding: a powerful tool to assess media selectivity and detect rare taxa. *Microorganisms* 2020;8:1129.
23. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1792–1797.
24. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 2000;17:540–552.
25. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 2010;59:307–321.
26. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993;10:512–526.
27. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 2010;27:221–224.
28. Cigna J, Dewaegeire P, Beury A, Gobert V, Faure D. A gapA PCR-sequencing assay for identifying the *Dickeya* and *Pectobacterium* potato pathogens. *Plant Dis* 2017;101:1278–1282.
29. Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep* 2015;5:8365.
30. Miele V, Penel S, Duret L. Ultra-fast sequence clustering from similarity networks with SiLiX. *BMC Bioinformatics* 2011;12:116.
31. Gascuel O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 1997;14:685–695.
32. Pritchard L, Glover RH, Humphris S, Elphinstone JG, Toth IK. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Anal Methods* 2016;8:12–24.
33. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 2013;14:60.
34. Jiang N, Dillon FM, Silva A, Gomez-Cano L, Grotewold E. Rhamnose in plants - from biosynthesis to diverse functions. *Plant Sci* 2021;302:S0168-9452(20)30293-4:110687..
35. Hélias V, Hamon P, Huchet E, Wolf JVD, Andrivon D. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*: Isolating pectolytic bacteria on CVP. *Plant Pathol* 2012;61:339–345.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

3. Chapeau conclusif

Pour situer taxonomiquement le clade '*P. quasiaquaticum*', différentes méthodes phylogénétiques, d'analyse de proximité génétique ainsi que des analyses phénotypiques ont été réalisées. L'ensemble de ces méthodes a montré que ce clade est bien distinct des autres *Pectobacterium* et constitue donc une nouvelle espèce. *P. quasiaquaticum* est néanmoins proche de l'espèce *P. aquaticum*, également isolée d'eaux de surface.

Au vu de la proximité entre les deux espèces, il aurait été possible de définir deux sous-espèces plutôt que deux espèces distinctes. D'autant plus que les capacités métaboliques de ces deux espèces sont peu contrastées, puisque la seule différence observée entre les deux espèces est la vitesse de croissance en milieu L-rhamnose. Le choix de décrire deux sous-espèces n'a pas été retenu pour les raisons suivantes. Premièrement, il existe au sein du genre *Pectobacterium* plusieurs espèces dont la proximité génétique est aussi forte que celle observée entre *P. aquaticum* et *P. quasiaquaticum*. Ainsi, il nous a semblé important de maintenir une cohérence taxonomique au sein du genre. Par ailleurs, les niveaux d'abondance et la répartition de l'espèce *P. quasiaquaticum* dans la rivière la Durance et dans les lacs étaient différents de ceux de l'espèce *P. aquaticum*, suggérant que les niches écologiques des deux espèces pouvaient être distinctes. Ceci souligne l'importance des données écologiques pour la discrimination des espèces proches.

Chapitre 3 : « étude de la diversité et de l'abondance des SRP dans la rivière Durance »

1. Chapeau introductif

Dans l'introduction générale, j'ai montré que la présence des SRP dans différents environnements en dehors des plantes, tels que l'eau, le sol et les insectes, a été rapportée dans de nombreuses études effectuées dans les années 1970-1980. À cette époque, la diversité des souches isolées de ces environnements a été étudiée à l'aide de tests biochimiques et sérologiques (serovar et biovar). Ceci a permis d'assigner ces souches aux espèces *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi* et *Erwinia atroseptica*, qui correspondent respectivement aux genres *Pectobacterium*, *Dickeya* et à l'espèce *Pectobacterium atrosepticum* actuels. Ces études n'ont donc pas permis une assignation précise des souches isolées, étant donné que la taxonomie actuelle distingue désormais 36 espèces chez les SRP, réparties sur les genres *Pectobacterium* (22 espèces), *Dickeya* (12 espèces) et *Musicola* (2 espèces).

De plus, les souches isolées lors des études menées entre 1970 et 1980 n'ont pas été déposées dans les collections bactériennes. Ainsi, en mars 2020, le nombre total des isolats environnementaux des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* déposés dans cinq collections bactériennes de référence n'était que de 17 souches, comparé aux 1293 souches isolées de plantes (Barney Marie-Anne, communication personnelle). L'absence des souches environnementales des collections ne permet donc pas de réaliser des études rétrospectives pour étudier la diversité des SRP dans les environnements hors plantes.

Afin d'explorer la répartition, l'abondance et la diversité des SRP dans l'environnement, il était donc nécessaire de réaliser à nouveau une campagne d'échantillonnage. C'est dans cette optique qu'au laboratoire, il a été décidé d'entreprendre une nouvelle campagne d'échantillonnage dans les eaux de surface tout au long du bassin versant de la Durance. Le choix d'effectuer une campagne d'échantillonnage sur les eaux de surface était motivé par les raisons suivantes. Premièrement, les eaux de surface sont utilisées pour l'irrigation des cultures ; l'évaluation de l'abondance de pathogènes généralistes comme les SRP était donc intéressante. De plus, les eaux de surface peuvent servir de sentinelle pour détecter des bactéries pathogènes, comme cela a été montré dans le cas des pathogènes humains (Zimmermann et al. 2018). Les ADN environnementaux révèlent par ailleurs que les rivières constituent des courroies de transmission intéressantes pour étudier la diversité à l'échelle du bassin versant (Deiner et al. 2016). Le bassin versant de la Durance a été choisi, car ce bassin versant présente un gradient d'anthropisation intéressant, avec des sites sauvages en Haute Durance et un développement progressif de l'agriculture jusqu'à la plaine agricole d'Avignon. De plus, la taille moyenne de

ce bassin permet un échantillonnage couvrant le bassin assez rapide pouvant être effectué sur 4 jours. Cette campagne d'échantillonnage a été menée sur 21 sites, couvrant le bassin versant et ses affluents principaux en automne, hivers, printemps et été entre 2015 et 2017.

Ce chapitre décrit les résultats de cette campagne d'échantillonnage et notamment la répartition, l'abondance et de la diversité des SRP dans la rivière Durance.

Contribution :

Dans cet article, ma contribution a consisté à mener une analyse phylogénétique du gène *gapA* et une analyse MLSA de trois gènes de ménages (*gapA*, *dnaX* et *recA*) sur un sous-groupe de 99 d'isolats d'eau. L'objectif de ces deux analyses était de vérifier la résolution et l'efficacité de l'analyse du gène *gapA* pour une assignation taxonomique correcte des isolats d'eau. De plus, j'ai également effectué toutes les analyses phylogénétiques basées sur les génomes complets.

**2. Article 2 : « The Diversity and Abundance of Soft Rot
Pectobacteriaceae Along the Durance River Stream in the
Southeast of France Revealed by Multiple Seasonal Surveys »**

The Diversity and Abundance of Soft Rot *Pectobacteriaceae* Along the Durance River Stream in the Southeast of France Revealed by Multiple Seasonal Surveys

Hajar Ben Moussa,¹ Claire Bertrand,¹ Emma Rochelle-Newall,¹ Sarah Fiorini,² Jacques Pédrón,¹ and Marie-Anne Barny^{1,†}

¹Sorbonne Université, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement, Institut de Recherche pour le Développement, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Est Créteil, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, UMR 7618, F-75252 Paris, France

²Ecole Normale Supérieure, Centre National de la Recherche Scientifique, Centre de Recherche en Écologie Expérimentale et Prédictive, Paris Sciences & Lettres Research University, UMS 3194, 77140 Saint-Pierre-lès-Nemours, France

Accepted for publication 21 February 2022.

ABSTRACT

Although irrigation water is frequently assessed for the presence of plant pathogens, large spatial and temporal surveys that provide clues on the diversity and circulation of pathogens are missing. We evaluate the diversity of soft rot *Pectobacteriaceae* (SRP) of the genera *Dickeya* and *Pectobacterium* over 2 years in a temperate, mixed-use watershed. The abundance of isolated strains correlates with the agricultural gradient along the watershed with a positive correlation found with temperature, nitrate, and dissolved organic carbon water concentration. We characterized 582 strains by amplification and sequencing of the *gapA* gene. Multilocus sequence analysis, performed with three housekeeping genes for 99 strains, and core genome analysis of 38 sequenced strains, confirmed for all the strains but one, the taxonomic assignment obtained with the sole *gapA* sequence. *Pectobacterium* spp. (549 isolates) were far more abundant than

Dickeya spp. (33 isolates). *Dickeya* spp. were only observed in the lower part of the river when water temperature was >19°C, and we experimentally confirmed a decreased fitness of several *Dickeya* spp. at 8°C in river water. *D. oryzae* dominates the *Dickeya* spp. and *P. versatile* and *P. aquaticum* dominate the *Pectobacterium* spp., but their repartition along the watershed was different, with *P. versatile* being the only species regularly recovered all along the watershed. Excepting *P. versatile*, the *Dickeya* and *Pectobacterium* spp. responsible for disease outbreak on crops were less abundant or rarely detected. This work sheds light on the various ecological behaviors of different SRP types in stream water and indicates that SRP occupation is geographically structured.

Keywords: bacterial pathogens, *Dickeya*, ecology, *Pectobacterium*, water

Soft rot *Pectobacteriaceae* (SRP) belonging to the *Dickeya*, *Pectobacterium*, and *Musicola* genera are plant pathogenic bacteria that collectively infect a wide range of plant species, infecting at least 35% of angiosperm plant orders all over the world (Charkowski 2018; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2021; Ma et al. 2007; Portier et al. 2020). The virulence of SRP pathogens relies mainly on the secretion of cell-wall-degrading enzymes provoking maceration symptoms (Charkowski 2018; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2014). Latent infections, where the pathogen is present on the plant in the absence of symptoms, are common, symptoms being expressed only when environmental conditions are conducive (Toth et al. 2021a) and the main route of infection and dissemination occurs via latently contaminated plant material. However, environmental sources of contamination also play an important role and it has been demonstrated on the potato host that axenically grown seed stocks, when planted on the field, could rapidly become contaminated when the environmental conditions are conducive (Van Gijsegem et al. 2021).

Plants can become contaminated with SRP pathogens from a variety of environmental sources including insects, soil, aerosols, water, or rainwater (Toth et al. 2021a). Identifying the major source(s) of these primary infections is complex and has still not been fully achieved. Particular attention has been paid to surface water that could serve for irrigation purposes. SRP pathogens are rare in surface water, and neither the genus *Pectobacterium* nor the genus *Dickeya* are detected in 16S metabarcoding studies performed on fresh water (Pédrón et al. 2020). However, the development of an efficient semiselective medium (Burr and Schroth 1977; Hélias et al. 2012) means SRP pathogens can be isolated from fresh water, and early reports observed the frequent contamination of surface water by SRP pathogens and the potential contamination of plants via water reservoirs (Cappaert et al. 1988; Franc and Harrison 1987; Gudmestad and Secor 1983; McCarter-Zorner et al. 1984; Peltzer and Sivasithamparam 1988). Serological analysis performed in these early works identified up to 21 serogroups, and a significant proportion of the isolates did not belong to known serogroups, pointing out the wide diversity of SRP water isolates (Cappaert et al. 1988; Peltzer and Sivasithamparam 1988; Powelson and Apple 1984). Unfortunately, the strains isolated during these early studies were not deposited in international collections, and therefore their taxonomic status remains unclear. Indeed, during these early samplings, only three different groups were recognized within SRP, but today, the taxonomy of the SRP group, clarified through genomic studies, encompasses 20 *Pectobacterium* spp., 12 *Dickeya* spp., and two *Musicola* spp. (Ben Moussa et al. 2021; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2021; Hugouvieux-Cotte-Pattat and Van Gijsegem 2021; Toth et al. 2021b; detailed up-to-date taxonomy and known host range of various species can be found in

†Corresponding author: M.-A. Barny; marie-anne.barny@sorbonne-universite.fr

H. B. Moussa and C. Bertrand contributed equally to this work.

Funding: This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche under grant ANR-17-CE32-0004.

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates there are two supplementary figures and supplementary tables published online.

The author(s) declare no conflict of interest.

© 2022 The American Phytopathological Society

Supplementary Table S1). Therefore, from these early studies, it is difficult to understand which particular species are circulating in stream water. Furthermore, water was poorly characterized in these early studies, and it is unclear whether better characterization of water quality could help to identify the risk of SRP pathogen presence in stream water. Recently, water environment has regained attention and several SRP species isolated from stream water were described. This includes *Pectobacterium fontis*, which was isolated from a waterfall in Malaysia (Oulghazi et al. 2019a), *P. quasiquaticum* from streams in France (Ben Moussa et al. 2021; Pédrón et al. 2019), *P. aquaticum* from streams in France and from a lake in Poland (Babinska et al. 2021; Pédrón et al. 2019), *P. polonicum* from groundwater within vegetable fields in Poland (Waleron et al. 2019), and *P. versatile* from water and a wide range of diverse plants (Portier et al. 2019, 2020). As well, in the genus *Dickeya*, *D. lacustris* was observed in small eutrophic lakes surrounded by wetlands in the French region of La Dombes and from the rhizosphere of pond-dwelling plants around these lakes (Hugouvieux-Cotte-Patrat et al. 2019), *D. aquatica* was isolated from rivers in Finland and Scotland (Parkinson et al. 2014) and further reported on rotted carrot plants (Zaczek-Moczyłowska et al. 2019), *D. undicola* was isolated from freshwater sampled both in Asia and Europe (Oulghazi et al. 2019b), and *D. zeae* and *D. chrysanthemi* were sampled from river water in Poland (Potrykus et al. 2016). It is unclear, as of this writing, whether these described “aquatic” species are the main species circulating in freshwater, or if freshwaters frequently harbor aggressive plant species regularly responsible for disease outbreaks.

The aim of this article was to obtain a comprehensive and holistic view of the various species circulating in an open freshwater system. To do this, we performed a seasonal survey along the Durance River. This river runs along 323 km from the pristine Alpine source to the stream mouth in the agricultural plain of Avignon in the southeast of France. The isolated strains were characterized through amplification and sequencing of the *gapA* house keeping gene, routinely used to characterize SPR at the species level (Cigna et al. 2017). This was further completed by multilocus sequence analysis (MLSA) with *gapA*, *recA*, and *dnaX* for 99 strains and genomic analysis of 38 strains. The obtained diversity was analyzed in regard to the species abundance, the isolation sites, the season, and the water physico-chemical properties to tease out the ecological behaviors of the different SRP species.

MATERIALS AND METHODS

Description of sampled sites and analysis of water quality.

Sampling of surface water was performed along the Durance River in the southeast of France. To cover the Durance watershed, 21 sites were selected among which eight were on the main river, 11 were on tributaries, and two sites were on an irrigation canal that diverts from the main river. Eleven of the sampled sites (1 to 11) were located in the Alpine pristine upstream of the Serre-Ponçon lake. This upper Alpine watershed is mainly devoted to pastoralism. The remaining 10 downstream sampled sites (12 to 21) were located in the agricultural part of the Durance watershed. Precise description of the sampling sites is shown in Figure 1 and Supplementary Table S2. Samplings were performed at two sites in May 2015; 20 sites at fall 2015; and 21 sites during winter, spring, summer, and fall in 2016 and 2017. Surface water was recovered at 5 m distant from the bank with a bucket secured with a rope. The bucket was first rinsed with river water, and the water recovered the second time was kept for analysis. Particular attention was paid to avoid any sediment or plant debris inside the bucket. One liter was maintained in a cool box before treatment, which treatment occurred within 24 h. Each sample (500 ml) was filtered through 0.22- μ m cellulose acetate filters (Sartorius, Göttingen, Germany). Water in situ temperature and electrical conductivity was measured with a multi-probe system (YSI 556; YSI, Yellow Springs, OH) and water turbidity was

measured with a turbidity meter (TN-100; EUTECH Instruments, Paisley, UK). Acidified (85% H_3PO_4), filtered river-water samples (0.2 μ m) were used to determine the dissolved organic carbon (DOC) concentration with a total organic carbon analyzer (Shimadzu, Kyoto, Japan), as described in (Rochelle-Newall et al. 2014). The concentration of nitrates, nitrites, ammonium, ortho-phosphates, and total dissolved nitrogen and phosphorus was determined by colorimetry (Bran+Luebbe 2013a, b, c, d) in the laboratory with a segmented continuous flow analyzer (AA3; Seal Analytical, King’s Lynn, UK). The samples (15 ml) were filtered in situ on 0.2 μ m for dissolved nutrients and on 50 μ m for total nitrogen and phosphorus and frozen ($-20^\circ C$) before analysis. Details of the water-quality parameters are presented in Supplementary Table S3.

Statistical analysis. Pairwise Spearman correlation were calculated between variables using the website <https://biostatv.sentiweb.fr/?module=tests/spearman>. For each pairwise analysis, missing data were first manually removed before calculation. Pairwise Spearman correlations between sampling site altitudes and water-quality parameters (temperature, conductivity, pH, turbidity, DOC, PO_4^- , NH_4^+ , NO_2^- , and NO_3^-) are presented in Table 1. Pairwise correlation among SRP, genus, or species strain occurrences and water-quality variables are presented in Table 2. Correlations were considered as nonsignificant when the *P* value was >0.01 .

Bacterial strains isolation. The fraction retained on the filter after the 500-ml sampled water filtration (0.2 μ m) was suspended in 1 ml of sterile distilled water, and 100 μ l were used to inoculate two plates of a CVP-modified medium (CVPm; per liter 1.02 g of $CaCl_2$, 5 g of trisodium citrate, 2.0 g of NH_4NO_3 , 2 ml of crystal violet 0.075%, 4 g of agar, 2.8 ml of NaOH 5M, and 18 g of pectin [Dipecta]; AG366; Agdia Biofords, Elkhart, IN) prepared as described by Hélias et al. (2012) for single-layer CVP. A 10-times dilution (100 μ l) was also spread on two or three plates of CVPm. The plates were incubated at $28^\circ C$ for 2 days. Each pit-forming colony chosen for

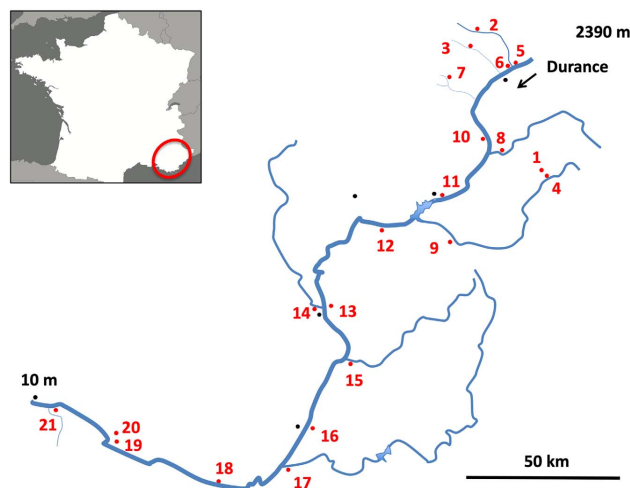


Fig. 1. Schematic representation of sampling points along the river Durance. The Durance River is located in south-east of France. Its headwaters rise in the Alp mountains at an altitude of 2,390 m. The river Durance runs for 323 km until it flows into the river Rhône at an altitude of 10 m. The 21 sampling points are indicated by red dots together with their assigned numbers from the highest to lowest altitude. Points 1 to 11 are in the Alpine part of the river above the Serre Ponçon lake; points 12 to 21 are in the lower part of the rivers where agriculture is important. The sampled tributaries are depicted from top to bottom: Clarée, Guisane, Gyrone, Guil, Ubaye, Buëch, Bléone, Verdon, and Grand Anguillon. Sampling points 1 and 20 are on irrigation canals that derivate from the river Durance. The lowest tributary, the Grand-Anguillon River, runs along 20.1 km as an irrigation canal from its spring to its confluence with the river Durance. The black dots indicate the main cities along the river, from top to bottom: Briançon, Embrun, Gap, Sisteron, Manosque, and Avignon. Detailed global positioning system coordinates and altitude of sampled points are indicated in Supplementary Table S2.

isolation was assigned with a number, collected with a toothpick, and further diluted into 1 ml of sterile water. The obtained dilution (100 µl) was further spread again on CVPm to check and isolate the pit-forming activity. When pit-forming activity was confirmed, a well-isolated colony was further spread on Luria Broth medium (LB; per liter: tryptone 10 g, yeast extract 5 g, and agar 15 g) and incubated overnight at 28°C. One isolated colony formed on this LB plate was spread again on an LB plate and checked again for its pit-forming activity on a CVPm plate. When the pit-forming activity was confirmed, bacteria were scratched out from the lawn obtained on LB, then the suspended LB liquid medium and the same volume of sterile glycerol (80%) was added. The prepared bacterial suspension was conserved at -80°C.

Bacterial regrowth in river water. River water collected at site 18 was used for the experiment. Just after collection, the water was filtered, and the filtrate was autoclaved and kept in a plastic bottle in the dark at room temperature until use. Just before use, water was filtered again through a 0.22-µm filter to eliminate potential salt precipitates. The bacterial regrowth was followed for species belonging to the *Pectobacterium* genus: *P. carotovorum*, *P. versatile*, *P. aquaticum*, and *P. atrosepticum*; and species of the *Dickeya* genus: *D. zeaeI*, *D. orizae*, *D. chrysanthemi*, *D. fangzhongdai*, and *D. solani*. The strains used are described in Supplementary Table S4. For most species, the bacterial growth of three to four different strains was followed. Bacterial strains were inoculated at 10³ CFU/ml and grown at 20 or 8°C. Solid 10% tryptic soy agar medium (14 g of agar, 1.5 g of pancreatic digest of casein, 0.5 g of peptic digest of soybean meal, and 0.5 g of sodium chloride per liter) was used to calculate the water culture's viable cell count by spreading a diluted sample over the plate's surface and placing the plate at 28°C for 48 h. Results shown in Figure 2 are the mean for each species of four independent growth curves.

Species delineation of isolated strains. The genus and species of each conserved bacteria was determined after amplification and sequencing of the *gapA* housekeeping gene, as described as Cigna et al. (2017). Briefly, bacteria were grown overnight on LB, diluted 10 times in sterile water, then boiled for 5 min and placed in a -20°C freezer for further use. Amplifications were performed with 5 µl of

the boiled bacteria and the *gapA* primers as Cigna et al. (2017) for 598 strains; and for a subset of 99 strains, amplifications with the *dnaX* primers (Sławiak et al. 2009) and the *recA* primers (Lee et al. 2014) were also performed. The amplified products were Sanger-sequenced by Eurofins Scientific (Germany). The FASTA files of the analyzed sequenced are available at <https://doi.org/10.5281/zenodo.5779227>. The *gapA* sequences were aligned with reference sequences extracted from complete genome sequences using the software MUSCLE (Edgar 2004) and the alignments were filtered with the program GBLOCKS (Castresana 2000). The tree was computed using the PHYML algorithm (Guindon and Gascuel 2003) implemented in the software SeaView (Gouy et al. 2010) under default settings using the GTR model (Tavaré 1986). *GapA* sequences shorter than 800 pb were not included in the phylogenetic tree. Species assignment was performed after Blast analysis on NCBI. These strains were assigned to a given species when at least 99% of identity was unambiguously observed along 90% of the sequence with a well-defined species. In addition, for a subset of 99 strains, an MLSA tree was constructed from concatenated nucleotide sequences of three housekeeping genes, *gapA*, *dnaX*, and *recA*. Each gene was aligned using the MUSCLE software and then concatenated. The alignments were filtered using the GBLOCK tool, the tree computed by the PhyML algorithm, and implemented in the SeaView software, under default settings with the GTR model. Furthermore, 38 strains isolated in the course of this study were sequenced, out of which 17 were previously released in the NCBI database and 21 were new genomes analyzed during the course of this study (Supplementary Table S5). For preparation of genomic DNA, the strains were grown overnight at 28°C on solid LB medium. A single colony was then picked up and grown overnight in 2 ml of liquid LB medium at 28°C, agitated at 120 rpm. After centrifugation of the culture broth (5 min at 12,000 rpm), DNA was extracted with the Wizard Genomic DNA Extraction Kit (Promega, Madison, WI) following the supplier's instructions. Genome sequencing was performed at the Next Generation Sequencing core facilities of the Institute for Integrative Biology of the Cell (Gif-sur-Yvette, France) or at Genoscreen (Lille, France). Nextera DNA libraries (Illumina, San Diego, CA) were prepared, and paired-end 2 × 75 pb or 2 × 150 pb sequencing

TABLE 1. Pairwise Spearman correlations of water-quality variables with altitude; each water-quality variable indicated in lane 2 was analyzed in regard to the altitude of the sampling points

Variable	Spearman correlation with altitude								
	Temp (°C)	Conductivity (µS)	pH	Turbidity (NTU) ^a	DOC ^b (µMC)	PO ₄ ⁻ (µg/liter)	NH ₄ ⁺ (µg/liter)	NO ₂ ⁻ (µg/liter)	NO ₃ ⁻ (µg/liter)
Spearman correlation	-0.6351	-0.386	0.369	-0.4599	-0.5325	0.09	-0.0908	-0.4573	-0.6029
<i>P</i> value	7.47E-23	3.80E-08	2.32E-05	3.63E-09	1.42E-14	0.42	0.41	1.38E-05	1.63E-9
Number of observations	190	190	125	149	180	83	83	83	83

^a Nephelometric turbidity unit.

^b Dissolved organic carbon.

TABLE 2. Pairwise Spearman correlations of strains occurrence along the watershed with environmental variables for all soft rot *Pectobacteriaceae* (SRPs) pathogens, the genus *Pectobacterium*, or the indicated species^a

Strains	Number of collected strains	Altitude (m)	Temp (°C)	DOC ^b (µMC)	Conductivity (µS)	pH	Turbidity (NTU) ^c	NO ₃ ⁻ (µg/liter)	NO ₂ ⁻ (µg/liter)
SRP	657	-0.5881 (4.60E-19)	0.49 (7.25E-13)	0.3775 (2.22E-05)	0.27 (1.64E-04)	-0.1388 (1.23E-01)	0.2483 (1.49E-03)	0.44 (2.22E-05)	0.4122 (1.08E-04)
<i>Pectobacterium</i> genus	549	-0.5689 (1.10E-17)	0.4524 (5.66E-11)	0.3572 (8.58E-07)	0.2814 (8.38E-05)	-0.1158 (1.98E-01)	0.2384 (2.33E-03)	0.4601 (1.07E-05)	0.4046 (1.48E-04)
<i>P. versatile</i>	256	-0.4165 (2.27E-09)	0.3228 (5.58E-06)	0.266 (4.02E-03)	0.2153 (2.86E-03)	0.0181 (8.41E-01)	0.1584 (4.48E-02)	0.3107 (4.02E-03)	0.2532 (2.09E-02)
<i>P. aquaticum</i>	219	-0.5112 (4.82E-14)	0.3758 (9.15E-18)	0.3657 (3.90E-04)	0.2176 (2.56E-03)	-0.177 (4.83E-02)	0.1017 (1.99E-01)	0.3782 (3.90E-04)	0.36 (8.03E-04)

^a Pairwise Spearman correlations between the bacterial groups indicated in column 1, and the water-quality variables are indicated on the first line; the *P* values are indicated in parentheses.

^b Dissolved organic carbon.

^c Nephelometric turbidity unit.

was performed on an Illumina NextSeq500 apparatus, with a High Output 150-cycle kit. The program CLC Genomics Workbench (v. 9.5.2; Qiagen Bioinformatics, Germantown, MD) was used to assemble reads. Final sequencing coverage was between 60 and 180. Coding sequences were predicted using the RAST server with the prediction tool Glimmer 3. Statistics of the 21 newly sequenced draft genomes are presented in Supplementary Table S5.

RESULTS

Analysis of water quality along the watershed. Analysis of water quality characteristics included the temperature, pH, conductivity, turbidity, and DOC in 2016 and 2017 and nitrate, nitrite, ammonium, and phosphate in 2017. Minimal, maximum, and mean values observed for each considered variables are indicated (Table 3) and complete results are provided Supplementary Table S3. Pairwise Spearman correlations between altitude and water quality variables were calculated (Table 1). No significant correlation was observed between altitude and phosphate or ammonium water content. However, significant negative correlations were observed between altitude and nitrite content, altitude and turbidity, and altitude and conductivity, whereas a positive correlation was observed between altitude and pH. As expected, a strong negative correlation was observed between altitude and temperature. Strong negative correlations were also observed between altitude and nitrate or altitude and DOC concentration. Overall, this analysis confirmed the increasing importance of agriculture along the watershed from its top to its bottom.

Strains isolation and assignation to genera. Depending on the sites and seasons, various numbers of pit-forming colonies were observed on the CVPm plates. When the number of pit-forming colonies observed in a given sample was <20, we attempted to isolate all of them; when the number of observed pit-forming colonies was superior to 20, we attempted to isolate 20 colonies. Overall, this survey led to isolation of 657 pit-forming colonies on CVPm. Successful isolation varied between sampling years and month. Out of these 657 isolated strains, the *gapA* amplicon was successfully amplified and sequenced for 598 strains; 16 sequences (2.7%) were not assigned to the genera *Dickeya*, *Pectobacterium*, or *Musicola* but related to other species of the order *Enterobacterale* such as *Enterobacter* sp. (eight) *Serratia* sp. (two), *Kluyvera* sp. (one), *Klebsiella* sp. (one), *Pantoea* sp. (one), *Rahnella* sp. (one), *Buttiauxella* sp. (one), and *Citrobacter* sp. (one). The 582 remaining sequences were all assigned to SRP (97.3%) with none assigned to the newly described genus *Musicola*, 33 (5.67%) assigned to the genus *Dickeya*, and 549 (94.32%) assigned to the genus *Pectobacterium*. Spearman correlations with environmental variables indicated SRP isolation correlates negatively with altitude and positively with temperature, nitrate, nitrite, and DOC content (Table 2). Weak but significant correlations were also observed with sampled water conductivity and turbidity, whereas no correlation was observed with sampled water pH (Table 2).

Strains belonging to the *Dickeya* genus. Out of the 582 SRP strains characterized, 33 (5.67%) were assigned to the *Dickeya* genus after *gapA* sequencing (Supplementary Table S6). Because of the small number of recovered *Dickeya* strains, we did not calculate

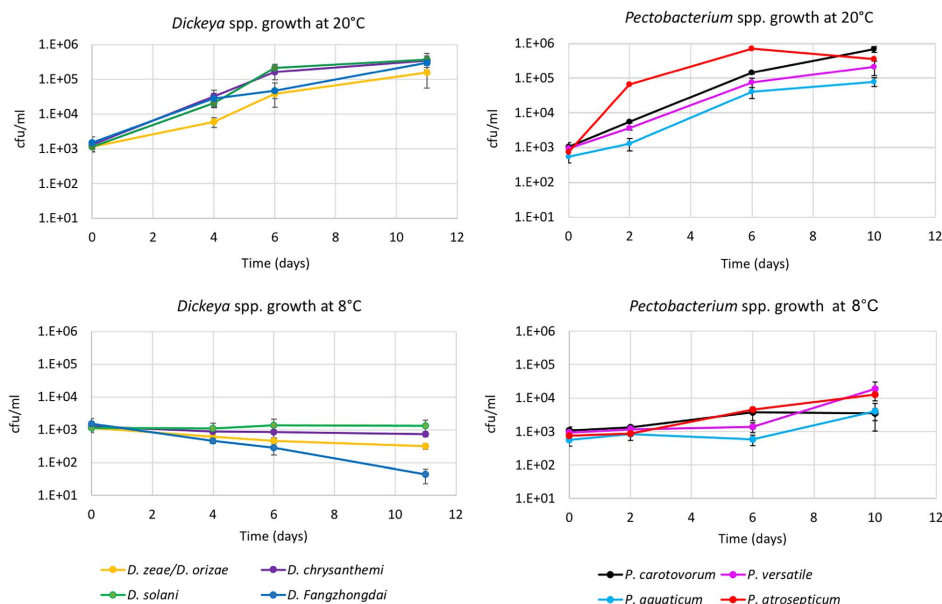


Fig. 2. Growth curves of *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. in Durance River water. Water was collected at site 18 in December 2018, filtered on a 0.22- μ m acetate cellulose membrane and then autoclaved before use. Bacteria were inoculated at 10^3 CFU/ml in 9 ml of river water. The 9 ml was then split evenly between two plastic tubes, containing a 4.5-ml culture each, one being incubated at 20°C and the other being put into an incubator at 8°C. The tested bacterial species are indicated below the bottom graphs. The four graphs represent the mean of three or four independent growth curves observed with up to four different strains of each species. *D. zeae* and *D. orizae* are presented together as they were included in the same species at the time of the experiment and were only recently split. All the strains used in this experiment are described in Supplementary Table S4.

TABLE 3. Observed minimum, maximum, and mean values for each water-quality variable

Value	pH	Temp (°C)	Conductivity (μ S)	Turbidity (NTU) ^a	DOC ^b (μ MC)	PO ₄ ⁻ (μ g/liter)	NH ₄ ⁺ (μ g/liter)	NO ₂ ⁻ (μ g/liter)	NO ₃ ⁻ (μ g/liter)
Minimum	7.80	0.30	81.00	0.00	16.66	1.05	0.56	0.11	2.54
Maximum	9.03	25.60	1,175.00	494.00	235.83	61.45	107.13	18.05	930.42
Mean	8.55	10.9	493.01	20.96	84.69	7.45	18.05	2.91	225.94

^a Nephelometric turbidity unit.

^b Dissolved organic carbon.

Spearman correlation with environmental variables. However, we noticed that these 33 *Dickeya* strains were only recovered during spring and summer (Table 4). Furthermore, these 33 *Dickeya* strains were isolated from six sites that were all located in the lower part of the watershed below an altitude of 500 m and many strains (19/33) were collected from irrigation canals at sites 16 and 20 (Table 5). All these *Dickeya* strains were isolated when water temperature was greater than 19.50°C (mean 20.71 ± 0.575°C). This prompted us to compare the viability and growth of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium* spp. in river water at different temperatures (Fig. 2). At 20°C, both *Dickeya* spp. and *Pectobacterium* spp. bacteria inoculated at 10³ CFU/ml were able to grow, and reached at least 10⁵ CFU/ml at 10 days. At 8°C, *Pectobacterium* spp. grew slowly, reaching 5.10³ to 2.10⁴ CFU/ml at 10 days; but *Dickeya* spp. did not grow, and some species such as *D. fangzhongdai* declined rapidly.

The *gapA* sequences allowed assignment of all but one of the isolated strains to known species (Supplementary Table S6). The last strain could be assigned to the *Dickeya* genus, but the *gapA* sequence was too short to decipher to which species it belonged. *GapA* species assignment was further confirmed for eight strains belonging to each identified species, with MLSA performed with three housekeeping genes *recA*, *dnaX*, and *gapA* (Fig. 3) and with MLSA-based core genome analysis (Fig. 4; Supplementary Table S7). Particularly, the phylogenetic tree performed with the sole *gapA* gene, the three housekeeping genes, or the core genome, allowed us to distinguish strains assigned to *D. zeae* from those assigned to the recently described and closely related *D. oryzae* species, the only difference being that strains belonging to the species *D. zeae* were split in two

clades within the *gapA* phylogenetic tree and grouped into a single clade after the *recA*, *dnaX*, and *gapA* MLSA (Fig. 3). This analysis was completed with an average nucleotide identity calculation performed on four sequenced strains that clearly differentiate strains belonging to *D. zeae* from strains belonging to the closely related species *D. oryzae* (Table 6). Overall, out of the 13 currently described *Dickeya* spp. and subsp., the 32 assigned strains belonged to six species, *D. oryzae*, *D. zeae*, *D. chrysanthemi*, *D. solani*, *D. dianthicola*, and *D. dadantii*. A strong domination of *D. oryzae* was observed as *D. oryzae* strains represented 23 out of the 32 strains assigned to *Dickeya* spp.

Strains belonging to the *Pectobacterium* genus. Out of the 582 SRP strains characterized, strains belonging to the *Pectobacterium* genus dominated, with 549 (94.32%) of the characterized SRP strains assigned to this genus on the basis of the *gapA* sequence. It is not surprising therefore that Spearman correlations with environmental variables follow the same trend as that observed with the full set of SRP isolated strains (Table 2). The strongest correlation found was with altitude of the sampling site, followed by nitrate content and temperature of the sampled water. However, in contrast to what was observed with *Dickeya* spp., *Pectobacterium* spp. were isolated at all seasons (Table 4) and at all sites but two (Table 5), in a large range of temperatures (from 3.6 to 22.6°C).

MLSA of a subset of 91 strains, performed with the three housekeeping genes *gapA*, *dnaX*, and *recA*, was compared with the one obtained with the sole *gapA* gene (Fig. 3; Supplementary Figs. S1 and S2 for extended trees). Out of the 91 analyzed strains, 90 were similarly assigned at the species level between the two phylogenetic

TABLE 4. Number of isolated strains for each season for the indicated genera or species

Seasons	<i>Pectobacterium</i> genus	<i>Dickeya</i> genus	<i>P. versatile</i>	<i>P. aquaticum</i>	<i>P. carotovorum</i>	<i>P. quasiquaticum</i>	<i>P. odoriferum</i>	<i>D. oryzae</i>	Total ^a
Fall	197	0	73	84	22	4	11	0	197
Winter	81	0	45	28	3	3	1	0	81
Spring	134	12	87	36	3	4	0	10	146
Summer	137	21	51	71	8	2	0	13	158
Total	549	33	256	219	36	13	12	23	582

^a The sum of *Pectobacterium* and *Dickeya* genera included rare species with occurrences <10 that were not individually displayed in this table.

TABLE 5. Number of strains isolated at each site for the indicated genera or species; the thick line indicates the limit between the Alpine upper watershed and the downstream agricultural part of the watershed

Site	Altitude (m)	<i>Pectobacterium</i> genus	<i>Dickeya</i> genus	<i>P. versatile</i>	<i>P. aquaticum</i>	<i>P. carotovorum</i>	<i>P. quasiquaticum</i>	<i>P. odoriferum</i>	<i>D. oryzae</i>	Total ^a
1	2,090	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1,813	5	0	5	0	0	0	0	0	5
3	1,659	4	0	2	0	2	0	0	0	4
4	1,443	4	0	4	0	0	0	0	0	4
5	1,363	4	0	4	0	0	0	0	0	4
6	1,363	15	0	13	2	0	0	0	0	15
7	1,294	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1,066	7	0	7	0	0	0	0	0	7
9	968	6	0	6	0	0	0	0	0	6
10	907	22	0	15	0	6	0	0	0	22
11	790	30	0	25	1	2	0	0	0	30
12	620	46	0	6	27	2	0	11	0	46
13	459	41	0	15	20	4	1	0	0	41
14	459	11	1	10	1	0	0	0	1	12
15	438	27	1	18	4	3	0	0	0	28
16	291	38	0	17	16	0	4	0	0	38
17	274	19	0	21	71	0	0	0	0	92
18	188	38	9	19	6	12	0	0	8	47
19	106	92	13	11	5	1	2	1	11	32
20	98	34	6	18	11	0	2	0	3	40
21	39	106	3	40	55	4	4	0	0	109
Total		549	33	256	219	36	13	12	23	582

^a The sum of *Pectobacterium* and *Dickeya* genera included rare species with occurrences <10 that were not individually named in this table.

trees (Fig. 3). The main differences observed were that the *P. carotovorum* strains were split in two different clades within the *gapA* phylogenetic tree and grouped in a single clade within the MLSA phylogenetic tree, while the reverse was observed for the *P. aquaticum* strains that were split in two clades within the MLSA and grouped in a single clade in the *gapA* phylogenetic tree (Fig. 3). Strain A519-S5-A17 was the only strain differentially assigned at the species level between the two phylogenetic tree. This strain grouped within the *P. aquaticum* clade after the *gapA* analysis and was

attached to the base of the *P. versatile* clade with the MLSA (Fig. 3; Supplementary Figs. S1 and S2). We then compared the species assignment obtained between the *gapA* phylogenetic trees with the one based on MLSA performed on core genome analysis of 30 *Pectobacterium* strains, isolated during our survey, whose full genome sequences were previously published or released in the NCBI database (Ben Moussa et al. 2021; Faye et al. 2018; Pédrón et al. 2019; Portier et al. 2019, 2020), or sequenced during the course of this study (Supplementary Table S5). These 30 strains were assigned to

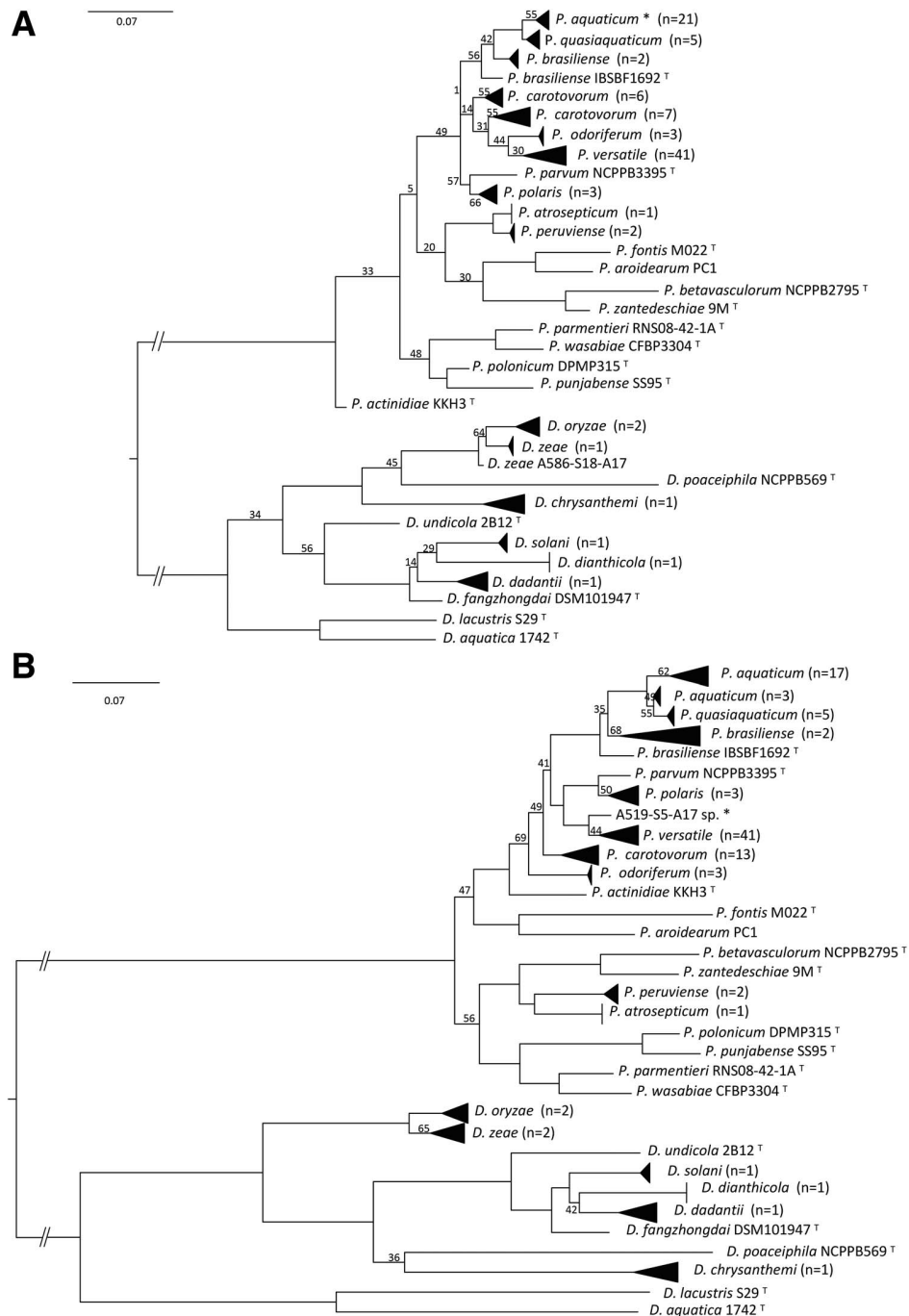


Fig. 3. Comparative phylogenetic analysis. **A**, Phylogenetic tree constructed on the basis of the partial *gapA* gene sequence. **B**, Phylogenetic tree constructed on the basis of concatenated partial gene sequences of *gapA*, *dnaX*, and *recA*. Ninety-nine strains (91 *Pectobacterium* spp. and eight *Dickeya* spp.) isolated during this study and 29 reference strains representatives of *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. were included in this analysis. The number in brackets indicates the number of isolated strains present in each clade. The position of strain A519-S5-A17, the only strain out of 99 that grouped with different species after each analysis, is indicated with an asterisk. In both phylogenetic analyses bootstrap percentages were calculated based on 100 replicates, and bootstrap support values are indicated if <70%. Scale bar = 0.07 changes per nucleotide position. FASTA (NCBI) sequences used to construct these phylogenetics analysis are provided at <https://doi.org/10.5281/zenodo.5779227>. Extended phylogenetic trees are provided in Supplementary Figures S1 and S2.

the same species after *gapA* analysis or full genome sequences. Therefore, the *gapA* sequence was used to classify the whole set of 549 *Pectobacterium* isolates within species. All the isolated *Pectobacterium* strains but one could be assigned to nine *Pectobacterium* spp. (Supplementary Table S6). A strong dominance of two species, *P. versatile* and *P. aquaticum*, was observed. *P. versatile*, with 256 isolates, accounted for 46.6% of the *Pectobacterium* strains isolated; *P. aquaticum*, with 219 isolates, accounted for 39.9% of the *Pectobacterium* isolated strains. Other species such

as *P. carotovorum* (36 isolates), *P. quasiaquaticum* (13 isolates), and *P. odoriferum* (11 isolates), each represented 2 to 6% of the isolated strains. The repartition of these latter species was variable: *P. carotovorum* strains were isolated from nine sites at various seasons, *P. quasiaquaticum* pathogens were recovered at all seasons on five sites located in the lower part of the watershed, and all the *P. odoriferum* strains but one were isolated from a single site on a single date (Tables 4 and 5). Finally, *P. atrosepticum* (one isolate), *P. peruviense* (two isolates), *P. polaris* (five isolates), and *P. brasiliense* (four isolates) each represented <1% of the isolated strains.

For the two abundant species, *P. versatile* and *P. aquaticum*, we compared when and where strains of each species were isolated. Both *P. versatile* and *P. aquaticum* were isolated at all seasons but *P. versatile* was most preferentially isolated at fall and spring, while *P. aquaticum* was preferentially isolated at summer and fall (Table 4). The sites of isolation varied between these two species. While *P. versatile* was isolated from 19 sites all along the watershed, *P. aquaticum* was isolated from 12 sites that were mostly located in the lower part of the watershed (Table 5). Furthermore, while the number of strains isolated at each site was roughly equilibrated for *P. versatile*, >50% of the *P. aquaticum* strains were isolated at two sites (Table 5). Interestingly, we also noted that 83% (81/97) of the *Pectobacterium* spp. isolated in the upper part of the Durance watershed belonged to the *P. versatile* species (Table 5).

DISCUSSION

This work represents a comprehensive view of SRP dissemination and diversity at the scale of a large watershed covering a surface of 14,280 km². This watershed was interesting to follow bacterial plant pathogens such as SRP because it runs along 323 km from an alpine area devoted to pastoralism and hiking to the agricultural plain of Avignon where various crop species are cultivated. Therefore, following the distribution and diversity of SRP along this watershed over >2 years along the four seasons helped us to differentiate species that could be isolated across the four seasons, those that are found in pristine areas and those that are more associated with crop culture. Characterization of the sampled water confirmed the increasing importance of agriculture along the watershed as nitrite, nitrate, and DOC negatively correlates with altitude of the sampled water. Water temperature from the top to the bottom was also an interesting parameter to follow as it varied from 0.3 to 25.6°C with a mean of 10.8°C.

