



République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة بالحراش

Thèse

Présentée par

LAALA Samia

**En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en
Sciences Agronomiques**

**Détection et diversité génétique de *Xanthomonas campestris* sur les
Brassicacées en Algérie**

Soutenue le 02 Juin 2016

Devant le jury :

Président	Bellal M.M. Professeur	Professeur l'E.N.S.A. d'El Harrach
D. thèse	Bouznad Z. Manceau C.	Professeur à l'E.N.S.A. d'El Harrach Co directeur , ANSES Angers
Examineurs :	Mme Louanchi M. Mme Krimi Zoulikha Mr. Sabaou N.E.	Professeur à l'E.N.S.A. d'El Harrach Professeur Université Saad Dahlab Blida Professeur Ecole Normale Supérieur

Année universitaire : 2015-2016

Remerciements

Je remercie sincèrement mon Directeur de thèse Pr Z. Bouznad pour son aide, ses précieux conseils et ses orientations.

Je tiens à remercier mon Co-Directeur de thèse, D^r Charles Manceau de m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de réaliser un travail de recherche intéressant. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour son aide, sa compréhension et l'amitié qu'il m'a accordée.

J'exprime mes remerciements à Pr M. Bellal qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma thèse.

Je remercie vivement Pr M. Louanchi, Pr Z Krimi et Pr N. Sabaou qui ont bien voulu être les examinateurs de cette thèse et d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'exprime mon amitié à tout le personnel du laboratoire de pathologie végétale de l'INRA d'Angers en particulier, Sophie Cesbron, Martial Briand, Marie-Agnès Jacques; Boureau Tristan, Marion Le Saux merci à vous pour votre soutien et vos encouragements.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à mes collègues du C.N.C.C. pour leur aide, leur soutien et leur encouragement.

Je tiens à remercier particulièrement Lyes Beninal pour son aide durant les prélèvements des échantillons.

Merci à tous mes amis qui ont beaucoup compté durant cette thèse : Nicol, Sofie, Mohamed, Kenza, Meriem et à tous mes amis sans exception.

Merci à toute ma famille, ma mère, ma sœur, mes frères, mes neveux, mes nièces et ma petite cousine Meriam et Nadjet.

Table des matières

Pages

Introduction générale.....	1
2.1 Les Brassicacées	5
2.1.1 Généralités	5
2.1.2 Importance économique des brassicacées.....	5
2.1.3 Origine et classification des brassicacées :	6
2.1.4 La diversification des brassicacées cultivées :.....	8
2.1.5 Données botaniques	10
2.2 Les ravageurs et les maladies des Brassicacées :	11
2.2.1 Les ravageurs	11
2.2.2 Les maladies.....	11
2.3 Les bacterioses des brassicacées causées par <i>Xanthomonas campestris</i>.....	16
2.3.1 Les maladies vasculaires	16
2.3.2 Les maladies du parenchyme	17
2.4 2.4 Les caractéristiques morphologiques et physiologiques des <i>Xanthomonas</i>	19
2.5 Position taxonomique des <i>Xanthomonas</i>.....	21
2.5.1 Quelques généralités sur les bactéries phytopathogènes.....	21
2.5.2 Taxonomie basée sur le pouvoir pathogène :.....	23
2.5.3 Taxonomie moléculaire et évolutive du genre <i>Xanthomonas</i> :.....	23
2.5.4 Classification intra spécifique des <i>X. campestris</i>	25
2.5.5 Les génomes séquencés pour le genre <i>Xanthomonas</i>	30
2.6 Le cycle infectieux de <i>X. campestris</i>	30
2.6.1 Transmission par la semence contaminée :.....	30
2.6.2 Conservation dans le sol	31
2.6.3 Les plantes adventices :.....	31
2.6.4 Les voies d'entrées des bactéries :	31
2.6.5 Les conditions favorables pour la dissémination de la maladie :.....	32
2.7 Les moyens de lutte contre <i>X. campestris</i> :	32
2.7.1 Traitement des semences	34
2.7.2 La culture des variétés résistantes ou tolérantes :	34