Our study showed that SRP pathogens were rare in water. This agrees with Pédrón et al. (2020), which showed that SRP pathogens are not detected through metabarcoding in river water, although they are detected when an efficient semiselective medium is used. This indicates that SRP pathogens are not indigenous planktonic species in surface water and are only sporadically passing by in water. The biological continuity between soil and stream microbial communities via surface water runoff has been shown elsewhere (Le et al. 2022), and this link probably explains the low and sporadic prevalence.

Our phylogenetic analysis, through the sequencing of the single *gapA* housekeeping gene, proved efficient for roughly classifying 582 of the recovered strains within 15 SRP species. This classification was congruent with that performed with three housekeeping genes for 99 strains for all the analyzed strains but one. Full genome analysis of 38 strains also confirmed the species assignment based on the sole *gapA* gene. This indicates that sequencing the housekeeping gene *gapA* is an efficient tool to rapidly classify large sets of strains within *Pectobacterium* and *Dickeya* genera.

No strain of the recently described genus *Muscolia* was observed during our survey (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2021). This new genus was described after an in-depth genomic analysis showing that genomes of the formerly *D. paradisiaca* species aligned with genomes of other *Dickeya* species on less than one-third of their genomes. The newly created genus was named *Muscolia*, with reference to the isolation of most strains from *Musa paradisiaca*. The fact

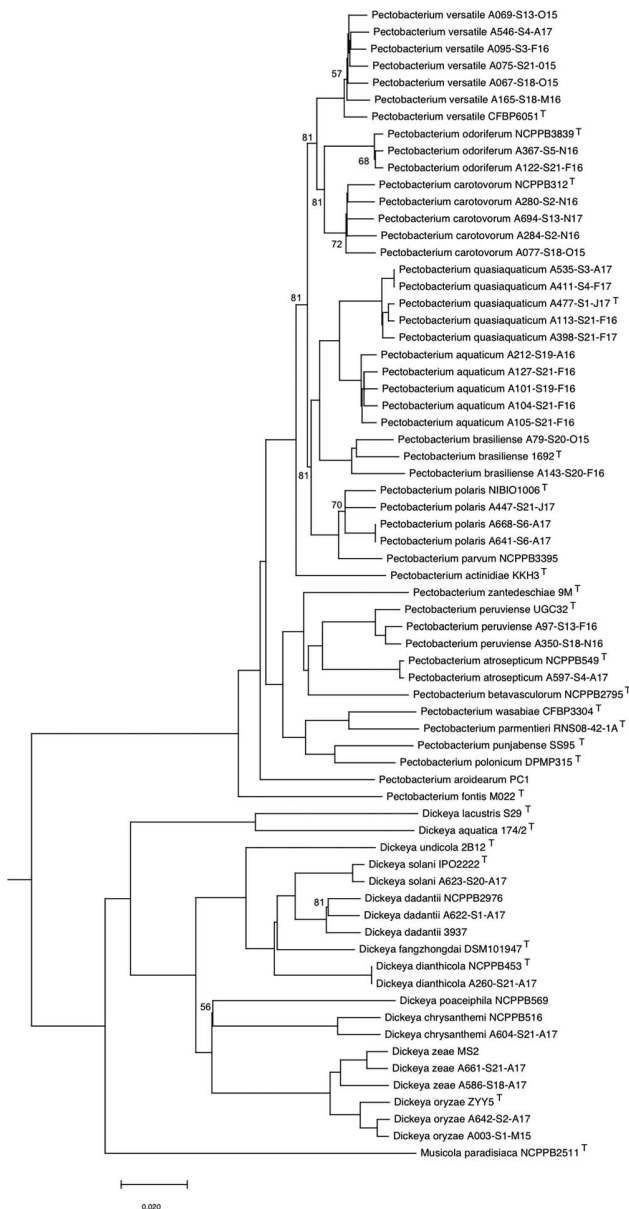


Fig. 4. Multilocus sequence analysis phylogenetic tree reconstructed from concatenated nucleotide sequences of 601 homologous gene sequences. The 38 sequenced strains, with strain names starting with an “A,” are included in the phylogenetic tree together with 29 reference strains for each species. Clustering of homologous nucleotide sequences was performed with the software SiliX with an 80% identity threshold. Homologous sequences of each gene were aligned using the software MUSCLE (Edgar 2004), then concatenated. The alignments were filtered using the GBLOCK tool (Castresana 2000) resulting in a data set of 627,806 sites (of which 211,221 are informative). The tree was computed with the software SeaView (Gouy et al. 2010) using the BioNJ method (Gascuel 1997). Bootstrap percentages were calculated based on 100 replicates and only bootstrap values <100 are represented. Scale bar = 0.02 changes per nucleotide position. The NCBI accession numbers for the genomes used in this analysis are available in Supplementary Table S7.

that members of *M. paradisiaca* species were mostly isolated from tropical and subtropical samples may explain their absence in a temperate watershed such as the one studied here.

We found that bacteria belonging to the *Dickeya* genus were restricted to the lower part of the watershed and were only isolated during spring and summer when temperature was higher than 19.5°C, and we experimentally confirmed the difficulty of several *Dickeya* spp. to grow and survive at low temperature in river water. This is in line with a previous survey from an Australian river that detected *Dickeya* spp. after an enrichment procedure on water samples with temperature above 16.2°C (Cothor and Gilbert 1990) and with the fact that *Dickeya* spp. were historically described as being present mainly in tropical and subtropical regions—although they now appear to be expanding their global distribution. With the prospect of global warming, it is expected that *Dickeya* spp. population will increase in river water in the future. Regular water monitoring when water temperature is high could help to mitigate the risk of crop cultures infection by *Dickeya* spp. through irrigation.

The isolation of *Dickeya* spp., *D. undicola*, *D. aquatica*, and *D. lacustris* from surface water of rivers, lakes, and irrigation canals have been described in the literature (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2019; Oulghazi et al. 2019b; Parkinson et al. 2014). Surprisingly, none of these species were isolated during our 2-year survey, suggesting that these species are sporadically associated with water. In 2016 and 2017, *D. undicola* strains were isolated from a small irrigation canal at Monfavet (Oulghazi et al. 2019b). This sampling point is close to the points 20 and 21 sampled in this study, suggesting that extensive sampling in the lower Durance sites during spring and summer, when water temperature is high, will likely extend the number of *Dickeya* spp. pathogens recovered. Indeed, we also isolated strains of *D. fangzhondai*, a highly aggressive *Dickeya* spp. (Alič et al. 2017), from additional sampling of a small irrigation canal (not included in this study) in the lower Durance watershed.

During our survey, the main isolated *Dickeya* spp. were *D. oryzae* followed by *D. chrysanthemi*. Similarly, a survey focusing on *Dickeya* spp. previously performed in Poland also identified *D. zea* followed by *D. chrysanthemi* as the main *Dickeya* species circulating in surface water (Potrykus et al. 2016). Since this 2016 publication, the *D. zea* clade has been split into two species: *D. zea* and *D. oryzae* (Wang et al. 2020). In our work, we found that *D. oryzae* was more abundant than *D. zea*. Interestingly, neither *D. zea*/*D. oryzae* nor *D. chrysanthemi* have been reported to cause crop disease outbreaks in Europe. *D. zea* and *D. oryzae* were, respectively, described as infecting maize and rice, both of which are monocotyledon plants. Therefore, it is plausible that their detection in river water could be because of their association with some common herbaceous monocotyledons unrelated to crop culture found on the riverbanks. Indeed, while some symptomless weeds in the vicinity of potato fields were found to harbor SRP pathogens (Tsrör et al. 2019; Zoledowska et al.

2018), plants along riverbanks have not been investigated in detail, although *D. lacustris* has been isolated from the rhizosphere of the pond edge plant *Solanum dulcamara* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2019). As well, *P. carotovorum* has been isolated from *S. dulcamara* in Poland (Fikowicz-Krosko et al. 2017). Enlarging sampling of common plants found along river banks could help to decipher if these plants are important drivers of SRP pathogen circulation in river water, particularly as the distance of plants from the stream course has been shown to be important in structuring aquatic microbial communities (Le et al. 2018).

Among SRP pathogens, our survey indicated that *Pectobacterium* spp. were far more frequently isolated than *Dickeya* spp. in river water. This is in line with previous surface water surveys performed along the Colorado rivers in the United States where no *Dickeya* spp. were reported (Maddox and Harrison 1988). Therefore, in temperate streams, both in Europe and the USA, *Pectobacterium* spp. largely dominate. This could be linked with the fact that *Pectobacterium* spp., in contrast with *Dickeya* spp., could be recovered across a large range of water temperatures. *Pectobacterium* spp. are also known to survive better in soils than *Dickeya* spp. (Perombelon and Hyman 1989) and this better survival could also contribute to the higher detection of *Pectobacterium* spp. in river water through leaching and surface water runoff during rain events.

Among the *Pectobacterium* recovered spp., two recently described species, *P. aquaticum* and *P. versatile*, dominated, representing, respectively, 46.6 and 39.9% of the recovered *Pectobacterium* spp. A recent taxonomic update of 265 *Pectobacterium* strains hosted at the CIRM-CFBP international collection that gathers strains isolated since 1944, showed that *P. versatile* is a broad spectrum species regularly isolated from a large number of cultivated plants. In contrast, no strain of *P. aquaticum* isolated from plants is hosted in this collection (Portier et al. 2020). Therefore, the abundance of both species in river water might have different origins. Interestingly, while *P. versatile* was recovered all along the stream course and was regularly isolated in the upper part of the watershed in Alpine pristine water area, *P. aquaticum* was mostly found in the lower part of the watershed and >50% of the strains were isolated from only two sampling sites. These two sampling sites were characterized by abundant presence of aquatic plants on their banks, suggesting that *P. aquaticum* could be associated with some of these plants on the riverbank. In contrast, the large circulation of *P. versatile* all along the stream course, both in the pristine area and the lower, agriculturally dominated part of the watershed, is reminiscent of what was observed another plant bacterial pathogen *P. syringae*. Actually, bacteria belonging to the *P. syringae* complex population were regularly isolated from Alpine lakes and streams and their ecology was proposed to be linked to the water cycle (Morris et al. 2013). However, strains of *P. versatile* are far less abundant in Alpine pristine water than strains of the *P. syringae* complex (Pédrón et al. 2020), and their presence in clouds or rain has not been reported (Failor et al. 2017). In addition, *P. versatile* occurrence along the watershed strongly correlates with environmental variables such as nitrate and DOC indicating a larger occurrence in the lower part of the watershed while previous work indicated that strains of the *P. syringae* complex are abundant in the upper part of the watershed (Monteil et al. 2014). Therefore, while *P. versatile* is the SRP species with the largest observed prevalence both on plant and in river stream, it behaves quite differently from strains of the *P. syringae* complex.

P. versatile, despite its large prevalence, has only recently been described. This is principally because of its close genomic proximity with *P. carotovorum*, which explains the previous mix-up of the two species (Portier et al. 2019, 2020). This mix-up was also favored by the fact that *P. carotovorum* and *P. versatile* both have a broad distribution on plants (Ma et al. 2007; Portier et al. 2020). Our river survey, however, indicated that *P. carotovorum* was far less abundant in stream water than *P. versatile* (36 versus 246 isolates) and was isolated from a smaller number of sites (nine versus 19 for *P. versatile*). The same was true for *P. quasiquaticum*, despite its close genomic proximity to *P. aquaticum* (Ben Moussa et al. 2021); its prevalence

TABLE 6. Pairwise average nucleotide identity (ANI) values between *Dickeya zea* and *D. oryzae* genomes^a

Description	1	2	3	4	5	6	7	8
1: <i>D. oryzae</i> A003-S1-M15	1.00	0.99	0.97	0.97	0.95	0.95	0.95	0.94
2: <i>D. oryzae</i> A642-S2-A17	0.99	1.00	0.97	0.97	0.95	0.95	0.95	0.94
3: <i>D. oryzae</i> ZYY5	0.97	0.97	1.00	0.99	0.95	0.95	0.95	0.94
4: <i>D. oryzae</i> EC1	0.97	0.97	0.99	1.00	0.95	0.95	0.95	0.94
5: <i>D. zea</i> MS2	0.95	0.95	0.95	0.95	1.00	0.98	0.98	0.96
6: <i>D. zea</i> A661-S21-A17	0.95	0.95	0.95	0.95	0.98	1.00	0.98	0.96
7: <i>D. zea</i> NCPBB3532	0.95	0.95	0.95	0.95	0.98	0.98	1.00	0.96
8: <i>D. zea</i> A586-S18-A17	0.94	0.94	0.94	0.94	0.96	0.96	0.96	1.00

^a ANI > 96% are shown in bold.

in river water was also one order-of-magnitude smaller (13 versus 219 isolates) with fewer sampling sites positive (five versus 12). This highlights the fact that closely related species have different ecological behaviors and warns against extensive generalization without careful analysis of the studied bacterial populations.

SRP pathogens regularly isolated from crop disease outbreaks such as *P. atrosepticum* and *P. brasiliense*, *D. solani*, or *D. dianthicola* were rarely isolated along the watershed. While the mean water temperature observed during this survey (10.9°C) could explain the rare occurrence of *Dickeya* spp., *Pectobacterium* spp. were recovered from a large range of water temperatures, and we experimentally observed the ability of *Pectobacterium* spp. to grow in sterilized river water at low temperature. *P. atrosepticum* is well known to be a specialized species mainly found on potato crops, which could explain its scarcity in water. *P. brasiliense* has a larger plant host spectrum and its rare occurrence was more surprising although it may suggest a poor survival capacity on soil or noncrop plants compared with species regularly observed in water, such as *P. versatile*.

The large majority of strains isolated during this survey belonged to two species, *P. aquaticum* and *P. versatile*, that are not known to be associated with severe outbreaks for crop culture. This suggests that the risk of infection may be overestimated when surveys do not include careful characterization of the SRP species involved. In that regard, taxonomical analysis with a single housekeeping gene could help to rapidly analyze the isolated species. However, the risk of infection with irrigation still remains, as species responsible for disease outbreak such as *P. atrosepticum*, *D. solani*, or *D. dianthicola* were sporadically isolated, albeit at low frequency. We also identified two strains of *P. peruvienne*. The *P. peruvienne* species was described following the strains isolated from diseased potato on the Peruvian altiplano but this species has not yet been described on crop plants in Europe (Faye et al. 2018; Waleron et al. 2018). The occurrence of *P. peruvienne* strains in European river water indicates surveys of microbial water quality could help to identify new bacterial threats not yet reported on plant in a given geographic area. Overall, our survey also revealed that the critical sites to be surveyed regularly to estimate the risk of SRP for crop culture are those located in the downstream section of the watershed, which is where most of the SRP strains are regularly found. Regular monitoring of well-chosen sites could help to prevent the risk of infection for crops.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Katherine Green for her help during the growth experiment in river water; Odile Berge and Frédérique Van Gijsegem for their help during river sampling; and Ariane Toussaint and Antoine Pourbaix for hosting us during the field samplings. This work has benefited from the expertise of the High-Throughput Sequencing Platform of I2BC, Gif sur Yvette, France.

LITERATURE CITED

Alič, Š., Naglič, T., Tušek-Žnidarič, M., Peterka, M., Ravnikar, M., and Dreo, T. 2017. Putative new species of the genus *Dickeya* as major soft rot pathogens in *Phalaenopsis* orchid production. *Plant Pathol.* 66:1357-1368.

Babinska, W., Motyka-Pomagruk, A., Sledz, W., Kowalczyk, A., Kaczynski, Z., and Lojkowska, E. 2021. The first polish isolate of a novel species *Pectobacterium aquaticum* originates from a Pomeranian lake. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18:5041.

Ben Moussa, H., Pédrón, J., Bertrand, C., Hecquet, A., and Barny, M.-A. 2021. *Pectobacterium quasiaquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71:71.

Bran+Luebbe. 2013a. Nitrite in water and seawater. Method No. G-173-96 Rev. 10. Bran & Luebbe, Noderstedt, Germany.

Bran+Luebbe. 2013b. Phosphate in water and seawater. Method No. G-175-96 Rev. 15. Bran & Luebbe, Noderstedt, Germany.

Bran+Luebbe. 2013c. Total nitrogen in water. Method No. G-392-08 Rev. 5. Bran & Luebbe, Noderstedt, Germany.

Bran+Luebbe. 2013d. Total phosphorous in water. Method No. G-393-08 Rev. 5. Bran & Luebbe, Noderstedt, Germany.

Burr, T. J., and Schroth, M. N. 1977. Occurrence of soft-rot *Erwinia* spp. in soil and plant material. *Phytopathology* 67:1382-1387.

Cappaert, M. R., Powelson, M. L., Franc, D. G., and Harrison, M. D. 1988. Irrigation water as a source of inoculum of soft rot *Erwinias* for aerial stem rot of potatoes. *Phytopathology* 78:1668-1672.

Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17:540-552.

Charkowski, A. O. 2018. The changing face of bacterial soft-rot diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56:269-288.

Cigna, J., Dewaegeire, P., Beury, A., Gobert, V., and Faure, D. 2017. A gapA PCR-sequencing assay for identifying the *Dickeya* and *Pectobacterium* potato pathogens. *Plant Dis.* 101:1278-1282.

Cother, E. J., and Gilbert, R. L. 1990. Presence of *Erwinia chrysanthemi* in two major river systems and their alpine sources in Australia. *J. Appl. Bacteriol.* 69:729-738.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:113.

Failor, K. C., Schmale, D. G., Vinatzer, B. A., and Monteil, C. L. 2017. Ice nucleation active bacteria in precipitation are genetically diverse and nucleate ice by employing different mechanisms. *ISME J.* 11:2740-2753.

Faye, P., Bertrand, C., Pédrón, J., and Barny, M.-A. 2018. Draft genomes of "*Pectobacterium peruvienne*" strains isolated from fresh water in France. *Stand. Genomic Sci.* 13:27.

Fikowicz-Krosko, J., Wszalek-Rozek, K., Smolarska, A., and Czajkowski, R. 2017. First report on isolation of soft rot *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* from symptomless bittersweet nightshade occurring in rural area in Poland. *J. Plant Pathol.* 99:294.

Franc, G. D., and Harrison, M. D. 1987. The role of contaminated irrigation water in the recontamination of *Erwinia* free seed potatoes. *Am. Potato J.* 64:438.

Gascuel, O. 1997. BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 14:685-695.

Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. 2010. SeaView Version 4: A multi-platform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27:221-224.

Gudmestad, N. C., and Secor, G. A. 1983. The bionomics of *Erwinia carotovora* in North Dakota. *Am. Potato J.* 60:759-771.

Guindon, S., and Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696-704.

Hélias, V., Hamon, P., Huchet, E., Wolf, J. V. D., and Andrivon, D. 2012. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathol.* 61:339-345.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., and Shevchik, V. E. 2014. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* 6:427-440.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Van Gijsegem, F. 2021. Diversity within the *Dickeya Zeae* complex, identification of *Dickeya zeae* and *Dickeya oryzae* members, proposal of the novel species *Dickeya parazeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., des-Combes, C. J., Briolay, J., and Pritchard, L. 2021. Proposal for the creation of a new genus *Muscolia* gen. nov., reclassification of *Dickeya paradisiaca* (Samson et al. 2005) as *Muscolia paradisiaca* comb. nov. and description of a new species *Muscolia keenii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Jacot-des-Combes, C., and Briolay, J. 2019. *Dickeya lacustris* sp. nov., a water-living pectinolytic bacterium isolated from lakes in France. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69:721-726.

Le, H. T., Pommier, T., Ribolzi, O., Soulléuth, B., Huon, S., Silvera, N., and Rochelle-Newall, E. 2022. Overland flow during a storm event strongly affects stream water chemistry and bacterial community structure. *Aquat. Sci.* 84:7.

Le, H. T., Rochelle-Newall, E., Auda, Y., Ribolzi, O., Sengtaeuanghoung, O., Thébault, E., Soulléuth, B., and Pommier, T. 2018. Vicinal land use change strongly drives stream bacterial community in a tropical montane catchment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94:fiy155.

Lee, D. H., Kim, J.-B., Lim, J.-A., Han, S.-W., and Heu, S. 2014. Genetic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* isolated in Korea. *Plant Pathol. J.* 30:117-124.

Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H.-S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T., Kelman, A., and Charkowski, A. O. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot *Enterobacteriaceae* genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology* 97:1150-1163.

Maddox, D. A., and Harrison, M. D. 1988. Presence and population dynamics of *Erwinia carotovora* in irrigation water in south central Colorado. *J. Appl. Bacteriol.* 64:169-182.

McCarter-Zorner, N. J., Franc, G. D., Harrison, M. D., Michaud, J. E., Quinn, C. E., Sells, I. A., and Graham, D. C. 1984. Soft rot *Erwinia*

- bacteria in surface and underground waters in southern Scotland and in Colorado, United States. *J. Appl. Bacteriol.* 57:95-105.
- Moncil, C. L., Lafolie, F., Laurent, J., Clement, J.-C., Simler, R., Travi, Y., and Morris, C. E. 2014. Soil water flow is a source of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in subalpine headwaters. *Environ. Microbiol.* 16: 2038-2052.
- Morris, C. E., Monteil, C. L., and Berge, O. 2013. The life history of *Pseudomonas syringae*: Linking agriculture to earth system processes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:85-104.
- Oulghazi, S., Cigna, J., Lau, Y. Y., Moumni, M., Chan, K. G., and Faure, D. 2019a. Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus *Pectobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69:470-475.
- Oulghazi, S., Pédrón, J., Cigna, J., Lau, Y. Y., Moumni, M., Van Gijsegem, F., Chan, K.-G., and Faure, D. 2019b. *Dickeya undicola* sp. nov., a novel species for pectinolytic isolates from surface waters in Europe and Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69:2440-2444.
- Parkinson, N., DeVos, P., Pirhonen, M., and Elphinstone, J. 2014. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:2264-2266.
- Pédrón, J., Bertrand, C., Taghouti, G., Portier, P., and Barny, M.-A. 2019. *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69:745-751.
- Pédrón, J., Guyon, L., Lecomte, A., Blottière, L., Chandeysson, C., Rochelle-Newall, E., Raynaud, X., Berge, O., and Barny, M.-A. 2020. Comparison of environmental and culture-derived bacterial communities through 16S metabarcoding: A powerful tool to assess media selectivity and detect rare taxa. *Microorganisms* 8:1129.
- Peltzer, S., and Sivasithamparam, K. 1988. Sero-groups of *Erwinia carotovora* associated with water, soil, tuber, and stems of potato plants in Western Australia. *N. Z. J. Exp. Agric.* 16:265-270.
- Perombelon, M. C. M., and Hyman, L. J. 1989. Survival of soft rot coliforms, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica* in soil in Scotland. *J. Appl. Bacteriol.* 66:95-106.
- Portier, P., Pédrón, J., Taghouti, G., Dutrieux, C., and Barny, M.-A. 2020. Updated taxonomy of *Pectobacterium* genus in the CIRM-CFBP bacterial collection: When newly described species reveal "old" endemic population. *Microorganisms* 8:1441.
- Portier, P., Pédrón, J., Taghouti, G., Fischer-Le Saux, M., Caullireau, E., Bertrand, C., Laurent, A., Chawki, K., Oulghazi, S., Moumni, M., Andriyon, D., Dutrieux, C., Faure, D., Hélias, V., and Barny, M.-A. 2019. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69:3207-3216.
- Potrykus, M., Golanowska, M., Sledz, W., Zoledowska, S., Motyka, A., Kolodziejska, A., Butrymowicz, J., and Lojkowska, E. 2016. Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. *Plant Dis.* 100:408-417.
- Powelson, M. L., and Apple, J. D. 1984. Soil and seed tubers as sources of inoculum of *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* for stem soft rot potatoes. *Phytopathology* 74:429-432.
- Rochelle-Newall, E., Hulot, F. D., Janeau, J. L., and Merroune, A. 2014. CDOM fluorescence as a proxy of DOC concentration in natural waters: A comparison of four contrasting tropical systems. *Environ. Monit. Assess.* 186:589-596.
- Sławiak, M., van Beckhoven, J. R. C. M., Spekseijder, A. G. C. L., Czajkowski, R., Grabe, G., and van der Wolf, J. M. 2009. Biochemical and genetic analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 125:245-261.
- Tavare, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Pages 57-86 in: *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*. R. M. Miura, ed. American Mathematical Society, Providence, RI.
- Toth, I. K., Barny, M.-A., Brurberg, M. B., Condemine, G., Czajkowski, R., Elphinstone, J. G., Hélias, V., Johnson, S. B., Moleleki, L. N., Pirhonen, M., Rossmann, S., Tsrör, L., van der Waals, J. E., van der Wolf, J. M., Van Gijsegem, F., and Yedidia, I. 2021a. *Pectobacterium* and *Dickeya*: Environment to disease development. Pages 39-84 in: *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*. F. Van Gijsegem, J. M. van der Wolf, and I. K. Toth, eds. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.
- Toth, I. K., Barny, M.-A., Czajkowski, R., Elphinstone, J. G., and Li, X. (Sean), Pédrón, J., Pirhonen, M., and Van Gijsegem, F. 2021b. *Pectobacterium* and *Dickeya*: Taxonomy and evolution. Pages 13-27 in: *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*. F. Van Gijsegem, J. M. van der Wolf, and I. K. Toth, eds. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.
- Tsrör, L., Lebiush, S., Erlich, O., Galilov, I., Chalupowicz, L., Reuven, M., Dror, O., and Manulis-Sasson, S. 2019. First report of latent infection of *Malva nicaeensis* caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Israel. *New Dis. Rep.* 39:4.
- Van Gijsegem, F., Toth, I. K., and van der Wolf, J. M. 2021. Soft rot *Pectobacteriaceae*: A brief overview. Pages 1-11 in: *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*. F. Van Gijsegem, J. M. van der Wolf, and I. K. Toth, eds. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.
- Waleron, M., Misztak, A., Waleron, M., Franczuk, M., Wielgomas, B., and Waleron, K. 2018. Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium peruvienne* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 41:85-93.
- Waleron, M., Misztak, A., Waleron, M., Jonca, J., Furmaniak, M., and Waleron, K. 2019. *Pectobacterium polonicum* sp. nov. isolated from vegetable fields. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69:1751-1759.
- Wang, X., He, S.-W., Guo, H.-B., Han, J.-G., Thin, K.-K., Gao, J.-S., Wang, Y., and Xiang, X.-X. 2020. *Dickeya oryzae* sp. nov., isolated from the roots of rice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70:4171-4178.
- Zaczek-Moczyłowska, M. A., Fleming, C. C., Young, G. K., Campbell, K., and O'Hanlon, R. 2019. *Pectobacterium* and *Dickeya* species detected in vegetables in Northern Ireland. *Eur. J. Plant Pathol.* 154:635-647.
- Zoledowska, S., Motyka, A., Zukowska, D., Sledz, W., and Lojkowska, E. 2018. Population structure and biodiversity of *Pectobacterium parmentieri* isolated from potato fields in temperate climate. *Plant Dis.* 102:154-164.

3. Chapeau conclusif

Cette étude a mis en évidence la prédominance des bactéries du genre *Pectobacterium* dans l'eau. Les espèces du genre *Dickeya* étaient rares dans l'eau et n'ont été isolées que lorsque la température de l'eau était égale ou supérieure à 19,5 °C. Les tests de croissance en eau ont confirmé que les espèces du genre *Dickeya* avaient une difficulté à croître dans l'eau à faible température. Cela indique que la température est une variable clé qui explique la variation d'abondance observée entre les deux genres. Les espèces de SRP les plus abondantes dans l'eau sont *P. versatile* et *P. aquaticum*. À l'exception de *P. versatile*, les espèces des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* responsables des épidémies en champs ont été rarement isolées dans l'eau de rivière. *P. aquaticum* étant uniquement isolé dans l'eau et elle n'a pas été détectée sur les plantes.

Ceci sous-entend que les risques éventuels que peut représenter l'eau en tant que réservoir environnemental des SRP pourraient être surestimés, si l'on se focalise uniquement sur l'abondance des SRP dans l'eau. Par conséquent, afin de mieux appréhender les risques liés aux réservoirs environnementaux et de développer des stratégies de lutte efficaces, il est important de caractériser taxonomiquement les différentes espèces de SRP et leurs abondances relatives, mais également de caractériser et évaluer le potentiel pathogène des nouvelles espèces 'environnementales'.

Dans ce contexte, dans le quatrième chapitre de ma thèse, je me suis intéressé à l'étude des caractéristiques génomiques, fonctionnelles et au potentiel pathogène des espèces *P. aquaticum* et *P. quasiahquaticum*, toutes deux isolées d'eau et non détectées sur les plantes.

Chapitre 4 : « études des caractéristiques génomiques, fonctionnelles et des traits évolutifs de deux espèces de *Pectobacterium* : *P. aquaticum* et *P. quasiaquaticum* exclusivement isolées dans l'eau »

1. Chapeau introductif

Dans le chapitre 3, il a été montré que dans l'eau de la rivière Durance, à l'exception de *P. versatile*, les souches responsables d'épidémie dans les cultures étaient rares. *P. versatile* était l'espèce de SRP la plus abondante dans l'eau (46,6 % des isolats d'eau de *Pectobacterium*). Cette espèce a été précédemment isolée de différentes plantes dans différents pays. *P. aquaticum*, est la deuxième espèce de SRP la plus abondante dans l'eau de la rivière Durance (39,9 % des isolats d'eau de *Pectobacterium*), et l'espèce proche *P. quasiahquaticum*, également isolée dans l'eau de la rivière Durance, est dix fois moins abondante. Ces deux espèces ont été également été isolées de différentes sources d'eau dans différents pays : de lacs artificiels situés en région parisienne (Ben Moussa et al. 2021; Pédrón et al. 2019), *P. aquaticum* a été isolée dans un lac en Pologne (Babinska et al. 2021) et *P. quasiahquaticum* a été isolée d'un canal d'eau issu de la rivière Meuse aux Pays-Bas (Jonkheer et al. 2021). Ceci indique que la distribution géographique de ces deux espèces n'est pas restreinte à la Durance. Malgré leur présence dans l'eau, ces deux espèces n'ont pas été rapportées sur plantes. Notamment, une étude rétrospective de la collection française de bactéries associées aux plantes, qui héberge plus de 200 souches de *Pectobacterium* isolées entre 1944 et 2019, a permis de montrer que *P. aquaticum* et *P. quasiahquaticum* n'avaient jamais été déposées dans cette collection avant notre étude (Portier et al. 2020). L'isolement exclusif de *P. aquaticum* et *P. quasiahquaticum* à partir d'eau, suggère que la niche principale de ces deux espèces de SRP pourrait ne pas être les plantes.

Dans ce chapitre, J'ai décidé de réaliser une étude génomique comparative entre *P. quasiahquaticum*, *P. aquaticum* et les autres espèces de *Pectobacterium* communément isolées des plantes. L'objectif est de déterminer les caractéristiques génomiques et fonctionnelles spécifiques à ces deux espèces. J'ai également évalué le pouvoir pathogène de ces deux espèces sur quatre plantes différentes. Ceci pourrait donner des indices sur le mode de vie ou la niche écologique potentielle de ces deux espèces.

Contribution :

Dans cet article, j'ai réalisé les différentes analyses génomiques et fonctionnelles, réalisé des tests de virulence sur les plantes, réalisé la mise en forme graphique des résultats, rédigé la première version du manuscrit et pris part aux corrections proposées lors de l'évaluation par les pairs.

2. **Article 3 : « Two species with a peculiar evolution within the genus *Pectobacterium* suggest adaptation to a new environmental niche»**

RESEARCH ARTICLE

Two species with a peculiar evolution within the genus *Pectobacterium* suggest adaptation to a new environmental niche

Hajar Ben Moussa¹  | Jacques Pédrón¹ | Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat² | Marie-Anne Barny¹ 

¹Sorbonne Université, INRAE, IRD, CNRS, UPEC, UMR 7618 Institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, Paris, France

²Université de Lyon, CNRS, UCBL, INSA, UMR5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, Villeurbanne, France

Correspondence

Marie-Anne Barny, Sorbonne Université, INRAE, IRD, CNRS, UPEC, UMR 7618 Institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, F-75252 Paris, France.

Email: marie-anne.barny@sorbonne-universite.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-19-CE35-0016-03

Abstract

Historically, research on Soft Rot *Pectobacteriaceae* (SRP) has focused on economically important crops and ornamentals and knowledge of these bacteria outside the plant context remains poorly investigated. Recently, two closely related species *Pectobacterium aquaticum* and *Pectobacterium quasiahquaticum* were isolated from water and have not been isolated from any plant yet. To identify the distinctive characteristics of these two species, we performed a comparative genomic analysis of 80 genomes representing 19 *Pectobacterium* species and performed an evolutionary reconstruction. Both water species underwent a reduction in genome size associated with a high pseudogene content. A high gene loss was predicted at the emergence of both species. Among the 199 gene families missing from both *P. aquaticum* and *P. quasiahquaticum* genomes but present in at least 80% of other *Pectobacterium* genomes, COG analysis identified many genes involved in nutrient transport systems. In addition, many type II secreted proteins were also missing in both species. Phenotypic analysis revealed that both species had reduced pectinolytic activity, a biofilm formation defect, were highly motile and had reduced virulence on several plants. These genomic and phenotypic data suggest that the ecological niche of *P. aquaticum* and *P. quasiahquaticum* may differ from that of other *Pectobacterium* species.

INTRODUCTION

Soft rot *Pectobacteriaceae* (SRP) are plant pathogenic bacteria that cause soft rot disease in a wide range of plants worldwide. SRP regroups three genera *Pectobacterium*, *Dickeya* and *Musicola* (Charkowski, 2018; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2021). Collectively, SRP species infect at least 35% of angiosperm plant orders all over the world (Ma et al., 2007; Portier et al., 2020). Taxonomic studies recognize 34 species within the SRP group, of which 21 belong to the genus *Pectobacterium*, 12 belong to the *Dickeya* genus and 2 were formerly assigned to the *Dickeya* genus and now belong to the newly described genus *Musicola* (Ben Moussa et al., 2021; Hugouvieux-Cotte-Pattat

et al., 2021; Hugouvieux-Cotte-Pattat & Van Gijsegem, 2021; Toth, Barny, Czajkowski, et al., 2021). The different SRP species differ in their host range. For example, *Pectobacterium betavasculorum* was recorded mainly on sugar beet and *Pectobacterium atrosepticum* on *Solanaceae*, whereas *Pectobacterium versatile*, *Pectobacterium brasiliense* or *Pectobacterium carotovorum* were isolated from various crops and ornamentals (Portier et al., 2020). The known geographical distribution also varied between species. *Pectobacterium cacticidum* occurs only in desert regions where the bacteria cause soft rot on various cacti (Alcorn et al., 1991). *P. atrosepticum* is common in cool climates, while *P. carotovorum*, *P. brasiliense*, *Pectobacterium odoriferum* and *P. versatile* are

recorded worldwide in different climatic zones (Oulghazi et al., 2021; Portier et al., 2020; Toth, Barny, Brurberg, et al., 2021).

The most important factor common to all SRP species is their ability to rot the infected plant tissue. This rotting ability is based on the secretion of plant cell wall degrading enzymes (PCWDEs) through a type II secretion system (Charkowski, 2018; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2014). These PCWDEs collectively destroy the pecto-cellulosic plant cell wall leading to rot symptoms. Unlike many other gram-negative plant pathogens that require a type III secretion system for pathogenicity (Büttner & He, 2009; Hueck, 1998), the type III secretion system is not essential for SRP pathogenesis (Kim et al., 2009).

As SRP attacks cultivated plants, particular attention has been paid to surface waters that could be used for irrigation purposes. A metagenomic study showed that SRP are rare in surface water as they are not detected by a classical 16S metabarcoding approach (Pédrón et al., 2020). Nevertheless, SRP can be isolated from surface water using the highly efficient semi-selective medium CVP (Burr & Schroth, 1977; Hélias et al., 2012). Water surveys indicate that SRP strains belonging to the genus *Pectobacterium* usually dominate and can be isolated at water temperatures as low as 3.6°C (Ben Moussa et al., 2022). In contrast, SRP belonging to the *Dickeya* genus was only recorded when water temperatures were higher than 16°C (Ben Moussa et al., 2022; Cother & Gilbert, 1990). Recently, several water surveys allowed the isolation and characterization of several new SRP species belonging to either the *Pectobacterium* or *Dickeya* genera (Ben Moussa et al., 2021; Ben Moussa et al., 2022; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2019a; Oulghazi, Cigna, et al., 2019; Oulghazi, Pédrón, et al., 2019; Parkinson et al., 2014; Pédrón et al., 2019; Waleron et al., 2019). Some of these species initially recorded in water have also been found on plants. For example, *Dickeya undicola* was isolated from diseased carrots in Taiwan (Wei et al., 2021) and *Dickeya lacustris* was isolated from the rhizosphere of asymptomatic pond-dwelling plants (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2019a). However, potential host plants remain to be discovered for many water-isolated species. Notably, attempts to identify potential host plants by screening the historical CIRM-CFBP collection of *Pectobacterium* strains isolated from plants around the world from 1944 to 2018 revealed that none of these plant-isolated strains belonged to the two closely related species *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* (Ben Moussa et al., 2021; Pédrón et al., 2019; Portier et al., 2020). This was surprising as *P. aquaticum* is a dominant SRP species in river surface water (Ben Moussa et al., 2022). Although closely related, the abundance of *P. quasiquaticum* in river water is an order of magnitude lower than that of *P. aquaticum* (Ben Moussa

et al., 2022) highlighting the different ecological behaviour of these two species.

The present work aimed to analyze the genomes of these two species, which have not yet been recorded on plants, and to compare them with those of plant-isolated species of the genus *Pectobacterium*. This genomic analysis was complemented by phenotypic analysis of protease, cellulase and pectinase secretion, biofilm formation, swimming ability and maceration capacity on different plant materials. Together, these genomic and phenotypic analyses challenged the ecological niche of both species and raised the hypothesis that plants may not be the primary reservoir for these species.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Genome annotation

In August 2020, the sequences of 177 *Pectobacterium* genomes were retrieved from the GenBank database. To this set, we added 15 genomes from our collection, which were later published in the GenBank database. They represent 19 *Pectobacterium* species. No genome of *Pectobacterium cacticidum* was available at the time of this study. When available, six genomes were selected per species including at least one complete genome. In this database, species represented by more than six genomes were *P. atrosepticum*, *P. brasiliense*, *P. carotovorum*, *Pectobacterium parmentieri*, *Pectobacterium polaris*, *P. versatile*, *P. odoriferum*, *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*. To choose six genomes representative of each species, pairwise ANI analysis was performed and a general phylogenetic tree of the *Pectobacterium* strains was constructed. We noted that several genomes were misclassified: *Pectobacterium polaris* strains WBC11, WBC9, and WB6 are affiliated with the species *P. parvum*, *P. carotovorum* S1.15.11.2D is affiliated with *P. brasiliense* and *P. carotovorum* PC1 belongs to the species *P. aroidearum* (Table S1). For each species, strains were selected with pairwise ANI values among the lowest for the species. The position of strains in the general phylogenetic tree was also considered to select genomes as diverse as possible within the species. When possible, strains were also selected from different plant hosts. When less than six genomes were available for a species, all the available genomes were included in the analysis. The species represented by less than six genomes were *Pectobacterium actinidiae* (three genomes), *Pectobacterium aroidearum* (four genomes), *Pectobacterium betavasculorum* (two genomes), *Pectobacterium peruvienne* (three genomes), *Pectobacterium polonicum* (one genome), *Pectobacterium punjabense* (one genome), *Pectobacterium wasabiae* (three genomes),

Pectobacterium zantedeschiae (two genomes) and *Pectobacterium fontis* (one genome). The genomes completeness was assessed with the BUSCO software using the enterobacterales_odb10 dataset (with 440 genes) (Manni et al., 2021a, 2021b,) and 80 genomes with complete BUSCO scores equal to or greater than 98% were retained. Details of selected genomes are provided in Table S1. Protein coding sequences were extracted from GenBank files, and functional annotation was performed using eggNOG-mapper v 2.1.3 db v5.0.2. (Cantalapiedra et al., 2021). About 14,127 genes out of the 16,288 homologous gene families that compose the pangenome of the *Pectobacterium*, were annotated by eggNOG-mapper. The web server dbCAN2 was used for automated carbohydrate-active enzyme annotation (<https://bcb.unl.edu/dbCAN2/>) (Zhang et al., 2018). General genome characteristics like genome size or pseudogenes content were recovered from NCBI. The NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) detected a total of 1934 pseudogenes in the 12 analyzed genomes of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*. The ancestral function of these pseudogenes is indicated in Table S2.

Abundance matrix of homologous gene families

A reciprocal all-against-all BLASTp of protein-coding sequences of the 80 *Pectobacterium* genomes was performed using protein–protein BLAST v2.10.1+ (Altschul et al., 1990) with a maximal e-value of $1e^{-5}$. Clustering of homologous nucleotide sequences was performed with SiLix v1.2.11 software (Miele et al., 2011) with a minimum identity of 70% and minimal sequence overlap of 70%. SiLiX predicted a total of 16,288 homologous families. The abundance matrix built from the SiLix output indicated for each genome if the predicted homologous gene families were absent or present in one or multiple copies.

Reference phylogeny of *Pectobacterium* species

From the 80 selected *Pectobacterium* genomes and the *Dickeya dadantii* 3937 genome, a set of 412 out of 440 BUSCO single-copy orthologous genes of the enterobacterales_odb10 dataset was recovered. The nucleotide sequences were aligned with the software Muscle and then concatenated. The phylogenetic tree was built using the PhyML method, the General Time-Reversible (GTR) substitution model (Nei & Kumar, 2000) implemented in MEGA11 software (Stecher et al., 2020; Tamura et al., 2021). Bootstrap percentages were calculated based on 100 replicates and the *D. dadantii* 3937 genome was used as an outgroup.

Evolutionary gene families gains and losses analysis with COUNT

The COUNT program (Csuos, 2010) was used to study the evolution of the gene repertoire within the *Pectobacterium* genus. COUNT uses phylogenetic models of birth and death in probabilistic inference. Reference phylogeny and the abundance matrix of gene families were loaded in the programme and the rate was optimized using the gain-loss-duplication model with no restriction on the lineage-specific rates with Poisson distribution set at the root. The other parameters remain by default. One hundred rounds of optimization were computed. Posterior probability analysis was then performed.

Analysis of genes missing in *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*

To verify whether the missing genes were genuinely absent from the genomes of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* or if they were erroneously labelled as missing due to annotation issues, we retrieved from *P. polaris* NIBIO1392 genome the nucleotide sequences of the 199 genes identified as missing in both *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*. Next, a nucleotide BLAST was performed using these *P. polaris* sequences as queries on genomes of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*. When an alignment was found, we manually verified the homologous region. A gene was categorized as missing if it aligned with a non-coding region or with a gene from a gene family different from the one of the query *P. polaris* sequence. A gene was categorized as a pseudogene if it aligned to a pseudogene of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* as identified by NCBI PGAP (see Table S3).

Strains and media

The strains used in the different phenotypic analyses are described in Table S4 (strains used in plant virulence, pectinase, cellulase, protease and swimming assays) and Table S5 (strains used in biofilm formation assay). The media used in the different phenotypic analyses were lysogeny broth (LB) without NaCl (10 g L^{-1} tryptone, 5 g L^{-1} yeast extract and 15 g L^{-1} agar, hereafter in the text LB), 10% TSA (3 g L^{-1} Tryptic Soy Broth and 15 g L^{-1} agar) and M63 supplemented with fructose unless otherwise stated (Miller, 1972). Strains were grown at 28°C except otherwise stated.

Plant virulence assays

Strains were grown overnight in liquid LB medium under agitation. Then $100\text{ }\mu\text{L}$ of the LB cultures were

spread on a 10% TSA plate that was incubated for 24 h. The bacteria were then scraped off the plates and resuspended in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) and adjusted to an OD₆₀₀ nm of 0.1 (for chicory leaf) or 1.0 (for tomato, carrot and potato) and 10 µL of the bacterial suspension was injected into the potato tuber, the tomato fruit or the carrot root. For chicory leaves, 10 µL of bacterial suspension was deposited on a 1 cm incision made in the centre of the leaf. A minimum of 10 independent inoculations were performed for each tested plant species. All the inoculated plants were placed on a wet paper towel in a plastic box. The boxes were closed and wrapped with plastic film to prevent loss of humidity and incubated for 48 h (chicory) or 72 h (potato, carrot and tomato). The macerated plant tissues were weighed at the end of the experiment.

Biofilm formation, pectinase, cellulase, protease and swimming assays

Biofilm formation was assessed as described by O'Toole GA in 2011 (O'Toole, 2011). Briefly, bacteria were grown overnight in LB medium and 30 µL were used to inoculate 3 mL of M63 medium. The culture was kept at room temperature without agitation for 11 days and biofilm formation was then assessed. Production of extracellular enzymes was detected on specific media as previously described (Ji et al., 1987). Briefly, pectinase secretion was detected after growth for 24 h at 30°C on plates containing M63 medium supplemented with glycerol (2 g L⁻¹) and polygalacturonate (4 g L⁻¹). After flooding the plates for a few seconds with a saturated solution of copper acetate, a clear zone appears immediately around the colonies able to degrade polygalacturonate when the copper solution is removed. Cellulase secretion was detected after growth for 24 h at 30°C on plates containing M63 medium supplemented with glycerol (2 g L⁻¹) and carboxy-methyl-cellulose (10 g L⁻¹). After flooding for 10 min with congo red (5 g L⁻¹) and washing for 5 min with 1 M NaCl, clear zones appeared around the colonies able to degrade cellulose. For cellulase and pectinase, the diameter including the halo and the colony were recorded. Protease secretion was tested on LB agar plates containing skim milk powder (6.25 g L⁻¹), and the size of the clear zones next to the colonies was recorded after plate incubation for 24 h and 48 h at 30°C. The motility of the strains was tested on semisolid agar plates (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2019b). Briefly, bacterial colonies picked from fresh LB plates were inoculated by stabbing into LB plates containing 3 g L⁻¹ agar. The diameter of the growth area was measured after incubation at 16 h at 30°C.

Statistical analysis

Statistical analyses in all phenotypic analyses (biofilm formation, pectinase, cellulase and protease secretion)

and plant virulence assays were performed in R version 4.0.2 using a Kruskal–Wallis test with *p* value <0.05 followed by a posthoc test (Dunn test with Bonferroni correction).

RESULTS

P. aquaticum and *P. quasiquaticum* genome size and pseudogene number

To determine the features that distinguish *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* from other *Pectobacterium* spp., we first compared the genome size of 80 genomes belonging to 19 *Pectobacterium* species (Figure 1A). Genome sizes ranged from 4.15 Mb (*P. fontis*) to 5.08 Mb (*P. zantedeschiae*). Interestingly, the three water-isolated species, *P. fontis*, *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* had the smallest genomes with median genome sizes of 4.15, 4.35 and 4.40 Mb respectively (Figure 1A). We then compared the number of homologous gene families observed per genome. The number of homologous gene families in *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* was also lower than in other *Pectobacterium* species, except in *P. fontis* (Figure 1B). The number of pseudogenes observed in the 80 studied genomes ranged from 41 genes (*P. carotovorum* and *P. atrosetticum*) to 221 (*P. aquaticum*) (Figure 1C). Both *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* were among the species with the highest pseudogene content, together with *P. odoriferum* and *P. parvum*, with a median number of pseudogenes per genome of 168, 154, 171 and 155, respectively (Figure 1C; see Table S2 for the ancestral functions of these pseudogenes). The reduced genome size and the high pseudogene content observed within the genomes of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* are peculiar within the genus *Pectobacterium*.

Comparison of the core and the pan-genome of each *Pectobacterium* species

Analysis of the core and pan genomes was performed on our set of species, excluding species with less than six genomes (Figure 2). All analyzed *Pectobacterium* species have an open pan-genome that expands with each genome added to the analysis. However, the rate of gene accumulation within the pan-genome varies between species, with three species, *P. quasiquaticum*, *P. parvum* and *P. atrosetticum*, showing the lowest rate of gene accumulation. Conversely, several species known to have a broad host spectrum, such as *P. versatile*, *P. brasiliense* and *P. odoriferum* (Portier et al., 2020), were among the species with the highest rate of gene accumulation within their pan-genome. Interestingly, the rate of gene accumulation within the pan-genome was higher for *P. aquaticum* than for *P. quasiquaticum*.

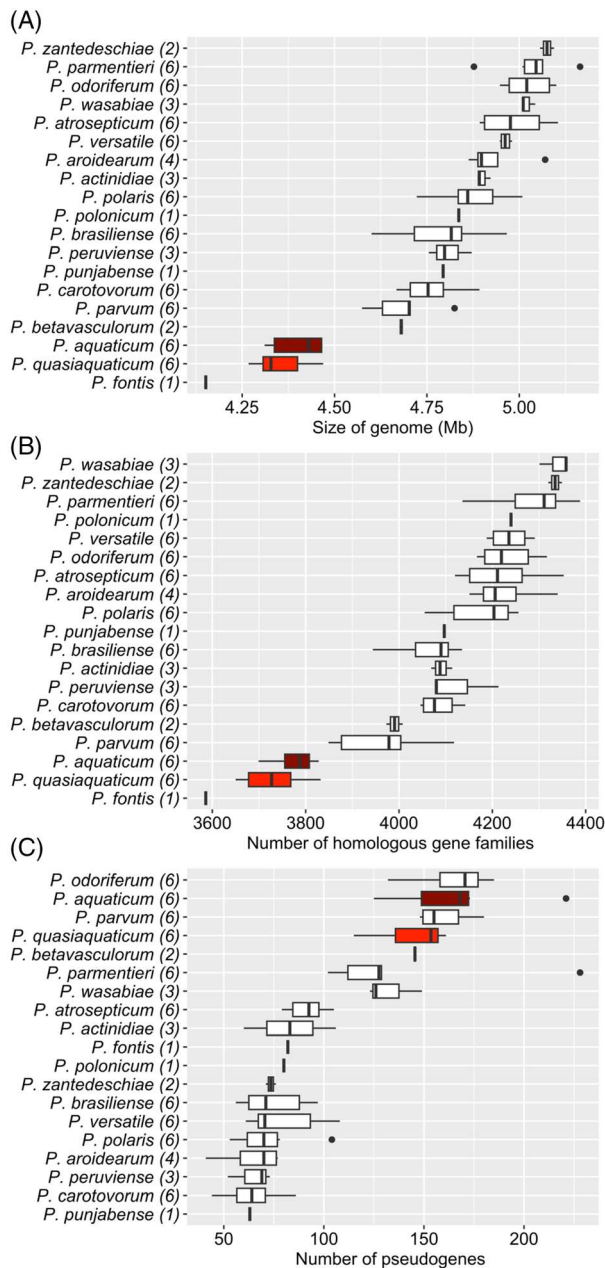


FIGURE 1 *Pectobacterium* species genomes size and pseudogenes content. Average genome size (A), number of homologous gene families (B) and number of pseudogenes (C) for different *Pectobacterium* species. For the species *P. aquaticum* and *P. quasიაquaticum*, boxplots are highlighted in dark red and red, respectively. Points outside the boxplot whiskers correspond to outliers. The number of genomes analyzed per species (*n*) is given in parentheses.

Evolutionary history of *P. aquaticum* and *P. quasიაquaticum* within the genus *Pectobacterium*

To study the evolutionary history of the gene repertoires of 19 *Pectobacterium* species we constructed a phylogenetic tree using 412 BUSCO single-copy orthologous genes (Figures S1 and S2). This phylogenetic

tree shows two major clusters. The first cluster contains nine species, *P. aquaticum*, *P. quasიაquaticum*, *P. brasiliense*, *P. parvum*, *P. polaris*, *P. versatile*, *P. carotovorum*, *P. odoriferum* and *P. actinidiae*. As expected, within this first cluster, *P. aquaticum* and *P. quasიაquaticum* form a subcluster due to their close proximity (Ben Moussa et al., 2021). The second cluster groups eight *Pectobacterium* species and the remaining two species, *P. aroidearum* and *P. fontis* were found at the base of the tree (Figures 3 and S1 and S2). This reference phylogeny, together with the gene family abundance matrix, was used to infer gene gain and loss events during the evolution of the *Pectobacterium* species using the COUNT program. A total of 2637 gene families were present in the common ancestor of all *Pectobacterium* species (Figure 3; for an uncollapsed version see Figure S3). After the divergence of *P. fontis*, 3700 gene families were present in the common ancestor of all the other *Pectobacterium* species. Interestingly, the highest gene loss (501 gene families) observed in this tree was at the node separating *P. aquaticum* and *P. quasიაquaticum* from the rest of the *Pectobacterium* species. This loss was only partially compensated by the gain of 148 gene families, resulting in a total loss of 353 gene families at this node. Such an important gene loss, not compensated by an equal or greater gene gain, is not observed at any other node of the *Pectobacterium* tree. Only a few nodes show a global loss of less than 60 gene families. The majority of nodes show either a net gain of genes or a balance between gains and losses. These data highlight the unusual evolutionary path of *P. aquaticum* and *P. quasიაquaticum* within the genus *Pectobacterium*.

COG distribution of missing and specific genes of *P. aquaticum* and *P. quasიაquaticum*

Whole genome analysis showed that the genomes of *P. aquaticum* and *P. quasიაquaticum* were smaller than those of most other *Pectobacterium* species. In addition, gene gain and loss analysis revealed a large reduction in homologous gene families at the node separating these two species from other *Pectobacterium* species. We were therefore interested in understanding which genes are missing from the genomes of *P. aquaticum* and *P. quasიაquaticum* strains compared to other *Pectobacterium* species. Using our set of 80 *Pectobacterium* genomes, we defined ‘missing’ gene families as gene families that are absent in 100% of *P. aquaticum* and *P. quasიაquaticum* genomes but are present in at least 80% of the other *Pectobacterium* genomes. Conversely, we also defined ‘specific’ gene families as gene families present in at least 80% of *P. aquaticum* and *P. quasიაquaticum* genomes but

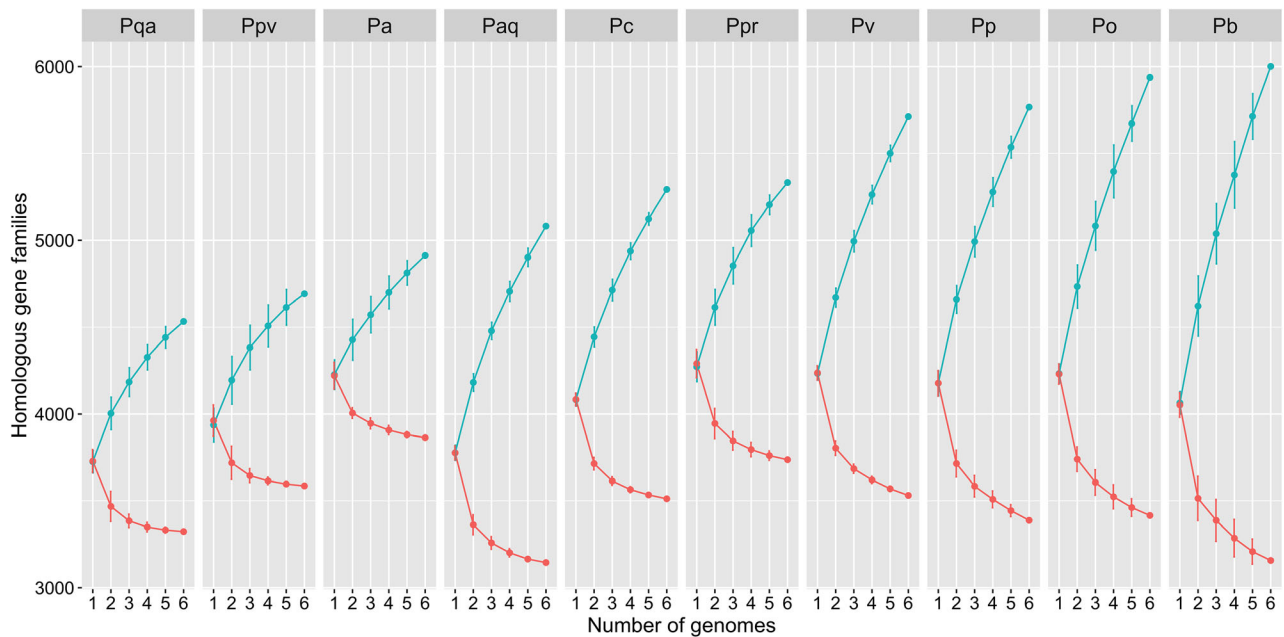


FIGURE 2 Core- and pan-genomes of 10 *Pectobacterium* species. The graph shows the estimated sizes of the core- and pan-genomes of *Pectobacterium* species in orange and blue, respectively, according to the number of genomes added (up to six). Species are indicated as follows from left to right; Pqa: *P. quasiquaticum*; Ppv: *P. parvum*; Pa: *P. atrosepticum*; Paq: *P. aquaticum*; Pc: *P. carotovorum*; Ppr: *P. parmentieri*; Pv: *P. versatile*; Pp: *P. polaris*; Po: *P. odoriferum*; Pb: *P. brasiliense*. This analysis was performed with the presence/absence matrix of homologous gene families using two scripts (accumulation_curve.R, rarefaction_curve.R) under R version 4.0.2 (Méric et al., 2014). Randomized genome sampling was performed 100 times. Standard deviations are shown as error bars.

present in less than 20% of the other *Pectobacterium* spp. genomes.

Using these definitions, 199 genes were missing in *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* while only 53 genes were specific to both species (Tables S6 and S7). This is consistent with the large gene loss event that occurred in the common ancestor of both species as inferred by the evolutionary analysis. We checked by BLAST analysis with the *P. polaris* sequences as queries if remnants of these 199 missing genes could be detected within the genomes of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*. Out of the 199 missing genes, only 47 had a remnant nucleotide homologous region in the *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* genomes. Out of these 47 homologous regions, 27 were pseudogenes of which 15 were found in both *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* (Table S3).

We mapped the missing genes on the *P. versatile* SCC1 complete genome and the specific genes on the *P. aquaticum* A212-S19-A16 complete genome (Figure S4). The missing genes are scattered across 110 locations in the *P. versatile* SCC1 genome, with 70 sites corresponding to a single gene and 40 sites corresponding to clusters of 2 to 10 genes. This indicated that the missing genes within *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* were not the result of large deletion events within the ancestor of both species but corresponded to a series of small deletion events. The specific genes were also scattered across 22 locations

within the *P. aquaticum* A212-S19-A16 genomes, with 14 sites corresponding to a single gene and 8 sites containing 2 to 10 genes, suggesting multiple independent acquisitions by horizontal gene transfer events.

To obtain information on gene function, we performed a COG analysis of the specific and missing gene families (Figure 4). Among the 53 gene families specific to *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* 48 were assigned to a COG category (Table S7). The three most represented COG categories were Function unknown (15 gene families), Transcription (7 gene families) and Carbohydrate transport and metabolism (5 gene families). Among the 199 gene families missing in *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*, 191 gene families were assigned to a COG category (Table S6). The most represented COG category is Inorganic ion transport and metabolism (36 gene families) and most of the genes assigned to this category (32/36) were involved in ion transport. Other COG categories affected by gene loss are the Function unknown (34 gene families), Cell wall/membrane/envelope biogenesis (24 gene families), Transcription (20 gene families), Amino acid transport and metabolism (19 gene families) and Carbohydrate transport and metabolism (18 gene families). Within these latter two categories, genes involved in transport are more abundant (24/37) than genes associated with metabolic functions. These two latter COG categories are also the main categories represented within the 53 gene families specific to *P. aquaticum* and

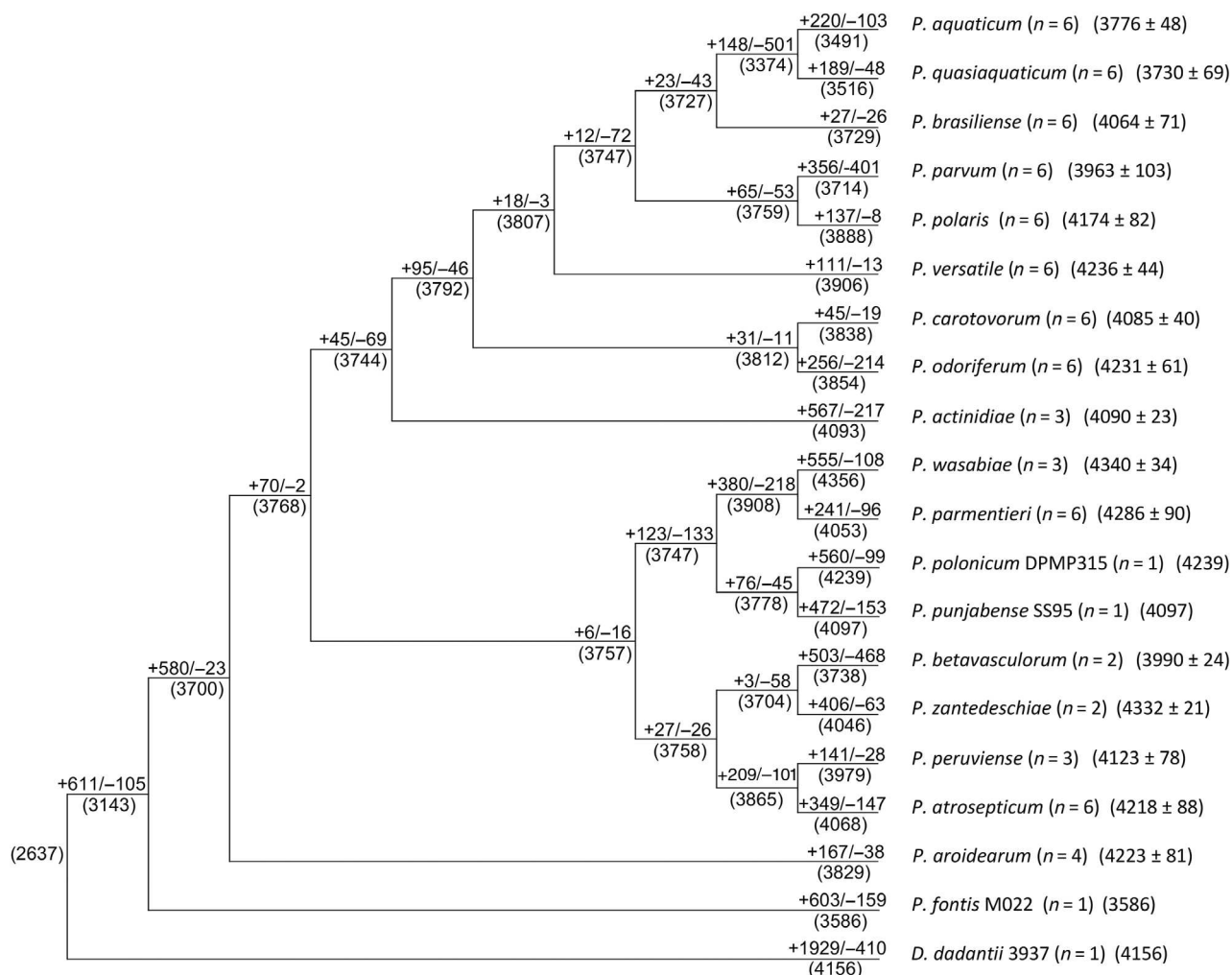


FIGURE 3 Evolution of gene family repertoire along the *Pectobacterium* phylogeny. The gains and losses of homologous gene families during the evolution of *Pectobacterium* species were inferred by COUNT. Values mapped above the branches correspond to +gains/−losses. Values below the branches given in parentheses correspond to the number of inferred gene families. The number of genomes analyzed per species (n) is given in parentheses. The mean number of inferred gene families at the strain level is also given between brackets, together with the standard deviation. Nodes by species that include the single strain level are described in Figure S3.

P. quasiquaticum including for instance sugar transporters. The differences in nutrient transport between *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* and other *Pectobacterium* species suggest that the niche occupied by these two species may be different from that of other *Pectobacterium* species. The number of missing (20) and specific (7) gene families in the COG Transcription category also denotes a noteworthy transcriptional reprogramming in both water-isolated species.

Distribution of secretion systems and secreted proteins among *Pectobacterium* species

As *Pectobacterium* spp. are well-known plant pathogens, we investigated the distribution of secretion systems and their cognate-secreted proteins involved in

virulence against plants (Figure 5; Table S8). The type I secretion system (T1SS) *PrtDEF* allows the secretion of metalloproteases that catalyze the degradation of plant cell wall structural proteins (Feng et al., 2014; Marits et al., 1999). Both the T1SS and the three associated secreted metalloproteases (Prt1, PrtW and PrtA) are conserved in all *Pectobacterium* species including *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* (Figure 5).

The Out-type II secretion system (T2SS-Out) is involved in the secretion of several pectinases and cellulase, which together are essential for the maceration of plant tissues and the development of soft rot symptoms (Charkowski et al., 2012; Pérombelon, 2002). Plant soft rot symptoms are the hallmark of SRP and, as expected, the genes encoding the T2SS-Out are well conserved within the 80 *Pectobacterium* genomes analyzed, except for *outN* that is not found in the genomes of *P. wasabiae*, *P. parmentieri* and *P. fontis*.

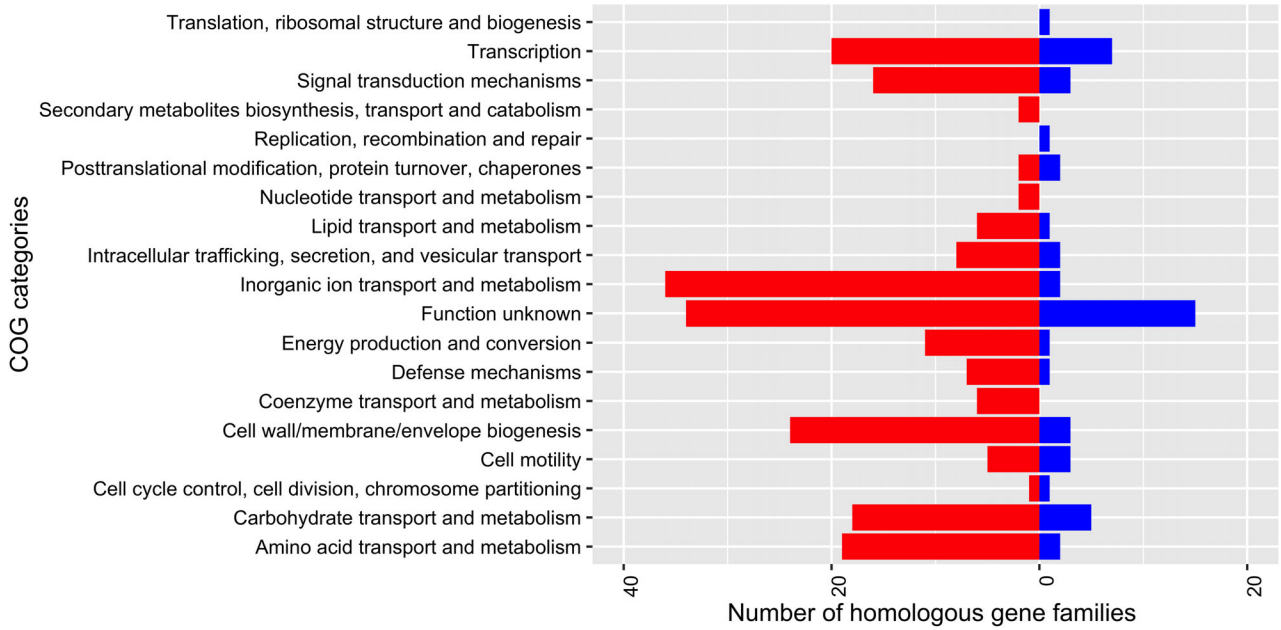


FIGURE 4 COGs distribution of gene families missing and specific to *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*. Missing genes are shown in red and specific genes are shown in blue. Of the 199 missing genes, 191 were assigned to COG categories and 48 out of 53 specific genes were assigned to COGs categories. A gene could be assigned to more than one category. Genes not assigned to any COG categories are not shown.

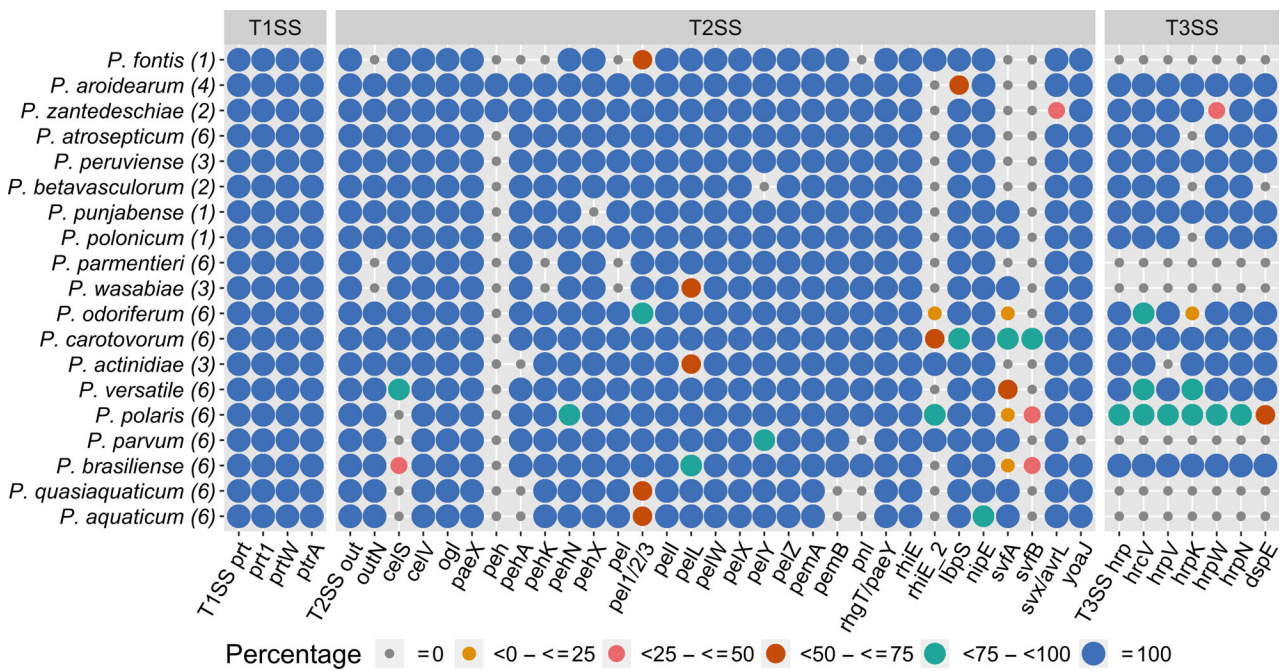


FIGURE 5 Distribution of type I, II and III secretion systems, pectinases and other secreted proteins in *Pectobacterium* species. The species analyzed are shown on the left together with the number of genomes analyzed given in parentheses after the species name. The repertoire of analyzed genes is shown at the bottom. The frequency of the gene within each species is represented by dots of different sizes and colours, as explained in the legend. For the triplicated *pel1/2/3* gene, the gene frequency (percentage) within a species corresponds to the average number of homologous gene copies within genomes of a species, divided by the maximum number of gene copies that can exist within a *Pectobacterium* genome (for *pel1/2/3* maximum copy number = 3), multiplied by one hundred. 'T1SS prt' label groups three genes *prtD*, *prtE* and *prtF*; 'T2SS out' label groups 14 genes (*outB*, *outC*, *outD*, *outE*, *outF*, *outG*, *outH*, *outI*, *outJ*, *outK*, *outL*, *outM*, *outO* and *outS*); 'T3SS hrp' label groups 23 genes (*hrcC*, *hrcJ*, *hrcN*, *hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*, *hrcT*, *hrcU*, *hrpA*, *hrpB*, *hrpD*, *hrpE*, *hrpF*, *hrpG*, *hrpJ*, *hrpL*, *hrpO*, *hrpP*, *hrpQ*, *hrpS*, *hrpT*, *hrpX* and *hrpY*). The detailed repertoire for each strain is shown in Table S8.

The *outN* gene encodes a dispensable T2SS protein that is also absent from the genomes of some *Dickeya* species (Jha et al., 2005). Among the 31 genes encoding pectinases and virulence proteins secreted by the T2SS-Out of *Pectobacterium* species (Condemine & Le Derout, 2022; Kazemi-Pour et al., 2004; Laasik et al., 2014; Liu et al., 2019), 10 genes (*celN*, *ogl*, *paex*, *pell*, *pelW*, *pelX*, *pelZ*, *pmeA*, *paey* and *rhiE*) are present in all genomes analyzed. The *Pectobacterium pel1/2/3* locus contains a series of two or three duplicated genes, usually called *pel1/2/3* and two genes from the *pel* locus are also found in all *Pectobacterium* genomes. Several other genes, *pehN*, *pelL*, *ipbS*, *nipE* and *svx* are also found in all *Pectobacterium* species, including *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* but are not found in a few genomes (Figure 5). For example, the gene *pelL* is absent from some genomes of *P. actinidiae*, *P. wasabiae* and *P. brasiliense*. Other genes, *celS*, *peh*, *pehA*, *pehK*, *pehX*, *pel*, *pelY*, *pmeB*, *pnl*, *rhiE_2*, *svfA*, *svfB*, *yoaJ* and the third copy at the *pel1/2/3* locus, occur at different frequencies within *Pectobacterium* species (Figure 5). For example, the gene encoding the polygalacturonase Peh is only detected in the genomes of *P. aroidearum* and *P. zantedeschiae* while the gene encoding the pectate lyase PelY is present in all *Pectobacterium* species except *P. betavascorum*. Among the 19 species analyzed, *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*, together with *P. fontis*, showed the highest number of missing genes among the pectinases or virulence factors secreted by the T2SS-Out. Genes encoding the polygalacturonases Peh and PehA, one copy of the pectate lyase Pel1/2/3, the pectin methylesterase PemB, the pectin lyase Pnl, the rhamnogalacturonate lyase RhiE_2 the cellulase CelS and the virulence factor SvfB were missing from all the analyzed genomes of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*.

We also checked the occurrence of the type-3 secretion system (T3SS) and cognate-secreted proteins within our genome set (Figure 5). The T3SS is the major pathogenicity determinant of many plant and animal pathogenic bacteria, (Gough, 1992). Its syringe-like structure injects several proteins, called effectors, directly into the host cells (Kubori et al., 1998). Many phytopathogenic bacteria possess a T3SS encoded by the *hrp-hrc* locus called the T3SS-*hrp* (Tampakaki et al., 2010). This T3SS-*hrp* is not essential for the *Pectobacterium* pathogenicity (Kim et al., 2009) but has been shown to enhance virulence (Kim et al., 2011). However, *P. parvum* possesses a different T3SS related to the *Salmonella* pathogenicity island 1 SPI-1 (Pasanen et al., 2020) that is not observed in any of the other *Pectobacterium* genomes except *P. brasiliense* S1.15.11.2D. Genes encoding the T3SS-*hrp* are found in several *Pectobacterium* species but are not detected in any of the analyzed genomes of *P. wasabiae*, *P. parmentieri*, *P. fontis*, *P. parvum*, *P. aquaticum* and

P. quasiquaticum and one out of six analyzed genomes of *P. polaris* (Figure 5, Table S8). In addition, the HrcV gene was missing in one of the six analyzed genomes of either *P. versatile* or *P. odoriferum* (Figure 5, Table S8). This suggests that the T3SS-*hrp* is not functional in these later strains, as the HrcV protein is an essential component of the T3SS-*hrp* (Hartmann & Büttner, 2013). The gene encoding the regulatory protein HrpV is not detected in *P. actinidiae* genomes (Figure 5, Table S8). Regarding the genes encoding the T3SS-secreted proteins, HrpK, HrpW, HrpN and DspE, they were detected at different frequencies within genomes harbouring the T3SS-*hrp* (Figure 5 and Table S8).

In conclusion, T1SS and its secreted proteins as well as T2SS are well conserved among all *Pectobacterium* species. The genomes of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* showed the highest number of missing genes encoding pectinases and T2SS-secreted virulence factors. The T3SS-*hrp* is missing in 6 out of 19 *Pectobacterium* species analyzed, including *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*. This analysis showed that *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* are under-equipped with many virulence factors compared to other *Pectobacterium* species.

Proteases, cellulases and pectinases activities

The reduced number of T2SS-secreted PCWDEs prompted us to compare the protease, cellulase and pectinase activities of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* strains with those of type strains of the five closest species, *P. brasiliense*, *P. carotovorum*, *P. versatile*, *P. polaris* and *P. odoriferum* (Figure 6 and Table S4). No significant difference in cellulase activity was found between *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* and other *Pectobacterium* species tested. Protease activity was in the same range for all the strains tested, although it was found to be statistically lower in *P. quasiquaticum* strains compared to other *Pectobacterium* species. In contrast, the pectinase activity was significantly lower in *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* compared to other *Pectobacterium* species.

Biofilm formation and swimming analysis

Analysis of orthologous gene families revealed that several genes involved in biofilm formation such as cellulose biosynthesis (Prigent-Combaret et al., 2012), type 1 fimbrial pili (Dahlberg et al., 2022) or the periplasmic protein PotD, which stimulates biofilm formation in *E. coli* (Thongbhubate et al., 2021), are absent from the genomes of *P. aquaticum* and

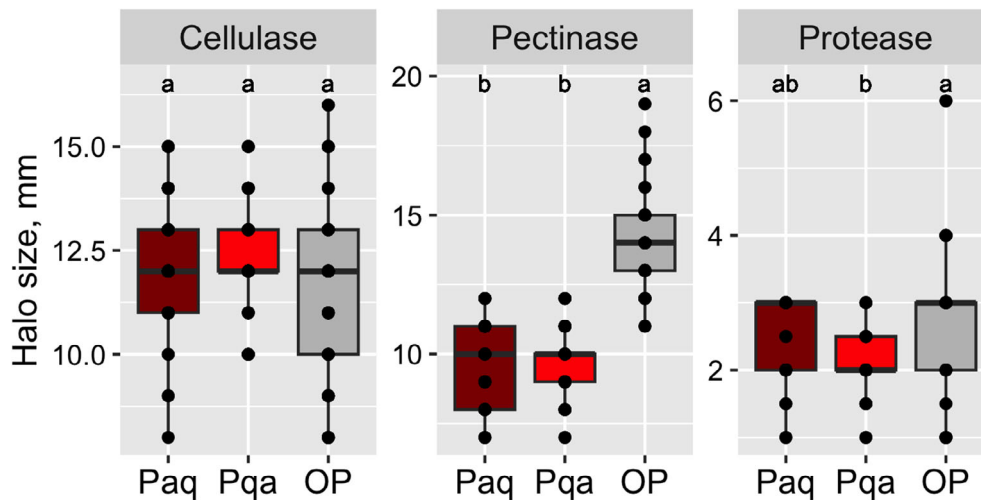


FIGURE 6 Pectinase, cellulase and protease secretion. Halo sizes measured for pectinase cellulase and protease activities are shown in dark red for *P. aquaticum* (Paq) strains; red for *P. quasiquaticum* (Pqa) strains and grey for strains belonging to other *Pectobacterium* species (OP). The result of the statistical analysis is indicated by the letters (A and B) at the top of the box plots. Box plots with the same letter are not statistically different from each other ($p > 0.05$ Kruskal–Wallis followed by Dunn test with the Bonferroni correction). The strains used are listed in Table S4.

P. quasiquaticum (Table S6). This prompted us to compare the ability of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* to form a biofilm with that of other *Pectobacterium* species (Figure 7 and Table S5). The biofilms formed by *Pectobacterium* ranged from thick biofilms that developed along the entire culture tube to small biofilms formed on the air surface. Several strains did not develop any biofilm (Figure 7A). *P. odoriferum* was the most efficient species in biofilm formation as the five strains of this species tested developed dense biofilms all along the culture tube, whereas *P. brasiliense* and *P. carotovorum* strains formed a thin air-surface biofilm. For other species such as *P. polaris* and *P. versatile* most of the strains tested formed air-surface biofilms of varying intensity and only 2 strains out of the 10 tested were unable to form biofilm. Of the 46 *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* strains tested, 42 were unable to form biofilm and only 4 developed a thin air-surface biofilm. Quantitative analysis of the biofilms confirmed that the amount of biofilm produced by both *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* was significantly lower than that produced by most *Pectobacterium* species, except for *P. brasiliense* (Figure 7B). These results showed that both *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* are severely impaired in their ability to form biofilms. We also performed a quantitative analysis of the swimming ability of both species and compared it with that of other *Pectobacterium* species (Figure S5). All the tested strains of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* were highly motile as observed for *P. brasiliense*. In contrast, *P. odoriferum* was non-motile, *P. carotovorum* *P. polaris* or *P. versatile* showed moderate motility. Thus, both *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* appeared to be significantly more motile than plant-

associated *Pectobacterium* species, except *P. brasiliense*. Interestingly, the swimming ability and the capacity to form biofilm showed inverse efficiencies in the tested species (Figures 7 and S5). The highly motile species *P. aquaticum*, *P. quasiquaticum* and *P. brasiliense* were unable to form thick biofilms. In contrast, the non-motile species *P. odoriferum* was efficient for biofilm formation.

Virulence phenotypes of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*

Both *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* species have been isolated based on their ability to degrade the polypectate present in CVP medium (Ben Moussa et al., 2022) and have been further shown to macerate potato slices (Ben Moussa et al., 2021; Pédrón et al., 2019) but their virulence has not been further investigated. We investigated the level of virulence of both species on different infection models such as chicory leaves, potato tubers, carrot roots and tomato fruits (Figure 8A). The maceration capacity of three *P. aquaticum* strains and three *P. quasiquaticum* strains was compared with that observed for *P. carotovorum*, *P. odoriferum*, *P. polaris*, *P. versatile* and *P. brasiliense* type strains (Figure 8B and Table S4). On potato and carrot, the *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* strains, together with the *P. carotovorum* type strain, were the strains with the lowest maceration capacity. On tomato, *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* strains caused small rotting symptoms similar to those observed for *P. carotovorum*, *P. odoriferum* and *P. polaris* type strains whereas *P. brasiliense* and *P. versatile* type

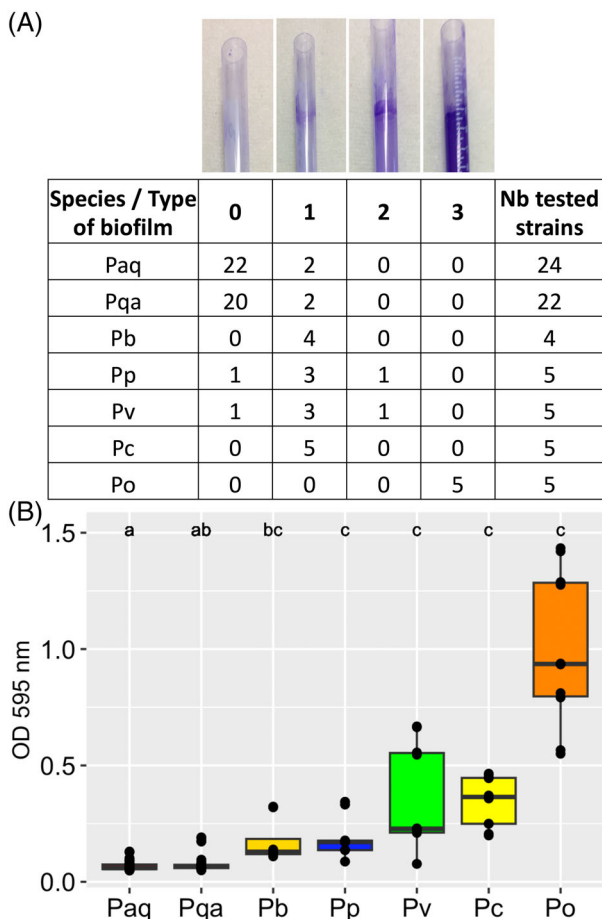


FIGURE 7 Biofilm formation. (A) Type of biofilm: the table shows the number of strains forming each type of biofilm in each species tested. Based on the intensity of biofilm production, the result was recorded as 0: no biofilm; 1: thin biofilm formed on the air surface; 2: dense biofilm formed on the air surface; 3: dense biofilm along the entire culture tube. (B) Quantitative analysis of biofilm formed. Paq: *P. aquaticum*; Pqa: *P. quasiquaticum*; Pb: *P. brasiliense*; Pp: *P. polaris*; Pv: *P. versatile*; Pc: *P. carotovorum*; Po: *P. odoriferum*. The result of the statistical analysis is indicated by the letters (A, B and C) at the top of the box plots. Species with the same letter are not statistically different from each other ($p > 0.05$ Kruskal–Wallis followed by Dunn test with the Bonferroni correction). The strains used are listed in Table S5.

strains caused significantly larger symptoms. On chicory, *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* strains caused moderate rotting symptoms of the same order of magnitude as those observed with *P. carotovorum*, *P. odoriferum* and *P. versatile* type strains but were weaker than those observed with *P. polaris* and *P. brasiliense* type strains. Overall, this indicates that both *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* are capable of macerating plant tissues, but with a low efficiency.

DISCUSSION

Three recently described *Pectobacterium* species, *P. fontis*, *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* have

been isolated from freshwater surface and their potential host plant (if any) is currently unknown. The present work focused on the two closely related species *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*. *P. fontis* was not included because this species is represented by a single strain and a single draft genome (Oulghazi, Cigna, et al., 2019). In contrast, numerous strains of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* have recently been isolated from waters in France, Poland and the Netherlands (Babinska et al., 2021; Ben Moussa et al., 2022; Jonkheer et al., 2021) and several genomes were available for both species at the start of the present study. Our genomic and phenotypic analysis together with the lack of isolation of these two species from plants questioned the niche of both species.

Genomic analysis revealed that *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* have distinct genomic signatures characterized by smaller genomes than those of plant-associated *Pectobacterium* species, a feature also shared with the *P. fontis* genome (Figure 1). A relationship between habitat and genome size has been previously described (Maistrenko et al., 2020) with free-living soil bacteria tending to have large genomes, whereas marine free-living and intracellular symbionts have small genomes (Chen et al., 2021; Giovannoni et al., 2014; Guieysse & Wuertz, 2012). One might therefore wonder whether the small genomes of water-isolated *Pectobacterium* are related to their habitat. Evolutionary analysis revealed an important loss of genes at the branch that separated *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* from other species (Figure 3), and many of the genes lost in actual genomes are involved in the transport of ions, carbohydrates and amino acids, suggesting that the niche of these two species may be different from that of the plant-associated *Pectobacterium* species (Figure 4). Missing genes included *fhuA*, *fhuB*, *fhuC* and *fhuD* involved in Fe(3+)-hydroxamate transport (Fecker & Braun, 1983) or *hasR*, *hasD*, *hasE* and *hasF* involved in heme transport (Wandersman & Delepelaire, 2004). As iron competition is an important factor in the development of a successful infection (Franza & Expert, 2013), these gene losses may affect the ability of the *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* to interact with plants. Many genes involved in sulphate transport, such as the sulphate transporter genes *cysP*, *cysT* and *cysW* or the aliphatic sulphonate transport genes *ssuA*, *ssuB*, *ssuC* and *ssuD* were also missing from the *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* genomes. These bacterial genes are induced when bacteria interact with plants (Andrés-Barrao et al., 2021) and again, their losses could alter plant-bacteria interactions. We also found that several genes encoding pectinases and T2SS-secreted virulence factors were missing from the genomes of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* (Figure 5). The loss of all these genes involved in the plant-bacteria interactions suggests that their function

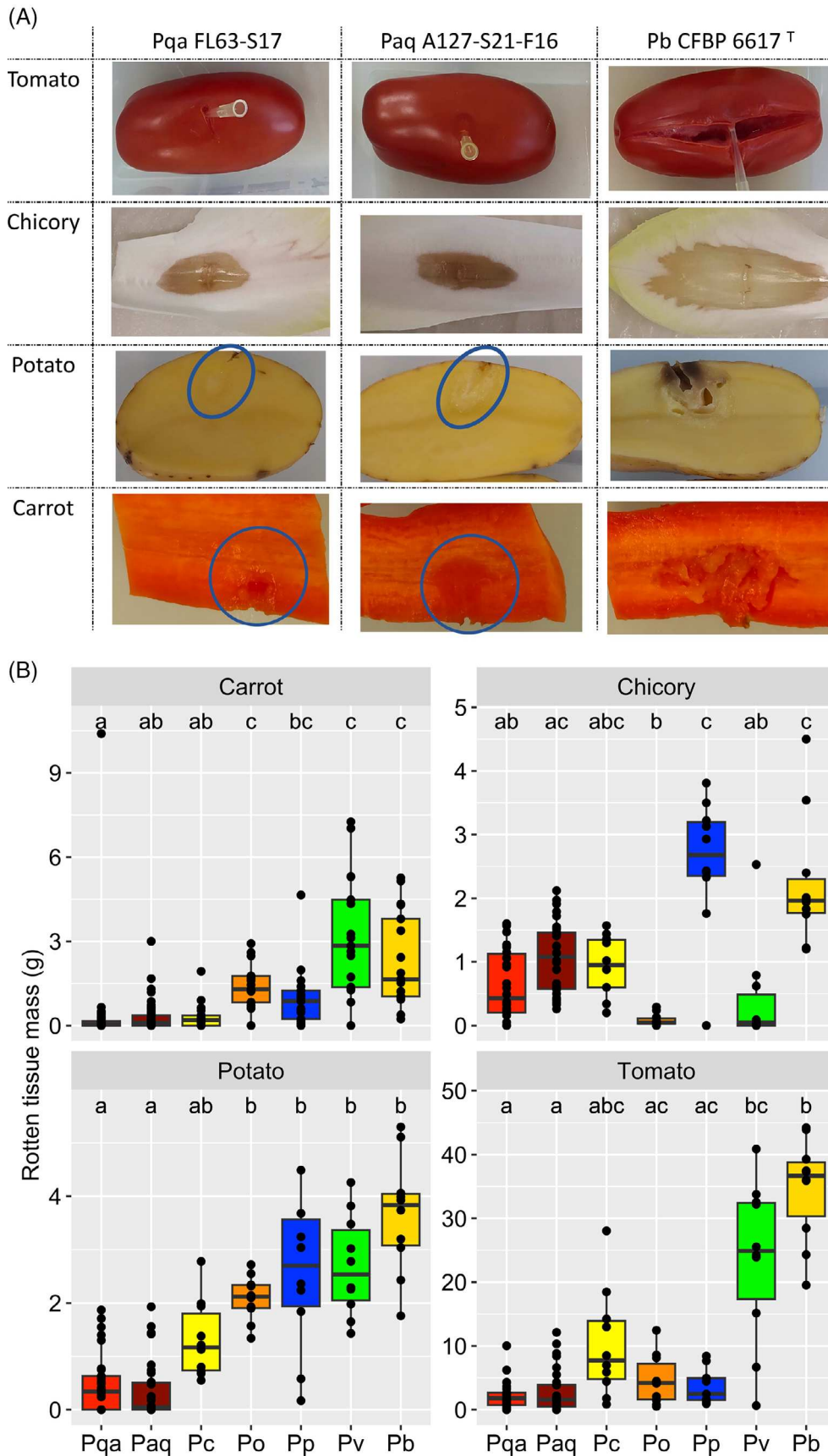


FIGURE 8 Legend on next page.

is dispensable in the habitat of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*. The number of missing and additional transcription factors also indicates transcriptional reprogramming in both water-isolated species.

Our experimental data also support an altered interaction with plants, as *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* were found to be impaired in their ability to secrete pectinases and to rot several known host plants of *Pectobacterium* species (Figures 6 and 8). An alternative niche is also supported by the absence of plant isolates for both species in bacterial collections (Portier et al., 2020). A simple hypothesis could be that both species infect some riparian plants that have no commercial value and have not been previously targeted by phytopathologists. To test this hypothesis, we analyzed 29 plant species commonly found along or in the river. We found no evidence of association of *P. aquaticum* or *P. quasiquaticum* with these plants, although these species were recovered from river water at concentrations of approximately 10^3 bacteria per litre. Although this single analysis cannot definitively rule out aquatic or riparian plants as a possible niche, it nevertheless does suggest that plants may not be the best habitat for *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*.

Our genomic analysis also showed that the size of the core and pan-genome varies between *Pectobacterium* species (Figure 2). The pan-genome of a given species is potentially shaped by its respective habitat(s) and phylogeny. A recent meta-analysis of 10,100 bacterial genomes found that environmental preferences explained 49% of the variance in pangenome traits while phylogenetic inertia explained only 18% (Maistrenko et al., 2020). Pangenome variation between *Pectobacterium* species may therefore reflect ecological differences. The lower rate of gene accumulation within the pangenome of *P. quasiquaticum* compared to *P. aquaticum* may reflect a narrower ecological niche for *P. quasiquaticum* than for *P. aquaticum*. This is consistent with the 10-fold lower abundance of *P. quasiquaticum* compared to *P. aquaticum* in freshwater (Ben Moussa et al., 2022).

A shared characteristic of *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* genomes is their high number of pseudogenes (Figure 1C). A high proportion of pseudogenes in genomes has been associated with adaptation to a restrictive lifestyle or a restricted host specificity (De La Fuente et al., 2022; Wu et al., 2021). *P. parvum*, a species that also has a high number of

pseudogenes, has been suggested to be associated with insects (Pasanen et al., 2020). Recently, the genus *Symbiopectobacterium*, sister to the genus *Pectobacterium*, has been characterized (Martinson et al., 2020; Nadal-Jimenez et al., 2022). This new genus gathers species that form obligate symbioses with nematodes and insects (Nadal-Jimenez et al., 2022). The genomes of these symbiotic bacteria ranged from 0.25 to 4.57 Mb, with pseudogene contents ranging from 62 to 1285 and a depauperate metabolism compared to those of *Pectobacterium* species. The pseudogene content of the *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* genomes is not as high as that observed in *Symbiopectobacterium* genomes (Martinson et al., 2020) and the metabolism of both species is similar to that of other *Pectobacterium* species (Ben Moussa et al., 2021; Pédrón et al., 2019). The specialization observed within *Symbiopectobacterium* raised nevertheless the question of whether the *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* might reflect a nascent adaptation of these two latter species to aquatic microfauna. This remains to be tested, but the inability of both species to form biofilms could explain their regular occurrence in water following a leak from such a primary source. Further sampling in different environments, non-economically important plants, and potential vectors will be needed to identify the ecological niche alternative to water for *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Hajar Ben Moussa: Conceptualization (equal); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); validation (equal); visualization (equal); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal). **Jacques Pédrón:** Conceptualization (equal); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); supervision (equal); validation (equal); visualization (supporting); writing – review and editing (equal). **Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat:** Formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); validation (equal); writing – review and editing (equal). **Marie-Anne Barny:** Conceptualization (lead); data curation (supporting); formal analysis (equal); funding acquisition (lead); investigation (equal); methodology (supporting); project administration (lead); supervision (lead); validation (equal); visualization (supporting); writing – original draft (equal); writing – review and editing (equal).