2.7.3 La lutte biologique contre <i>X. campestris</i> :	35
2.7.4 La sélection phytosanitaire des semences :	36
2.8 Les techniques de détection	36
2.8.1 Les tests biologiques	37
2.8.2 Les tests biochimiques	37
2.8.3 Les tests sérologiques.....	37
2.8.4 Les techniques moléculaires	38
Chapitre 1	
Mise au point d'une nouvelle technique de détection des cellules vivantes de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> dans les semences de brassicacees : seed-qPCR	41
1.1 Introduction :	42
1.2 Matériel et méthodes	44
1.2.1 Souches bactériennes	44
1.2.2 Lots de semences utilisés :	44
1.2.3 Contamination artificielle des lots de semences	44
1.2.4 Germination des semences contaminées	45
1.2.5 Macération des graines germées	46
1.2.6 Préparation de l'ADN et amplification par PCR :	46
1.2.7 Mise au point d'une méthode de germination adaptée pour 10 000 graines :... 47	
1.2.8 Comparaison entre la méthode de détection en BIO-PCR et en seed-qPCR en temps réel dans des semences naturellement contaminées	47
1.2.9 Evaluation du seuil de sensibilité de la seed- qPCR.....	48
1.3 Résultats	48
1.3.1 Contamination artificielle des semences de choux	51
1.3.2 Evaluation de la sensibilité de la détection de <i>X. c. pv. campestris</i> dans les semis par seed-qPCR	51
1.3.3 Dynamique de croissance des bactéries au cours de la germination estimée par pcr en temps réel	51
1.3.4 Mise au point d'une méthode de germination adaptée pour 10 000 graines.....	53
1.3.5 Comparaison entre la méthode de détection en LPGACvc / BIO-PCR et la seed-qPCR en temps réel dans des semences naturellement contaminées par <i>X. c. pv. campestris</i> :	56

1.3.6 Seuil de sensibilité de la seed-qPCR en temps réel	57
1.4 Discussion et conclusion :	58
Chapitre 2.....
Caracterisation des premiers isolats de la nervation noire des Brassicacees en Algerie, cas du chou et chou-fleur	62
2.1 Introduction.....	63
2.2 Matériel et méthodes	65
2.2.1 Prélèvement des échantillons	65
2.2.2 Isolement et purification des isolats.....	65
2.2.3 Identification biochimique :	68
2.2.4 Hypersensibilité sur tabac	68
2.2.5 Amplification de l'ADN par polymerase chain reaction (PCR) :	68
2.2.6 Analyse des produits amplifiés	68
2.2.7 Test du pouvoir pathogène :	69
2.2.8 Amplification et séquençage des gènes de ménage :	69
2.2.9 Analyse de la diversité génétique par MLSA (Multilocus Sequence Analysis)71	
2.3 Résultats.....	72
2.3.1 Caractérisation physiologique et biochimique des souches isolées en Algérie	
2.3.2 Réaction d'hypersensibilité sur tabac	72
2.3.3 Amplification de l'ADN par polymerase chain reaction (PCR) :	75
2.3.4 Test du pouvoir pathogène :	75
2.3.5 Amplification des gènes de ménage :	75
2.3.6 Etude de la diversité génétique par la méthode MLSA (Multilocus Sequence Analysis)	79
2.4 Discussion et conclusion	84
Conclusion générale.....	91
Références bibliographiques.....	95
Annexe	113
Publication	
Résumé	

Liste des tableaux

Données bibliographiques

Tableau 2.1 : Récapitulatif des superficies, des productions et des rendements des principales brassicacées cultivées en Algérie (Données statistiques agricole, 2014).....	5
--	---

Partie expérimentale

Tableau 1.1 : Niveau d'infection estimé sur les graines après inoculation.....	50.
Tableau 1.2 : Comparaison entre trois méthodes de germination pour 10 000 graines ...	56
Tableau 1.3 : Comparaison entre deux méthodes d'enrichissement bactérien la BIO-PCR et la seed-qPCR	58
Tableau 1.4 : Evaluation du seuil de sensibilité de la seed-qPCR.....	59
Tableau 2.1 : Amorces utilisées pour la détection et le séquençage de <i>X. c. pv. campestris</i>	70
Tableau 2.2 : Caractérisation physiologiques et biochimiques des isolats algériens échantillonnés de 2011 à 2014 en comparaison avec des souches de référence.....	72
Tableau 2.3 : Comparaison entre les séquences d'ADN des 4 gènes de ménage des isolats algériens avec les autres espèces de <i>Xanthomonas</i>	77
Tableau 2.4 : Diversité génétique des isolats de <i>Xanthomonas campestris pv campestris</i> déterminée par MLSA.....	80
Tableau 2.5 : Liste des haplotypes formés à partir des séquences de 77 souches de <i>X. campestris pv campestris</i> concaténées.....	81
Tableau 2.6 : Liste des isolats de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> utilisés pour cette étude.....	113