FIGURE 8 Maceration assays on potato, tomato, carrot and chicory. (A) Typical soft rot symptoms observed for the strains *P. quasiquaticum* FL63-S17, *P. aquaticum* A127-S21-F16 and *P. brasiliense* CFBP6617 on the different plant organs tested. (B) Comparison of the maceration capacity of each species tested. Paq: *P. aquaticum*; Pqa: *P. quasiquaticum*; Pc: *P. carotovorum*; Po: *P. odoriferum*; Pv: *P. versatile*; Pp: *P. polaris*; Pb: *P. brasiliense*. The result of the statistical analysis is indicated by the letters (A, B and C) at the top of the box plots. Species with the same letter are not statistically different from each other ($p > 0.05$ Kruskal–Wallis followed by Dunn test with the Bonferroni correction). The strains used are listed in Table S4.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge Sophie Pasek for the discussion on genomic analysis and Eric Motard for sampling and identification of plants along the river bank. The authors also acknowledge the funding from the ANR project ANR-19-CE35-0016-03. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data shown in this article are available within the article and supplementary materials. The genomes used in this publication are available in NCBI and their accession numbers are provided in Table S1.

ORCID

Hajar Ben Moussa  <https://orcid.org/0000-0002-2836-3896>

Marie-Anne Barny  <https://orcid.org/0000-0002-2005-1388>

REFERENCES

- Alcorn, S.M., Orum, T.V., Steigerwalt, A.G., Foster, J.L.M., Fogleman, J.C. & Brenner, D.J. (1991) Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacticida* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 197–212.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
- Andrés-Barrao, C., Alzubaidy, H., Jalal, R., Mariappan, K.G., de Zélicourt, A., Bokhari, A. et al. (2021) Coordinated bacterial and plant sulfur metabolism in *Enterobacter* sp. SA187-induced plant salt stress tolerance. *Proceedings. National Academy of Sciences. United States of America*, 118, e2107417118.
- Babinska, W., Motyka-Pomagruk, A., Sledz, W., Kowalczyk, A., Kaczynski, Z. & Lojkowska, E. (2021) The first Polish isolate of a novel species *Pectobacterium aquaticum* originates from a Pomeranian Lake. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 5041.
- Ben Moussa, H., Bertrand, C., Rochelle-Newall, E., Fiorini, S., Pédrón, J. & Barny, M.-A. (2022) The Diversity and abundance of soft rot *Pectobacteriaceae* along the Durance river stream in the southeast of France revealed by multiple seasonal surveys. *Phytopathology*, 112, 1676–1685.
- Ben Moussa, H., Pédrón, J., Bertrand, C., Hecquet, A. & Barny, M.-A. (2021) *Pectobacterium quasiquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71, 005042.
- Burr, T.J. & Schroth, M.N. (1977) Occurrence of soft-rot *Erwinia* spp. in soil and plant material. *Phytopathology*, 77, 1382.
- Büttner, D. & He, S.Y. (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, 150, 1656–1664.
- Cantalapiedra, C.P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P. & Huerta-Cepas, J. (2021) eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the meta-genomic scale. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 5825–5829.
- Charkowski, A., Blanco, C., Condemine, G., Expert, D., Franza, T., Hayes, C. et al. (2012) The role of secretion systems and small molecules in soft-rot *Enterobacteriaceae* pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 425–449.
- Charkowski, A.O. (2018) The changing face of bacterial soft-rot diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 269–288.
- Chen, M.-Y., Teng, W.-K., Zhao, L., Hu, C.-X., Zhou, Y.-K., Han, B.-P. et al. (2021) Comparative genomics reveals insights into cyanobacterial evolution and habitat adaptation. *The ISME Journal*, 15, 211–227.
- Condemine, G. & Le Derout, B. (2022) Identification of new *Dickeya dadantii* virulence factors secreted by the type 2 secretion system. *PLoS One*, 17, e0265075.
- Cotter, E.J. & Gilbert, R.L. (1990) Presence of *Erwinia chrysanthemi* in two major river systems and their alpine sources in Australia. *The Journal of Applied Bacteriology*, 69, 729–738.
- Csuos, M. (2010) Count: evolutionary analysis of phylogenetic profiles with parsimony and likelihood. *Bioinformatics*, 26, 1910–1912.
- Dahlberg, T., Baker, J.L., Bullitt, E. & Andersson, M. (2022) Unveiling molecular interactions that stabilize bacterial adhesion pili. *Biophysical Journal*, 121, 2096–2106.
- De La Fuente, L., Merfa, M.V., Cobine, P.A. & Coleman, J.J. (2022) Pathogen adaptation to the xylem environment. *Annual Review of Phytopathology*, 60, 163–186.
- Fecker, L. & Braun, V. (1983) Cloning and expression of the *flu* genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 156, 1301–1314.
- Feng, T., Nyffenegger, C., Højrup, P., Vidal-Melgosa, S., Yan, K.-P., Fangel, J.U. et al. (2014) Characterization of an extensin-modifying metalloprotease: N-terminal processing and substrate cleavage pattern of *Pectobacterium carotovorum* Prt1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 10077–10089.
- Franza, T. & Expert, D. (2013) Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: an “à la carte” menu. *Molecular Plant Pathology*, 14, 429–438. Available from: <https://doi.org/10.1111/mpp.12007>
- Giovannoni, S.J., Cameron Thrash, J. & Temperton, B. (2014) Implications of streamlining theory for microbial ecology. *The ISME Journal*, 8, 1553–1565.
- Gough, C.L. (1992) *hrp* Genes of *Pseudomonas solanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 384–389.
- Guieysse, B. & Wuertz, S. (2012) Metabolically versatile large-genome prokaryotes. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 467–473.
- Hartmann, N. & Büttner, D. (2013) The Inner Membrane Protein HrcV from *Xanthomonas* spp. Is Involved in Substrate Docking During Type III Secretion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26, 1176–1189.
- Hélias, V., Hamon, P., Huchet, E., Wolf, J.V.D. & Andrivon, D. (2012) Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*: Isolating pectolytic bacteria on CVP. *Plant Pathology*, 61, 339–345.
- Hueck, C.J. (1998) Type III Protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 379–433.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G. & Shevchik, V.E. (2014) Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 6, 427–440.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., des-Combes, C.J., Briolay, J. & Pritchard, L. (2021) Proposal for the creation of a new genus *Musicola* gen. nov., reclassification of *Dickeya paradisiaca* (Samson et al. 2005) as *Musicola paradisiaca* comb. nov. and description of a new species *Musicola keenii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71, 5037.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Jacot-des-Combes, C. & Briolay, J. (2019a) *Dickeya lacustris* sp. nov., a water-living pectinolytic

- bacterium isolated from lakes in France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 721–726.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Jacot-des-Combes, C. & Briolay, J. (2019b) Genomic characterization of a pectinolytic isolate of *Serratia oryzae* isolated from lake water. *Journal of Genomics*, 7, 64–72.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. & Van Gijsegem, F. (2021) Diversity within the *Dickeya zeae* complex, identification of *Dickeya zeae* and *Dickeya oryzae* members, proposal of the novel species *Dickeya parazeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71, 005059.
- Jha, G., Rajeshwari, R. & Sonti, R.V. (2005) Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 891–898.
- Ji, J., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. & Robert-Baudouy, J. (1987) Use of Mu-lac insertions to study the secretion of pectate lyases by *Erwinia chrysanthemi*. *Microbiology*, 133, 793–802.
- Jonkheer, E.M., Brankovics, B., Houwers, I.M., van der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Vreeburg, R.A.M. et al. (2021) The *Pectobacterium* pangenome, with a focus on *Pectobacterium brasiliense*, shows a robust core and extensive exchange of genes from a shared gene pool. *BMC Genomics*, 22, 265.
- Kazemi-Pour, N., Condemine, G. & Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004) The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics*, 4, 3177–3186.
- Kim, H.-S., Ma, B., Perna, N.T. & Charkowski, A.O. (2009) Phylogeny and virulence of naturally occurring type III secretion system-deficient *Pectobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4539–4549.
- Kim, H.-S., Thammarat, P., Lommel, S.A., Hogan, C.S. & Charkowski, A.O. (2011) *Pectobacterium carotovorum* elicits plant cell death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE does not suppress callose or induce expression of plant genes early in plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 773–786.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A. et al. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, 280, 602–605.
- Laasik, E., Pöllumaa, L., Pasanen, M., Mattinen, L., Pirhonen, M. & Mäe, A. (2014) Expression of nipP_w of *Pectobacterium wasabiae* is dependent on functional flgKL flagellar genes. *Microbiology*, 160, 179–186.
- Liu, L., Gueguen-Chaignon, V., Gonçalves, I.R., Rasclé, C., Rigault, M., Dellagi, A. et al. (2019) A secreted metal-binding protein protects necrotrophic phytopathogens from reactive oxygen species. *Nature Communications*, 10, 4853.
- Ma, B., Hibbing, M.E., Kim, H.-S., Reedy, R.M., Yedidia, I., Breuer, J. et al. (2007) Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*, 97, 1150–1163.
- Maistrenko, O.M., Mende, D.R., Luetge, M., Hildebrand, F., Schmidt, T.S.B., Li, S.S. et al. (2020) Disentangling the impact of environmental and phylogenetic constraints on prokaryotic within-species diversity. *The ISME Journal*, 14, 1247–1259.
- Manni, M., Berkeley, M.R., Seppey, M., Simão, F.A. & Zdobnov, E.M. (2021a) BUSCO update: Novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 4647–4654.
- Manni, M., Berkeley, M.R., Seppey, M. & Zdobnov, E.M. (2021b) BUSCO: Assessing genomic data quality and beyond. *Current Protocols*, 12, e323.
- Marits, R., Köiv, V., Laasik, E. & Mäe, A. (1999) Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology*, 145, 1959–1966.
- Martinson, V.G., Gawryluk, R.M.R., Gowen, B.E., Curtis, C.I., Jaenike, J. & Perlman, S.J. (2020) Multiple origins of obligate nematode and insect symbionts by a clade of bacteria closely related to plant pathogens. *Proceedings. National Academy of Sciences. United States of America*, 117, 31979–31986.
- Méric, G., Yahara, K., Mageiros, L., Pascoe, B., Maiden, M.C.J., Jolley, K.A. et al. (2014) A reference pan-genome approach to comparative bacterial genomics: identification of novel epidemiological markers in pathogenic *Campylobacter*. *PLoS One*, 9, e92798.
- Miele, V., Penel, S. & Duret, L. (2011) Ultra-fast sequence clustering from similarity networks with SiLiX. *BMC Bioinformatics*, 12, 116.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Nadal-Jimenez, P., Siozios, S., Halliday, N., Cámara, M. & Hurst, G.D.D. (2022) *Symbiopectobacterium purcellii*, gen. nov., sp. nov., isolated from the leafhopper *Empoasca decipiens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72, 5440.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- O'Toole, G.A. (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 40, 2437.
- Oulghazi, S., Cigna, J., Lau, Y.Y., Moumni, M., Chan, K.G. & Faure, D. (2019) Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus *Pectobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 470–475.
- Oulghazi, S., Pédrón, J., Cigna, J., Lau, Y.Y., Moumni, M., Van Gijsegem, F. et al. (2019) *Dickeya undicola* sp. nov., a novel species for pectinolytic isolates from surface waters in Europe and Asia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 2440–2444.
- Oulghazi, S., Sarraz, S., Zaczek-Moczydłowska, M.A., Khayi, S., Ed-Dra, A., Leckbach, Y. et al. (2021) *Pectobacterium brasiliense*: genomics, host range and disease management. *Microorganisms*, 9, 106.
- Parkinson, N., DeVos, P., Pirhonen, M. & Elphinstone, J. (2014) *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2264–2266.
- Pasanen, M., Waleron, M., Schott, T., Cleenwerck, I., Misztak, A., Waleron, K. et al. (2020) *Pectobacterium parvum* sp. nov., having a *Salmonella* SPI-1-like type III secretion system and low virulence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 2440–2448.
- Pédrón, J., Bertrand, C., Taghouti, G., Portier, P. & Barny, M.-A. (2019) *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 745–751.
- Pédrón, J., Guyon, L., Lecomte, A., Blottière, L., Chandeysson, C., Rochelle-Newall, E. et al. (2020) Comparison of environmental and culture-derived bacterial communities through 16S metabarcoding: a powerful tool to assess media selectivity and detect rare taxa. *Microorganisms*, 8, 1129.
- Pérombelon, M.C.M. (2002) Potato diseases caused by soft rot *erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51, 1–12.
- Portier, P., Pédrón, J., Taghouti, G., Dutrieux, C. & Barny, M.-A. (2020) Updated taxonomy of *Pectobacterium* genus in the CIRM-CFBP bacterial collection: when newly described species reveal “old” endemic population. *Microorganisms*, 8, 1441.
- Prigent-Combaret, C., Zghidi-Abouzid, O., Effantin, G., Lejeune, P., Reverchon, S. & Nasser, W. (2012) The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*: *Dickeya dadantii* Fis protein and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 86, 172–186.

- Stecher, G., Tamura, K. & Kumar, S. (2020) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution*, 37, 1237–1239.
- Tampakaki, A.P., Skandalis, N., Gazi, A.D., Bastaki, M.N., Panagiotis, F.S., Charova, S.N. et al. (2010) Playing the “Harp”: Evolution of Our Understanding of *hrp* Genes. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 347–370.
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022–3027.
- Thongbhubate, K., Nakafuji, Y., Matsuoka, R., Kakegawa, S. & Suzuki, H. (2021) Effect of spermidine on biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 203, 1–15.
- Toth, I.K., Barny, M., Brurberg, M.B., Condemine, G., Czajkowski, R., Elphinstone, J.G. et al. (2021) *Pectobacterium* and *Dickeya*: environment to disease development. In: van Gijsegem, F., van der Wolf, J.M. & Toth, I.K. (Eds.) *Plant diseases caused by Dickeya and Pectobacterium species*. Cham: Springer International Publishing, pp. 39–84.
- Toth, I.K., Barny, M., Czajkowski, R., Elphinstone, J.G., Li, X.S., Pédrón, J. et al. (2021) *Pectobacterium* and *Dickeya*: taxonomy and evolution. In: van Gijsegem, F., van der Wolf, J.M. & Toth, I.-K. (Eds.) *Plant diseases caused by Dickeya and Pectobacterium species*. Cham: Springer International Publishing, pp. 13–37.
- Waleron, M., Misztak, A., Waleron, M., Jonca, J., Furmaniak, M. & Waleron, K. (2019) *Pectobacterium polonicum* sp. nov. isolated from vegetable fields. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 1751–1759.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58, 611–647.
- Wei, X., Deng, W. & Chu, C. (2021) Phylogenetic and phenotypic analyses on *Dickeya* spp. isolated from different host plants in Taiwan. *Journal of Phytopathology*, 169, 678–691.
- Wu, X., Ning, C., Key, F.M., Andrades Valtueña, A., Lankapalli, A.K., Gao, S. et al. (2021) A 3,000-year-old, basal *S. enterica* lineage from bronze age Xinjiang suggests spread along the proto-silk road. *PLoS Pathogens*, 17, e1009886.
- Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z. et al. (2018) dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 46, W95–W101.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Ben Moussa, H., Pédrón, J., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. & Barny, M.-A. (2023) Two species with a peculiar evolution within the genus *Pectobacterium* suggest adaptation to a new environmental niche. *Environmental Microbiology*, 1–16. Available from: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16479>

3. Chapeau conclusif :

Cette étude a révélé que *P. aquatium* et *P. quasiquaticum* avaient des génomes réduits comparés à d'autres espèces de *Pectobacterium*. De plus, ces deux espèces ont perdu 501 gènes lors de leur évolution. Cela suggère une évolution réductive chez ces deux espèces. Ceci est particulièrement intéressant étant donné que le gain de gènes est le mode évolutif prédominant chez les espèces de *Pectobacterium*. Parmi les gènes absents chez *P. aquatium* et *P. quasiquaticum* plusieurs sont impliqués dans le transport d'ions organiques, de glucides et d'acides aminés, ce qui implique que ces deux espèces occupent une niche avec des besoins nutritifs différents. De plus, certains gènes impliqués dans la virulence sont également absents, notamment cinq gènes codants des PCWDE, ce qui est cohérent avec la capacité réduite de *P. aquatium* et *P. quasiquaticum* de sécréter des pectinases. Par ailleurs, ces deux espèces sont globalement moins agressives sur les plantes, comparées à d'autres espèces proches de *Pectobacterium*. Tous ces éléments, combinés à l'absence de ces deux espèces des plantes, suggèrent que ces deux espèces se sont adaptées à une nouvelle niche, qui n'est probablement pas les plantes.

Étant donné que *P. aquatium* et *P. quasiquaticum* ont exclusivement été isolées d'eau, il est très possible que l'eau soit la niche principale de ces deux espèces. Toutefois, cela reste incertain. En effet, l'évolution réductive peut être observée chez des bactéries endosymbiontes (McCutcheon et Moran 2012), chez des bactéries en mode de vie libre, telles que les bactéries marines (Batut et al. 2014), mais également chez des pathogènes de plantes, suite à une spécialisation à une plante hôte (Vandroemme et al. 2013) ou un environnement spécifique au sein de la plante hôte, tel que le xylème (Pieretti et al. 2009). Par conséquent, il reste possible que ces bactéries soient spécialisées sur une plante non échantillonnée jusqu'à présent. Néanmoins, l'absence de *P. aquaticum* sur les plantes de bordures de rivière sur un site où elle est retrouvée de manière abondante dans l'eau, suggère que la niche de cette espèce pourrait être différente des plantes.

Ce chapitre a montré que *P. aquatium* et *P. quasiquaticum*, exclusivement isolées d'eau, ont des caractéristiques génomiques et fonctionnelles distinctes des autres *Pectobacterium* communément isolées de plantes et qu'elles présentent peu de risque sur les plantes cultivées. Cependant, les mécanismes permettant à ces deux espèces et à d'autres SRP de survivre et de persister dans l'eau demeurent inconnus. Ainsi, dans le cinquième chapitre de ma thèse, j'ai

entrepris une analyse Tn-Seq visant à identifier les déterminants génétiques essentiels à la survie des SRP et des bactéries pathogènes de plantes du genre *Pseudomonas* dans l'eau douce.

Chapitre 5 : « Identification des déterminants génétiques nécessaires à la survie dans l'eau de trois groupes bactériens (*Pseudomonas*, *Dickeya* et *Pectobacterium*) par une analyse Tn-Seq »

1. Introduction

Chez les bactéries phytopathogènes, plusieurs approches ont été utilisées dans le but d'identifier les gènes impliqués dans la pathogénicité afin de développer des stratégies de lutte spécifiques et appropriées. La première approche consiste à réaliser une mutagenèse dirigée sur des gènes que l'on suppose *a priori* comme étant impliqués dans le pouvoir pathogène de par leurs fonctions biochimiques ou de leur implication dans le processus d'infection chez d'autres pathogènes. Une seconde approche sans *a priori* consiste à muter aléatoirement par insertion la majorité des gènes et à tester individuellement chaque mutant sur plante. Cette seconde approche laborieuse et chronophage a permis par exemple la description des SST3 chez de nombreuses bactéries phytopathogènes. L'émergence de nouvelles méthodes de séquençage à haut débit a permis le développement du Transposon-insertion sequencing (TIS). La TIS combine la mutagenèse à large échelle médiée par insertion de transposons associée au séquençage Illumina des séquences flanquantes des insertions, afin d'identifier les régions génomiques qui sont essentielles et/ou qui offrent un avantage sélectif dans une condition donnée. Cette méthode est suffisamment précise pour identifier non seulement les gènes mais, également les régions promotrices, les régions intergéniques et les domaines protéiques essentiels (Cain et al. 2020; van Opijnen et Camilli 2013). Cette méthode est également suffisamment sensible pour détecter des changements mineurs de croissance (fitness) des mutants (Cain et al. 2020). La TIS se décompose en plusieurs étapes (voir Figure 9) :

1. Construction d'une banque de mutants (hautement saturée) par insertion aléatoire d'un transposon (une seule insertion par génome/bactérie), le plus souvent par conjugaison ou transformation.
2. Mise en culture du pool de mutants dans une ou plusieurs conditions différentes.
3. Après culture, l'ADN est extrait et digéré, puis ligaturé avec des adaptateurs. Les jonctions transposon-ADN sont ensuite amplifiées par PCR à l'aide d'une paire d'amorces, l'une spécifique de l'adaptateur et l'autre complémentaire du transposon. Le produit d'amplification est ensuite purifié sur gel afin de s'assurer que seules les séquences correspondant à la taille des jonctions transposon-ADN sont conservées.
4. Les jonctions transposon-ADN sont séquencées et afin de cartographier les sites d'insertion des transposons, les lectures (reads) sont ensuite alignées (mapping) sur le génome complet de l'espèce étudiée.

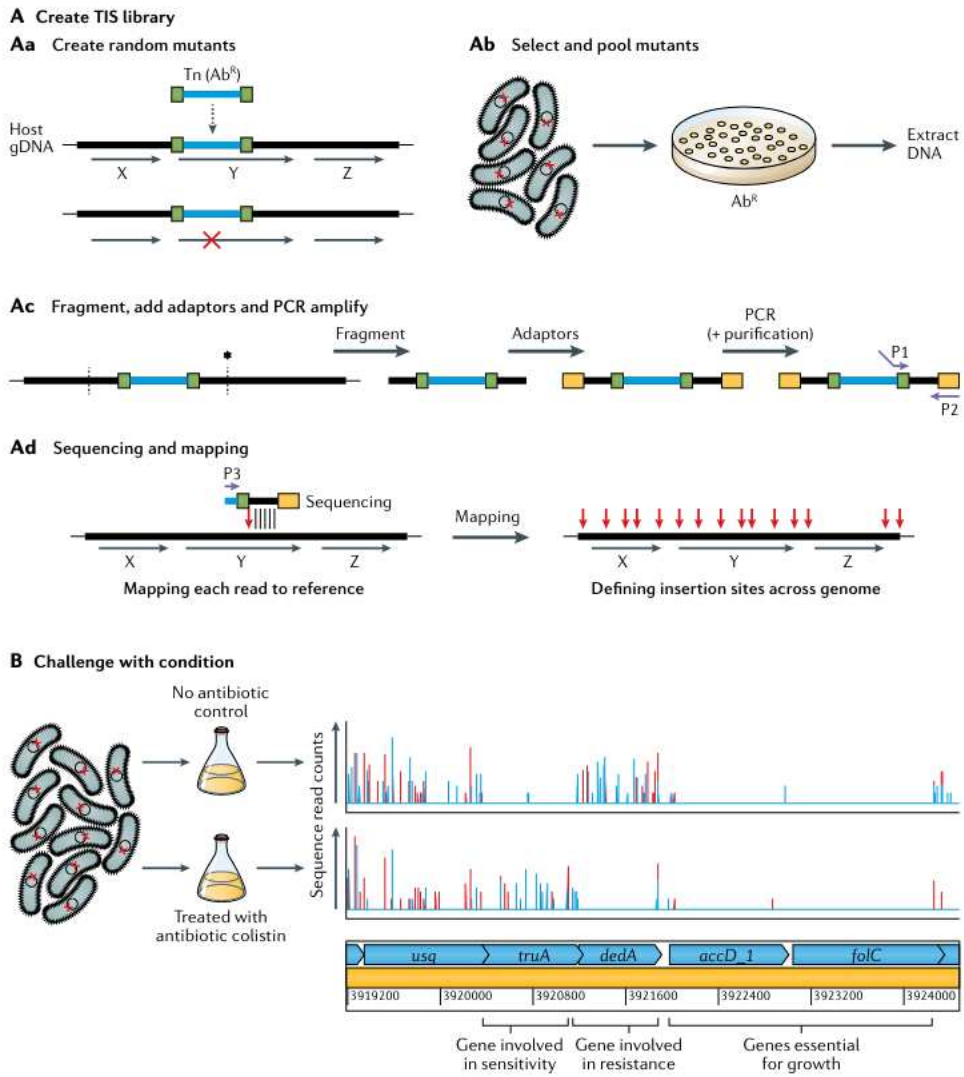


Figure 9 : Schéma de la méthode TIS (Cain et al., 2020)

5. Une analyse bio-informatique/statistique est effectuée pour définir les gènes essentiels à la survie de l'espèce étudiée dans les différentes conditions testées, sur la base du nombre de sites d'insertion du transposon détectés.
6. La validation des résultats du TIS doit *in fine* être effectuée par la construction de mutants dans les gènes d'intérêt, qui doivent être étudiés dans les conditions testées.

Pour une région génomique donnée (génique ou non génique), la fréquence des lectures (reads) alignées entre la condition témoin utilisée comme référence et la/les condition(s) testée(s) est ensuite effectuée :

- Si aucun transposon n'est inséré dans la séquence d'un gène, cela indique que ce gène ne peut pas être muté et qu'il est donc essentiel dans la/les condition(s) testée(s).
- Si la fréquence d'insertion du transposon dans un gène donné est équivalente entre la condition testée et le contrôle, cela indique que ce gène est neutre et n'apporte donc aucun avantage sélectif (fitness) dans la ou les conditions testées.
- Si la fréquence d'insertion du transposon dans un gène donné diminue par rapport à la condition contrôle, cela indique que ce gène présente un avantage sélectif dans la condition testée.
- Si la fréquence d'insertion du transposon dans un gène donné est supérieure à celle de la condition témoin, cela indique que la perte de ce gène confère un avantage sélectif dans la/les condition(s) testée(s).

Il existe quatre variantes de la méthode TIS : transposon sequencing (Tn-Seq), transposon-directed insertion site sequencing (TraDIS), insertion sequencing (INSeq) et high-throughput insertion tracking by deep sequencing (HITS). Ces méthodes diffèrent par le choix du transposon, la méthode de préparation des bibliothèques de séquençage et d'analyse des données de séquençage (van Opijnen et Camilli 2013). Par exemple, les techniques Tn-Seq et INSeq utilisent le transposon Himar I Mariner qui contient un site de restriction MmeI; ce transposon s'insère dans le site dinucléotide thymine-adénine T-A. Lors de l'étape de digestion de l'ADN, l'enzyme de restriction de type IIS MmeI coupe à 20 bases en aval de son site de reconnaissance, à l'extérieur du transposon, ce qui génère des produits finaux de tailles identiques. Les méthodes HITS et TraDIS utilisent d'autres transposons qui ne contiennent pas de site de restriction de type IIS, et utilisent une digestion mécanique aléatoire, ce qui donne des produits finaux de tailles variables (van Opijnen et Camilli 2013).

Parmi les nombreuses applications de cette méthode, on peut citer l'identification de gènes impliqués dans la survie de pathogènes humains, animaux et végétaux (Cain et al. 2020). En outre, pour les gènes dont les fonctions biochimiques sont inconnues, cette méthode permet d'identifier les conditions biologiques dans lesquelles ces gènes sont essentiels (Price et al. 2018). Cette méthode peut également mettre en évidence des réseaux de gènes qui interagissent, de manière directe ou indirecte, avec un gène cible, lorsque la TIS est mise en place avec une souche mutée dans une fonction donnée (van Opijnen et al. 2009). La méthode TIS a également été adaptée et appliquée à des cellules mammifères haploïdes pour déterminer quels gènes sont importants lors d'une infection, par exemple par le virus de la grippe (van Opijnen et Camilli 2013).

Les analyses TIS peuvent être réalisées *in vitro* ou *in vivo*. La méthode TIS *in vivo* permet de déterminer les gènes nécessaires pour la survie et la croissance dans des niches spécifiques (van Opijnen et Camilli 2013). Cependant, l'analyse *in vivo* présente certaines limites. Par exemple, pendant la culture des mutants *in vivo*, une réduction sévère et stochastique du nombre de mutants présents dans le pool de mutants peut se produire, phénomène connu sous le nom de goulot d'étranglement. Ce phénomène biaise l'analyse des résultats finaux, car il est difficile de déterminer si les mutants ont été éliminés parce que la mutation est essentielle ou importante dans les conditions testées, ou s'ils ont été éliminés aléatoirement par ce phénomène de goulot d'étranglement (van Opijnen et Camilli 2013). Pour éviter les goulets d'étranglement, il est important d'ajuster la concentration de mutants dans l'inoculum initial à une valeur inférieure à la concentration bactérienne tolérée par le modèle d'infection. Par exemple, si le modèle d'infection (par exemple la plante A) ne tolère que 10^4 bactéries (quel que soit le nombre de mutants dans l'inoculum initial), un nombre de mutants compris entre 10 et 100 bactéries est recommandé pour inoculer une unité (de la plante A) (van Opijnen et Camilli 2013). Ainsi, pour s'assurer que tous les mutants du pool sont représentés, plusieurs inoculations (plusieurs plante A) peuvent être nécessaires. Une autre approche possible consiste à appliquer une normalisation multinomiale aux résultats finaux afin de minimiser l'effet du goulot d'étranglement (Pritchard et al. 2014).

L'une des principales limitations de la méthode TIS est qu'elle ne peut être appliquée qu'aux souches bactériennes qui peuvent être génétiquement modifiées. De plus, cette méthode ne permet pas l'identification de gènes si leur produit est sécrété et apporte un bénéfice partagé à la communauté bactérienne présente dans le pool de mutants analysés (Cain et al. 2020). Par exemple, chez les SRP, le système de sécrétion de type 2 et leurs enzymes sécrétés nécessaires

au pouvoir pathogène ne sont pas identifiés, car la grande majorité des souches bactériennes présentes dans le pool de mutants sont fonctionnelles pour la sécrétion et complètent donc les mutants affectés dans la sécrétion (Royet et al. 2019).

Chez les bactéries pathogènes de plante, la méthode Tn-Seq n'a pour l'instant été utilisée que pour identifier les gènes nécessaires à la colonisation et à la survie *in planta*. Par exemple, cette méthode a été appliquée pour identifier les gènes de *Pseudomonas simiae* nécessaires à la colonisation du système racinaire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Cole et al. 2017), pour identifier les gènes de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* importants pour la colonisation du xylème de jeunes plants de maïs (Duong et al. 2018). Par ailleurs, La méthode Tn-Seq a été associée à une analyse de génomique comparative afin d'identifier les gènes essentiels à la survie *in vitro* de l'espèce *Xanthomonas hortorum* pv. *vitiens*, responsable d'une maladie bactérienne de la laitue (Morinière et al. 2021).

Dans le cas des SRP, cette méthode a principalement été appliquée chez le genre *Dickeya*. Elle a été utilisée pour la première fois par Royet et ses collaborateurs (2019) pour identifier les gènes nécessaires à la survie et croissance d'une souche de *Dickeya dadantii* lors de l'infection de feuilles d'endive. Cette étude a révélé l'importance d'environ 100 gènes, dont plusieurs n'avaient pas été identifiés auparavant, impliquant notamment les voies de biosynthèse de l'uridine monophosphate et des bases puriques, ainsi que certains acides aminés essentiels tels que la leucine, la cystéine et la lysine. Des régulateurs globaux tels que RsmC et GcpA ont également été identifiés lors de cette étude comme étant importants lors de l'infection (Royet et al. 2019). Dans une étude plus récente, une variante de la méthode Tn-Seq appelée Random barcode transposon-site sequencing (RB-Tn-Seq) a été utilisée sur deux souches de *Dickeya dianthicola* et sur la souche modèle *Dickeya dadantii* 3937, lors de l'infection de tubercules de pomme de terre. Cette étude a révélé l'importance du gène *kduD*, un gène de la voie de la dégradation intracellulaire des oligogalacturonides (produits de dégradation extracellulaire de la pectine), pour la croissance dans les tubercules de pomme de terre. De plus, des régulateurs de transcription souches-spécifiques impliqués dans la croissance dans les tubercules de pomme de terre ont été identifiés (Helmann et al. 2022). Le Tn-Seq a également permis d'explorer les répertoires de gènes communs ou spécifiques nécessaires pour la survie d'une souche de *Dickeya solani* dans différents organes de la plante de pomme de terre (tubercule, tige et racine) (Robic et al. 2023).

Pour mieux comprendre l'épidémiologie des pathogènes, il est également important de bien comprendre quels sont les gènes impliqués dans la persistance et la multiplication de ces

pathogènes dans les réservoirs environnementaux. La description récente de plusieurs espèces de SRP dans l'eau (voir chapitre 1 section 8.1 : SRP dans l'eau et chapitre 3), et l'importance de ce réservoir pour l'irrigation des cultures rend cet environnement particulièrement intéressant à étudier. Dans ce cadre, l'ANR TnPhyto (ANR TNPHYTO : ANR-19-CE35-0016, 2020 - 2024) a pour objectif d'étudier en parallèle les déterminants génétiques essentiels à l'infection des plantes et à la persistance dans l'eau par une approche Tn-Seq. Dans le cadre de ce projet, trois genres bactériens (*Pseudomonas*, *Dickeya* et *Pectobacterium*) sont étudiés avec 3 espèces différentes pour chaque genre. Ce projet rassemble plusieurs laboratoires disposant d'expertises variées. L'UMR 5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie (MAP-Lyon) est expert dans la mise en œuvre d'approches Tn-Seq et dans la pathogénie des bactéries du genre *Dickeya* (*D. dadantii* et *D. solani*). Le laboratoire de pathologie végétale de l'INRAE PACA-Avignon possède une expertise sur l'écologie des bactéries du groupe *Pseudomonas syringae*. La Plateforme de bio-informatique, bio-statistique et bio-analyse de la métropole lilloise est chargée de la mise en place d'un pipeline d'analyse des résultats du Tn-Seq (pipeline TnSeek). L'iEES-Paris, laboratoire où j'ai effectué ma thèse s'intéresse aux réservoirs environnementaux des SRP (*Dickeya* et *Pectobacterium*). Dans le cadre de ce projet, mon rôle a été d'établir et mettre en place un protocole permettant la culture des banques de mutants des trois genres bactériens étudiés en eau de rivière (Durance) stérile, puis d'extraire leur ADN. La construction des banques de mutants et de la librairie de séquençage, a été réalisé par nos collègues du MAP de Lyon qui ont également réalisé les expériences Tn-Seq sur les plantes pour les mêmes bactéries. Le pipeline d'analyse des données de séquençage Tn-Seq (shiny server sous Docker) a été développé par la Plateforme de bio-informatique, bio-statistique et bio-analyse de la métropole Lilloise. Ce chapitre décrit les conditions et les résultats préliminaires des tests de croissance dans l'eau pour les trois genres bactériens.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Milieux de cultures

L'eau utilisée lors de tous les tests réalisés dans le cadre du projet TnPhyto a été prélevée de la rivière Durance en octobre 2020 à Avignon. Le point de prélèvement, Pertuis, est situé dans la partie basse du bassin versant et 100 litres ont été prélevés. Immédiatement après collecte, l'eau a été filtrée à l'aide d'un filtre 0,22 µm, pour éliminer les particules, les organismes bactériens et non bactériens, afin d'éviter une éventuelle variation de la concentration en carbone organique

dissous (DOC) suite à l'autoclavage. La concentration (DOC) a été déterminée (115 μM). Le filtrat a ensuite été stérilisé par autoclavage et conservée à l'abri de lumière à température ambiante. Avant chaque utilisation, l'eau a été à nouveau filtrée (filtre 0,22 μm) pour éliminer les éventuels précipités de sels. Les milieux utilisés tout au long de ces manipulations sont le milieu TSA 50 % (15 g L⁻¹ Tryptic Soy Broth, 15g L⁻¹ agar) utilisé pour le dénombrement des bactéries et le milieu TSB 100 % (30 g L⁻¹ Tryptic Soy Broth) utilisé lors de l'étape d'enrichissement. Les milieux CVP (Hélias et al. 2012) et KB (King et al. 1954) ont été occasionnellement utilisés pour vérifier si la culture était contaminée ou non. Les cultures contaminées ont été éliminées de l'analyse.

2.2. Souches analysées

Les neuf banques de mutants pour les trois genres bactériens analysés (trois espèces par genre) ont été construites par nos collègues du MAP de Lyon, et stockées à -80 °C dès leur réception. Les neuf souches utilisées pour construire ces banques sont décrites dans le tableau 2 : elles appartiennent à 3 genres distincts, *Pectobacterium*, *Dickeya* et *Pseudomonas*. Pour le genre *Pseudomonas*, deux souche souches étudiées appartiennent à trois génomospecies (PG2, PG7 et PG10) du groupe *Pseudomonas syringae* qui regroupe des pathogènes de plantes et une appartient à l'espèce *Pseudomonas viridiflava*. Pour le genre *Pectobacterium*, les trois souches étudiées appartiennent aux espèces *P. atrosepticum*, *P. versatile* et *P. aquaticum*. Pour le genre *Dickeya*, les trois souches étudiées appartiennent aux espèces *D. dadantii*, *D. zeae* et *D. fangzhongdai*. Les génomes complets de ces souches sont accessibles sur le site NCBI (URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.3. Estimation de la concentration des banques

Pour chaque banque, un aliquot de 100 μL a été décongelé dans la glace et dilué dans une solution de 900 μL de MgSO_4 10 mM (préalablement stockée à 4 °C). Ces aliquots ont été centrifugés à 7000 r.p.m 5 minutes à 4°C. Les surnageants ont été éliminés et les culots remis en suspension dans 500 μL de MgSO_4 10 mM. Une dilution au 1/10eme a été effectuée avec 100 μl de cette suspension afin de mesurer la densité optique à 600 nm (DO_{600}). Ceci a permis d'ajuster chaque banque à une $\text{DO}_{600}=1$. L'estimation du nombre de UFC/mL de cette suspension a ensuite été effectuée par dilution et étalement sur milieu TSA50%. Les résultats obtenus (Tableau 3) montre qu'il y a une variation d'un facteur d'environ 150 pour une $\text{DO}_{600}=1$ selon la banque considérée.

Tableau 2 : Description des souches testées

Espèces	Caractéristique de l'espèce	Souche	Isolée de	Pays	Date d'isolement	Accession GenBank
<i>Dickeya dadantii</i>	Large spectre d'hôte (Charkowski 2018)	3937	<i>Dieffenbachia</i>	France	NA	CP002038
<i>Dickeya fangzhongdai</i>	Infecte le poirier, les orchidées et isolée d'eau (Alič et al. 2018)	B16	<i>Phalaenopsis</i>	Slovenie	2010	CP087226
<i>Dickeya zaeae</i>	Pathogènes de Maïs et de riz et isolées d'eau (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Van Gijsegem 2021)	A586-S18-A17	Eau de rivière	France	2017	CP084740.1
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Principalement solanacée (Portier et al. 2020)	1043	<i>Solanum tuberosum</i>	Ecosse	1985	BX950851
<i>Pectobacterium versatile</i>	Large spectre d'hôtes, abondante dans l'eau (Ben Moussa et al. 2022; Portier et al. 2020)	A73-S18-O15	Eau de rivière	France	2015	CP086369.1
<i>Pectobacterium aquaticum</i>	Abondante dans l'eau pas de plantes hôte connue (Pédrón et al. 2019)	A212-S19-A16	Eau de rivière	France	2016	CP086253
<i>Pseudomonas syringae</i> (PG10c)	Les souches de PG10c proviennent exclusivement de milieux environnementaux. (Berge et al. 2014)Cependant, il a été démontré que la souche CC1557 est très virulente sur les feuilles de tabac.(Hockett et al. 2014)	CC1557	Neige	France	NA	CP007014, Plasmide : CP007015
<i>Pseudomonas syringae</i> (PG2b)	Les souche PG2b sont présentes dans toutes les niches échantillonnées (environnement, plantes agricoles). La souche CC440 est pathogène sauf sur melon. (Berge et al. 2014)	CC440	<i>Cucumis melo</i>	France	NA	CP093321
<i>Pseudomonas viridiflava</i> (PG7a)	Large spectre d'hôte (plus 50 plantes) (Lipps et Samac 2022)	TA043(Psy35)	<i>Primula officinalis</i>	France	NA	CP036495

Tableau 3: Les concentrations de référence des inocula de banques de mutants après ajustement à $DO_{600} = 1$

Souche	Concentration bactérienne (UFC/mL) pour une $DO_{600} = 1$
<i>Dickeya dadantii</i> 3937	1.07E+09
<i>Dickeya fangzhongdai</i> B16	9.73E+06
<i>Dickeya zeae</i> A586-S18-A17	5.47E+08
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> 1043	1.03E+09
<i>Pectobacterium versatile</i> A73-S18-O15	7.07E+08
<i>Pectobacterium aquaticum</i> A212-S19-A16	7.47E+07
<i>Pseudomonas syringae</i> CC1557	1.63E+08
<i>Pseudomonas syringae</i> CC440	1.25E+08
<i>Pseudomonas viridiflava</i> TA043	7.30E+06

2.4. Inoculation des banques dans l'eau

Des tests préliminaires ont montré que la croissance des 9 souches en eau de rivière atteint une concentration maximale de 10^6 UFC/mL quel que soit l'inoculum de départ. Dans une expérience de Tn-Seq, il est nécessaire d'avoir au moins deux Log_{10} de croissance afin de discriminer les retards / gains de croissance liés aux mutations. Il est nécessaire d'avoir un inoculum suffisant d'environ 10^6 bactéries pour que tous les mutants de la banque soient bien représentés en début d'expérience. Ainsi pour chaque souche analysée, $1,1 \times 10^6$ bactéries ont été inoculées dans 550 mL d'eau, ce qui correspond une concentration initiale de 2×10^3 UFC/mL dans l'eau.

2.5. Conditions de culture des mutants Tn-Seq dans l'eau de rivière

Les 550 mL d'eau de rivière inoculés ont été répartis dans 11 Erlenmeyer stériles d'un volume de 500 mL chacun (50 mL par Erlenmeyer). Un Erlenmeyer a été désigné comme culture témoin, utilisé pour les dénombrements après inoculation au temps zéro (T0) et pour le suivi journalier de la croissance bactérienne. Les 11 cultures ont été incubées à 20 °C avec une agitation de 90 r.p.m sur une durée de 6 jours pour les souches du genre *Pectobacterium* et *Dickeya*, et de 3 jours pour les souches de *Pseudomonas*. Après la période d'incubation, à partir

de la culture témoin, la concentration bactérienne a été déterminée par étalement sur milieu TSB 50 %. Par la suite, un enrichissement des cultures a été réalisé, par addition de 50 ml de milieu TSB 100 % dans chaque Erlenmeyer, suivi d'une incubation de 7 h à 20 °C avec une agitation de 90 r.p.m. Après enrichissement, les 10 cultures ont été regroupées pour obtenir un volume final de 1 L, et la concentration bactérienne a été déterminée. Les bactéries ont été récupérées en centrifugeant la culture à 10 000 r.p.m pendant 10 minutes à 20 °C, et le culot bactérien a été stocké à -20 °C avant l'extraction d'ADN. Deux réplicats biologiques ont été réalisés pour chaque expérience de croissance.

Il est à noter qu'aucun goulot d'étranglement après inoculation ni aucune variabilité de croissance entre les échantillons n'a été observé pour aucune des souches testées au cours de la mise au point de ce protocole. L'enrichissement a été réalisé afin d'augmenter la densité bactérienne, car sans cela, il était difficile de récupérer les bactéries par centrifugation de la culture d'eau. Le temps d'incubation pour l'enrichissement est court (7 heures) et a été effectué dans du TSB 50 %. Le TSB 50 % a été choisi pour l'enrichissement, car ce milieu est celui utilisé pour l'analyse Tn-Seq de la condition contrôle réalisée par le MAP à Lyon

2.6. Extraction de l'ADN

Les échantillons contenant le culot bactérien ont été décongelés sur de la glace. L'extraction de l'ADN a été réalisé par le Kit d'extraction d'ADN Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega en suivant les préconisations d'extraction du fournisseur pour les bactéries Gram-négatives. Les culots d'ADN ont été réhydratés dans 100 µL d'eau de qualité biologique moléculaire, stockés à 4 °C avant d'être envoyés au laboratoire MAP à Lyon pour la suite de l'analyse (préparation des bibliothèques de séquençage).

3. Résultats

3.1. Suivre de croissance en eau

Toutes les souches de *Pectobacterium* et de *Dickeya* atteignent un plateau en 2 à 3 jours avec une concentration d'environ 10^5 UFC/mL, à partir d'un inoculum initial d'environ 10^3 UFC/mL. La densité bactérienne reste stable jusqu'au sixième jour sans observation de mortalité significative (voir Figure 10 a et b). La période de culture en eau a été fixée à 6 jours afin de sélectionner les souches qui peuvent persister dans l'eau et d'éviter la sélection de bactéries qui pourraient se développer grâce au faible apport de milieu riche persistant malgré le lavage des banques de mutants lors de la préparation de l'inoculum. Aucune variation significative de croissance n'a été observée entre les deux réplicats d'une même souche.

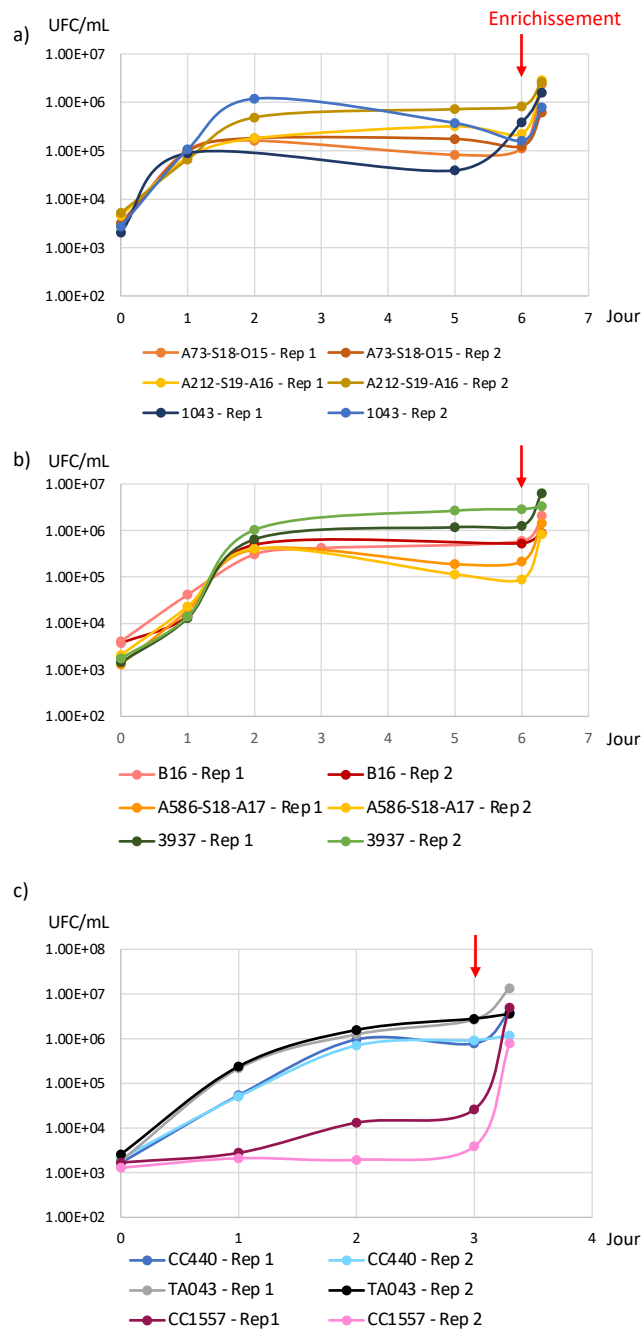


Figure 10 : Courbes de croissance dans l'eau des mutants de a) *Pectobacterium*, b) *Dickeya* et c) *Pseudomonas*. L'axe des ordonnées montre la concentration bactérienne en UFC/mL et l'axe des abscisses représente le temps de croissance (par jour). Les flèches rouges indiquent le début de l'enrichissement. Seul le code des souches est indiqué ; les noms complets des souches : *Pectobacterium* (*P. atrosepticum* 1043, *P. versatile* A73-S18-O15 et *P. aquaticum* A212-S19-A16) ; *Dickeya* (*D. dadantii* 3937, *D. fangzhongdai* B16 et *D. zeae* A586-S18-A17) ; *Pseudomonas* (*P. syringae* CC1557, *P. syringae* CC440 et *P. viridiflava* TA043). La mention Rep signifie réplicat biologique.

Pour les souches de *Pseudomonas*, une mortalité a parfois été observée après 3 jours d'incubation lors des tests préliminaires (données non présentées), la période de culture en eau des souches de *Pseudomonas* a donc été réduite à 3 jours. Cependant seules deux souches de *Pseudomonas syringae* CC440 et *Pseudomonas viridiflava* TA043 ont atteint une concentration égale ou supérieure à 10^5 UFC/mL à partir d'un inoculum initial d'environ 10^3 U/mL, tandis que *Pseudomonas syringae* CC1557 s'est révélé incapable de croître dans l'eau avant l'enrichissement par addition du milieu TSA 50 % (Figure 10 c). Par conséquent, la souche *Pseudomonas syringae* CC1557 a été exclue des analyses Tn-Seq ultérieures. L'enrichissement a favorisé la croissance des souches testées : le nombre de générations obtenues avant et après enrichissement pour chaque culture est présenté dans le tableau 4.

Tableau 4 : Nombre de générations (doublement de l'effectif) des bactéries lors de la culture en eau avant et après enrichissement.

Souches	Nombre de générations jour 6 (SRP) / jour 3 (<i>P. syringae</i>) avant enrichissement	Nombre de générations jour 6 (SRP) / jour 3 (<i>P. syringae</i>) après enrichissement
A73-S18-O15 - Rep 1	5.2	9.6
A73-S18-O15 - Rep 2	5.3	7.6
A212-S19-A16 - Rep 1	5.6	9.3
A212-S19-A16 - Rep 2	7.3	9
1043 - Rep 1	7.6	9.6
1043 - Rep 2	5.9	8.2
B16 - Rep 1	7.2	9
B16 - Rep 2	7.1	7.9
A586-S18-A17- Rep 1	7.3	10.1
A586-S18-A17- Rep 2	5.4	8.7
3937 - Rep 1	9.8	12.1
3937 - Rep 2	10.7	10.9
CC440 - Rep 1	8.9	11.2
CC440 - Rep 2	8.8	9.2
TA043 - Rep 1	10.5	12.8
TA043 - Rep 2	10.1	10.5
CC1557 - Rep 1	3.9	11.5
CC1557 - Rep 2	1.6	9.3

*Le nombre de génération était calculé comme suit $n = \ln(N/N_0)/\ln(2)$ avec n : nombre de générations, N_0 : nombre de bactéries initial, N : nombre de bactéries final.

3.2. Résultats préliminaires du Tn-Seq « eau » : Les gènes essentiels pour la survie et la croissance dans l'eau de deux souches de *Pectobacterium*

L'analyse des données de séquençage à l'aide du pipeline bio-informatique TnSeek n'a été réalisée jusqu'à présent que pour deux souches, *P. versatile* A73-S18-O15 et *P. aquaticum* A212-S19-A16, l'ADN de la souche *P. atrosepticum* 1043 cultivée dans l'eau étant contaminé et donc exclu de l'analyse. Les données de séquençage des mutants sélectionnés par le milieu riche TSB 50 %, réalisées par nos collègues du MAP à Lyon, ont servi de condition de contrôle. En utilisant les mêmes critères que Royet et collaborateurs (2019), seuls les gènes ayant une p-value ajustée $\leq 0,05$ et un nombre moyen de lectures (reads) dans le milieu de contrôle supérieur ou égal à cinq ont été sélectionnés. De plus, les gènes dont la valeur de log₂FC (Fold Change) était comprise entre 2 et -2 ont été exclus de l'analyse. Les gènes avec une valeur de log₂FC ≥ 2 sont des gènes pour lesquels la mutation a un effet positif sur la fitness bactérienne, et les gènes avec une valeur de log₂FC ≤ -2 sont des gènes essentiels pour lesquels la mutation a un effet négatif sur la fitness bactérienne dans l'eau. En appliquant ces critères, 164 et 171 gènes nécessaires à la survie et la croissance en eau ont respectivement été identifiés chez *P. versatile* A73-S18-O15 et *P. aquaticum* A212-S19-A16. Parmi ces gènes, 113 gènes sont communs entre les deux espèces étudiées (Figure 11). En revanche, seuls 6 gènes dont la mutation a un impact positif sur la fitness bactérienne ont été identifiés chez *P. aquaticum* A212-S19-A16, et aucun gène de ce type n'a été identifié chez *P. versatile* A73-S18-O15.

Les gènes nécessaires à la survie dans l'eau chez les deux souches ont été annotés par le serveur EggNOG version 2.1.12 ; URL : <http://eggnog-mapper.embl.de>). Ce serveur web permet de déterminer les fonctions COG (Clusters of Orthologous Groups) des différents gènes analysés. La distribution des catégories COG des gènes nécessaires à la survie dans l'eau était similaire entre les deux souches analysées (Figure 12). Cela était attendu, car la majorité des gènes nécessaires à la survie dans l'eau de rivière sont communs aux deux souches. Les catégories COG les plus représentées chez *P. versatile* A73-S18-O15 et *P. aquaticum* A212-S19-A16 étaient : transport et métabolisme d'acides aminés (38 et 35 gènes respectivement), transport et métabolisme de coenzymes (25 et 23 gènes respectivement) et transport et métabolisme de nucléotides (16 et 20 gènes respectivement). Et dans un second ordre les catégories transcription (11 et 19 gènes respectivement) et transport et métabolisme d'ion inorganiques (11 et 15 gènes respectivement). La majorité des gènes assignés à toutes ces catégories sont des gènes ayant des fonctions métaboliques, à l'exception de la catégorie transport et métabolisme des ions inorganiques, où la majorité des gènes codent des transporteurs. Ces résultats indiquent que le métabolisme des acides aminés, des co-enzymes et des nucléotides est essentielle pour la survie de ces deux bactéries dans l'eau de rivière.

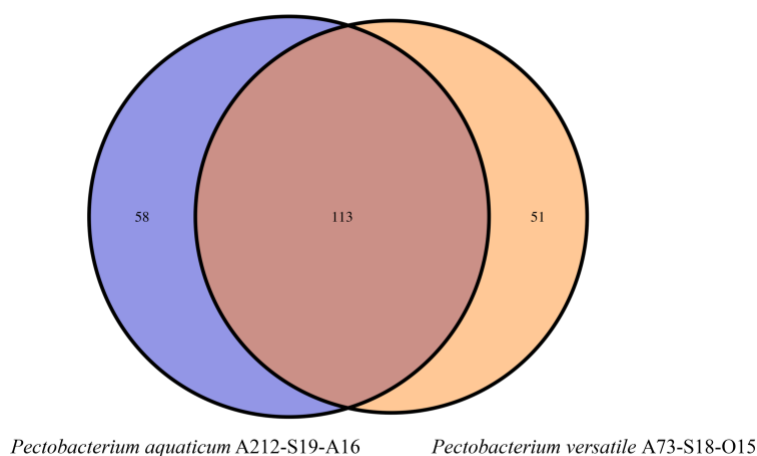


Figure 11 : Les gènes essentiels à la survie et la croissance dans l'eau de rivière, qui sont commune et spécifiques à *Pectobacterium versatile* A73-S18-O15 et *Pectobacterium aquaticum* A212-S19-A16 (indiqués en orange et bleu respectivement).

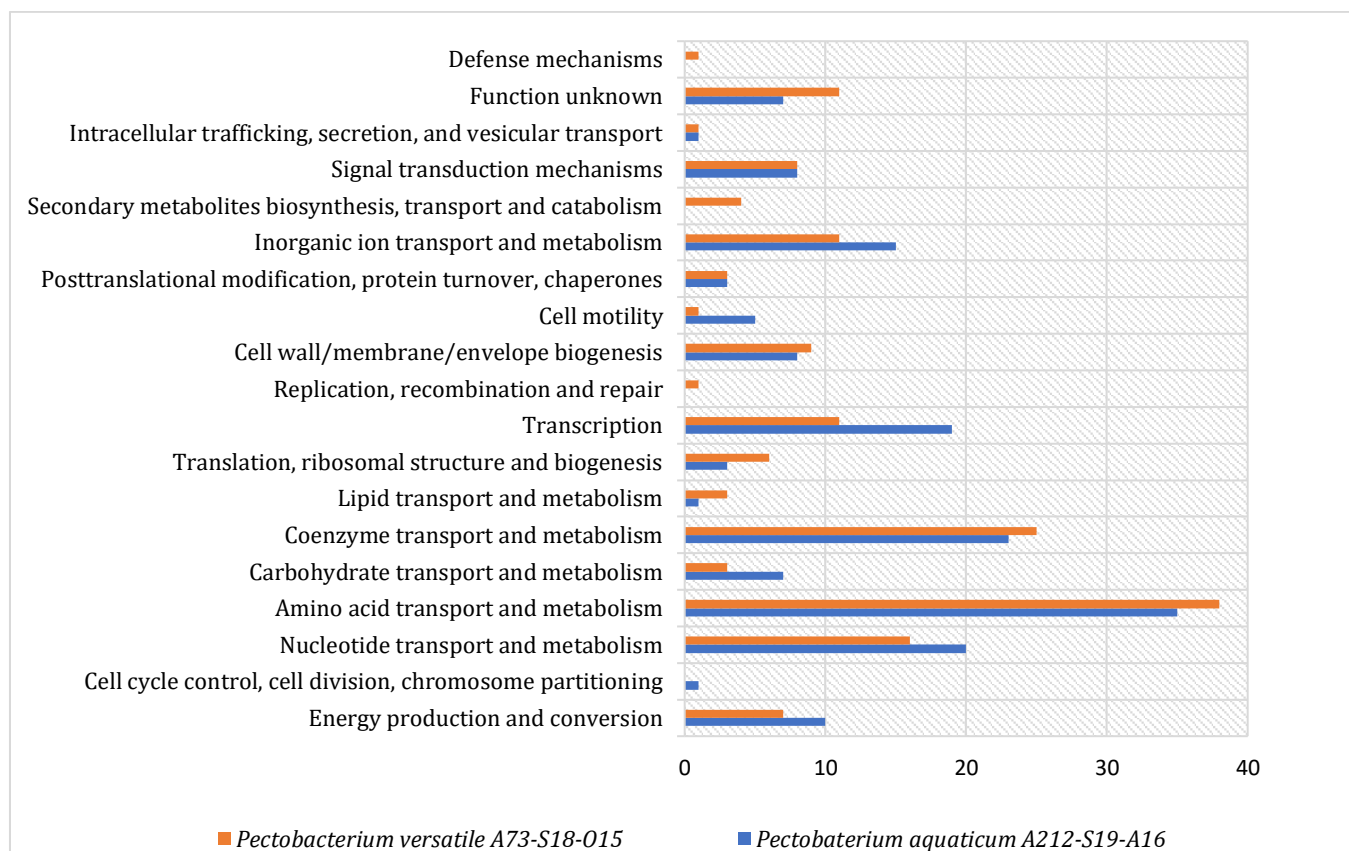


Figure 12 : Distribution des catégories fonctionnelles COG des gènes essentiels à la survie dans l'eau chez *Pectobacterium versatile* A73-S18-O15 et *Pectobacterium aquaticum* A212-S19-A16 (indiqués en orange et bleu respectivement). L'axe des abscisses représente le nombre de gènes par catégorie.

Conclusions et perspectives

Les travaux réalisés lors de ma thèse ont eu pour objectif d'étudier les SRP présents dans les eaux de surface, leur diversité, leur répartition, leurs caractéristiques génomiques et fonctionnelles ainsi que les déterminants génétiques nécessaires à leur survie dans cet environnement. Mes travaux reposent sur l'analyse d'une collection de souches de SRP isolées entre 2015 et 2017 dans l'eau de la rivière Durance et du lac artificiel/expérimental Planaqua en France. Une analyse préliminaire du gène *gapA* de cette collection avait révélé trois nouveaux clades distincts des espèces de SRP décrites, dont deux clades avaient été décrits comme de nouvelles espèces avant le début de ma thèse : l'espèce *P. versatile* et *P. aquaticum* (Pédron et al. 2019; Portier et al. 2019).

Dans un premier temps, j'ai réalisé une étude taxonomique pour décrire le troisième clade d'isolats d'eau appelé '*P. quasiahquaticum*'. Cette étude a été réalisée en suivant une approche polyphasique combinant des analyses moléculaires et phénotypiques. L'analyse phylogénétique à base du gène *gapA* et l'analyse MLSA du core génome ont démontré que les souches de *P. quasiahquaticum* forment un clade distinct de l'espèce proche *P. aquaticum*, en comparaison, l'analyse phylogénétique de l'ARNr 16S a donné des résultats incohérents et peu fiables. La faible résolution de l'arbre ARNr 16S pour la classification des espèces de SRP a été précédemment rapporté dans une autre étude (Adeolu et al. 2016). Les résultats des analyses dDDH et ANI ont également montré que le clade *P. quasiahquaticum* est bien distinct des autres espèces de *Pectobacterium*. Néanmoins, les valeurs dDDH et ANI entre les génomes de *P. quasiahquaticum* et *P. aquaticum* se situent dans une zone grise où la délimitation des espèces est sujette à interprétation par les taxonomistes (Richter et Rosselló-Móra 2009; Rosselló-Móra et Amann 2015). La capacité réduite de *P. quasiahquaticum* à utiliser le L-Rhamnose comme source de carbone est liée à la pseudogénération du gène *rhaT*, codant un transporteur de L-rhamnose. Ce phénotype est particulièrement intéressant, car le L-rhamnose est un sucre présent dans les parois cellulaires végétales, à des proportions variables selon les types de plantes (Jiang et al. 2021). Cela suggère que *P. quasiahquaticum* et *P. aquaticum* pourraient être associés à des plantes hôtes différentes. Par ailleurs, les données écologiques issue de l'échantillonnage des SRP de la rivière Durance et du lac artificiel Planaqua montrent que les deux clades ont des distributions et des abondances différentes. Cela suggère que *P. quasiahquaticum* et *P. aquaticum* occupent des niches écologiques distinctes. Tous ces arguments plaident en faveur de la description du clade *P. quasiahquaticum* en tant que nouvelle espèce distincte de *P. aquaticum*. Ce choix de décrire deux espèces s'est également appuyé sur le fait qu'au sein des

Pectobacteriaceae, *P. quasиаquaticum* et *P. aquaticum* ne sont pas les seules espèces proches décrites, les couples d'espèces *P. versatile* - *P. carotovorum* et *P. polaris* - *P. parvum* ont également des valeurs ANI et dDDH similaires à celles calculées pour *P. quasиаquaticum* - *P. aquaticum* (voir chapitre 2 : Tableau 3). De même dans le genre *Dickeya* les valeurs ANI entre les espèces *D. zeaе* et *D. parazeae* se situent entre 95.7 - 96.0 % (Hugouvieux-Cotte-Pattat et Van Gijsegem 2021).

L'utilisation des caractéristiques phénotypiques dans la classification des bactéries et de plus en plus critiquée pour plusieurs raisons. Dans la plupart des analyses phénotypiques, seule la souche-type ou un faible nombre de souches par espèce sont testées, ce qui n'est pas nécessairement représentatif de la diversité intra-espèce. Par exemple, Koh et collaborateurs (2012) ont rapporté que les souches de *P. actinidiae* réagissent positivement au test d'hydrolyse de la gélatine (Koh et al. 2012), ce qui n'est pas vrai pour toutes les souches de *P. actinidiae* (Portier et al. 2019). De plus, Portier et collaborateurs (2019) ont montré, lors d'analyses phénotypiques réalisées sur des souches représentatives de 8 espèces de *Pectobacterium*, qu'aucun des phénotypes testés ne s'est révélé spécifique à une espèce donnée. En effet, tous les phénotypes examinés étaient partagés par au moins deux espèces. Par ailleurs, pour que les caractéristiques aient une importance phénotypique, ils doivent être stables au cours du temps. Toutefois chez certaines bactéries comme les bactéries du genre *Rhizobium*, plusieurs caractéristiques phénotypiques sont codées par des gènes situés sur des plasmides (Ormeño-Orrillo et Martínez-Romero 2013). Ainsi, la perte ou le gain de ces plasmides peut affecter le résultat de tests phénotypiques et conduire à des classifications phénotypiques en désaccord avec les données génomiques (Kumar et al. 2015; Ormeño-Orrillo et Martínez-Romero 2013). Par ailleurs, pour tester les caractéristiques phénotypiques d'une bactérie, cette dernière doit être cultivable. Ainsi, l'utilisation du critère phénotypique dans la taxonomie exclut les bactéries non ou difficilement cultivables, même lorsque leurs séquences génomiques sont disponibles (Thompson et al. 2015). Tous ces arguments remettent en question l'utilité des tests phénotypiques pour la classification des bactéries et suggère que la taxonomie des bactéries doit être principalement basée sur les données génomiques.

Les caractéristiques phénotypiques des espèces sont néanmoins importantes pour les laboratoires ne disposant pas de facilités de biologie moléculaire ou effectuant de nombreuses analyses de routine comme les laboratoires effectuant des analyses diagnostics. Ainsi chez les SRP, les tests phénotypiques sont utilisés en première analyse lors des contrôles des semences de pomme de terre. De plus, dans certains cas, ces tests restent très discriminants. Par exemple,

les bactéries du genre *Shigella*, responsables de la Shigellose, et l'espèce *Escherichia coli*, se distinguent par leurs caractéristiques biochimiques, sérologiques et leur pathogénicité chez l'homme. Cependant sur le plan génétique, ces deux groupes bactériens constituent une même espèce avec plus de 80% d'hybridation ADN-ADN (Germani et Sansonetti 2008). Néanmoins, la communauté médicale conserve cette subdivision, pour son intérêt biomédical et épidémiologique.

Suite à la description de l'espèce *P. quasiquaticum*, j'ai participé à l'étude de la diversité, de l'abondance et de la répartition des SRP au cours du temps dans le bassin versant de la Durance. Cette étude a mis en évidence la prédominance du genre *Pectobacterium* dans l'eau de rivière qui représente 94,32 % des isolats d'eau de SRP caractérisées. En revanche, le genre *Dickeya* est rare et représente seulement 5,67 % des souches isolées. Au sein du genre *Pectobacterium*, l'espèce *P. versatile* était la plus abondante avec une large répartition au sein du bassin versant. Cette espèce a également un large spectre d'hôte sur plante (Portier et al. 2020). Les raisons de ce succès écologique ne sont pas connues. Il a néanmoins été observé que les souches de *P. versatile* sont plus résistantes aux antibiotiques que les autres espèces de SRP (Smoktunowicz et al. 2022). De plus, la majorité des souches de *P. versatile* portent dans leurs génomes le gène *bla_{PEC-1}* codant pour une b-lactamase proche de la b-lactamase *bla_{TEM-1}* d'*E. coli* (Royer et al. 2022). Il est donc possible que les souches de *P. versatile* soient avantagées dans l'environnement par ce trait d'espèce.

Les souches de *Dickeya* n'ont été isolées dans le bassin versant de la Durance que lorsque la température de l'eau était au-dessus de 19,5°C, ce qui a été également observé lors d'études antérieures (Cothier et Gilbert 1990; Laurila et al. 2008). Par ailleurs l'étude comparative de la répartition et des abondances des SRP et du complexe d'espèces *Pseudomonas syringae*, a montré que la température était la principale variable explicative des variations d'abondances observées entre les deux groupes bactériens (Morris et al., 2023). Plus spécifiquement, chez le complexe d'espèces *Pseudomonas syringae*, la taille de population augmentait à faible température, tandis que chez les SRP la taille de population augmentait avec la température (Morris et al., 2023). L'importance de cette variable environnementale indique que les populations de pathogènes dans les eaux risquent fort d'être modifiées par l'augmentation des températures due au réchauffement climatique. De plus, les études d'écologie ayant été majoritairement effectuées en climat tempéré, il serait intéressant de répéter ce type d'étude sous d'autres climats, par exemple en Afrique ou en Amérique du sud. De plus, au vu de l'importance de la variable température dans l'environnement, il serait intéressant d'effectuer

une analyse fonctionnelle Tn-Seq à différentes températures. Le groupe des bactéries SRP se prête bien à ce type d'analyse. Ainsi on pourrait rechercher chez *P. atrosepticum*, qui est inféodée aux basses températures, les gènes essentiels pour se multiplier à faible température. A l'inverse, pour rechercher les gènes importants pour croître à température élevée, on pourrait utiliser une espèce appartenant au genre *Dickeya* qui croissent à plus forte température.

Le travail réalisé a également permis de confirmer la haute résolution de la phylogénie *gapA* pour l'identification des espèces de SRP. Ce gène de ménage constitue donc un outil intéressant pour toutes les études de terrain à venir sur la diversité des SRP dans différents environnements. Par ailleurs, le gène *gapA* pourrait être utilisé pour analyser plus efficacement la diversité des espèces de SRP au champ présentant des mêmes symptômes d'infection. Ainsi, une amplification *gapA* suivi d'un séquençage Illumina de l'amplifiat permettrait de connaître précisément la proportion de symptômes hébergeant plusieurs espèces de SRP et la proportion de chaque espèce en cas de co-infection. Ceci permettrait de mieux comprendre la dynamique des infections en champs.

Certaines espèces de SRP décrites dans l'eau, telles que *D. lacustris*, *D. aquatica* ou *P. fontis*, n'ont pas été isolées lors de la campagne d'échantillonnage dans la Durance. Ceci indique que ces espèces ne sont pas présentes partout. Néanmoins *D. aquatica* a été isolée d'eau en Angleterre, en Finlande et en région parisienne (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2019, 2023; Parkinson et al. 2014). Ceci indique une large distribution géographique de cette espèce. De la même manière, la présence de *P. aquaticum* et de *P. quasiaquaticum* dans un lac en Pologne et dans les canaux d'irrigation aux Pays-Bas respectivement (Babinska et al. 2021; Jonkheer et al. 2021) indique également une large circulation de ces deux espèces. Toutefois, ce n'est pas clair si l'environnement aquatique est la principale niche de ces deux espèces ou si leur présence dans l'eau est due à une contamination par l'environnement adjacent. En effet, ces espèces restent rares dans l'eau et mon travail de génomique comparative n'a pas permis d'identifier de gènes spécifiques de l'environnement aquatique, comme par exemple le cluster de gènes *gvp* codant les vésicules à gaz permettant la flottaison des cyanobactéries dans l'eau (Pancrace et al. 2017) Il est donc probable que ces espèces « aquatiques » ne font que passer dans l'eau. Leur présence dans l'eau pourrait par exemple résulter du lessivage des sols où d'une association avec des plantes communes situées au bord des rivières ou aquatiques. En effet, différentes campagnes d'échantillonnage montrent que les SRP peuvent être isolées de différentes plantes non cultivées dans différents pays (Tsrör et al. 2010, 2019). Plus particulièrement, différentes SRP ont été isolées à plusieurs occasions à partir de *Solanum dulcamara* (Morelle douce-amère)

situé proche de champs agricoles (Cothier et Gilbert 1990; Fikowicz-Krosko et al. 2017). *D. lacustris*, une espèce principalement isolée dans l'eau, a été également isolée de la rhizosphère de *Solanum dulcamara* situé en bord de lac (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2019). Pour rechercher si les SRP infectent certaines plantes riveraines, les membres de notre laboratoire de recherche ont effectué un échantillonnage de végétaux vasculaires et de macro-algues des berges et dans le lit du Verdon, ainsi qu'un échantillonnage d'eau dans un site situé sur la commune de Vinon-sur-Verdon. Parmi les 29 espèces végétales échantillonnées, cinq bactéries pectinolytiques ont été isolées à partir de cinq plantes appartenant à quatre familles distinctes : *Carex pseudocyperus* (famille des *Cyperaceae*), *Eupatorium cannabinum* (famille des *Asteraceae*), *Groenlandia densa* (famille des *Potamogetonaceae*), *Scirpus lacustris* (famille des *Cyperaceae*) et *Lythrum salicaria* (famille des *Lythraceae*). Bien que l'espèce *Solanum dulcamara* était également échantillonnée, aucune SRP n'a été détectée sur cette plante. (Barny *et al.*, communication personnelle). L'analyse phylogénétique du gène *gapA* a révélé que tous les isolats d'eau (15 isolats) ont été assignés à l'espèce *P. aquaticum* à l'exception d'une souche identifiée comme *D. solani*. En revanche, les 5 isolats de plantes ont été assignés à *P. brasiliense* (3 isolats) et *D. solani* (2 isolats) (Barny *et al.*, communication personnelle). Ceci indique que les plantes riveraines ne sont probablement pas à l'origine des souches de *P. aquaticum* détectées dans l'eau. L'isolement de *D. lacustris* à partir de fèces humaine au Pakistan (Accession GenBank GCA_027571425.1) indique que d'autres niches sont encore à explorer pour mieux comprendre le mode de vie des espèces aquatiques.

J'ai ensuite décidé d'étudier les caractéristiques génomiques et fonctionnelles qui distinguent *P. aquaticum* et *P. quasiaquaticum* des autres espèces de SRP communément isolées des plantes, dans le but de trouver des indices sur leur mode de vie ou leur niche écologique. L'étude de génomique comparative réalisée entre *P. aquaticum*, *P. quasiaquaticum* et les autres *Pectobacterium* a révélé que ces deux espèces avaient des génomes plus petits et avaient un nombre élevé de pseudogènes comparé aux autres espèces de *Pectobacterium*. Une analyse de l'évolution des répertoires de gènes des espèces du genre *Pectobacterium* a révélé une perte significative d'environ 500 gènes à l'émergence de ces deux espèces, qui n'a été que partiellement compensé par un gain de 148 gènes. Parmi les gènes absents chez *P. aquaticum* et *P. quasiaquaticum*, plusieurs étaient impliqués dans le transport d'ions inorganiques telle que le fer et le sulfure, de carbohydrates et d'acides aminés. Cette réduction des transporteurs est un indice important suggérant un changement de niche. De plus, cinq gènes codant des

PCWDE était également absents en concordance avec une faible production de pectinases chez ces deux espèces et leur moindre agressivité sur plantes.

En tenant compte de l'évolution réductive de *P. aquaticum* et *P. quasiaquaticum*, il est peu probable que le sol soit l'habitat principal de ces deux espèces, car les bactéries du sol ont généralement des génomes de grande taille (Giovannoni et al. 2014). Ce type d'évolution réductive est plus souvent observée chez les bactéries endosymbiontes d'insectes, telle que la bactérie du genre *Buchnera* spp., symbiontes des aphides (McCutcheon et Moran 2012). De plus, des souches de SRP non caractérisées taxonomiquement ont été isolées à plusieurs reprises à partir d'insectes et de nématodes (voir Chapitre 1 : section 8.3). Il est donc possible que *P. aquaticum* et *P. quasiaquaticum* soient en association symbiotique avec ces organismes. Cependant, cela demeure incertain, car aucune de ces deux espèces ne possède de gènes spécifiques reconnus pour être impliqués dans la survie chez les insectes, comme dans le cas de *P. parvum* (Pasanen et al. 2020).

Une évolution réductive a été également observée chez certaines bactéries marines, telle que les cyanobactéries du genre *Prochlorococcus* (1,66 – 2,41 Mb) ou des protéobactéries de l'ordre des *Pelagibacterales* (1,28 – 1,46 Mb) (Giovannoni et al. 2014). Il a été suggéré que ce type d'évolution, également appelé « Streamlining », permet de minimiser la complexité cellulaire afin de réduire les ressources nécessaires à la réplication. Cette stratégie confère un avantage sélectif dans les niches où une complexité fonctionnelle minimale est suffisante (Giovannoni et al. 2014). Cependant, chez ces bactéries, la taille efficace de population est importante (Giovannoni et al. 2014), ce qui n'est pas le cas de nos deux espèces d'intérêt. Par ailleurs, aucun des gènes spécifiques à nos deux espèces ne sont connus pour conférer un avantage de croissance dans l'eau. En revanche, les espèces potentiellement 'aquatique' de *Dickeya*, *D. aquatica* et *D. lacustris*, présentent également des caractéristiques génomiques similaires à nos deux espèces, notamment des génomes plus petits et des répertoires de virulence légèrement réduits. Ceci suggère que l'adaptation à l'environnement aquatique pourrait être à l'origine de l'évolution réductive chez ces espèces. Cependant, il convient de noter que contrairement à *P. aquaticum* et *P. quasiaquaticum*, les espèces « aquatiques » de *Dickeya* conservent un important potentiel pathogène important vis-à-vis de certaines plantes (Duprey et al. 2019; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al. 2023).

Des exemples d'évolution réductive ont précédemment été rapportés chez des bactéries pathogènes de plantes telles que *Xylella fastidiosa* ou *Xanthomonas albilineans* (Pieretti et al. 2009; Vandroemme et al. 2013). Par exemple, *Xanthomonas albilineans*, un pathogène qui cause des dégâts importants aux plants de canne à sucre, a un génome plus petit comparé aux autres espèces de *Xanthomonas*. Il a été suggéré que l'adaptation au xylème des plantes infectées, un environnement pauvre en nutriments, pourrait être à l'origine de l'évolution réductive chez cette espèce (Pieretti et al. 2009). Cependant, ces bactéries conservent leur pouvoir pathogène et causent des dégâts importants, contrairement à *P. aquaticum* et *P. quasiquaticum*, qui n'ont pas été détectés sur plantes et qui sont peu agressives en comparaison des autres SRP.

Avec les données actuelles, il est difficile de déterminer si l'évolution réductive observée chez *P. aquaticum* et *P. quasiquaticum* est le résultat d'une adaptation au milieu aquatique, d'une spécialisation sur une plante inconnue ou à une association symbiotique avec des insectes ou des nématodes.

Des analyses génomiques complémentaires pourraient éventuellement fournir des indices pour mieux appréhender cette question. Il serait intéressant de rechercher les gènes soumis à une sélection positive ou négative chez ces deux espèces et leurs fonctions. Les gènes sous sélection positive sont ceux favorisés par l'environnement, tandis que les gènes sous sélection négative sont défavorisés. En identifiant ces gènes et leurs fonctions, nous pourrions mieux comprendre quelles fonctions sont privilégiées ou défavorisées dans les niches respectives de ces deux espèces, permettant ainsi de prédire leurs niches potentielles.

Une évaluation du taux de recombinaison et leurs origines serait également pertinente. En effet, un taux de recombinaison bas pourrait indiquer une association endosymbiotique avec des insectes ou des nématodes, où l'isolement physique au sein de l'hôte réduit les opportunités de recombinaison avec d'autres bactéries. Si des événements de recombinaison sont observés chez ces deux espèces, il serait important d'identifier l'origine des séquences. Cela pourrait fournir des indices sur les espèces bactériennes proches partageant la même niche, car la probabilité de recombinaison avec ces dernières serait plus importante, comparé aux bactéries qui occupent des niches distinctes (Didelot et Maiden 2010).

L'analyse de la distribution de gènes impliqués dans les transferts horizontaux, tels que les transposases, a été utilisée pour étudier l'histoire de la cohabitation entre différents microorganismes (Hooper et al. 2009). Appliquer cette méthode sur nos espèces et d'autres

bactéries occupant différentes niches (eau, sol, insectes) pourrait fournir des indices sur les espèces bactériennes distantes partageant la même niche et ainsi éclairer davantage l'écologie de ces deux espèces.

Afin d'obtenir une vision plus complète de la niche écologique de ces deux espèces, ainsi que pour évaluer les risques potentiels des réservoirs environnementaux, un effort supplémentaire d'échantillonnage serait nécessaire. Notamment des échantillonnages de sol, de rhizosphère, de plantes non cultivées, ainsi que d'insectes et de nématodes. Par ailleurs, il serait intéressant de vérifier la présence de séquences génomiques de *P. aquaticum*, *P. quasiahquaticum* et d'autres SRP dans les bases de données métagénomiques environnementales.

Suite à l'étude des caractéristiques génomiques et fonctionnelles des espèces de *P. aquaticum* et *P. quasiahquaticum* et le mode évolutif de ces deux espèces, j'ai entrepris la réalisation d'une analyse Tn-Seq afin d'identifier les déterminants génétiques nécessaires à la survie et la croissance de 3 groupes de bactéries pathogènes de plantes dans l'eau. L'approche Tn-Seq est complémentaire de l'approche écologique. En effet, si l'approche écologique a permis d'identifier des biomes préférentiels selon les espèces de SRP, l'approche Tn-Seq permet d'identifier des gènes essentiels selon les biomes, ces gènes pouvant être communs à plusieurs espèces ou spécifiques d'une espèce donnée. Afin de différencier les gènes essentiels « communs » et les gènes essentiels « spécifiques », ce travail a été mené sur 9 espèces appartenant à 3 genres bactériens, *Pectobacterium*, *Dickeya* et *Pseudomonas*. Dans le projet Tn-Seq, les deux biomes étudiés sont la plante, la plante choisie étant la fève sur laquelle toutes les bactéries se développent et l'eau de rivière. L'étude dans l'eau est particulièrement intéressante car elle constitue une des premières applications de la méthode Tn-Seq pour les bactéries pathogènes de plantes dans une condition hors plante. Les résultats sont en cours d'analyse, et dans l'eau, seuls les résultats obtenus pour *P. versatile* et *P. aquaticum* sont actuellement disponibles.

L'analyse des données de séquençage des banques de mutants cultivés dans l'eau pour deux souches *P. versatile* A73-S18-O15 et *P. aquaticum* A212-S19-A16 a révélé 222 gènes impliqués dans la survie dans l'eau, dont plus de la moitié sont communs entre les deux espèces. La majorité de ces gènes étaient liés au métabolisme des produits riches en azote notamment des acides aminés et nucléotides.

Les acides aminés et les nucléotides sont une source organique d'azote. L'azote est un élément essentiel à la survie des organismes. Dans les milieux aquatiques oligotrophes (pauvres en

nutriments), le phosphate et l'azote, sont les principaux macronutriments qui limitent la croissance des producteurs primaires (organismes capables de produire la matière organique à partir de la matière minérale), tels que les cyanobactéries (Burkholder et Glibert 2013). Chez les bactéries hétérotrophes qui vivent dans ce type d'environnement, une sélection positive a été observée sur les gènes impliqués dans le transport et de métabolisme des composés organiques riches en azote, ainsi que des transporteurs de phosphate et de carbone (Props et al. 2019). De même, une analyse génomique des bactéries de l'ordre des *Enterobacter* (*Enterobacter asburiae* et *Lelliottia*) qui prolifèrent dans les lacs et réservoirs oligotrophes, a révélé que ces bactéries possèdent des gènes qui leur permettent de faire face à de faibles niveaux d'azote et de phosphate, notamment des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des acides aminés et des gènes de transport du phosphate et du sulfure (Leister et Hügler 2022). Ainsi, étant donné que les gènes essentiels à la survie de nos deux souches *P. versatile* A73-S18-O15 et *P. aquaticum* A212-S19-A16 dans l'eau de rivière sont principalement liés au métabolisme des produits riches en azote, cela reflète une réponse métabolique de ces deux bactéries aux environnements aquatiques oligotrophes.

Il sera essentiel de confirmer le caractère essentiel ou délétère dans l'eau des gènes identifiés en créant des mutants de délétion et en comparant leur croissance en eau avec celle des souches sauvages. Avec la disponibilité de nombreux génomes de SRP dans les bases données publiques, il sera également intéressant d'étudier la distribution des gènes impliqués dans la survie et la croissance dans l'eau chez toutes les SRP. En particulier, il sera intéressant de voir si cette distribution est différente chez les espèces 'aquatiques' et les espèces 'plantes'. Il sera également pertinent de déterminer si les déterminants génétiques nécessaires à la survie dans l'eau des SRP, identifiés lors de nos études, sont présents chez les bactéries inféodées aux eaux douces, comme les bactéries du genre *Rhodospirillum rubrum* and *Polynucleobacter* (Llirós et al. 2014).

Pour conclure, cette thèse a permis d'explorer la diversité, l'abondance et la répartition des SRP dans les eaux de surfaces, en tenant compte de la taxonomie actuelle des SRP. La description de la nouvelle espèce, isolée dans l'eau, *P. quasiaquaticum* et l'étude comparative entre *P. quasiaquaticum*, *P. aquaticum* et d'autres espèces de *Pectobacterium*, ont mis en évidence une trajectoire évolutive particulière à ces deux espèces, suggérant une adaptation à une nouvelle niche, probablement aquatique. De plus, cette recherche a permis d'identifier des déterminants génétiques essentiels à leur survie en eau douce. Dans l'ensemble, ces résultats enrichissent notre compréhension de l'écologie et de l'évolution des SRP en dehors de leurs plantes hôte.

Références bibliographiques

- Acosta Muniz C., Jaillard D., Lemaitre B., Bocard F. 2007. « *Erwinia carotovora* Evf Antagonizes the Elimination of Bacteria in the Gut of *Drosophila* Larvae ». *Cellular Microbiology* 9(1):106-19. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00771.x.
- Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S., S. Gupta R. 2016. « Genome-Based Phylogeny and Taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: Proposal for *Enterobacterales* ord. nov. Divided into the Families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov. *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(12):5575-99. doi: 10.1099/ijsem.0.001485.
- Ahrenholtz I., Harms K., De Vries J., Wackernagel W. 2000. « Increased Killing of *Bacillus subtilis* on the Hair Roots of Transgenic T4 Lysozyme-Producing Potatoes ». *Applied and Environmental Microbiology* 66(5):1862-65. doi: 10.1128/AEM.66.5.1862-1865.2000.
- Alcorn S.M., Orum T.V., Steigerwalt A.G., Foster J.L., Fogleman J.C., Brenner D.J. 1991. « Taxonomy and Pathogenicity of *Erwinia cacticida* sp. nov. ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 41(2):197-212. doi: 10.1099/00207713-41-2-197.
- Alič Š., Van Gijsegem F., Pédrón J., Ravnikař M., Dreo T. 2018. « Diversity within the Novel *Dickeya Fangzhongdai* sp., Isolated from Infected Orchids, Water and Pears ». *Plant Pathology* 67(7):1612-20. doi: 10.1111/ppa.12866.
- Anilkumar T., Chakravarti B. 1970. « Factors affecting survival of *Erwinia carotovora*, causal organism of stalk rot of Maize in soil. » *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 5(2-A):333-40.
- Aremu B.R., Babalola O.O. 2015. « Classification and Taxonomy of Vegetable Macergens. » *Frontiers in Microbiology* 6:1361. doi: 10.3389/fmicb.2015.01361.
- Azimi S., Klementiev A.D., Whiteley M., Diggle S.P. 2020. « Bacterial Quorum Sensing During Infection ». *Annual Review of Microbiology* 74(1):201-19. doi: 10.1146/annurev-micro-032020-093845.
- Babinska W., Motyka-Pomagruk A., Sledz W., Kowalczyk A., Kaczynski Z., Lojkowska E. 2021. « The First Polish Isolate of a Novel Species *Pectobacterium aquaticum* Originates from a Pomeranian Lake ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(9):5041. doi: 10.3390/ijerph18095041.
- Barny M.-A. 1990. « Étude génétique et moléculaire du déterminisme du pouvoir pathogène d'*Erwinia amylovora* : agent du feu bactérien des pomicées ». Thèse de doctorat en Sciences biologiques et fondamentales appliquées, Université Paris 7.
- Batut B., Knibbe C., Marais G., Daubin V. 2014. « Reductive Genome Evolution at Both Ends of the Bacterial Population Size Spectrum ». *Nature Reviews Microbiology* 12(12):841-50. doi: 10.1038/nrmicro3331.
- Ben Moussa H., Bertrand C., Rochelle-Newall E., Fiorini S., Pédrón J., Barny M.-A. 2022. « The Diversity and Abundance of Soft Rot *Pectobacteriaceae* Along the Durance River Stream in the Southeast of France Revealed by Multiple Seasonal Surveys ». *Phytopathology*® 112(8):1676-85. doi: 10.1094/PHYTO-12-21-0515-R.
- Ben Moussa H., Pédrón J., Bertrand C., Hecquet A., Barny M.-A. 2021. « *Pectobacterium quasiquaticum* sp. nov., Isolated from Waterways ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71(10). doi: 10.1099/ijsem.0.005042.
- Ben Moussa H., Pédrón J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Barny M. 2023. « Two Species with a Peculiar Evolution within the Genus *Pectobacterium* Suggest Adaptation to a New Environmental Niche ». *Environmental Microbiology* 1462-2920.16479. doi: 10.1111/1462-2920.16479.
- Berge O., Monteil C.L., Bartoli C., Chandeysson C., Guilbaud C., Sands D.C., Morris C.E. 2014. « A

- User's Guide to a Data Base of the Diversity of *Pseudomonas syringae* and Its Application to Classifying Strains in This Phylogenetic Complex » édité par M. Vos. *PLoS ONE* 9(9):e105547. doi: 10.1371/journal.pone.0105547.
- Bonde R., De Souza P. 1954. « Studies on the Control of Potato Bacterial Seed-Piece Decay and Blackleg with Antibiotics ». *American Potato Journal* 31(10):311-16. doi: 10.1007/BF02861599.
- Boughammoura A., Franza T., Dellagi A., Roux C., Matzanke-Markstein B., Expert D. 2007. « Ferritins, Bacterial Virulence and Plant Defence ». *BioMetals* 20(3-4):347-53. doi: 10.1007/s10534-006-9069-0.
- Brady C., Hunter G., Kirk S., Arnold D., Denman S. 2014. « *Rahnella victoriana* sp. nov., *Rahnella bruchi* sp. nov., *Rahnella woolbedingensis* sp. nov., Classification of *Rahnella* Genomespecies 2 and 3 as *Rahnella variigena* sp. nov. and *Rahnella inusitata* sp. nov., Respectively and Emended Description of the Genus *Rahnella* ». *Systematic and Applied Microbiology* 37(8):545-52. doi: 10.1016/j.syapm.2014.09.001.
- Brady C.L., Cleenwerck I., Denman S., Venter S.N., Rodríguez-Palenzuela P., Coutinho T.A., De Vos P. 2012. « Proposal to Reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a New Genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., Descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., Emendation of the Description of the Genus *Brenneria*, Reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and Emendation of the Description of *Dickeya dadantii* ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(Pt_7):1592-1602. doi: 10.1099/ij.s.0.035055-0.
- Brenner D.J., Fanning G.R., Steigerwalt A.G. 1972. « Deoxyribonucleic Acid Relatedness Among Species of *Erwinia* and Between *Erwinia* Species and Other Enterobacteria ». *Journal of Bacteriology* 110(1):12-17. doi: 10.1128/jb.110.1.12-17.1972.
- Brewer J.W., Harrison M.D., Winston J.A. 1981. « Survival of Two Varieties of *Erwinia carotovora* on *Drosophila Melanogaster* Meigen and *Drosophila Busckii* Coquillett, (Diptera: *Drosophilidae*) Vectors of Potato Blackleg in Colorado ». *American Potato Journal* 58(9):439-49. doi: 10.1007/BF02874541.
- Brinza L., Viñuelas J., Cottret L., Calevro F., Rahbé Y., Febvay G., Duport G., Colella S., Rabatel A., Gautier C., Fayard J.-M., Sagot M.-F., Charles H. 2009. « Systemic Analysis of the Symbiotic Function of *Buchnera aphidicola*, the Primary Endosymbiont of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum* ». *Comptes Rendus Biologies* 332(11):1034-49. doi: 10.1016/j.crv.2009.09.007.
- Burkholder J.M., Glibert P.M. 2013. « Eutrophication and Oligotrophication ». P. 347-71 in *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier.
- Burkholder W., McFadden L.A., Dimock E. 1953. « A bacterial blight of Chrysanthemums. » *Phytopathology* 43(9).
- Burr T.J., Schroth, M.N. 1977. « Occurrence of Soft-rot *Erwinia* spp. in Soil and Plant Material ». *Phytopathology* 77(11):1382. doi: 10.1094/Phyto-67-1382.
- Cain A.K., Barquist L., Goodman A.L., Paulsen I.T., Parkhill J., van Opijnen T. 2020. « A Decade of Advances in Transposon-Insertion Sequencing ». *Nature Reviews Genetics* 21(9):526-40. doi: 10.1038/s41576-020-0244-x.
- Cappaert M.R. 1988. « Irrigation Water as a Source of Inoculum of Soft Rot *Erwinias* for Aerial Stem Rot of Potatoes ». *Phytopathology* 78(12):1668. doi: 10.1094/Phyto-78-1668.
- Cazelles O., Schwaerzel R. 1992. « Enquête sur les bactérioses causées par *Erwinia* dans les cultures de plants de pommes de terre en Suisse romande ». *Revue suisse d'agriculture* 24(4):215-18.
- Cescau S., Cwerman H., Létoffé S., Delepelaire P., Wandersman C., Biville F. 2007. « Heme Acquisition by Hemophores ». *BioMetals* 20(3-4):603-13. doi: 10.1007/s10534-006-9050-y.
- Chandrashekar B.S., PrasannaKumar M.K., Parivallal P.B., Pramesh D., Banakar S.N., Patil S.S., Mahesh H.B. 2022. « Host Range and Virulence Diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Strain RDKLR Infecting Radish in India, and Development of a LAMP-Based

Diagnostics ». *Journal of Applied Microbiology* 132(6):4400-4412. doi: 10.1111/jam.15553.

Charkowski A., Blanco C., Condemine G., Expert D., Franza T., Hayes C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Solanilla E.L., Low D., Moleleki L., Pirhonen M., Pitman A., Perna N., Reverchon S., Rodríguez Palenzuela P., San Francisco M., Toth I., Tsuyumu S., van der Waals J., van der Wolf J., Van Gijsegem F., Yang C.-H., Yedidia I. 2012. « The Role of Secretion Systems and Small Molecules in Soft-Rot *Enterobacteriaceae* Pathogenicity ». *Annual Review of Phytopathology* 50(1):425-49. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-173013.

Charkowski A.O. 2006. « The Soft Rot *Erwinia* ». P. 423-505 in *Plant-Associated Bacteria*, édité par S. S. Gnanamanickam. Dordrecht: Springer Netherlands.

Charkowski A.O. 2018. « The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases ». *Annual Review of Phytopathology* 56(1):269-88. doi: 10.1146/annurev-phyto-080417-045906.

Chiu W., Yuen C., Wu C. 1958. On The Overwintering and Dissemination of The Soft-Rot Organism, *Erwinia aroideae* (Townsend) Holland. *Acta Phytopathologica Sinica* v.4(1):8-15.

Cianciotto N.P., White R.C. 2017. « Expanding Role of Type II Secretion in Bacterial Pathogenesis and Beyond » édité par A. T. Maurelli. *Infection and Immunity* 85(5):e00014-17. doi: 10.1128/IAI.00014-17.

Cigna J., Dewaegeneire P., Beury A., Gobert V., Faure D. 2017. « A *gapA* PCR-Sequencing Assay for Identifying the *Dickeya* and *Pectobacterium* Potato Pathogens ». *Plant Disease* 101(7):1278-82. doi: 10.1094/PDIS-12-16-1810-RE.

Coenye T., Gevers D., Depeer Y., Vandamme P., Swings J. 2005. « Towards a Prokaryotic Genomic Taxonomy ». *FEMS Microbiology Reviews* 29(2):147-67. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2004.11.004>.

Cole B.J., Feltcher M.E., Waters R.J., Wetmore K.M., Mucyn T.S., Ryan E.M., Wang G., Ul-Hasan S., McDonald M., Yoshikuni Y., Malmstrom R.R., Deutschbauer A.M., Dangl J.L., Visel A. 2017. « Genome-Wide Identification of Bacterial Plant Colonization Genes » édité par X. Dong. *PLOS Biology* 15(9):e2002860. doi: 10.1371/journal.pbio.2002860.

Condemine G., Le Derout B. 2022. « Identification of New *Dickeya dadantii* Virulence Factors Secreted by the Type 2 Secretion System » édité par C.-H. Kuo. *PLOS ONE* 17(4):e0265075. doi: 10.1371/journal.pone.0265075.

Costechareyre D., Balmand S., Condemine G., Rahbé Y. 2012. « *Dickeya dadantii*, a Plant Pathogenic Bacterium Producing Cyt-Like Entomotoxins, Causes Septicemia in the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum* » édité par C.-H. Yang. *PLoS ONE* 7(1):e30702. doi: 10.1371/journal.pone.0030702.

Cother E.J., Bradley J.K., Gillings M.R., Fahy P.C. 1992. « Characterization of *Erwinia chrysanthemi* Biovars in Alpine Water Sources by Biochemical Properties, GLC Fatty Acid Analysis and Genomic DNA Fingerprinting ». *Journal of Applied Bacteriology* 73(2):99-107. doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb01694.x.

Cother E.J., Gilbert R.L. 1990. « Presence of *Erwinia chrysanthemi* in Two Major River Systems and Their Alpine Sources in Australia ». *Journal of Applied Bacteriology* 69(5):729-38. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb01570.x.

Cronin D., Moëne-Loccoz Y., Fenton A., Dunne C., Dowling D.N., O'Gara F. 2006. « Ecological Interaction of a Biocontrol *Pseudomonas fluorescens* Strain Producing 2,4-Diacetylphloroglucinol with the Soft Rot Potato Pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* ». *FEMS Microbiology Ecology* 23(2):95-106. doi: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00394.x.

Cuppels D., Kelman A. 1974. « Evaluation of Selective Media for Isolation of Soft-Rot Bacteria from Soil and Plant Tissue ». *Phytopathology* 64(4):468. doi: 10.1094/Phyto-64-468.

Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., Jafra S., Lojkowska E., Potrykus M., van der Wolf J.M., Sledz W. 2015. « Detection, Identification and Differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* Species Causing Potato Blackleg and Tuber Soft Rot: A Review ». *Annals of Applied Biology* 166(1):18-38. doi:

10.1111/aab.12166.

Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., van Veen J.A., van der Wolf J.M. 2011. « Control of Blackleg and Tuber Soft Rot of Potato Caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* Species: A Review ». *Plant Pathology* 60(6):999-1013. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x.

Dahler G.S., Barras F., Keen N.T. 1990. « Cloning of Genes Encoding Extracellular Metalloproteases from *Erwinia chrysanthemi* EC16 ». *Journal of Bacteriology* 172(10):5803-15. doi: 10.1128/jb.172.10.5803-5815.1990.

De Boer S.H. 1979. « Serogroups of *Erwinia carotovora* Potato Strains Determined with Diffusible Somatic Antigens ». *Phytopathology* 69(4):316. doi: 10.1094/Phyto-69-316.

De Boer S.H., Allan E., Kelman A. 1979. « Survival of *Erwinia carotovora* in Wisconsin Soils ». *American Potato Journal* 56(5):243-52. doi: 10.1007/BF02854308.

Dees M.W., Lysøe E., Rossmann S., Perminow J., Brurberg M.B. 2017. « *Pectobacterium polaris* sp. nov., Isolated from Potato (*Solanum Tuberosum*) ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67(12):5222-29. doi: 10.1099/ijsem.0.002448.

De Werra P., Debonneville C., Kellenberger I., Dupuis B. 2021. « Pathogenicity and Relative Abundance of *Dickeya* and *Pectobacterium* Species in Switzerland: An Epidemiological Dichotomy ». *Microorganisms* 9(11):2270. doi: 10.3390/microorganisms9112270.

Degefu Y., Potrykus M., Golanowska M., Virtanen E., Lojkowska E. 2013. « A New Clade of *Dickeya* spp. Plays a Major Role in Potato Blackleg Outbreaks in North Finland ». *Annals of Applied Biology* 162(2):231-41. doi: 10.1111/aab.12020.

Deiner K., Fronhofer E.A., Mächler E., Walser J.-C., Altermatt F. 2016. « Environmental DNA Reveals That Rivers Are Conveyor Belts of Biodiversity Information ». *Nature Communications* 7(1):12544. doi: 10.1038/ncomms12544.

DeLude A., Wells R., Boomla S., Chuang S.-C., Urena F., Shipman A., Rubas N., Kuehu D.L., Bickerton B., Peterson T., Dobhal S., Arizala D., Klair D., Ochoa-Corona F., Ali M.E., Odani J., Bingham J.-P., Jenkins D.M., Fletcher J., Stack J.P., Alvarez A.M., Arif M. 2022. « Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Specific and Rapid Detection of *Dickeya fangzhongdai* Targeting a Unique Genomic Region ». *Scientific Reports* 12(1):19193. doi: 10.1038/s41598-022-22023-4.

Denamur E., Matic I. 2006. « Evolution of Mutation Rates in Bacteria ». *Molecular Microbiology* 60(4):820-27. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05150.x.

Didelot X., Maiden M.C.J. 2010. « Impact of Recombination on Bacterial Evolution ». *Trends in Microbiology* 18(7):315-22. doi: 10.1016/j.tim.2010.04.002.

Doehlemann G., Ökmen B., Zhu W., Sharon A. 2017. « Plant Pathogenic Fungi » édité par J. Heitman et B. J. Howlett. *Microbiology Spectrum* 5(1):5.1.14. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016.

Domingo R., Perez C., Klair D., Vu H., Candelario-Tochiki A., Wang X., Camson A., Uy J.N., Salameh M., Arizala D., Dobhal S., Boluk G., Bingham J.-P., Ochoa-Corona F., Ali M.E., Stack J.P., Fletcher J., Odani J., Jenkins D., Alvarez A.M., Arif M. 2021. « Genome-Informed Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Specific Detection of *Pectobacterium parmentieri* in Infected Potato Tissues and Soil ». *Scientific Reports* 11(1):21948. doi: 10.1038/s41598-021-01196-4.

Duarte V., De Boer S.H., Ward L.J., Oliveira A.M.R. 2004. « Characterization of Atypical *Erwinia carotovora* Strains Causing Blackleg of Potato in Brazil ». *Journal of Applied Microbiology* 96(3):535-45. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02173.x.

Dufresne A., Garczarek L., Partensky F. 2005. « Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote ». *Genome Biology* 6(2):R14. doi: 10.1186/gb-2005-6-2-r14.

Duong D.A., Jensen R.V., Stevens A.M. 2018. « Discovery of *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* Genes Important for Survival in Corn Xylem through a Tn-Seq Analysis ». *Molecular Plant Pathology*

19(8):1929-41. doi: 10.1111/mpp.12669.

Duprey A., Taib N., Leonard S., Garin T., Flandrois J., Nasser W., Brochier-Armanet C., Reverchon S. 2019. « The Phytopathogenic Nature of *Dickeya aquatica* 174/2 and the Dynamic Early Evolution of *Dickeya* Pathogenicity ». *Environmental Microbiology* 21(8):2809-35. doi: 10.1111/1462-2920.14627.

Dupuis B., Schaerer S., Gilliland H., Cazelles O. 2010. « The *Dickeya* and *Pectobacterium* situation in Switzerland ».

Eichenlaub R., Gartemann K.-H. 2011. « The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens ». *Annual Review of Phytopathology* 49(1):445-64. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095258.

Faquihi H., Terta M., Amdan M., Achbani E.H., Ennaji M.M., Ait Mhand R. 2015. « Phenotypic and Genotypic Diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Causing Soft Rot Disease of Potatoes in Morocco ». *European Journal of Plant Pathology* 143(4):801-11. doi: 10.1007/s10658-015-0732-6.

Faye P., Bertrand C., Pédrón J., Barny M.-A. 2018. « Draft Genomes of “*Pectobacterium peruvienne*” Strains Isolated from Fresh Water in France ». *Standards in Genomic Sciences* 13(1):27. doi: 10.1186/s40793-018-0332-0.

Ferrandez Y., Condemine G. 2008. « Novel Mechanism of Outer Membrane Targeting of Proteins in Gram-Negative Bacteria ». *Molecular Microbiology* 69(6):1349-57. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06366.x.

Ficke W., Naumann K., Skadow K., Müller H.J., Zielke R. 1973. « Die Lebensdauer von *Pectobacterium carotovorum* var. *atrosepticum* (van Hall) Dowson Auf Dem Pflanzgut Und Im Boden ». *Archiv Für Pflanzenschutz* 9(5):281-93. doi: 10.1080/03235407309440499.

Fikowicz-Krosko J., Wszalek-Rozek K., Smolarska A., Czajkowski R. 2017. « First Report on Isolation of Soft Rot *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* From Symptomless Bittersweet Nightshade Occuring in Rural Area in Poland. » *Journal of Plant Pathology* 99(1).

Franza T., Expert D. 2013. « Role of Iron Homeostasis in the Virulence of Phytopathogenic Bacteria: An “à La Carte” Menu ». *Molecular Plant Pathology* 14(4):429-38. doi: 10.1111/mpp.12007.

Gallois A., Samson R., Ageron E., Grimont P.A.D. 1992. « *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., Associated with Odorous Soft Rot of Chicory (*Cichorium intybus* L.) ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(4):582-88. doi: 10.1099/00207713-42-4-582.

Gardan L., Gouy C., Christen R., Samson R. 2003. « Elevation of Three Subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to Species Level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(2):381-91. doi: 10.1099/ijms.0.02423-0.

Germani Y., Sansonetti P. 2008. « Shigellose et infections à *Escherichia coli* entéro-invasifs ». *EMC - Maladies infectieuses* 5(2):1-17. doi: 10.1016/S1166-8598(08)45924-0.

Ghigo J.-M., Wandersman C. 1992. « A Fourth Metalloprotease Gene in *Erwinia chrysanthemi* ». *Research in Microbiology* 143(9):857-67. doi: 10.1016/0923-2508(92)90073-W.

Giovannoni S.J., Cameron Thrash J., Temperton B. 2014. « Implications of Streamlining Theory for Microbial Ecology ». *The ISME Journal* 8(8):1553-65. doi: 10.1038/ismej.2014.60.

Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J.M. 2007. « DNA–DNA Hybridization Values and Their Relationship to Whole-Genome Sequence Similarities ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(1):81-91. doi: 10.1099/ijms.0.64483-0.

Gorshkov V., Parfirova O., Petrova O., Gogoleva N., Kovtunov E., Vorob'ev V., Gogolev Y. 2021. « The Knockout of Enterobactin-Related Gene in *Pectobacterium atrosepticum* Results in Reduced Stress Resistance and Virulence towards the Primed Plants ». *International Journal of Molecular*

Sciences 22(17):9594. doi: 10.3390/ijms22179594.

Goto M., Matsumoto K. 1987. « *Erwinia Carotovora* Subsp. *Wasabiae* Subsp. Nov. Isolated from Diseased Rhizomes and Fibrous Roots of Japanese Horseradish (*Eutrema Wasabi* Maxim.) ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 37(2):130-35. doi: 10.1099/00207713-37-2-130.

Graham D., Harper P. 1966. « Effect of inorganic fertilizers on the incidence of potato blackleg disease ». *European Potato Journal* 9(3):141-45.

Graham D.C. 1958. « Occurrence of Soft Rot Bacteria in Scottish Soils ». *Nature* 181(4601):61-61. doi: 10.1038/181061a0.

Graham D.C., Quinn C.E., Sells I.A., Harrison M.D. 1979. « Survival of Strains of Soft Rot Coliform Bacteria on Microthreads Exposed in the Laboratory and in the Open Air ». *Journal of Applied Bacteriology* 46(2):367-76. doi: 10.1111/j.1365-2672.1979.tb00833.x.

Gürlebeck D., Thieme F., Bonas U. 2006. « Type III Effector Proteins from the Plant Pathogen *Xanthomonas* and Their Role in the Interaction with the Host Plant ». *Journal of Plant Physiology* 163(3):233-55. doi: 10.1016/j.jplph.2005.11.011.

Han W., Wang J., Pirhonen M., Pan Y., Qin J., Zhang S., Zhu J., Yang Z. 2023. « Identification and characterization of opportunistic pathogen *Pectobacterium polonicum* causing potato blackleg in China ». *Frontiers in Plant Science* 14:1097741. doi: 10.3389/fpls.2023.1097741.

Harris R.I. 1979. « Chemical Control of Bacterial Soft-Rot of Wounded Potato Tubers ». *Potato Research* 22(3):245-49. doi: 10.1007/BF02357357.

Harrison M.D., Quinn C.E., Ann Sells I., Graham D.C. 1977. « Waste Potato Dumps as Sources of Insects Contaminated with Soft Rot Coliform Bacteria in Relation to Re-Contamination of Pathogen-Free Potato Stocks ». *Potato Research* 20(1):37-52. doi: 10.1007/BF02362299.

Hauben L., Moore E.R.B., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., Swings J. 1998. « Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae* ». *Systematic and Applied Microbiology* 21(3):384-97. doi: 10.1016/S0723-2020(98)80048-9.

Hayward A.C. 1974. « Latent Infections by Bacteria ». *Annual Review of Phytopathology* 12(1):87-97. doi: 10.1146/annurev.py.12.090174.000511.

Hélias V., Hamon P., Huchet E., Wolf J.V.D., Andrivon D. 2012. « Two New Effective Semiselective Crystal Violet Pectate Media for Isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*: Isolating Pectolytic Bacteria on CVP ». *Plant Pathology* 61(2):339-45. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02508.x.

Helmann T.C., Filiatrault M.J., Stodghill P.V. 2022. « Genome-Wide Identification of Genes Important for Growth of *Dickeya dadantii* and *Dickeya dianthicola* in Potato (*Solanum tuberosum*) Tubers ». *Frontiers in Microbiology* 13:778927. doi: 10.3389/fmicb.2022.778927.

Hibar K., Daami-Remadi M., de Phytopathologie, Mahjoub M.E., de Phytopathologie. 2007. « First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* on Tomato Plants in Tunisia ». 2(1).

Hockett K.L., Nishimura M.T., Karlsrud E., Dougherty K., Baltrus D.A. 2014. « *Pseudomonas syringae* CC1557: A Highly Virulent Strain With an Unusually Small Type III Effector Repertoire That Includes a Novel Effector ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 27(9):923-32. doi: 10.1094/MPMI-11-13-0354-R.

Hommais F., Oger-Desfeux C., Van Gijsegem F., Castang S., Liori S., Expert D., Nasser W., Reverchon S. 2008. « PecS Is a Global Regulator of the Symptomatic Phase in the Phytopathogenic Bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937 ». *Journal of Bacteriology* 190(22):7508-22. doi: 10.1128/JB.00553-08.

Hong S.-M., Ten L.N., Park K.-T., Back C.-G., Waleron M., Kang I.-K., Lee S.-Y., Jung H.-Y. 2023. « *Pectobacterium jejuense* sp. nov. Isolated from Cucumber Stem Tissue ». *Current Microbiology* 80(9):308. doi: 10.1007/s00284-023-03419-5.

Hooper S.D., Mavromatis K., Kyrpides N.C. 2009. « Microbial Co-Habitation and Lateral Gene

- Transfer: What Transposases Can Tell Us ». *Genome Biology* 10(4):R45. doi: 10.1186/gb-2009-10-4-r45.
- Hu L.X., Yang Z.H., Zhang D., Zhao D.M., Zhu J.H. 2016. « Sensitive and Rapid Detection of *Pectobacterium atrosepticum* by Targeting the *gyrB* Gene Using a Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay ». *Letters in Applied Microbiology* 63(4):289-96. doi: 10.1111/lam.12618.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., des-Combes C.J., Briolay J., Pritchard L. 2021. « Proposal for the Creation of a New Genus *Musicola* gen. nov., Reclassification of *Dickeya paradisiaca* (Samson et al. 2005) as *Musicola paradisiaca* comb. nov. and Description of a New Species *Musicola keenii* sp. nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71(10). doi: 10.1099/ijsem.0.005037.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S. 1996. « Regulation of Pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* ». *Annual Review of Microbiology* 50(1):213-57. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.213.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Jacot-des-Combes C., Briolay J. 2019. « *Dickeya lacustris* sp. nov., a Water-Living Pectinolytic Bacterium Isolated from Lakes in France ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69(3):721-26. doi: 10.1099/ijsem.0.003208.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Pédrón J., Van Gijsegem F. 2023. « Insight Into Biodiversity of The Recently Rearranged Genus *Dickeya* ». *Frontiers in Plant Science* 14:1168480. doi: 10.3389/fpls.2023.1168480.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Van Gijsegem F. 2021. « Diversity within the *Dickeya zae* Complex, Identification of *Dickeya zae* and *Dickeya oryzae* Members, Proposal of the Novel Species *Dickeya parazeae* Sp. Nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71(11). doi: 10.1099/ijsem.0.005059.
- Jain C., Rodriguez-R L.M., Phillippy A.M., Konstantinidis K.T., Aluru S. 2018. « High Throughput ANI Analysis of 90K Prokaryotic Genomes Reveals Clear Species Boundaries ». *Nature Communications* 9(1):5114. doi: 10.1038/s41467-018-07641-9.
- Janda J.M., Abbott S.L. 2021. « The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: “*Enterobacterales*”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes ». *Clinical Microbiology Reviews* 34(2):e00174-20. doi: 10.1128/CMR.00174-20.
- Janse J.D. 1988. « Characterization and Classification of *Erwinia chrysanthemi* Strains from Several Hosts in The Netherlands ». *Phytopathology* 78(6):800. doi: 10.1094/Phyto-78-800.
- Jiang J.-F., Li J.-G., Dong Y.-H. 2013. « Effect of Calcium Nutrition on Resistance of Tomato against Bacterial Wilt Induced by *Ralstonia solanacearum* ». *European Journal of Plant Pathology* 136(3):547-55. doi: 10.1007/s10658-013-0186-7.
- Jiang N., Dillon F.M., Silva A., Gomez-Cano L., Grotewold E. 2021. « Rhamnose in Plants - from Biosynthesis to Diverse Functions ». *Plant Science* 302:110687. doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110687.
- Johnson J.S., Spakowicz D.J., Hong B.-Y., Petersen L.M., Demkowicz P., Chen L., Leopold S.R., Hanson B.M., Agresta H.O., Gerstein M., Sodergren E., Weinstock G.M. 2019. « Evaluation of 16S rRNA Gene Sequencing for Species and Strain-Level Microbiome Analysis ». *Nature Communications* 10(1):5029. doi: 10.1038/s41467-019-13036-1.
- Jones L. 1901. « *Bacillus carotovorus* n. sp., die Ursache einer weichen Fäulnis der Möhre ». *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Abt II* 7:12-21.
- Jonkheer E.M., Brankovics B., Houwers I.M., van der Wolf J.M., Bonants P.J.M., Vreeburg R.A.M., Bollema R., de Haan J.R., Berke L., Smit S., de Ridder D., van der Lee T.A.J. 2021. « The *Pectobacterium* Pangenome, with a Focus on *Pectobacterium brasiliense*, Shows a Robust Core and Extensive Exchange of Genes from a Shared Gene Pool ». *BMC Genomics* 22(1):265. doi: 10.1186/s12864-021-07583-5.

- Joynson R., Swamy A., Bou P.A., Chapuis A., Ferry N. 2014. « Characterization of Cellulolytic Activity in the Gut of the Terrestrial Land Slug *Arion ater*: Biochemical Identification of Targets for Intensive Study ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 177-178:29-35. doi: 10.1016/j.cbpb.2014.08.003.
- Khayi S., Cigna J., Chong T.M., Quêtu-Laurent A., Chan K.-G., Hélias V., Faure D. 2016. « Transfer of the Potato Plant Isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(12):5379-83. doi: 10.1099/ijsem.0.001524.
- Kikumoto T., Sakamoto M. 1969. « Ecological Studies on the Soft-Rot Bacteria of Vegetables VI. Influence of The Development of Various Plants on The Survival of *Erwinia aroideae* Added To Soil ». *Japanese Journal of Phytopathology* 35(1):29-35.
- Kim H.-S., Ma B., Perna N.T., Charkowski A.O. 2009. « Phylogeny and Virulence of Naturally Occurring Type III Secretion System-Deficient *Pectobacterium* Strains ». *Applied and Environmental Microbiology* 75(13):4539-49. doi: 10.1128/AEM.01336-08.
- Kim H.-S., Thammarat P., Lommel S.A., Hogan C.S., Charkowski A.O. 2011. « *Pectobacterium carotovorum* Elicits Plant Cell Death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE Does Not Suppress Callose or Induce Expression of Plant Genes Early in Plant-Microbe Interactions ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 24(7):773-86. doi: 10.1094/MPMI-06-10-0143.
- King E.O., Ward M.K., Raney D.E. 1954. « Two Simple Media for the Demonstration of Pyocyanin and Fluorescein ». *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44(2):301-7.
- Kloepper J.W., Brewer J.W., Harrison M.D. 1981. « Insect Transmission of *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* to Potato Plants in the Field ». *American Potato Journal* 58(4):165-75. doi: 10.1007/BF02854416.
- Kloepper J.W., Harrison M.D., Brewer J.W. 1979. « The Association of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and *Erwinia carotovora* var. *carotovora* with Insects in Colorado ». *American Potato Journal* 56(7):351-61. doi: 10.1007/BF02853850.
- Koh Y., Kim G., Lee Y., Sohn S., Koh H., Kwon S., Heu S., Jung J. 2012. « *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* subsp. nov., a New Bacterial Pathogen Causing Canker-like Symptoms in Yellow Kiwifruit, *Actinidia chinensis* ». *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 40(4):269-79. doi: 10.1080/01140671.2012.707129.
- Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. 2005. « Genomic Insights That Advance the Species Definition for Prokaryotes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(7):2567-72. doi: 10.1073/pnas.0409727102.
- Kumar N., Lad G., Giuntini E., Kaye M.E., Udomwong P., Shamsani N.J., Young J.P.W., Bailly X. 2015. « Bacterial Genospecies That Are Not Ecologically Coherent: Population Genomics of *Rhizobium leguminosarum* ». *Open Biology* 5(1):140133. doi: 10.1098/rsob.140133.
- Kyöstiö S.R., Cramer C.L., Lacy G.H. 1991. « *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Extracellular Protease: Characterization and Nucleotide Sequence of the Gene ». *Journal of Bacteriology* 173(20):6537-46. doi: 10.1128/jb.173.20.6537-6546.1991.
- Kyöstiö S.R.M. 1990. « *Erwinia carotovora* extracellular proteases: characterization and role in soft rot ». Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Latorre A., Manzano-Marín A. 2017. « Dissecting Genome Reduction and Trait Loss in Insect Endosymbionts: Trait Loss in Insect Endosymbionts ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1389(1):52-75. doi: 10.1111/nyas.13222.
- Laurila J., Ahola V., Lehtinen A., Joutsjoki T., Hannukkala A., Rahkonen A., Pirhonen M. 2008. « Characterization of *Dickeya* Strains Isolated from Potato and River Water Samples in Finland ». *European Journal of Plant Pathology* 122(2):213-25. doi: 10.1007/s10658-008-9274-5.
- Lazâr I., Bucur E. 1964. « Recent Research in Roumania on Blackleg and Bacterial Soft Rot of Potato ».

European Potato Journal 7(2):102-11. doi: 10.1007/BF02414419.

Leach J.G. 1934. « The Method of Survival of Bacteria in the Puparia of the Seed-Corn Maggot (*Hylemyia cilicrura* Rond.)1 ». *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie* 20(1):150-61. doi: 10.1111/j.1439-0418.1934.tb00358.x.

Lee S.D., Kim I.S., Choe H., Kim J.-S. 2021. « *Acerihabitans arboris* gen. nov., sp. nov., a New Member of the Family *Pectobacteriaceae* Isolated from Sap Drawn from *Acer Pictum* ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71(3). doi: 10.1099/ijsem.0.004674.

Lee Y.-A., Yu C.-P. 2006. « A Differential Medium for the Isolation and Rapid Identification of a Plant Soft Rot Pathogen, *Erwinia chrysanthemi* ». *Journal of Microbiological Methods* 64(2):200-206. doi: 10.1016/j.mimet.2005.04.031.

Leister C., Hügler M. 2022. « Genome Analysis of *Enterobacter asburiae* and *Lelliottia* spp. Proliferating in Oligotrophic Drinking Water Reservoirs and Lakes » édité par J. D. Semrau. *Applied and Environmental Microbiology* 88(14):e00471-22. doi: 10.1128/aem.00471-22.

Lelliott R., Dickey R. 1984. « Genus vii *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith, 1920, 209AL ». P. 469-76 in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. Vol 1, édité par N. R. Krieg et J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Liao C.-H., Shollenberger L.M. 2003. « Survivability and Long-Term Preservation of Bacteria in Water and in Phosphate-Buffered Saline ». *Letters in Applied Microbiology* 37(1):45-50. doi: 10.1046/j.1472-765X.2003.01345.x.

Lipps S.M., Samac D.A. 2022. « *Pseudomonas viridiflava*: An Internal Outsider of the *Pseudomonas syringae* Species Complex ». *Molecular Plant Pathology* 23(1):3-15. doi: 10.1111/mpp.13133.

Liu Q., Zhang H., Huang X. 2022. « Strong Linkage Between Symbiotic Bacterial Community and Host Age and Morph in a Hemipteran Social Insect ». *Microbial Ecology*. doi: 10.1007/s00248-022-02114-5.

Liu Y., Kong D., Wu H.-L., Ling H.-Q. 2021. « Iron in Plant–Pathogen Interactions » édité par N. Von Wirén. *Journal of Experimental Botany* 72(6):2114-24. doi: 10.1093/jxb/eraa516.

Llirós M., Inceoğlu Ö., García-Armisen T., Anzil A., Leporcq B., Pigneur L.-M., Viroux L., Darchambeau F., Descy J.-P., Servais P. 2014. « Bacterial Community Composition in Three Freshwater Reservoirs of Different Alkalinity and Trophic Status » édité par L. Zhu. *PLoS ONE* 9(12):e116145. doi: 10.1371/journal.pone.0116145.

Lumb V.M., Pérombelon M.C.M., Zutra D. 1986. « Studies of a Wilt Disease of the Potato Plant in Israel Caused by *Erwinia chrysanthemi* ». *Plant Pathology* 35(2):196-202. doi: 10.1111/j.1365-3059.1986.tb02004.x.

Ma B., Hibbing M.E., Kim H.-S., Reedy R.M., Yedidia I., Breuer Jane, Breuer Jeffrey, Glasner J.D., Perna N.T., Kelman A., Charkowski A.O. 2007. « Host Range and Molecular Phylogenies of the Soft Rot *Enterobacterial* Genera *Pectobacterium* and *Dickeya* ». *Phytopathology*® 97(9):1150-63. doi: 10.1094/PHYTO-97-9-1150.

Mackay J.M., Shipton P.J. 1983. « Heat Treatment of Seed Tubers for Control of Potato Blackleg (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) and Other Diseases ». *Plant Pathology* 32(4):385-93. doi: 10.1111/j.1365-3059.1983.tb02852.x.

Maddox D.A., Harrison M.D. 1988. « Presence and Population Dynamics of *Erwinia carotovora* in Irrigation Water in South Central Colorado ». *Journal of Applied Bacteriology* 64(2):169-82. doi: 10.1111/j.1365-2672.1988.tb02737.x.

Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster G.D. 2012. « Top 10 Plant Pathogenic Bacteria in Molecular Plant Pathology ». *Molecular Plant Pathology* 13(6):614-29. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.

- Marais G.A.B., Calteau A., Tenaillon O. 2008. « Mutation Rate and Genome Reduction in Endosymbiotic and Free-Living Bacteria ». *Genetica* 134(2):205-10. doi: 10.1007/s10709-007-9226-6.
- Marits R., Kõiv V., Laasik E., Mäe A. 1999. « Isolation of an Extracellular Protease Gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Strain SCC3193 by Transposon Mutagenesis and the Role of Protease in Phytopathogenicity ». *Microbiology* 145(8):1959-66. doi: 10.1099/13500872-145-8-1959.
- Marković S., Stanković S., Jelušić A., Iličić R., Kosovac A., Poštić D., Popović T. 2021. « Occurrence and Identification of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* and *Dickeya dianthicola* Causing Blackleg in Some Potato Fields in Serbia ». *Plant Disease* 105(4):1080-90. doi: 10.1094/PDIS-05-20-1076-RE.
- Martínez-Cano D.J., Reyes-Prieto M., Martínez-Romero E., Martínez L.P., Latorre A., Moya A., Delaye L. 2015. « Evolution of small prokaryotic genomes ». *Frontiers in Microbiology* 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00742.
- Matsumoto H., Jitareerat P., Baba Y., Tsuyumu S. 2003. « Comparative Study of Regulatory Mechanisms for Pectinase Production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi* ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 16(3):226-37. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.3.226.
- McCarter-Zorner N.J., Franc G.D., Harrison M.D., Michaud J.E., Quinn C.E., Sells I.A., Graham D.C. 1984. « Soft Rot *Erwinia* Bacteria in Surface and Underground Waters in Southern Scotland and in Colorado, United States ». *Journal of Applied Bacteriology* 57(1):95-105. doi: 10.1111/j.1365-2672.1984.tb02361.x.
- McCarthy B.J., Bolton E.T. 1963. « An Approach To The Measurement of Genetic Relatedness Among Organisms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 50(1):156-64. doi: 10.1073/pnas.50.1.156.
- McCutcheon J.P., Moran N.A. 2012. « Extreme Genome Reduction in Symbiotic Bacteria ». *Nature Reviews Microbiology* 10(1):13-26. doi: 10.1038/nrmicro2670.
- McGowan J., Fitzpatrick D.A. 2020. « Recent Advances in Oomycete Genomics ». P. 175-228 in *Advances in Genetics*. Vol. 105. Elsevier.
- McGuire R.G. 1984. « Reduced Severity of *Erwinia* Soft Rot in Potato Tubers with Increased Calcium Content ». *Phytopathology* 74(10):1250. doi: 10.1094/Phyto-74-1250.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. 2013. « Genome Sequence-Based Species Delimitation with Confidence Intervals and Improved Distance Functions ». *BMC Bioinformatics* 14(1):60. doi: 10.1186/1471-2105-14-60.
- Mendonça M. de, Stanghellini M.E. 1979. « Endemic and Soilborne Nature of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*, a Pathogen of Mature Sugar Beets ». *Phytopathology* 69(10):1096. doi: 10.1094/Phyto-69-1096.
- Meneley J.C., Stanghellini M.E. 1976. « Isolation of Soft-Rot *Erwinia* spp. from Agricultural Soils Using an Enrichment Technique ». *Phytopathology* 66(3):367. doi: 10.1094/Phyto-66-367.
- Mills A.A.S., (Bud) Platt H.W., Hurta R.A.R. 2006. « Sensitivity of *Erwinia* Spp. to Salt Compounds in Vitro and Their Effect on the Development of Soft Rot in Potato Tubers in Storage ». *Postharvest Biology and Technology* 41(2):208-14. doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.03.015.
- Mira A., Ochman H., Moran N.A. 2001. « Deletional Bias and the Evolution of Bacterial Genomes ». *Trends in Genetics* 17(10):589-96. doi: 10.1016/S0168-9525(01)02447-7.
- Mohr T.J., Liu H., Yan S., Morris C.E., Castillo J.A., Jelenska J., Vinatzer B.A. 2008. « Naturally Occurring Nonpathogenic Isolates of the Plant Pathogen *Pseudomonas Syringae* Lack a Type III Secretion System and Effector Gene Orthologues ». *Journal of Bacteriology* 190(8):2858-70. doi: 10.1128/JB.01757-07.
- Mongae A., Kubheka G.C., Moleleki N., Moleleki L.N. 2013. « The Use of Fluorescent Reporter Protein

- Tagging to Study the Interaction between Root-Knot Nematodes and Soft Rot *Enterobacteriaceae* ». *Letters in Applied Microbiology* 56(4):258-63. doi: 10.1111/lam.12045.
- Morinière L., Lecomte S., Gueguen E., Bertolla F. 2021. « In Vitro Exploration of the *Xanthomonas hortorum* pv. *vitians* Genome Using Transposon Insertion Sequencing and Comparative Genomics to Discriminate between Core and Contextual Essential Genes ». *Microbial Genomics* 7(6). doi: 10.1099/mgen.0.000546.
- Morris J.J., Lenski R.E., Zinser E.R. 2012. « The Black Queen Hypothesis: Evolution of Dependencies through Adaptive Gene Loss ». *mBio* 3(2):e00036-12. doi: 10.1128/mBio.00036-12.
- Morris, C.E.; Lacroix, C.; Chandeysson, C.; Guilbaud, C.; Monteil, C.; Piry, S.; Rochelle Newall, E.; Fiorini, S.; Van Gijsegem, F.; Barny, M.A.; Berge, O. 2023. « Comparative abundance and diversity of populations of the *Pseudomonas syringae* and Soft Rot *Pectobacteriaceae* species complexes throughout the Durance River catchment from its French Alps sources to its delta ». *Peer Community Journal*, Volume 3, article no. e88. doi: 10.24072/pcjournal.317. <https://peercommunityjournal.org/articles/10.24072/pcjournal.317/>
- Motyka-Pomagruk A., Zoledowska S., Sledz W., Lojkowska E. 2021. « The Occurrence of Bacteria from Different Species of *Pectobacteriaceae* on Seed Potato Plantations in Poland ». *European Journal of Plant Pathology* 159(2):309-25. doi: 10.1007/s10658-020-02163-x.
- Murata N., Starr M.P. 1974. « Intrageneric Clustering and Divergence of *Erwinia* Strains from Plants and Man in the Light of Deoxyribonucleic Acid Segmental Homology ». *Canadian Journal of Microbiology* 20(11):1545-65. doi: 10.1139/m74-242.
- Naas H., Sebahia M., Orfei B., Rezzonico F., Buonauro R., Moretti C. 2018. « *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as Causal Agents of Potato Soft Rot in Algeria ». *European Journal of Plant Pathology* 151(4):1027-34. doi: 10.1007/s10658-018-1438-3.
- Nabhan S., Boer S.H., Maiss E., Wydra K. 2012. « Taxonomic Relatedness Between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov ». *Journal of Applied Microbiology* 113(4):904-13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05383.x.
- Nabhan S., De Boer S.H., Maiss E., Wydra K. 2013. « *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a Soft Rot Pathogen with Preference for Monocotyledonous Plants ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(Pt_7):2520-25. doi: 10.1099/ijms.0.046011-0.
- Nadal-Jimenez P., Siozios S., Halliday N., Cámara M., Hurst G.D.D. 2022. « *Symbiopectobacterium Purcellii*, gen. nov., sp. nov., Isolated from the Leafhopper *Empoasca decipiens* ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 72(6). doi: 10.1099/ijsem.0.005440.
- Norman D.J., Yuen J.M.F., Resendiz R., Boswell J. 2003. « Characterization of *Erwinia* Populations from Nursery Retention Ponds and Lakes Infecting Ornamental Plants in Florida ». *Plant Disease* 87(2):193-96. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.2.193.
- Nunes L.L., Haan E.G., Krijger M., Kastelein P., Zouwen P.S., Bovenkamp G.W., Tebaldi N.D., Wolf J.M. 2014. « First Report of Potato Blackleg Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands ». *New Disease Reports* 29(1):24-24. doi: 10.5197/j.2044-0588.2014.029.024.
- Nykyri J., Fang X., Dorati F., Bakr R., Pasanen M., Niemi O., Palva E.T., Jackson R.W., Pirhonen M. 2014. « Evidence That Nematodes May Vector the Soft Rot-Causing *Enterobacterial* Phytopathogens ». *Plant Pathology* 63(4):747-57. doi: 10.1111/ppa.12159.
- Ocenar J., Arizala D., Boluk G., Dhakal U., Gunarathne S., Paudel S., Dobhal S., Arif M. 2019. « Development of a Robust, Field-Deployable Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Specific Detection of Potato Pathogen *Dickeya dianthicola* Targeting a Unique Genomic Region » édité par U. Melcher. *Plos One* 14(6):e0218868. doi: 10.1371/journal.pone.0218868.
- Okinaka Y., Yang C.-H., Perna N.T., Keen Noel.T. 2002. « Microarray Profiling of *Erwinia*

- chrysanthemi* 3937 Genes That Are Regulated During Plant Infection ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 15(7):619-29. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.7.619.
- Onkendi E.M., Maluleke L.N., Moleleki L.N. 2014. « First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Soft Rot and Blackleg of Potatoes in Kenya ». *Plant Disease* 98(5):684-684. doi: 10.1094/PDIS-09-13-0988-PDN.
- van Opijnen T., Bodi K.L., Camilli A. 2009. « Tn-Seq: High-Throughput Parallel Sequencing for Fitness and Genetic Interaction Studies in Microorganisms ». *Nature Methods* 6(10):767-72. doi: 10.1038/nmeth.1377.
- van Opijnen T., Camilli A. 2013. « Transposon Insertion Sequencing: A New Tool for Systems-Level Analysis of Microorganisms ». *Nature Reviews Microbiology* 11(7):435-42. doi: 10.1038/nrmicro3033.
- Ormeño-Orrillo E., Martínez-Romero E. 2013. « Phenotypic Tests in *Rhizobium* Species Description: An Opinion and (a Sympatric Speciation) Hypothesis ». *Systematic and Applied Microbiology* 36(3):145-47. doi: 10.1016/j.syapm.2012.11.009.
- Oulghazi S., Cigna J., Lau Y.Y., Moumni M., Chan K.G., Faure D. 2019. « Transfer of the Waterfall Source Isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a Deep-Branching Species within the Genus *Pectobacterium* ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69(2):470-75. doi: 10.1099/ijsem.0.003180.
- Oulghazi S., Moumni M., Khayi S., Robic K., Sarfraz S., Lopez-Roques C., Vandecasteele C., Faure D. 2020. « Diversity of *Pectobacteriaceae* Species in Potato Growing Regions in Northern Morocco ». *Microorganisms* 8(6):895. doi: 10.3390/microorganisms8060895.
- Oulghazi S., Pédrón J., Cigna J., Lau Y.Y., Moumni M., Van Gijsegem F., Chan K.-G., Faure D. 2019. « *Dickeya undicola* sp. nov., a Novel Species for Pectinolytic Isolates from Surface Waters in Europe and Asia ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69(8):2440-44. doi: 10.1099/ijsem.0.003497.
- Oulghazi S., Sarfraz S., Zaczek-Moczydłowska M.A., Khayi S., Ed-Dra A., Lebbach Y., Campbell K., Novungayo Moleleki L., O'Hanlon R., Faure D. 2021. « *Pectobacterium brasiliense*: Genomics, Host Range and Disease Management ». *Microorganisms* 9(1):106. doi: 10.3390/microorganisms9010106.
- Panrace C., Barny M.-A., Ueoka R., Calteau A., Scalvenzi T., Pédrón J., Barbe V., Piel J., Humbert J.-F., Gugger M. 2017. « Insights into the *Planktothrix* Genus: Genomic and Metabolic Comparison of Benthic and Planktic Strains ». *Scientific Reports* 7(1):41181. doi: 10.1038/srep41181.
- Panda P., Fiers M.A.W.J., Armstrong K., Pitman A.R. 2012. « First Report of Blackleg and Soft Rot of Potato Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in New Zealand ». *New Disease Reports* 26(1):15-15. doi: 10.5197/j.2044-0588.2012.026.015.
- Parkinson N., DeVos P., Pirhonen M., Elphinstone J. 2014. « *Dickeya aquatica* sp. nov., Isolated from Waterways ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(Pt_7):2264-66. doi: 10.1099/ijse.0.058693-0.
- Pasanen M., Waleron M., Schott T., Cleenwerck I., Misztak A., Waleron K., Pritchard L., Bakr R., Degefu Y., van der Wolf J., Vandamme P., Pirhonen M. 2020. « *Pectobacterium parvum* sp. nov., Having A *Salmonella* SPI-1-Like Type III Secretion System and Low Virulence ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4):2440-48.
- Patrick Z.A. 1954. « The Antibiotic Activity of Soil Microorganisms As Related To Bacterial Plant Pathogens ». *Canadian Journal of Botany* 32(5):705-35. doi: 10.1139/b54-064.
- Paulin J.-P., Ridé M., Prunier J.-P. 2001. « Découverte des bactéries phytopathogènes il y a cent ans : controverses et polémiques transatlantiques ». *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 324(10):905-14. doi: 10.1016/S0764-4469(01)01376-2.
- Pédrón J., Bertrand C., Taghouti G., Portier P., Barny M.-A. 2019. « *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., Isolated from Waterways ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69(3):745-51. doi: 10.1099/ijsem.0.003229.

- Pédrón J., Guyon L., Lecomte A., Blottière L., Chandeysson C., Rochelle-Newall E., Raynaud X., Berge O., Barny M.-A. 2020. « Comparison of Environmental and Culture-Derived Bacterial Communities through 16S Metabarcoding: A Powerful Tool to Assess Media Selectivity and Detect Rare Taxa ». *Microorganisms* 8(8):1129. doi: 10.3390/microorganisms8081129.
- Pédrón J., Schaerer S., Kellenberger I., Van Gijsegem F. 2021. « Early Emergence of *Dickeya solani* Revealed by Analysis of *Dickeya* Diversity of Potato Blackleg and Soft Rot Causing Pathogens in Switzerland ». *Microorganisms* 9(6):1187. doi: 10.3390/microorganisms9061187.
- Pei A.Y., Oberdorf W.E., Nossa C.W., Agarwal A., Chokshi P., Gerz E.A., Jin Z., Lee P., Yang L., Poles M., Brown S.M., Sotero S., DeSantis T., Brodie E., Nelson K., Pei Z. 2010. « Diversity of 16S rRNA Genes within Individual Prokaryotic Genomes ». *Applied and Environmental Microbiology* 76(12):3886-97. doi: 10.1128/AEM.02953-09.
- Pérez-Brocal V., Latorre A., Moya A. 2011. « Symbionts and Pathogens: What Is the Difference? » P. 215-43 in *Between Pathogenicity and Commensalism*. Vol. 358, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, édité par U. Dobrindt, J. H. Hacker, et C. Svanborg. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Pérombelon M., Kelman A. 1987. « Blackleg and Other Potato Diseases Caused by Soft Rot Erwinias: Proposal For Revision Of Terminology. » *Plant Disease* 71(3):283-85.
- Pérombelon M., Van Der Wolf J. 2002. « Methods for The Detection and Quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on Potatoes: A Laboratory Manual ». *Scottish crop research institute annual report* 10.
- Pérombelon M.C.M. 1974. « The Role of the Seed Tuber in the Contamination by *Erwinia carotovora* of Potato Crops in Scotland ». *Potato Research* 17(2):187-99. doi: 10.1007/BF02360386.
- Pérombelon M.C.M. 1992. « Potato Blackleg: Epidemiology, Host-Pathogen Interaction and Control ». *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98(S2):135-46. doi: 10.1007/BF01974480.
- Pérombelon M.C.M. 2002. « Potato Diseases Caused by Soft Rot Erwinias: An Overview of Pathogenesis ». *Plant Pathology* 51(1):1-12. doi: 10.1046/j.0032-0862.2001.Shorttitle.doc.x.
- Pérombelon M.C.M., Fox R.A., Lowe R. 1979. « Dispersion of *Erwinia carotovora* in Aerosols Produced by the Pulverization of Potato Haulm Prior to Harvest ». *Journal of Phytopathology* 94(3):249-60. doi: 10.1111/j.1439-0434.1979.tb01557.x.
- Perombelon M.C.M., Hyman L.J. 1987. « Frequency of *Erwinia carotovora* in the Alyth Burn in Eastern Scotland and the Sources of the Bacterium ». *Journal of Applied Bacteriology* 63(4):281-91. doi: 10.1111/j.1365-2672.1987.tb02704.x.
- Perombelon M.C.M., Hyman L.J. 1989. « Survival of Soft Rot Coliforms, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica* in Soil in Scotland ». *Journal of Applied Bacteriology* 66(2):95-106. doi: 10.1111/j.1365-2672.1989.tb02459.x.
- Pérombelon M.C.M., Kelman A. 1980. « Ecology of the Soft Rot Erwinias ». *Annual Review of Phytopathology* 18(1):361-87. doi: 10.1146/annurev.py.18.090180.002045.
- Phillips J.A., Kelman A. 1982. « Direct Fluorescent Antibody Stain Procedure Applied to Insect Transmission of *Erwinia carotovora* ». *Phytopathology* 72(7):898. doi: 10.1094/Phyto-72-898.
- Pierce L. 1992. « Selective Medium for Isolation of Pectolytic *Erwinia* sp. » *Plant Disease* 76(4):382. doi: 10.1094/PD-76-0382.
- Pieretti I., Royer M., Barbe V., Carrere S., Koebnik R., Cociancich S., Couloux A., Darrasse A., Gouzy J., Jacques M.-A., Lauber E., Manceau C., Mangenot S., Poussier S., Segurens B., Szurek B., Verdier V., Arlat M., Rott P. 2009. « The Complete Genome Sequence of *Xanthomonas albilineans* Provides New Insights into the Reductive Genome Evolution of the Xylem-Limited *Xanthomonadaceae* ». *BMC Genomics* 10(1):616. doi: 10.1186/1471-2164-10-616.
- Portier P., Pédrón J., Taghouti G., Dutrieux C., Barny M.-A. 2020. « Updated Taxonomy of

- Pectobacterium* Genus in the CIRM-CFBP Bacterial Collection: When Newly Described Species Reveal “Old” Endemic Population ». *Microorganisms* 8(9):1441. doi: 10.3390/microorganisms8091441.
- Portier P., Pédrón J., Taghouti G., Fischer-Le Saux M., Caullireau E., Bertrand C., Laurent A., Chawki K., Oulgazi S., Moumni M., Andrivon D., Dutrieux C., Faure D., Hélias V., Barny M.-A. 2019. « Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to Species Level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., Proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., Emended Description of *Pectobacterium carotovorum* and Description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., Isolated from Streams and Symptoms on Diverse Plants ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69(10):3207-16. doi: 10.1099/ijsem.0.003611.
- Potrykus M., Golanowska M., Sledz W., Zoledowska S., Motyka A., Kolodziejska A., Butrymowicz J., Lojkowska E. 2016. « Biodiversity of *Dickeya* spp. Isolated from Potato Plants and Water Sources in Temperate Climate ». *Plant Disease* 100(2):408-17. doi: 10.1094/PDIS-04-15-0439-RE.
- Price M.N., Wetmore K.M., Waters R.J., Callaghan M., Ray J., Liu H., Kuehl J.V., Melnyk R.A., Lamson J.S., Suh Y., Carlson H.K., Esquivel Z., Sadeeshkumar H., Chakraborty R., Zane G.M., Rubin B.E., Wall J.D., Visel A., Bristow J., Blow M.J., Arkin A.P., Deutschbauer A.M. 2018. « Mutant Phenotypes for Thousands of Bacterial Genes of Unknown Function ». *Nature* 557(7706):503-9. doi: 10.1038/s41586-018-0124-0.
- Pritchard J.R., Chao M.C., Abel S., Davis B.M., Baranowski C., Zhang Y.J., Rubin E.J., Waldor M.K. 2014. « ARTIST: High-Resolution Genome-Wide Assessment of Fitness Using Transposon-Insertion Sequencing » édité par P. H. Viollier. *PLoS Genetics* 10(11):e1004782. doi: 10.1371/journal.pgen.1004782.
- Props R., Monsieurs P., Vandamme P., Leys N., Denev V.J., Boon N. 2019. « Gene Expansion and Positive Selection as Bacterial Adaptations to Oligotrophic Conditions » édité par S. G. Tringe. *mSphere* 4(1):e00011-19. doi: 10.1128/mSphereDirect.00011-19.
- Raoul Des Essarts Y., Cigna J., Quêtu-Laurent A., Caron A., Munier E., Beury-Cirou A., Hélias V., Faure D. 2016. « Biocontrol of the Potato Blackleg and Soft Rot Diseases Caused by *Dickeya dianthicola* » édité par J. L. Schottel. *Applied and Environmental Microbiology* 82(1):268-78. doi: 10.1128/AEM.02525-15.
- Reverchon S., Nasser W. 2013. « *Dickeya* Ecology, Environment Sensing and Regulation of Virulence Programme: *Dickeya Dadantii* Pathogenicity ». *Environmental Microbiology Reports* n/a-n/a. doi: 10.1111/1758-2229.12073.
- Richter M., Rosselló-Móra R. 2009. « Shifting the Genomic Gold Standard for the Prokaryotic Species Definition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(45):19126-31. doi: 10.1073/pnas.0906412106.
- Robic K., Munier E., Effantin G., Lachat J., Naquin D., Gueguen E., Faure D. 2023. « Dissimilar gene repertoires of *Dickeya solani* involved in the colonization of lesions and roots of *Solanum tuberosum* ». *Frontiers in Plant Science* 14:1154110. doi: 10.3389/fpls.2023.1154110.
- Robinson K., Foster G. 1987. « Control of Potato Blackleg by Tuber Pasteurisation: The Determination of Time-Temperature Combinations for the Inactivation of Pectolytic *Erwinia* ». *Potato Research* 30(1):121-25. doi: 10.1007/BF02357691.
- Rosselló-Móra R., Amann R. 2015. « Past and Future Species Definitions for Bacteria and Archaea ». *Systematic and Applied Microbiology* 38(4):209-16. doi: 10.1016/j.syapm.2015.02.001.
- Rossmann S., Dees M.W., Perminow J., Meadow R., Brurberg M.B. 2018. « Soft Rot *Enterobacteriaceae* Are Carried by a Large Range of Insect Species in Potato Fields » édité par E. V. Stabb. *Applied and Environmental Microbiology* 84(12):e00281-18. doi: 10.1128/AEM.00281-18.
- Royer G., Dixit Z., Pédrón J., Pierrat G., Demontant V., Berçot B., Rodriguez C., Barny M.-A., Jacquier H., Woerther P.-L. 2022. « Genetic and Phenotypic Study of the *Pectobacterium versatile* Beta-Lactamase, the Enzyme Most Similar to the Plasmid-Encoded TEM-1 » édité par C. A. Elkins. *Applied*

and *Environmental Microbiology* 88(11):e00220-22. doi: 10.1128/aem.00220-22.

Royet K., Parisot N., Rodrigue A., Gueguen E., Condemine G. 2019. « Identification by Tn-Seq of *Dickeya Dadantii* Genes Required for Survival in Chicory Plants: *Dickeya Dadantii* Genes Important in Planta ». *Molecular Plant Pathology* 20(2):287-306. doi: 10.1111/mpp.12754.

Rybicki E.P. 2015. « A Top Ten List for Economically Important Plant Viruses ». *Archives of Virology* 160(1):17-20. doi: 10.1007/s00705-014-2295-9.

Samson R., Legendre J.B., Christen R., Saux M.F.-L., Achouak W., Gardan L. 2005. « Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and Brenneria Paradisiaca to the Genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and Delineation of Four Novel Species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(4):1415-27. doi: 10.1099/ijms.0.02791-0.

Sands D.C., Hankin L. 1975. « Ecology and Physiology of Fluorescent Pectolytic Pseudomonads ». *Phytopathology* 65(8):921. doi: 10.1094/Phyto-65-921.

Sarfraz S., Riaz K., Oulghazi S., Cigna J., Sahi S.T., Khan S.H., Faure D. 2018. « *Pectobacterium punjabense* sp. nov., Isolated from Blackleg Symptoms of Potato Plants in Pakistan ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68(11):3551-56. doi: 10.1099/ijsem.0.003029.

Sayers E.W., Bolton E.E., Brister J.R., Canese K., Chan J., Comeau D.C., Connor R., Funk K., Kelly C., Kim S., Madej T., Marchler-Bauer A., Lanczycki C., Lathrop S., Lu Z., Thibaud-Nissen F., Murphy T., Phan L., Skripchenko Y., Tse T., Wang J., Williams R., Trawick B.W., Pruitt K.D., Sherry S.T. 2022. « Database Resources of the National Center for Biotechnology Information ». *Nucleic Acids Research* 50(D1):D20-26. doi: 10.1093/nar/gkab1112.

Schildkraut C.L., Marmur J., Doty P. 1961. « The Formation of Hybrid DNA Molecules and Their Use in Studies of DNA Homologies ». *Journal of Molecular Biology* 3(5):595-IN16. doi: 10.1016/S0022-2836(61)80024-7.

Schleifer K.H. 2009. « Classification of Bacteria and Archaea: Past, Present and Future ». *Systematic and Applied Microbiology* 32(8):533-42. doi: 10.1016/j.syapm.2009.09.002.

Schouten H.J., Krens F.A., Jacobsen E. 2006. « Cisgenic Plants Are Similar to Traditionally Bred Plants: International Regulations for Genetically Modified Organisms Should Be Altered to Exempt Cisgenesis ». *EMBO Reports* 7(8):750-53. doi: 10.1038/sj.embor.7400769.

Serrano C., Arce-Johnson P., Torres H., Gebauer M., Gutierrez M., Moreno M., Jordana X., Venegas A., Kalazich J., Holuigue L. 2000. « Expression of the Chicken Lysozyme Gene in Potato Enhances Resistance to Infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* ». *American Journal of Potato Research* 77(3):191-99. doi: 10.1007/BF02853944.

Sharga B.M., Lyon G.D. 1998. « *Bacillus Subtilis* BS 107 as an Antagonist of Potato Blackleg and Soft Rot Bacteria ». *Canadian Journal of Microbiology* 44(8):777-83. doi: 10.1139/w98-064.

Sławiak M., van Beckhoven J.R.C.M., Speksnijder A.G.C.L., Czajkowski R., Grabe G., van der Wolf J.M. 2009. « Biochemical and Genetical Analysis Reveal a New Clade of Biovar 3 *Dickeya* Spp. Strains Isolated from Potato in Europe ». *European Journal of Plant Pathology* 125(2):245-61. doi: 10.1007/s10658-009-9479-2.

Smoktunowicz M., Jonca J., Stachowska A., May M., Waleron M.M., Waleron M., Waleron K. 2022. « The International Trade of Ware Vegetables and Ornamental Plants—An Underestimated Risk of Accelerated Spreading of Phytopathogenic Bacteria in the Era of Globalisation and Ongoing Climatic Changes ». *Pathogens* 11(7):728. doi: 10.3390/pathogens11070728.

Soutar C.D., Stavrinides J. 2020. « Phylogenetic Analysis Supporting the Taxonomic Revision of Eight Genera within the Bacterial Order *Enterobacterales* ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(12):6524-30. doi: 10.1099/ijsem.0.004542.

Stackebrandt E., Ebers J. 2006. « Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards ». *Microbial*

Today 33:152.

Stackebrandt E., Goebel B.M. 1994. « Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44(4):846-49. doi: 10.1099/00207713-44-4-846.

Sueno W.S.K., Marrero G., de Silva A.S., Sether D.M., Alvarez A.M. 2014. « Diversity of *Dickeya* Strains Collected from Pineapple Plants and Irrigation Water in Hawaii ». *Plant Disease* 98(6):817-24. doi: 10.1094/PDIS-03-13-0219-RE.

Sun M., Liu H., Huang J., Peng J., Fei F., Zhang Y., Hsiang T., Zheng L. 2019. « A Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Pectobacterium aroidearum* That Causes Soft Rot in Konjac ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(8):1937. doi: 10.3390/ijms20081937.

Terta M., El Karkouri A., Ait M'hand R., Achbani E., Barakate M., Amdan M., Annajar B., El Hassouni M., Val F., Bouteau F., Ennaji M.M. 2010. « Occurrence of *Pectobacterium carotovorum* Strains Isolated from Potato Soft Rot in Morocco ». *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 56 Suppl:OL1324-1333.

Thompson C.C., Amaral G.R., Campeão M., Edwards R.A., Polz M.F., Dutilh B.E., Ussery D.W., Sawabe T., Swings J., Thompson F.L. 2015. « Microbial Taxonomy in the Post-Genomic Era: Rebuilding from Scratch? ». *Archives of Microbiology* 197(3):359-70. doi: 10.1007/s00203-014-1071-2.

Thomson S., Hildebrand D., Schroth M. 1981. « Identification and Nutritional Differentiation of the *Erwinia* Sugar Beet Pathogen from Members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. » *Phytopathology* 71(10):1037-42.

Toth I.K., Barny M., Brurberg M.B., Condemine G., Czajkowski R., Elphinstone J.G., Helias V., Johnson S.B., Moleleki L.N., Pirhonen M., Rossmann S., Tsrör L., van der Waals J.E., van der Wolf J.M., Van Gijsegem F., Yedidia I. 2021. « *Pectobacterium* and *Dickeya*: Environment to Disease Development ». P. 39-84 in *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*, édité par F. Van Gijsegem, J. M. van der Wolf, et I. K. Toth. Cham: Springer International Publishing.

Toth I.K., van der Wolf J.M., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsrör Lahkim L., Elphinstone J.G. 2011. « *Dickeya* Species: An Emerging Problem for Potato Production in Europe: *Dickeya* spp. on Potato in Europe ». *Plant Pathology* 60(3):385-99. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x.

Trias R., Bañeras L. 2008. « Lactic Acid Bacteria from Fresh Fruit and Vegetables as Biocontrol Agents of Phytopathogenic Bacteria and Fungi ». *International Microbiology* (11):231-36. doi: 10.2436/20.1501.01.66.

Tsrör L., Lebiush S., Erlich O., Ben-Daniel B., Wolf J. 2010. « First Report of Latent Infection of *Cyperus rotundus* Caused by a Biovar 3 *Dickeya* sp.(Syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Israel ». *New Disease Reports* 22(1):14-14. doi: 10.5197/j.2044-0588.2010.022.014.

Tsrör L., Lebiush S., Erlich O., Galilov I., Chalupowicz L., Reuven M., Dror O., Manulis-Sasson S. 2019. « First Report of Latent Infection of *Malva nicaeensis* Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Israel ». *New Disease Reports* 39(1):4-4. doi: 10.5197/j.2044-0588.2019.039.004.

van der Merwe J.J., Coutinho T.A., Korsten L., van der Waals J.E. 2010. « *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* Causing Blackleg on Potatoes in South Africa ». *European Journal of Plant Pathology* 126(2):175-85. doi: 10.1007/s10658-009-9531-2.

van der Wolf J., Czajkowski R., Velvis H. 2009. « Effectieve kolonisatie van aardappelplanten door *Dickeya* soorten (*Erwinia chrysanthemi*). *Gewasbescherming Jaargang* 40(4):169-71.

van der Wolf J.M., Acuña I., De Boer S.H., Brurberg M.B., Cahill G., Charkowski A.O., Coutinho T., Davey T., Dees M.W., Degefu Y., Dupuis B., Elphinstone J.G., Fan J., Fazelisani E., Fleming T., Gerayeli N., Gorshkov V., Helias V., le Hingrat Y., Johnson S.B., Keiser A., Kellenberger I., Li X., Lojkowska E., Martin R., Perminow J.I., Petrova O., Motyka-Pomagruk A., Rossmann S., Schaerer S.,

- Sledz W., Toth I.K., Tsrer L., van der Waals J.E., de Werra P., Yedidia I. 2021. « Diseases Caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* Species Around the World ». P. 215-61 in *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*, édité par F. Van Gijsegem, J. M. van der Wolf, et I. K. Toth. Cham: Springer International Publishing.
- van der Wolf J.M., de Haan E.G., Kastelein P., Krijger M., de Haas B.H., Velvis H., Mendes O., Kooman-Gersmann M., van der Zouwen P.S. 2017. « Virulence of *Pectobacterium carotovorum* Subsp. *Brasiliense* on Potato Compared with That of Other *Pectobacterium* and *Dickeya* Species under Climatic Conditions Prevailing in the Netherlands ». *Plant Pathology* 66(4):571-83. doi: 10.1111/ppa.12600.
- Van Gijsegem F., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Kraepiel Y., Lojkowska E., Moleleki L.N., Gorshkov V., Yedidia I. 2021. « Molecular Interactions of *Pectobacterium* and *Dickeya* with Plants ». P. 85-147 in *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*, édité par F. Van Gijsegem, J. M. Van Der Wolf, et I. K. Toth. Cham: Springer International Publishing.
- Van Gijsegem F., van der Wolf J.M., Toth I.K., éd. 2021. *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*. Cham: Springer International Publishing.
- Van Hall C.J.J. 1902. *Bijdragen tot de kennis der Bakteriele Plantenziekten*. Inaugural dissertation, University of Amsterdam
- Vandromme J., Cottyn B., Baeyen S., De Vos P., Maes M. 2013. « Draft Genome Sequence of *Xanthomonas fragariae* reveals Reductive Evolution and Distinct Virulence-Related Gene Content ». *BMC Genomics* 14(1):829. doi: 10.1186/1471-2164-14-829.
- Varon M., Zeigler B.P. 1978. « Bacterial Predator-Prey Interaction at Low Prey Density ». *Applied and Environmental Microbiology* 36(1):11-17. doi: 10.1128/aem.36.1.11-17.1978.
- Vavre F., Mavingui P. 2011. « Les bactéries symbiotiques d'arthropodes et de nématodes: De nouvelles alliées dans le contrôle des maladies infectieuses ». *médecine/sciences* 27(11):953-58. doi: 10.1051/medsci/20112711010.
- Verhaegen M., Bergot T., Liebana E., Stancanelli G., Streissl F., Mingeot-Leclercq M.-P., Mahillon J., Bragard C. 2023. « On the use of antibiotics to control plant pathogenic bacteria: a genetic and genomic perspective ». *Frontiers in Microbiology* 14:1221478. doi: 10.3389/fmicb.2023.1221478.
- Volpin H., Elad Y. 1991. « Influence of Calcium Nutrition on Susceptibility of Rose Flowers to *Botrytis* Blight ». *Phytopathology* 81(11):1390. doi: 10.1094/Phyto-81-1390.
- Von Bodman S.B., Bauer W.D., Coplin D.L. 2003. « Quorum Sensing in Plant Pathogenic Bacteria ». *Annual Review of Phytopathology* 41(1):455-82. doi: 10.1146/annurev.phyto.41.052002.095652.
- Waldee E.L. 1942. « Comparative Studies of Some Peritrichous Phytopathogenic Bacteria ». Doctor of Philosophy, Iowa State University, Digital Repository, Ames.
- Waleron Malgorzata, Misztak A., Waleron Michal, Franczuk M., Jońca J., Wielgomas B., Mikiciński A., Popović T., Waleron K. 2019. « *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a New Species of a Soft Rot Pathogen Isolated from Calla Lily (*Zantedeschia* spp.) ». *Systematic and Applied Microbiology* 42(3):275-83. doi: 10.1016/j.syapm.2018.08.004.
- Waleron Malgorzata, Misztak A., Waleron Michal, Franczuk M., Wielgomas B., Waleron K. 2018. « Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Strains Isolated from Potatoes Grown at High Altitudes to *Pectobacterium peruviense* sp. nov. ». *Systematic and Applied Microbiology* 41(2):85-93. doi: 10.1016/j.syapm.2017.11.005.
- Waleron Malgorzata, Misztak A., Waleron Michal, Jonca J., Furmaniak M., Waleron K. 2019. « *Pectobacterium polonicum* sp. nov. Isolated from Vegetable Fields ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69(6):1751-59. doi: 10.1099/ijsem.0.003387.
- Wayne L.G., Moore W.E.C., Stackebrandt E., Kandler O., Colwell R.R., Krichevsky M.I., Truper H.G., Murray R.G.E., Brenner D.J., Grimont P.A.D., Starr M.P., Moore L.H. 1987. « Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37(4):463-64. doi: 10.1099/00207713-37-4-463.

- White J., Prell J., James E.K., Poole P. 2007. « Nutrient Sharing between Symbionts ». *Plant Physiology* 144(2):604-14. doi: 10.1104/pp.107.097741.
- Winslow C.-E.A., Broadhurst J., Buchanan R.E., Krumwiede C., Rogers L.A., Smith G.H. 1920. « The Families and Genera of The Bacteria Final Report of The Committee of The Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types ». *Journal of Bacteriology* 5(3):191-229. doi: 10.1128/jb.5.3.191-229.1920.
- Woese C.R., Fox G.E. 1977. « Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(11):5088-90. doi: 10.1073/pnas.74.11.5088.
- Yahiaoui-Zaidi R., Jouan B., Andrivon D. 2003. « Biochemical and Molecular Diversity among *Erwinia* Isolates from Potato in Algeria ». *Plant Pathology* 52(1):28-40. doi: 10.1046/j.1365-3059.2003.00791.x.
- Yahyaoui A., Oueslati M., Motyka-Pomagruk A., Kaczynska N., Sledz W., Tarhouni B., Hajlaoui M.R., Lojkowska E., Sadfi-Zouaoui N. 2023. « Characterisation of Pectinolytic *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus amyloliticus* Strains, New Pathogens of Potato in Tunisia ». *Agriculture* 13(6):1275. doi: 10.3390/agriculture13061275.
- Yang S., Perna N.T., Cooksey D.A., Okinaka Y., Lindow S.E., Ibekwe A.M., Keen N.T., Yang C.-H. 2007. « Genome-Wide Identification of Plant-Upregulated Genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 Using a GFP-Based IVET Leaf Array ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 17(9):999-1008. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.9.999.
- Yasuhara-Bell J., Marrero G., Arif M., De Silva A., Alvarez A.M. 2017. « Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of *Dickeya* spp. ». *Phytopathology*® 107(11):1339-45. doi: 10.1094/PHYTO-04-17-0160-R.
- Zaczek-Moczydłowska M.A., Fleming C.C., Young G.K., Campbell K., O'Hanlon R. 2019. « *Pectobacterium* and *Dickeya* Species Detected in Vegetables in Northern Ireland ». *European Journal of Plant Pathology* 154(3):635-47. doi: 10.1007/s10658-019-01687-1.
- Zhang W., Luo Q., Zhang Y., Fan X., Ye T., Mishra S., Bhatt P., Zhang L., Chen S. 2020. « Quorum Quenching in a Novel *Acinetobacter* Sp. XN-10 Bacterial Strain against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ». *Microorganisms* 8(8):1100. doi: 10.3390/microorganisms8081100.
- Zhou J., Hu M., Hu A., Li C., Ren X., Tao M., Xue Y., Chen S., Tang C., Xu Y., Zhang L., Zhou X. 2022. « Isolation and Genome Analysis of *Pectobacterium colocasium* Sp. Nov. and *Pectobacterium aroidearum*, Two New Pathogens of Taro ». *Frontiers in Plant Science* 13:852750. doi: 10.3389/fpls.2022.852750.
- Zimmermann R.E., Ribolzi O., Pierret A., Rattanavong S., Robinson M.T., Newton P.N., Davong V., Auda Y., Zopfi J., Dance D.A.B. 2018. « Rivers as Carriers and Potential Sentinels for *Burkholderia pseudomallei* in Laos ». *Scientific Reports* 8(1):8674. doi: 10.1038/s41598-018-26684-y.

Annexes

1. Données supplémentaires - Article 1

Figures & Tableaux : Voir la section suivante.

Table S2 : voir doi: [10.1099/ijsem.0.005042](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005042)

Supplementals for

Pectobacterium quasiquaticum sp. nov., isolated from waterways

Hajar Ben Moussa, Jacques Pédrón, Claire Bertrand, Amandine Hecquet and Marie-Anne Barny

Sorbonne Université, INRAE, Institute of Ecology and Environmental Sciences-Paris, 4 place

7 Jussieu, F-75 252 Paris, France.

for correspondance : marie-anne.barny@sorbonne-universite.fr

Include Supplementals are in the following order

- **Figure S1 and legend:** Symptoms observed following inoculation of potato slices.
- **Figure S2 and legend :** Phylogenetic tree of 16S rRNA gene of 29 *Pectobacterium* strains.
- **Figure S3 and legend:** Extended MLSA phylogenetic tree of *P. quasiquaticum* sp. nov. strains and type strains of other *Pectobacterium* species
- **Figure S4 and legend:** MLSA phylogenetic tree of *P. quasiquaticum* sp. nov. strains and *P. aquaticum* strains including the reclassified strain NAK:467.
- **Table S1:** genes ID of the 265 genes of strain A477-S1-J17^T used in the MLSA phylogenetic tree Figure 2.
- **Table S3:** Phenotypic characterization of *P. quasiquaticum* A477-S1-J17^T, A113-S21-F16, A411-S4-F17, FL63-S17 and FL60-S17 and *P. aquaticum* A212-S19-A16^T using GENIII Biolog plates.
- **Table S4:** ANIm, values between genomes of *P. quasiquaticum* strains sp. nov., *P. aquaticum* and NAK:467. ANI values $\geq 96\%$ are indicated in red, ANI values between 96%-95% are indicated in light blue and ANI values $\leq 95\%$ are indicated in blue.

Table S2 is not included in this supplemental and is a separate excel file

Figure S1

A398-S21-F17



A411-S4-F17



A477-S1-J17^T



FL63-S17



Buffer



Figure S1: Symptoms observed following inoculation of potato slices.

Photo were taken after 48h of incubation at 26°C. The inoculated strains are indicated below each photo.

Figure S2

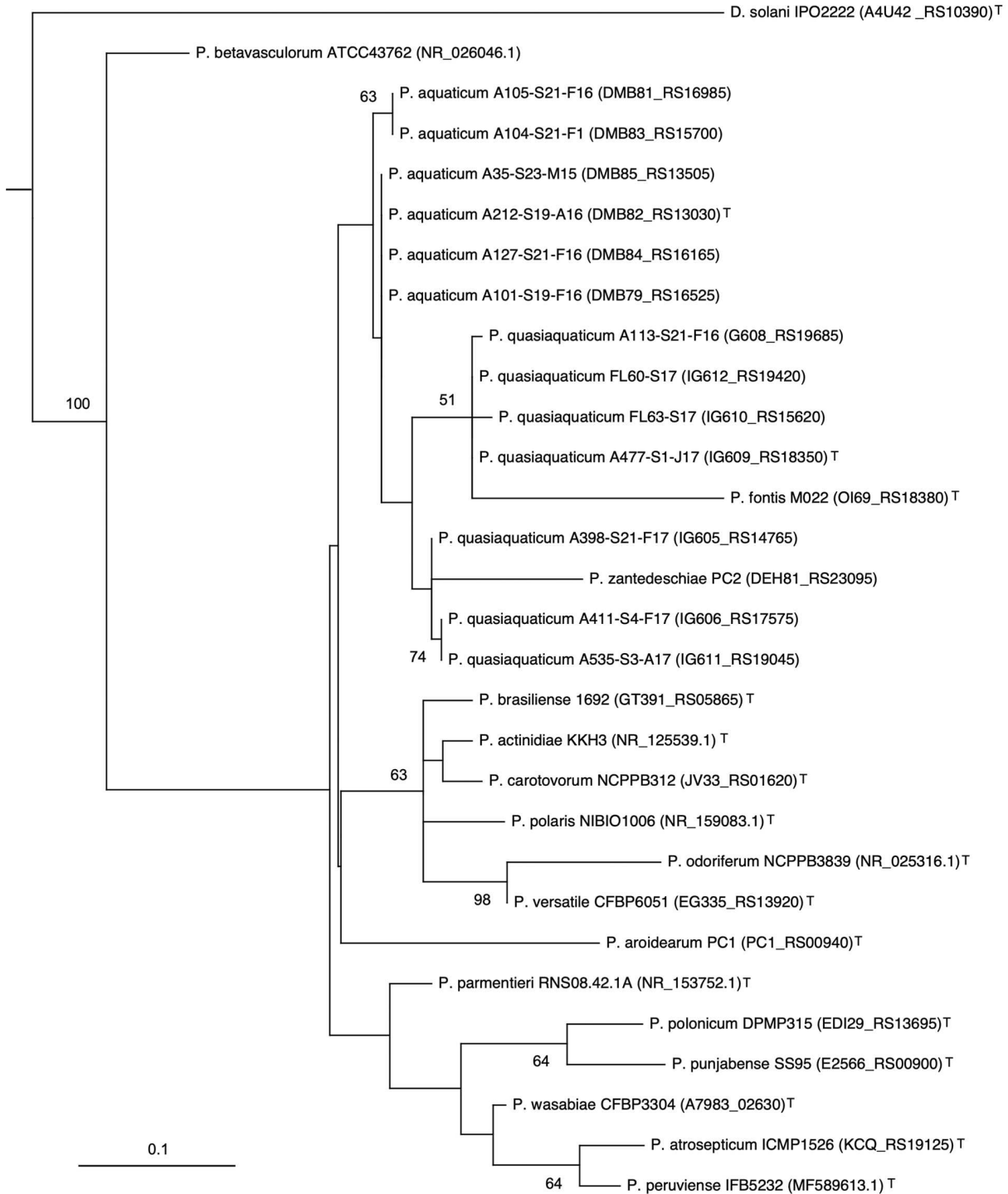
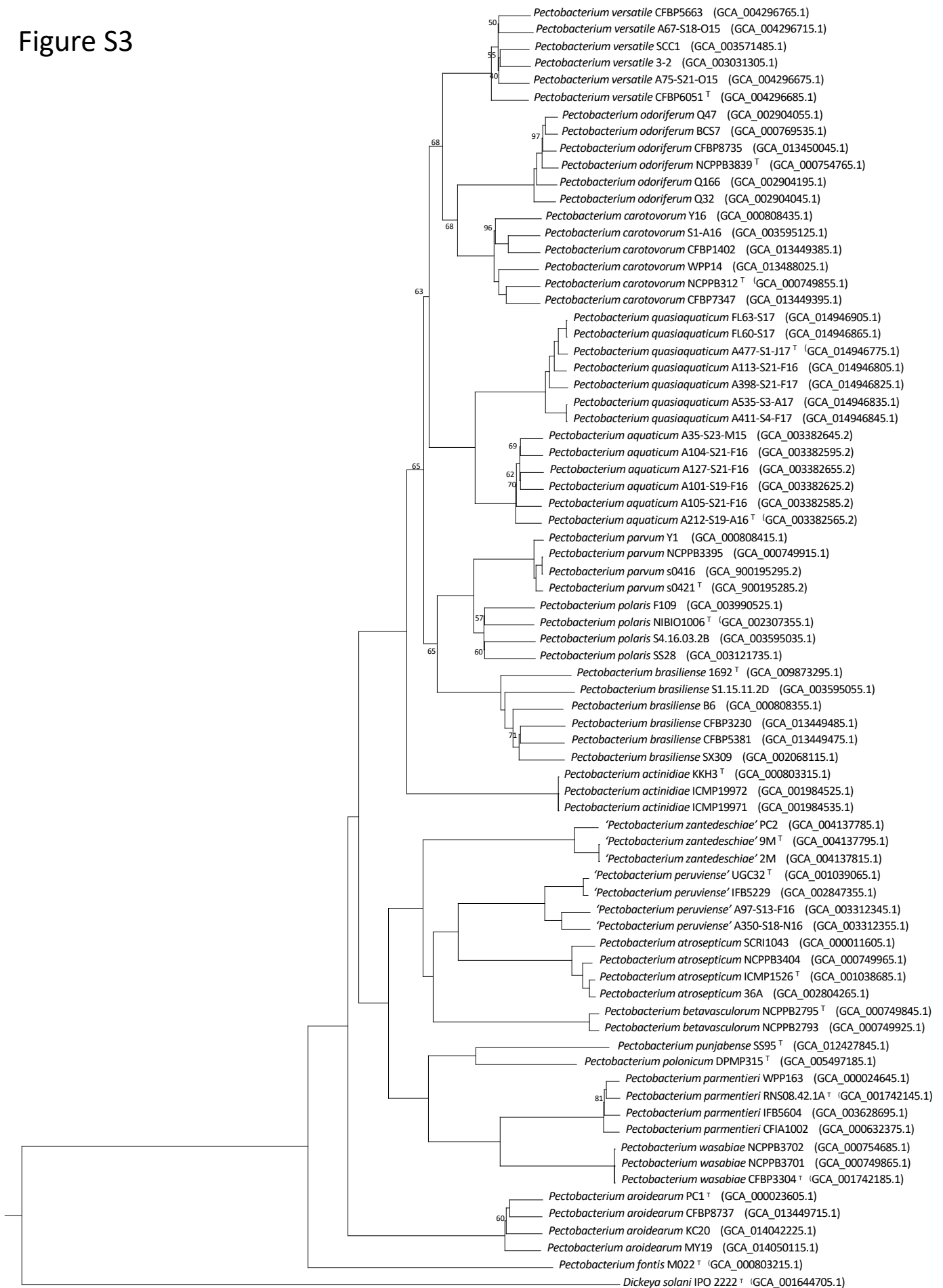


Figure S2: Phylogenetic tree of 16S rRNA gene of 29 *Pectobacterium* strains. Accession numbers are indicated in brackets after the strain name. Only bootstrap support values above 50% are indicated. Bar, 0.1 changes per nucleotide position. *Dickeya solani* IPO2222T was used as outgroup.

Figure S3



0.020

Figure S3: Extended MLSA phylogenetic tree of *P. quasiquaticum* sp. nov. strains and type strains of other *Pectobacterium* species. Accession numbers are indicated in brackets after the strain name. The bootstrap support values are indicated if less than 100%. Bar, 0.020 changes per nucleotide position.

Figure S4

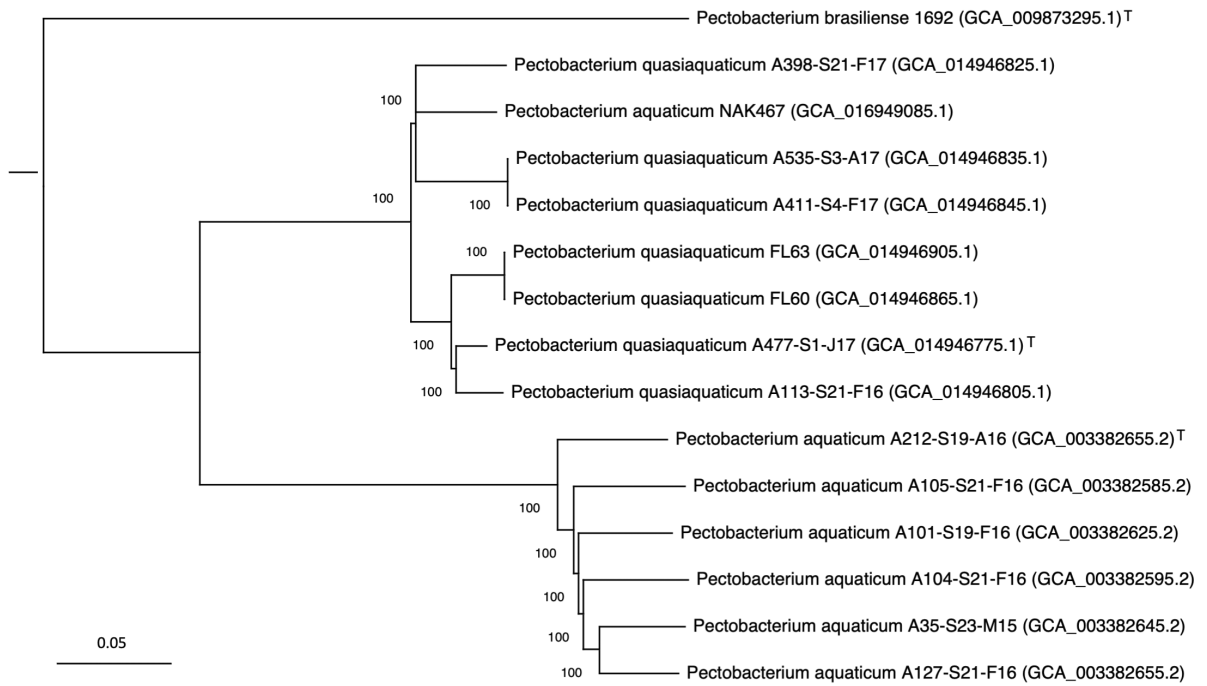


Figure S4: MLSA phylogenetic tree of *P. quasiquaticum* sp. nov. strains and *P. aquaticum* strains including the reclassified strain NAK:467. The MLSA phylogenetic tree was reconstructed from concatenated nucleotide sequences of 2899 homologous gene sequences of the 15 *Pectobacterium* genomes. The clustering of homologous nucleotide sequences was performed with SiLix [30] software with an 80% identity threshold. Homologous sequences of each gene were aligned using MUSCLE [23] software then concatenated. The alignments were filtered using the GBLOCK tool [24] resulting in a data set of 2,881,708 sites (of which 142,278 are informative). The tree was computed with the SeaView software [27] using the BioNJ method [31]. Bootstrap percentages were calculated based on 200 replicates. *P. brasiliense* 1692T was used as an outgroup. Bar, 0.05 changes per nucleotide position.

Table S1: List of homologous genes used for the MLSA phylogeny Fig 2 and Figure S2
Protein ID and annotation were from the genome of the *Pectobacterium quasiquaticum*
A477-S1-J17 type strain (accession JACYTJ010000000)

WP_002208627.1	P-II family nitrogen regulator
WP_002211347.1	translation initiation factor IF-1
WP_002442576.1	50S ribosomal protein L33
WP_005967968.1	50S ribosomal protein L28
WP_005967978.1	nucleoid occlusion factor SlmA
WP_005968491.1	fumarate/nitrate reduction transcriptional regulator Fnr
WP_005968829.1	transcription antiterminator/RNA stability regulator CspE
WP_005968887.1	50S ribosomal protein L20
WP_005969047.1	iron-sulfur cluster insertion protein ErpA
WP_005969846.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit B
WP_005970171.1	ISC system 2Fe-2S type ferredoxin
WP_005971295.1	co-chaperone GroES
WP_005971891.1	phosphocarrier protein Hpr
WP_005973551.1	autonomous glycyl radical cofactor GrcA
WP_005975342.1	DNA-binding transcriptional regulator Fis
WP_005975488.1	50S ribosomal protein L13
WP_005975503.1	stringent starvation protein A
WP_005975525.1	DnaA initiator-associating protein DiaA
WP_005975910.1	UMP kinase
WP_005975999.1	transcriptional regulator NrdR
WP_005976031.1	DNA-binding protein HU-beta
WP_005976668.1	50S ribosomal protein L34
WP_010274915.1	ribose-phosphate diphosphokinase
WP_010275594.1	cupin domain-containing protein
WP_010275699.1	50S ribosomal protein L35
WP_010275900.1	YebC/PmpR family DNA-binding transcriptional regulator
WP_010277211.1	leucine-responsive transcriptional regulator Lrp
WP_010278884.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit Nuol
WP_010280087.1	Fe-S cluster assembly transcriptional regulator IscR
WP_010280182.1	30S ribosomal protein S9
WP_010280320.1	peptidylprolyl isomerase B
WP_010282093.1	YajQ family cyclic di-GMP-binding protein
WP_010282097.1	protoheme IX farnesyltransferase
WP_010282437.1	outer membrane protein assembly factor BamE
WP_010282899.1	chaperonin GroEL
WP_010284196.1	DJ-1/Pfpl family protein
WP_010284552.1	aspartate carbamoyltransferase regulatory subunit
WP_010284628.1	leucyl aminopeptidase
WP_010284845.1	acyl-ACP--UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase
WP_010286428.1	glycine--tRNA ligase subunit alpha
WP_010287191.1	RpiB/LacA/LacB family sugar-phosphate isomerase
WP_010295235.1	formyltetrahydrofolate deformylase
WP_010296489.1	alkylphosphonate utilization protein
WP_010296630.1	RNase adapter RapZ

WP_010298042.1	division/cell wall cluster transcriptional repressor MraZ
WP_010299049.1	peroxiredoxin C
WP_010299774.1	type 3 dihydrofolate reductase
WP_010300175.1	acyl carrier protein
WP_010300311.1	type II 3-dehydroquinate dehydratase
WP_010300322.1	rod shape-determining protein MreB
WP_010301142.1	serine hydroxymethyltransferase
WP_010301392.1	PTS glucose transporter subunit IIA
WP_010302498.1	ribonuclease III
WP_010303333.1	biotin synthase BioB
WP_010305867.1	fumarate hydratase
WP_010306328.1	pyruvate dehydrogenase complex transcriptional repressor PdhR
WP_010306529.1	high-affinity branched-chain amino acid ABC transporter ATP-binding protein LivF
WP_010681437.1	phosphate ABC transporter ATP-binding protein PstB
WP_012772977.1	rod shape-determining protein MreD
WP_012773638.1	molecular chaperone Skp
WP_012822898.1	GTPase Era
WP_014915263.1	phenylalanine--tRNA ligase subunit alpha
WP_014915875.1	bifunctional 3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase/trans-2-decenoyl-ACP isomerase
WP_014916138.1	5-(carboxyamino)imidazole ribonucleotide mutase
WP_014916217.1	iron-sulfur cluster assembly protein IscA
WP_014916629.1	dihydrolipoyl dehydrogenase
WP_014916699.1	carbamoyl-phosphate synthase large subunit
WP_014917083.1	dipeptide ABC transporter ATP-binding protein
WP_039275834.1	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter permease UgpE
WP_039275909.1	RNA polymerase sigma factor RpoH
WP_039275912.1	high-affinity branched-chain amino acid ABC transporter permease LivH
WP_039277752.1	YeaH/YhbH family protein
WP_039278778.1	argininosuccinate lyase
WP_039280199.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoN
WP_039283781.1	D-galactonate dehydratase family protein
WP_039284904.1	oligopeptidase A
WP_039344379.1	bifunctional 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase/2-dehydro-3-deoxy-phosphogluconate aldolase
WP_039364143.1	serine O-acetyltransferase
WP_039476015.1	elongation factor 4
WP_039484051.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D
WP_039484058.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit M
WP_039487144.1	acetate uptake transporter
WP_039487851.1	NCS2 family permease
WP_039490396.1	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase
WP_039490971.1	UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase
WP_039491522.1	pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase
WP_039507167.1	homoserine kinase
WP_039507277.1	FAD-dependent oxidoreductase
WP_039517275.1	threonylcarbamoyl-AMP synthase

WP_095699512.1	peptide chain release factor 1
WP_095993276.1	phosphate signaling complex protein PhoU
WP_102116768.1	endopeptidase La
WP_102116769.1	ATP-dependent protease ATP-binding subunit ClpX
WP_102116770.1	ATP-dependent Clp endopeptidase proteolytic subunit ClpP
WP_102116798.1	phosphate response regulator transcription factor PhoB
WP_102116996.1	rhodanese-like domain-containing protein
WP_102117032.1	YicC family protein
WP_102117081.1	LPS export ABC transporter ATP-binding protein
WP_102117157.1	YhcH/YjgK/YiaL family protein
WP_102117354.1	cell division protein FtsA
WP_102117359.1	cell division protein FtsW
WP_102117369.1	2-isopropylmalate synthase
WP_102117547.1	ABC transporter ATP-binding protein
WP_102117548.1	carbohydrate ABC transporter permease
WP_102117549.1	sugar ABC transporter permease
WP_102117551.1	2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate 5-dehydrogenase KduD
WP_102117575.1	septum site-determining protein MinD
WP_102117593.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
WP_102117717.1	phosphate acetyltransferase
WP_102117728.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoH
WP_102117835.1	glucose-6-phosphate dehydrogenase
WP_102117915.1	translation initiation factor IF-3
WP_102117963.1	DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) subunit B
WP_102117966.1	chromosomal replication initiator protein DnaA
WP_102118125.1	branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein
WP_102118126.1	high-affinity branched-chain amino acid ABC transporter permease LivM
WP_102118188.1	6-phosphofructokinase
WP_102118227.1	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase PtsI
WP_102118228.1	cysteine synthase A
WP_102118232.1	3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase
WP_102118266.1	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit alpha
WP_102118277.1	30S ribosomal protein S2
WP_102118278.1	type I methionyl aminopeptidase
WP_102118484.1	molecular chaperone DnaJ
WP_102118497.1	energy-dependent translational throttle protein EttA
WP_102118560.1	RNA polymerase sigma factor RpoE
WP_102118774.1	23S rRNA (adenine(2030)-N(6))-methyltransferase RlmJ
WP_102118793.1	universal stress protein UspA
WP_102119376.1	putrescine ABC transporter permease PotI
WP_102119406.1	fumarate reductase (quinol) flavoprotein subunit
WP_102119538.1	ribonuclease G
WP_103860923.1	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein PotF
WP_110162335.1	small ribosomal subunit biogenesis GTPase RsgA
WP_116155383.1	LysR family transcriptional regulator ArgP
WP_116162252.1	arabinose ABC transporter substrate-binding protein
WP_116162312.1	PD40 domain-containing protein
WP_116163731.1	cell division protein FtsZ

WP_116163903.1	dipeptide ABC transporter permease DppC
WP_116164523.1	DNA polymerase III subunit beta
WP_116166183.1	acetate kinase
WP_116186251.1	3-isopropylmalate dehydrogenase
WP_116227065.1	aspartate carbamoyltransferase
WP_129709163.1	ABC transporter permease subunit
WP_137740624.1	serine endoprotease DegQ
WP_170309992.1	3-hydroxyacyl-ACP dehydratase FabZ
WP_174435741.1	acetylglutamate kinase
WP_180774649.1	molecular chaperone HtpG
WP_180784214.1	DNA-binding transcriptional regulator KdgR
WP_180784335.1	tryptophan synthase subunit beta
WP_180784382.1	superoxide dismutase
WP_180785144.1	AMP-binding protein
WP_180785292.1	bifunctional aspartate kinase/homoserine dehydrogenase I
WP_180785294.1	transaldolase
WP_180786002.1	oxaloacetate-decarboxylating malate dehydrogenase
WP_180786186.1	tRNA 4-thiouridine(8) synthase Thil
WP_180786425.1	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase
WP_180786596.1	AAA family ATPase
WP_180787217.1	two-component system response regulator DcuR
WP_180787247.1	membrane protein insertase YidC
WP_180787248.1	tRNA uridine-5-carboxymethylaminomethyl(34) synthesis GTPase MnmE
WP_180787263.1	phosphate ABC transporter permease PstA
WP_180787264.1	phosphate ABC transporter permease PstC
WP_180830202.1	threonine synthase
WP_193396996.1	nitrate reductase subunit beta
WP_193396997.1	nitrate reductase subunit alpha
WP_193397180.1	aerobic respiration two-component sensor histidine kinase ArcB
WP_193397190.1	lipid asymmetry maintenance ABC transporter permease subunit MlaE
WP_193397197.1	RNA polymerase factor sigma-54
WP_193397198.1	metalloprotease PmbA
WP_193397202.1	metalloprotease TldD
WP_193397211.1	50S ribosomal protein L11 methyltransferase
WP_193397213.1	tRNA dihydrouridine synthase DusB
WP_193397220.1	transporter substrate-binding domain-containing protein
WP_193397244.1	ABC transporter substrate-binding protein
WP_193397275.1	phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS
WP_193397373.1	NCS2 family permease
WP_193397397.1	aminomethyl-transferring glycine dehydrogenase
WP_193397554.1	trigger factor
WP_193397559.1	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I
WP_193397560.1	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III
WP_193397616.1	porin OmpA
WP_193397705.1	glutamate--tRNA ligase
WP_193397714.1	5\\'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase
WP_193397716.1	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase
WP_193397772.1	envelope stress response regulator transcription factor CpxR

WP_193397798.1	cell division ATP-binding protein FtsE
WP_193397817.1	PTS transporter subunit EIIC
WP_193397825.1	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase
WP_193397837.1	valine--tRNA ligase
WP_193397838.1	DNA polymerase III subunit chi
WP_193397843.1	cupin domain-containing protein
WP_193397890.1	rhamnulose-1-phosphate aldolase
WP_193397989.1	transcriptional regulator GcvA
WP_193397992.1	DUF3412 domain-containing protein
WP_193398006.1	DNA polymerase III subunit alpha
WP_193398130.1	pyruvate kinase
WP_193398170.1	succinate dehydrogenase/fumarate reductase iron-sulfur subunit
WP_193398171.1	elongation factor P--(R)-beta-lysine ligase
WP_193398217.1	phosphoglycerate dehydrogenase
WP_193398229.1	bifunctional riboflavin kinase/FAD synthetase
WP_193398230.1	isoleucine--tRNA ligase
WP_193398232.1	glutamine-hydrolyzing carbamoyl-phosphate synthase small subunit
	bifunctional tRNA pseudouridine(32) synthase/23S rRNA
WP_193398240.1	pseudouridine(746) synthase RluA
WP_193398241.1	RNA polymerase-associated protein RapA
WP_193398253.1	3-isopropylmalate dehydratase large subunit
WP_193398255.1	acetolactate synthase 3 large subunit
WP_193398257.1	peptidoglycan glycosyltransferase FtsI
WP_193398260.1	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase
WP_193398267.1	preprotein translocase subunit SecA
WP_193398277.1	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring), homodimeric type
WP_193398366.1	Dyp-type peroxidase
WP_193398508.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoG
WP_193398509.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF
WP_193398601.1	HTH-type transcriptional regulator CysB
WP_193398602.1	type I DNA topoisomerase
WP_193398608.1	anthranilate synthase component 1
WP_193398620.1	oligopeptide ABC transporter permease OppC
WP_193398632.1	asparaginase
WP_193398638.1	protein kinase YeaG
WP_193398661.1	L-serine ammonia-lyase
WP_193398664.1	mannose/fructose/sorbose family PTS transporter subunit IIC
WP_193398679.1	ammonia-dependent NAD(+) synthetase
WP_193398682.1	phenylalanine--tRNA ligase subunit beta
WP_193398683.1	threonine--tRNA ligase
WP_193398702.1	polyphosphate kinase 1
WP_193398750.1	Fe-S cluster assembly scaffold IscU
WP_193398751.1	IscS subfamily cysteine desulfurase
WP_193398899.1	DUF1852 family protein
WP_193398900.1	methionine synthase
WP_193399014.1	glutathione-disulfide reductase
WP_193399026.1	glycine--tRNA ligase subunit beta
WP_193399036.1	argininosuccinate synthase

WP_193399097.1	3-deoxy-8-phosphooctulonate synthase
WP_193399099.1	Re/Si-specific NAD(P)(+) transhydrogenase subunit alpha
WP_193399100.1	Re/Si-specific NAD(P)(+) transhydrogenase subunit beta
WP_193399288.1	HTH-type transcriptional regulator MetR
WP_193399295.1	ADP-glyceromanno-heptose 6-epimerase
WP_193399337.1	cysteine--tRNA ligase
WP_193399340.1	HAAAP family serine/threonine permease
WP_193399343.1	membrane-bound O-acyltransferase
WP_193399453.1	excinuclease ABC subunit B
WP_193399986.1	anaerobic C4-dicarboxylate transporter
WP_193400178.1	NADP-dependent oxaloacetate-decarboxylating malate dehydrogenase
	pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoyllysine-residue
WP_193400192.1	acetyltransferase
WP_193400212.1	glutamine-hydrolyzing GMP synthase
WP_193400215.1	IMP dehydrogenase
WP_193400223.1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine S-methyltransferase
WP_193400225.1	ribosome biogenesis GTPase Der
WP_193400229.1	histidine--tRNA ligase
	flavodoxin-dependent (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate
WP_193400231.1	synthase
WP_193400272.1	orotate phosphoribosyltransferase
WP_193400281.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit L
WP_193400296.1	alanine transaminase
WP_193400314.1	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)
WP_193400316.1	DNA replication/repair protein RecF
WP_193400330.1	dipeptide ABC transporter permease DppB
WP_193400332.1	dipeptide ABC transporter ATP-binding protein
WP_193400334.1	valine--pyruvate transaminase
WP_193400499.1	aspartate--tRNA ligase
WP_193400501.1	Holliday junction branch migration protein RuvA
WP_193400628.1	glutathione ABC transporter substrate-binding protein
WP_193400663.1	phosphoenolpyruvate carboxylase
WP_193400973.1	DNA topoisomerase IV subunit B
WP_193400982.1	PTS mannitol transporter subunit IICBA
WP_193400992.1	DNA topoisomerase IV subunit A

Table S3 : Phenotypic characterization of *P. quasiaquaticum* (A477-S1-J17T, A113-S21-F16, A411-S4-F17, FL63-S17 and FL60-S17 and *P. aquaticum* A212-S19-A16T using GENIII Biolog plates.

Test	<i>P. aquaticum</i>	<i>P. quasiaquaticum</i>				
	A212-S19-A16T	A113-S21-F16	A411-S4-F17	A477-S1-J17T	FL63-S17	FL60-S17
1% NaCl	+	+	+	+	+	+
1% Sodium Lactate	+	+	+	+	+	+
3-O-Methyl-D-Glucose	-	-	-	-	-	-
4% NaCl	w	-	-	-	-	-
8% NaCl	-	-	-	-	-	-
Acetic Acid	+	+	+	+	+	+
Acetoacetic Acid	-	-	-	-	-	-
Aztreonam	-	-	-	-	-	-
Bromo-Succinic Acid	+	+	+	+	+	+
Citric Acid	+	+	+	+	+	+
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
D-Aspartic Acid	+	+	+	+	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	+
D-Fructose-6-Phosphate	+	+	+	+	+	+
D-Fucose	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+
D-Galacturonic Acid	+	+	+	+	+	+
D-Gluconic Acid	+	+	+	+	+	+
D-Glucose-6-Phosphate	+	+	+	+	+	+
D-Glucuronic Acid	-	-	-	-	-	-
D-Lactic Acid Methyl Ester	-	-	-	-	-	-
D-Malic Acid	-	-	-	-	-	-
D-Maltose	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+
D-Saccharic Acid	+	+	+	+	+	+
D-Salicin	+	+	+	+	+	+
D-Serine #1	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-
D-Trehalose	-	-	-	-	-	-
Turanose	-	-	-	-	-	-
Dextrin	-	-	-	-	-	-
Sodium Formate	-	w	w	-	-	-
Fusidic Acid	+	+	+	+	+	+
Gelatin	-	-	-	-	-	-
β -Gentiobiose	+	+	+	+	+	+
Glucuronamide	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+

+ : Positive
- : Negative

Gly-Pro	-	-	-	-	-	-
Guanidine Hydrochloride	+	+	+	+	+	+
Inosine	-	-	-	-	-	-
L-Alanine	-	-	-	-	-	-
L-Arginine	-	-	-	-	-	-
L-Aspartic Acid	+	+	+	+	+	+
L-Fucose	-	-	-	-	-	-
L-Galactonic Acid- γ -Lactone	+	+	+	+	+	+
L-Glutamic Acid	w	W	W	W	W	W
L-Histidine	-	-	-	-	-	-
L-Lactic Acid	-	-	-	-	-	-
L-Malic Acid	+	+	+	+	+	+
L-Pyroglutamic Acid	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	W	W	W	-	W
L-Serine	+	+	+	+	+	+
Lincomycin	+	+	+	+	+	+
Lithium Chloride	w	+	+	+	+	+
Methyl Pyruvate	+	+	+	+	+	+
Minocycline	-	-	-	-	-	-
Mucic Acid	+	+	+	+	+	+
myo-Inositol	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl-Neuraminic Acid	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl- β -D-Mannosamine	-	-	-	-	-	-
Nalidixic Acid	-	-	-	-	-	-
Niaproof	+	+	+	+	+	+
Pectin	+	+	+	+	+	+
pH 5	w	W	W	W	W	-
pH 6	+	+	+	+	+	+
Potassium Tellurite	-	-	-	-	-	-
Propionic Acid	-	-	-	-	-	-
Quinic Acid	-	-	-	-	-	-
Rifamycin SV	+	+	+	+	+	+
Sodium Bromate	-	-	-	-	-	-
Butyric Acid	+	+	+	+	+	+
Stachyose	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Tetrazolium Blue	+	+	+	+	+	+
Tetrazolium Violet	+	+	+	+	+	+
Troleandomycin	+	+	+	+	+	+
Tween 40	-	-	-	-	-	-
Vancomycin	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
α -D-Lactose	+	+	+	+	+	+
α -Hydroxy-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-
α -Keto-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-
α -Keto-Glutaric Acid	-	-	-	-	-	-

β -Hydroxy-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-
p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	-	-	-	-	-	-
β -Methyl-D-Glucoside	+	+	+	+	+	+
γ -Amino-n-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-

Table S4: ANIm, values between genomes of *P. quasiquaticum* strains sp. nov., *P. aquaticum* and NAK:467. ANI values $\geq 96\%$ are indicated in red, ANI values between $96\% - 95\%$ are indicated in light blue and ANI values $\leq 95\%$ are indicated in blue. Pq: *P. quasiquaticum*; Pa: *P. aquaticum*; Pb: *P. brasiliense*. NAK:467 is highlighted in yellow

		A398-S21-F17	NAK:467*	A411-S4-F17	A535-S3-A17	A113-S21-F16	A477-S1-J17 T	FL60-S17	FL63-S17	A101-S19-F16	A104-S21-F16	A127-S21-F16	A35-S23-M15	A105-S21-F16	A212-S19-A16 T	1692 T
Pq	A398-S21-F17	100,00	98,91	98,98	98,99	98,87	99,01	98,88	98,88	95,76	95,67	95,70	95,67	95,62	95,84	94,25
Pa	NAK:467*	98,91	100,00	98,97	98,98	98,82	99,05	98,82	98,83	95,72	95,65	95,67	95,66	95,61	95,80	94,25
Pq	A411-S4-F17	98,98	98,97	100,00	99,99	98,87	99,03	98,88	98,87	95,77	95,68	95,73	95,70	95,66	95,84	94,25
Pq	A535-S3-A17	98,99	98,98	99,99	100,00	98,87	99,03	98,88	98,88	95,77	95,69	95,73	95,70	95,65	95,84	94,24
Pq	A113-S21-F16	98,87	98,82	98,87	98,87	100,00	99,48	99,40	99,39	95,78	95,68	95,74	95,72	95,61	95,73	94,23
Pq	A477-S1-J17 T	99,01	99,05	99,03	99,03	99,48	100,00	99,54	99,55	95,76	95,66	95,71	95,68	95,63	95,79	94,22
Pq	FL60-S17	98,88	98,82	98,88	98,88	99,40	99,54	100,00	99,98	95,93	95,88	95,89	95,86	95,80	95,98	94,18
Pq	FL63-S17	98,88	98,83	98,87	98,88	99,39	99,55	99,98	100,00	95,93	95,89	95,89	95,86	95,80	95,98	94,18
Pa	A101-S19-F16	95,76	95,72	95,77	95,77	95,78	95,76	95,93	95,93	100,00	98,84	98,81	98,82	98,80	98,66	93,37
Pa	A104-S21-F16	95,67	95,65	95,68	95,69	95,68	95,66	95,88	95,89	98,84	100,00	98,81	98,79	98,69	98,70	93,36
Pa	A127-S21-F16	95,70	95,67	95,73	95,73	95,74	95,71	95,89	95,89	98,81	98,81	100,00	99,01	98,72	98,57	93,39
Pa	A35-S23-M15	95,67	95,66	95,70	95,70	95,72	95,68	95,86	95,86	98,82	98,79	99,01	100,00	98,70	98,57	93,35
Pa	A105-S21-F16	95,62	95,61	95,66	95,65	95,61	95,63	95,80	95,80	98,80	98,69	98,72	98,70	100,00	98,69	93,37
Pa	A212-S19-A16 T	95,84	95,80	95,84	95,84	95,73	95,79	95,98	95,98	98,66	98,70	98,57	98,57	98,69	100,00	93,45
Pb	1692 T	94,25	94,25	94,25	94,24	94,23	94,22	94,18	94,18	93,37	93,36	93,39	93,35	93,37	93,45	100,00

2. Données supplémentaires - Article 2

Figures : Voir la section suivante.

Fig S1: Extended *gapA* phylogenetic tree corresponding to Fig 3A

Fig S2: Extended *gapA-dnaX-recA* phylogenetic tree corresponding to Fig 3B

Tableaux : Voir doi: [10.1094/PHYTO-12-21-0515-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-21-0515-R)

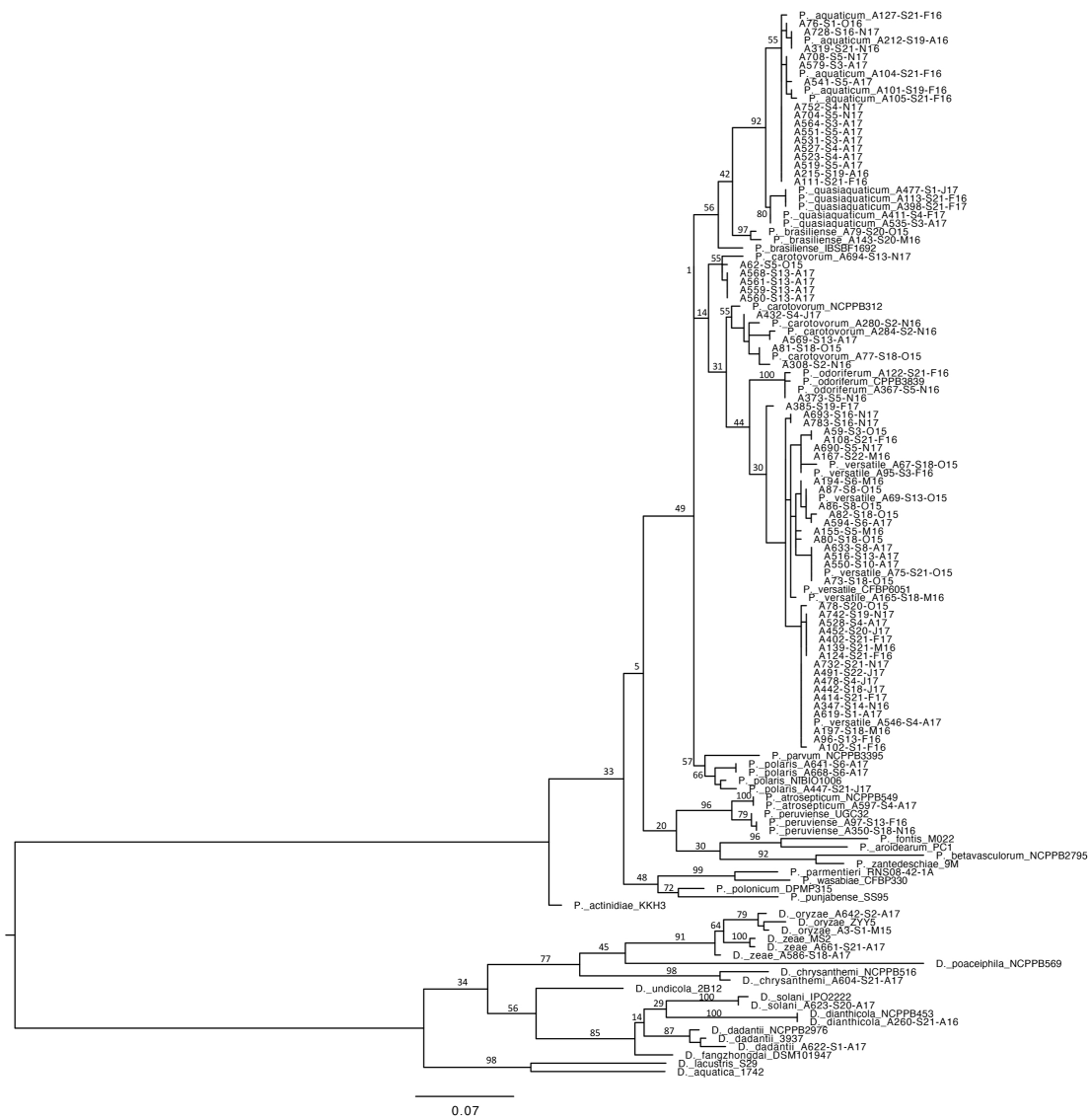


Fig S1: Extended *gapA* phylogenetic tree corresponding to Fig 3A.

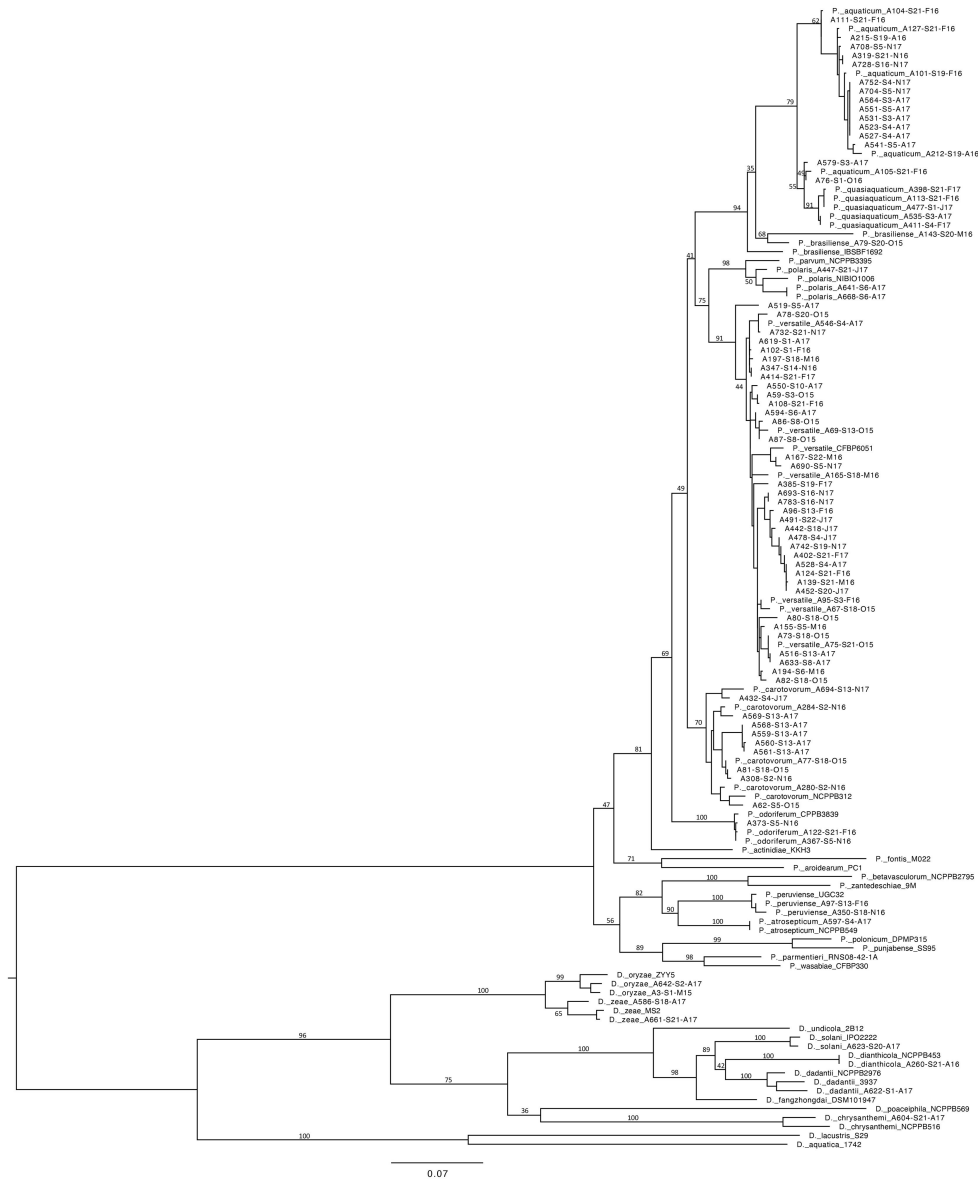


Fig S2: Extended *gapA-dnaX-recA* phylogenetic tree corresponding to Fig 3B

3. Données supplémentaires – Article 3

Figures : Voir la section suivante.

Tableaux : Voir doi: [10.1111/1462-2920.16479](https://doi.org/10.1111/1462-2920.16479)

P. aquaticum and *P. quasiaquaticum* are two species with a peculiar evolution within the genus *Pectobacterium*, suggesting an adaptation to a new environmental niche.

Ben moussa Hajar¹, Pédron Jacques¹, Hugouvieux-Cotte-Pattat Nicole², Barny Marie-Anne^{1*}

¹*Sorbonne Université, INRAE, IRD, CNRS, UPEC, UMR 7618 Institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris, F-75252 Paris, France.*

²*Université de Lyon, CNRS, UCBL, INSA, UMR5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, Villeurbanne, France.*

SUPPLEMENTAL FIGURES S1, S2, S3, S4, S5

Figure S1

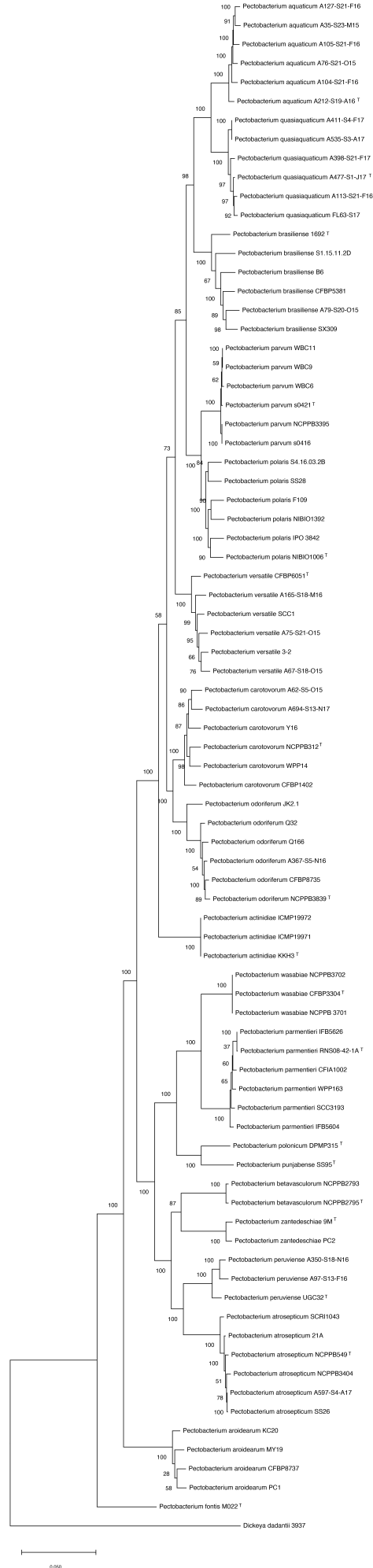


Figure S1: MLSA phylogeny of *Pectobacterium* species.

The reference phylogeny was constructed from concatenated nucleotide sequences of 412 Busco single-copy gene sequences were retrieved from 80 *Pectobacterium* genomes and *D. dadantii* 3937. The genes nucleotide sequences were aligned using MUSCLE v3.8.1551 resulting in a dataset of 430,743 sites (of which 97,782 are informative). *D. dadantii* 3937 was used as the outgroup. The phylogenetic tree was built using PhyML, using the General Time-Reversible (GTR) Substitution Model implemented in MEGA11 software. Bootstrap percentages were calculated based on 100 replicates. Bar, 0.05 changes per nucleotide position. Information and accession numbers of the 81 genomes used in this analysis are provided in Table S1.

Figure S2

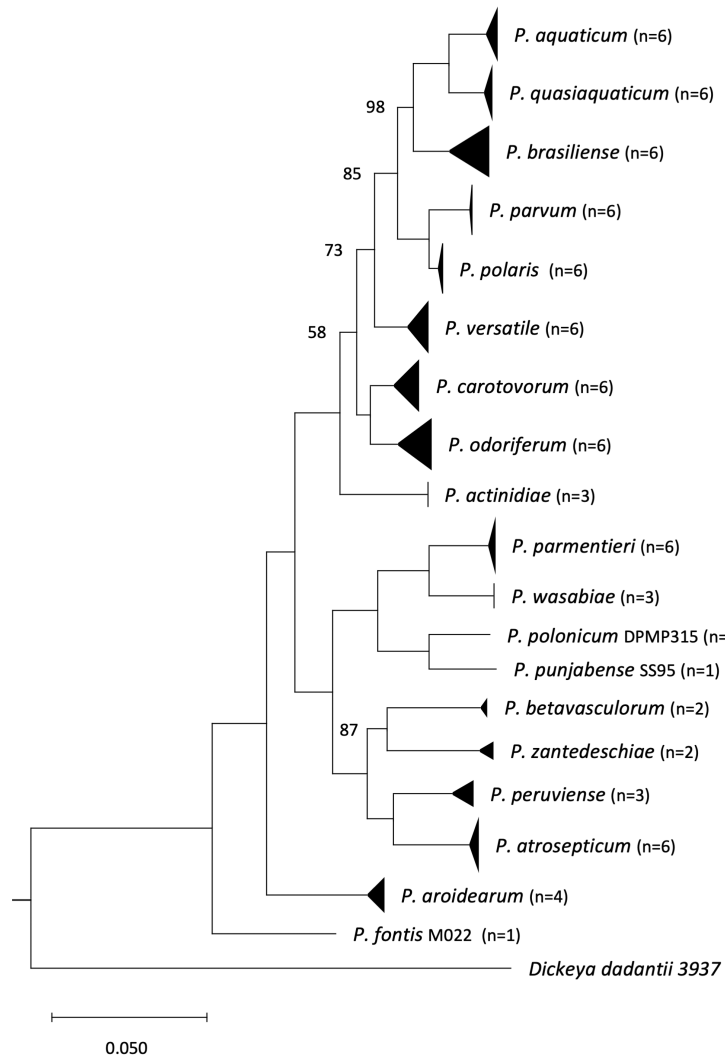


Figure S2: Collapse MLSA phylogeny of *Pectobacterium* species.

Reference phylogeny of 81 genomes representing 19 *Pectobacterium* species and *D. dadantii* 3937 as outgroup. This phylogenetic tree was constructed as shown in figure S1 (uncollapsed version); strains belonging to the same species were collapsed at the species level. The number given in parentheses after the species name indicates the number of genomes analyzed. Only bootstrap support values below 100 are shown. Bar, 0.05 changes per nucleotide position.

Figure S3

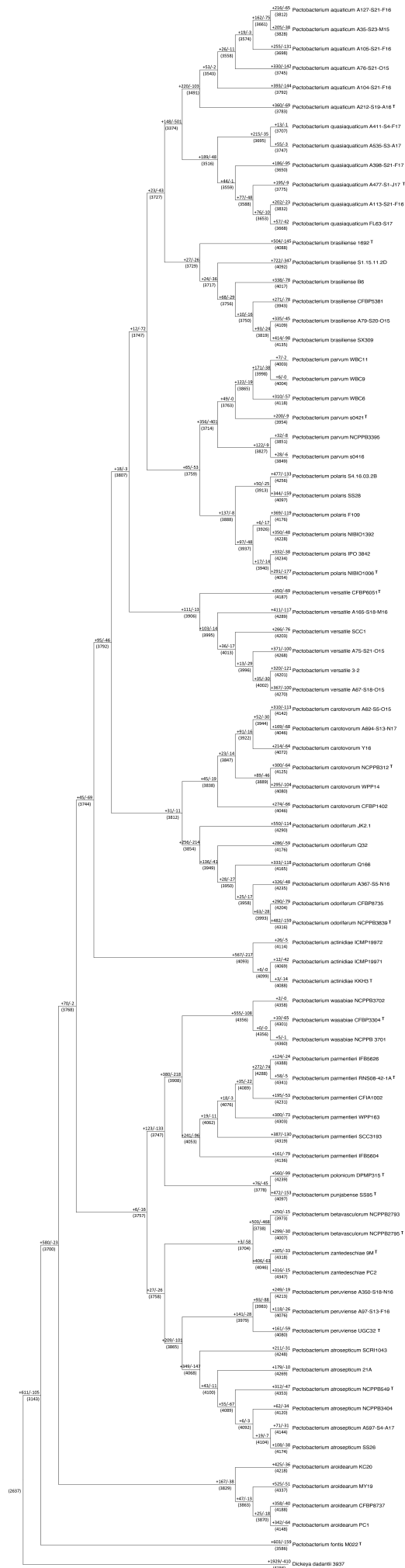
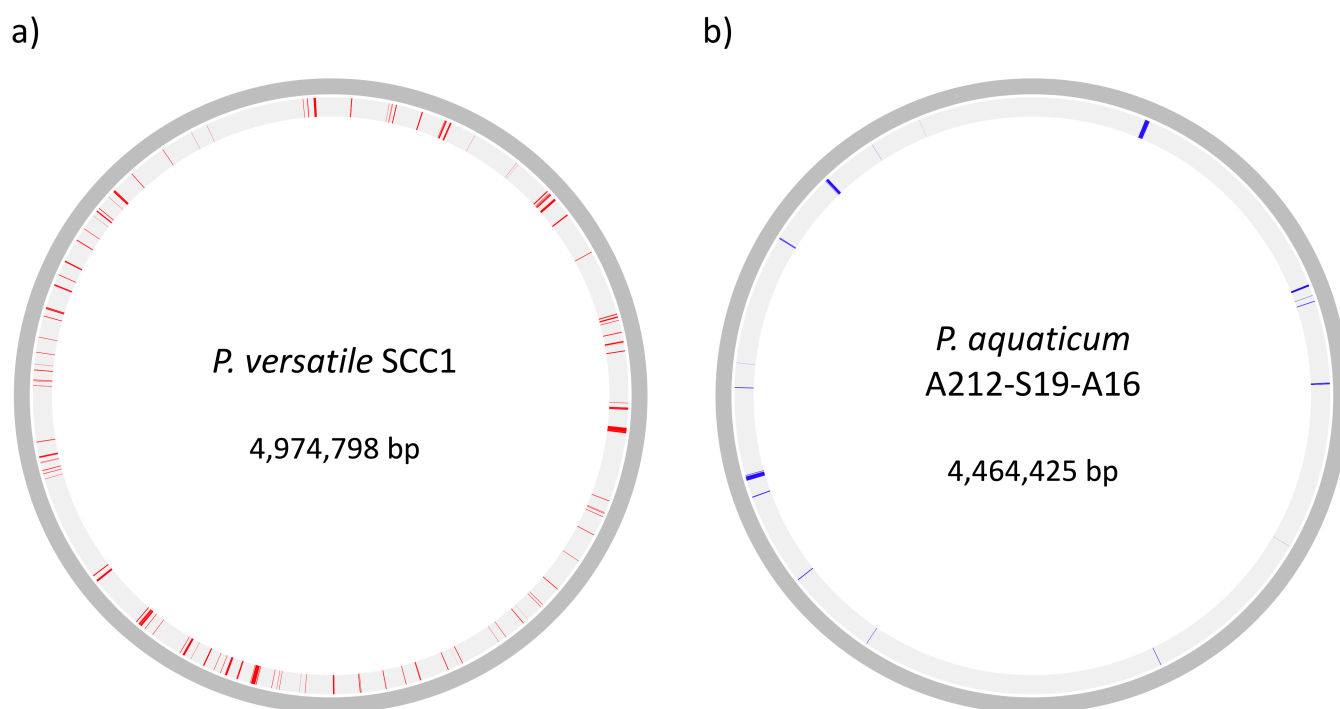


Figure S3: Evolution of the gene families repertoire along the *Pectobacterium* phylogeny including the strain level.

The gains and losses of homologous gene families during the evolution of *Pectobacterium* species were inferred by COUNT. Values mapped above the branches correspond to +gains/-losses; values below the branches, given in parentheses, correspond to the number of gene families inferred. The number of genomes analyzed per species (n) is given in parentheses after the species name.

Figure S4



c)

Number of gene families per cluster											Total of gene families locations
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Specific genes	14	4	0	1	0	0	1	0	0	2	22
Missing genes	70	19	9	6	3	1	0	0	1	1	110

Figure S4: Genomic distribution of missing genes or specific genes of both *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* species.

a) The *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* missing gene families (197 out of 199) were mapped in red in the *P. versatile* *SCC1* genome. b) The *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum* specific gene families (52 out of 53) were mapped in blue in the *P. aquaticum* A212-S19-A16 genome. Both missing and specific genes were mapped using shiny Circos package in R. c) Distribution of missing and specific gene families within clusters of different sizes.

Figure S5

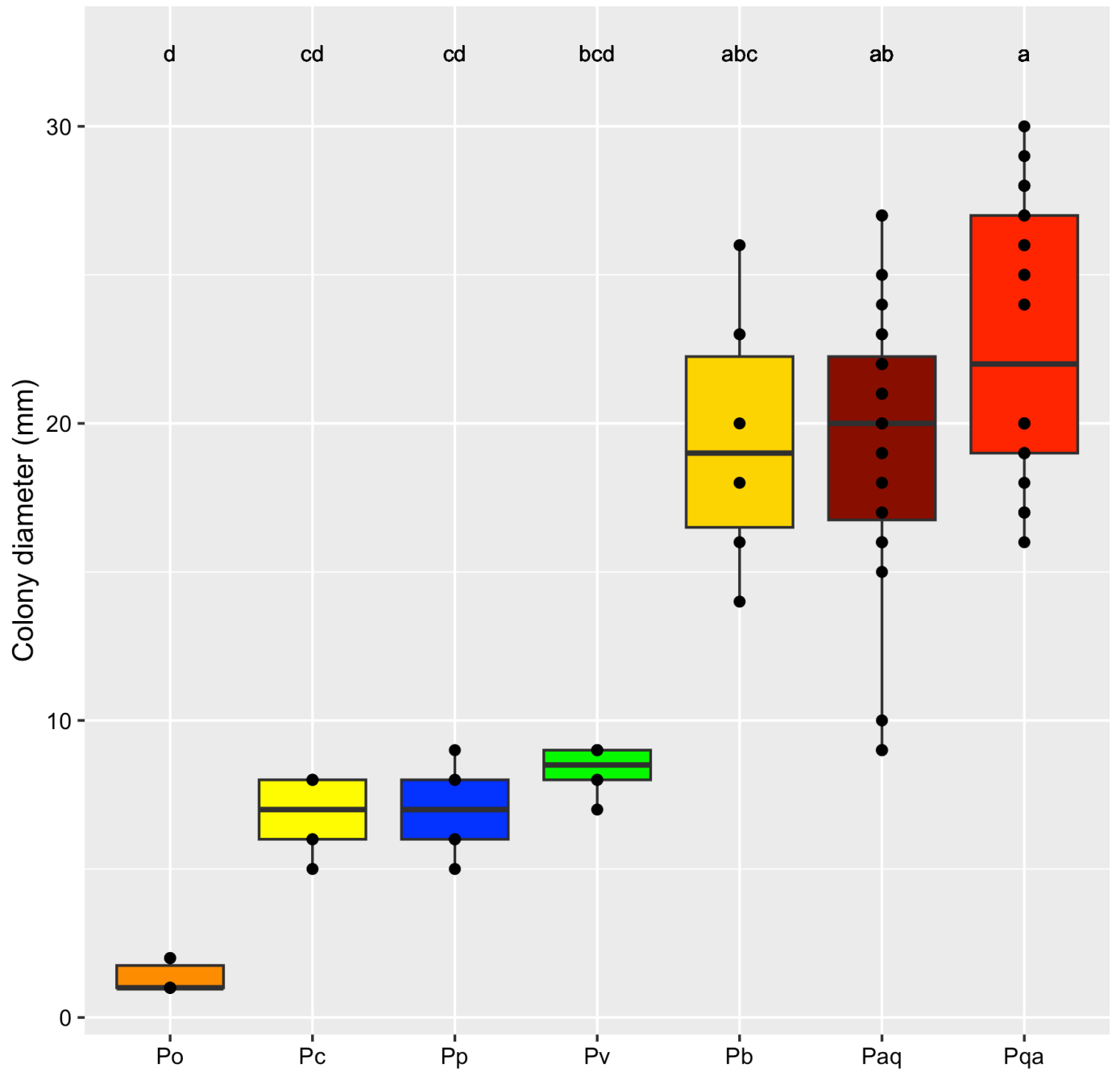


Figure S5: Swimming assay of *Pectobacterium* species

Seven *Pectobacterium* species were assayed for their swimming ability: eight strains for *P. aquaticum* (Pa) and *P. quasiaquaticum* (Pqa) each and five strains representative of close species *P. brasiliense* (Pb), *P. versatile* (Pv), *P. polaris* (Pp), *P. carotovorum* (Pc), *P. odoriferum* (Po). Bacterial cultures were spotted on 0,3% GL agar plates and incubated at 28°C for 16h. The results are based on three replicate swimming plates per strain for *P. aquaticum* and *P. quasiaquaticum* and six replicate swimming plates per strain of the other *Pectobacterium* species. The result of the statistical analysis is represented by the letters (a, b, c) at the top of the boxplots. Species with the same letter are not statistically different from each other ($P > 0.05$ Kruskal Wallis followed by Dunn test with the Bonferroni correction). The strains used are listed in Table S4.

4. Données supplémentaires - Chapitre 5

Tableau : Données de croissance des mutants de *Pectobacterium*, de *Dickeya*, *Pseudomonas* dans l'eau de rivière.

Tableau S-1 : Suivre de la croissance (u : UFC/ ml) des mutants de a) *Pectobacterium* et *Dickeya* b) *Pseudomonas* dans l'eau de rivière.

a)	Souches	Jour 0 (u)	Jour 1(u)	Jour 2(u)	Jour 3(u)	Jour 5(u)	Jour 6(u)	Jour 6 + 7 h(u) enrichissements	Nombre de génération * J6 avant enrichissement	Nombre de génération * J6 après enrichissement
<i>Pectobacterium versatile</i>	A73-S18-O15 - Rep 1	3.04E+03	1.03E+05	1.61E+05	NA	8.20E+04	1.11E+05	2.37E+06	5.2	9.6
	A73-S18-O15 - Rep 2	3.20E+03	9.70E+04	1.82E+05	NA	1.74E+05	1.23E+05	6.20E+05	5.3	7.6
<i>Pectobacterium aquaticum</i>	A212-S19-A16 - Rep 1	4.54E+03	7.27E+04	1.80E+05	NA	3.20E+05	2.24E+05	2.84E+06	5.6	9.3
	A212-S19-A16 - Rep 2	5.17E+03	6.60E+04	4.87E+05	NA	7.20E+05	8.27E+05	2.63E+06	7.3	9
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	1043 - Rep 1	2.06E+03	8.93E+04	NA	NA	3.90E+04	3.87E+05	1.59E+06	7.6	9.6
	1043 - Rep 2	2.72E+03	1.06E+05	1.19E+06	NA	3.73E+05	1.60E+05	7.93E+05	5.9	8.2
<i>Dickeya fangzhongdai</i>	B16 - Rep 1	4.09E+03	4.15E+04	3.07E+05	4.20E+05	NA	5.90E+05	2.10E+06	7.2	9
	B16 - Rep 2	3.77E+03	1.43E+04	4.93E+05	NA	NA	5.30E+05	8.80E+05	7.1	7.9
<i>Dickeya zeae</i>	A586-S18-A17- Rep 1	1.32E+03	1.90E+04	3.93E+05	NA	1.88E+05	2.13E+05	1.43E+06	7.3	10.1
	A586-S18-A17- Rep 2	2.08E+03	2.30E+04	4.07E+05	NA	1.14E+05	8.87E+04	8.40E+05	5.4	8.7
<i>Dickeya dadantii</i>	3937 - Rep 1	1.44E+03	1.30E+04	6.47E+05	NA	1.17E+06	1.25E+06	6.27E+06	9.8	12.1
	3937 - Rep 2	1.75E+03	1.40E+04	1.03E+06	NA	2.67E+06	2.87E+06	3.33E+06	10.7	10.9

b)		Souches	Jour 0 (u)	Jour 1 (u)	Jour 2 (u)	Jour 3 (u)	Jour 3 + 7 h (u) enrichissement	Nombre de génération* J6 avant enrichissement	Nombre de génération* J3 après enrichissement
<i>Pseudomonas syringae</i> (PG2b)	CC440 - Rep 1		1.65E+03	5.40E+04	9.60E+05	7.80E+05	4.00E+06	8.9	11.2
	CC440 - Rep 2		2.04E+03	5.10E+04	7.07E+05	9.27E+05	1.18E+06	8.8	9.2
<i>Pseudomonas viridiflava</i> (PG7a)	TA043 - Rep 1		1.83E+03	2.17E+05	1.25E+06	2.67E+06	1.33E+07	10.5	12.8
	TA043 - Rep 2		2.57E+03	2.40E+05	1.57E+06	2.80E+06	3.60E+06	10.1	10.5
<i>Pseudomonas syringae</i> (PG10c)	CC1557 - Rep 1		1.69E+03	2.77E+03	1.31E+04	2.61E+04	4.93E+06	3.9	11.5
	CC1557 - Rep 2		1.29E+03	2.10E+03	1.93E+03	3.87E+03	7.87E+05	1.6	9.3

*Le nombre de génération était calculé comme suit $n = \ln(N/N_0)/\ln(2)$ avec n : nombre de générations, N_0 : nombre de bactéries initial, N : nombre de bactéries final.

(u) : Concentration bactérienne en UFC/mL

NA : non disponible".

Résumé

Les bactéries des genres *Pectobacterium*, *Dickeya* et *Musicola* sont des pathogènes de plantes collectivement appelés Soft Rot *Pectobacteriaceae* (SRP). Ces pathogènes causent des dégâts significatifs à des cultures d'importance agronomique et des plantes ornementales. La caractéristique principale de ces pathogènes est leur capacité à sécréter une grande quantité d'enzymes qui dégradent la paroi cellulaire végétale (plant cell wall degrading enzymes : PCWDE), causant les symptômes de pourriture sur les plantes infectées. Des études antérieures ont montré que les SRP ont été isolées de plusieurs environnements non-hôtes, tels que l'eau, le sol et les insectes. Cependant, la diversité des SRP associées à ces environnements est mal décrite. Afin d'étudier la diversité des souches isolées dans l'eau, une campagne d'échantillonnage menée dans la rivière Durance entre 2015 et 2017 a permis d'isoler 582 souches de SRP. Lors de mon doctorat, en utilisant une approche génomique, j'ai décrit une nouvelle espèce isolée dans l'eau de la rivière la Durance et dans les lacs Planaqua (CEREEP-ECOTRON Île De France), nommée *Pectobacterium quasiaquaticum*. J'ai ensuite étudié la diversité de la collection de souches de SRP isolées de la rivière Durance, ce qui a permis de montrer que deux espèces, *Pectobacterium aquaticum* et *Pectobacterium versatile*, étaient prédominantes dans l'eau de rivière. En revanche, le genre *Dickeya* était rarement isolé dans l'eau. De plus, à l'exception de *P. versatile*, les espèces responsables des épidémies sur plantes étaient rarement isolées dans l'eau. *P. aquaticum* et *P. quasiaquaticum* sont deux espèces proches qui ont été exclusivement isolées d'eau et sont absentes des collections de souches isolées de plantes symptomatiques. J'ai alors étudié les caractéristiques génomiques et fonctionnelles de ces deux espèces en comparaison avec d'autres espèces de *Pectobacterium* communément isolées de plantes. L'analyse génomique comparative, effectuée sur 80 génomes, a montré que les deux espèces ont subi une perte significative de gènes au cours de leur évolution. Parmi les gènes manquants dans les deux espèces, de nombreux gènes sont impliqués dans le transport d'ions organiques, de glucides et d'acides aminés. De plus, les tests de virulence réalisés sur quatre plantes différentes ont montré que ces deux espèces étaient peu agressives en comparaison d'autres espèces de *Pectobacterium*. Ce phénotype est appuyé par une capacité réduite pour dégrader le pectate et un nombre plus restreint d'enzymes impliqués dans la dégradation des parois cellulaires de plantes. L'ensemble de ces résultats suggère que la niche écologique de ces deux espèces n'est pas la plante. J'ai ensuite entrepris par une approche Tn-Seq, d'identifier les déterminants génétiques nécessaires à la survie et à la croissance de bactéries pathogènes des plantes dans l'eau. L'analyse préliminaire des données

Tn-Seq dans l'eau pour deux espèces, *P. versatile* et *P. aquaticum*, a mis en évidence plus de 200 gènes impliqués dans la survie dans l'eau, dont plus 50 % de ces gènes sont communs aux deux espèces.

En conclusion, ce travail fournit une description générale de la diversité et de l'abondance des SRP dans l'eau de rivière. Il révèle que, à l'exception de *P. versatile*, les espèces de SRP à l'origine des épidémies dans les cultures sont rarement présentes dans les eaux. En outre, mon travail révèle également l'évolution particulière de deux espèces exclusivement "aquatiques", *P. aquaticum* et *P. quasiahquaticum*, suggérant un changement de niche ou de mode de vie pour ces deux espèces. De plus, mon travail offre une idée sur les déterminants génétiques impliqués dans la survie dans l'eau et qui seront étudiés de manière plus approfondie dans des recherches ultérieures.

Mots-clés : Soft Rot *Pectobacteriaceae*, bactérie phytopathogène, taxonomie, *Pectobacterium*, *Dickeya*, souches environnementales, diversité, abondance, répartition, eau douce, eau de surface, évolution réductive, *Pectobacterium quasiahquaticum*, *Pectobacterium aquaticum*, Tnseq, adaptation.

Abstract

Bacteria of the genera *Pectobacterium*, *Dickeya* and *Musicola* are plant pathogens collectively known as Soft Rot *Pectobacteriaceae* (SRP). These pathogens cause significant damage to economically important crops and ornamentals. The main characteristic of these pathogens is their ability to secrete large amounts of plant cell wall degrading enzymes (PCWDE), causing rotting symptoms on plants. Earlier studies showed that SRP are isolated from various non-host environments, such as water, soil and insects. However, the diversity of SRP associated with these environments is poorly described. To investigate the diversity of strains isolated from water, a sampling campaign was conducted in the Durance River between 2015 and 2017, and 582 SRP strains were isolated. During my PhD, using a polyphasic approach, I described a new species, *Pectobacterium quasiaquaticum*, isolated from water in the Durance River and the Planaqua Lakes (CEREAP-ECOTRON Île De France). I then studied the diversity of the collected strains isolated from the Durance River, and showed that two species, *Pectobacterium aquaticum* and *Pectobacterium versatile*, were predominant in the river water. In contrast, the genus *Dickeya* was rarely isolated from the water. Moreover, with the exception of *P. versatile*, SRP species responsible for outbreaks in crops were rarely found in water. *P. aquaticum* and *P. quasiaquaticum* are two closely related species that were only isolated from water and have not been reported on plants. The genomic and functional characteristics of these two species were compared with other *Pectobacterium* species commonly isolated from plants. Comparative genomic analysis showed that both species have undergone significant gene loss during their evolution. Among the missing genes, in both species, many are involved in the transport of organic ions, carbohydrates and amino acids. In addition, a virulence assay conducted on four different plants showed that both species were less aggressive than other *Pectobacterium* species. This phenotype is supported by a reduced capacity to degrade pectate and a smaller number of enzymes involved in the degradation of plant cell wall. Taken together, these results suggest that the ecological niche of these two species is not the plant. I then undertook a Tn-Seq approach to identify the genetic determinants required for the growth and survival of plant pathogenic bacteria in water. Preliminary analysis of Tn-Seq data in water for two species, *P. versatile* and *P. aquaticum*, revealed over 200 genes involved in survival in water, with over 50% of these genes being common to both species. In conclusion, this work provides a general description of the diversity and abundance of SRP in river water. It reveals that, with the exception of *P. versatile*, the SRP species that cause diseases outbreaks and

epidemics in crops are rarely present in water. Moreover, my work reveals the peculiar evolution of two exclusively "aquatic" species, *P. aquaticum* and *P. quasiquaticum*, suggesting a change of niche or lifestyle for these two species. Furthermore, my work provides valuable insights into the genetic determinants involved in survival in water, which will be further explored in future research.

Keywords: Soft Rot *Pectobacteriaceae*, phytopathogenic bacteria, taxonomy, *Pectobacterium*, *Dickeya*, environmental strains, diversity, abundance, distribution, freshwater, surface water, reductive evolution, *Pectobacterium quasiquaticum*, *Pectobacterium aquaticum*, Tnseq, adaptation.

Résumé

Les bactéries des genres *Pectobacterium*, *Dickeya* et *Musicola* sont des pathogènes de plantes collectivement appelés Soft Rot *Pectobacteriaceae* (SRP). Ces pathogènes causent des dégâts significatifs à des cultures d'importance agronomique et des plantes ornementales. La caractéristique principale de ces pathogènes est leur capacité à sécréter une grande quantité d'enzymes qui dégradent la paroi cellulaire végétale (plant cell wall degrading enzymes : PCWDE), causant les symptômes de pourriture sur les plantes infectées. Des études antérieures ont montré que les SRP ont été isolées de plusieurs environnements non-hôtes, tels que l'eau, le sol et les insectes. Cependant, la diversité des SRP associées à ces environnements est mal décrite. Afin d'étudier la diversité des souches isolées dans l'eau, une campagne d'échantillonnage menée dans la rivière Durance entre 2015 et 2017 a permis d'isoler 582 souches de SRP. Lors de mon doctorat, en utilisant une approche génomique, j'ai décrit une nouvelle espèce isolée dans l'eau de la rivière la Durance et dans les lacs Planaqua (CEREEP-ECOTRON Île De France), nommée *Pectobacterium quasიაquaticum*. J'ai ensuite étudié la diversité de la collection de souches de SRP isolées de la rivière Durance, ce qui a permis de montrer que deux espèces, *Pectobacterium aquaticum* et *Pectobacterium versatile*, étaient prédominantes dans l'eau de rivière. En revanche, le genre *Dickeya* était rarement isolé dans l'eau. De plus, à l'exception de *P. versatile*, les espèces responsables des épidémies sur plantes étaient rarement isolées dans l'eau. *P. aquaticum* et *P. quasიაquaticum* sont deux espèces proches qui ont été exclusivement isolées d'eau et sont absentes des collections de souches isolées de plantes symptomatiques. J'ai alors étudié les caractéristiques génomiques et fonctionnelles de ces deux espèces en comparaison avec d'autres espèces de *Pectobacterium* communément isolées de plantes. L'analyse génomique comparative, effectuée sur 80 génomes, a montré que les deux espèces ont subi une perte significative de gènes au cours de leur évolution. Parmi les gènes manquants dans les deux espèces, de nombreux gènes sont impliqués dans le transport d'ions organiques, de glucides et d'acides aminés. De plus, les tests de virulence réalisés sur quatre plantes différentes ont montré que ces deux espèces étaient peu agressives en comparaison d'autres espèces de *Pectobacterium*. Ce phénotype est appuyé par une capacité réduite pour dégrader le pectate et un nombre plus restreint d'enzymes impliqués dans la dégradation des parois cellulaires de plantes. L'ensemble de ces résultats suggère que la niche écologique de ces deux espèces n'est pas la plante. J'ai ensuite entrepris par une approche Tn-Seq, d'identifier les déterminants génétiques nécessaires à la survie et à la croissance de bactéries pathogènes des plantes dans l'eau. L'analyse préliminaire des données Tn-Seq dans l'eau pour deux espèces, *P. versatile* et *P. aquaticum*, a mis en évidence plus de 200 gènes impliqués dans la survie dans l'eau, dont plus 50 % de ces gènes sont communs aux deux espèces. En conclusion, ce travail fournit une description générale de la diversité et de l'abondance des SRP dans l'eau de rivière. Il révèle que, à l'exception de *P. versatile*, les espèces de SRP à l'origine des épidémies dans les cultures sont rarement présentes dans les eaux. En outre, mon travail révèle également l'évolution particulière de deux espèces exclusivement "aquatiques", *P. aquaticum* et *P. quasიაquaticum*, suggérant un changement de niche ou de mode de vie pour ces deux espèces. De plus, mon travail offre une idée sur les déterminants génétiques impliqués dans la survie dans l'eau et qui seront étudiés de manière plus approfondie dans des recherches ultérieures.

Mots-clés : Soft Rot *Pectobacteriaceae*, bactérie phytopathogène, taxonomie, *Pectobacterium*, *Dickeya*, souches environnementales, diversité, abondance, répartition, eau douce, eau de surface, évolution réductive, *Pectobacterium quasიაquaticum*, *Pectobacterium aquaticum*, Tnseq, adaptation.