Liste des figures

Données bibliographiques

Figure 2.1	:	Evolution des superficies plantées en crucifères en Algérie.....	6
Figure 2.2	:	Arbre construit avec les données de séquences des gènes (<i>adh 1</i> , <i>atpB</i> , chalcone synthase, ITS, <i>matK</i> , <i>ndhF</i> , <i>pistillata</i> intron 1, <i>rbcL</i> , <i>leafy</i> , and <i>trnL-F</i>) présentant les relations phylogénétique entre quelques tribus appartenant à la famille des brassicacées.....	7
Figure 2.3	:	Photos de quelques brassicacées.....	9
Figure 2.4	:	Les ravageurs des brassicacées cultivées	12
Figure 2.5	:	Symptômes causés par les maladies virales.....	12
Figure 2.6	:	Symptômes de mildiou causé par <i>Peronospora parasitica</i>	13
Figure 2.7	:	Symptômes de l' <i>Alternaria</i> causé par <i>Alternaria brassicae</i>	13
Figure 2.8	:	Symptômes de pourriture molle causés par <i>Erwinia</i> spp sur chou	15
Figure 2.9	:	Symptômes de tache bactérienne sur feuille de chou.	15
Figure 2.10	:	Symptômes de nervation noire causés par <i>X. c. pv. campestris</i>	15
Figure 2.11	:	A) Lésions en forme de « V » typique de nervation noire causées par <i>X. c. pv. campestris</i> B) La maladie du dépérissement des giroflées induite par <i>X. c. pv. incana</i>	18
Figure 2.12	:	Maladie des taches foliaires sur brassicacées provoquée par A) <i>X. c. pv armoraciae</i> , (B) <i>X. c. pv raphani</i> et (C) <i>X. c. pv. abberans</i>	18
Figure 2.13	:	Bactérie du genre <i>Xanthomonas</i> mobile par un flagelle polaire	20
Figure 2.14	:	Cultures bactériennes de <i>X. c. pv. campestris</i> jaune et muqueuse sur un milieu riche gélosé.....	20
Figure 2.15	:	Structure de la Xanthomonadine.....	20
Figure 2.16	:	Le gène de synthèse de la xanthomonadin (xanthomonadin gene cluster) Chez <i>X. c. pv. campestris</i>	21

Partie expérimentale

Figure 2.17	: Portrait de Erwin Frink Smith.....	22
Figure 2.18	: Evolution de la nomenclature des <i>Xanthomonas</i> (Vauterin <i>et al.</i> , 1995).....	27
Figure 2.19	: Localisation schématique des 7 gènes de ménages au niveau du chromosome <i>X. c. pv. campestris</i> souche ATCC 33913.....	28
Figure 2.20	: Cycle infectieux de la nervation noire des crucifères.....	32
Figure 2.21	: Localisation des hydathodes : Voies naturelles d'entrées de la bactérie <i>X. campestris</i> qui se trouvent à l'aboutissement des nervures à l'extrémité des feuilles.....	33
Figure 2.22	: Modèle génétique de l'interaction gène pour gène.....	35
Figure 1.1	: Photos de symptômes sur plantules de chou contaminées par la souche (CFBP 5241) 14 jours après semis.....	51
Figure 1.2	: L'évaluation de la sensibilité de la seed-qPCR pour la détection de <i>X. c. pv. campestris</i>	53
Figure 1.3	: Dynamique de croissance des bactéries au cours de la germination estimée par PCR en temps réel (seed-qPCR).....	54
Figure 1.4	: Comparaison entre trois méthodes de germination pour 10 000 graines.....	56
Figure 2.1	: Parcelle de choux- (variété Arizona) présentant des symptômes typiques de la nervation noir sur une parcelle de choux dans la région de Tipaza.....	64
Figure 2.2	: Exemples d'échantillons présentant des symptômes typiques ayant servi à l'isolement des souches de <i>X. c. pv. campestris</i> en Algérie.....	66
Figure 2.3	: Zones de prospection et de collecte des échantillons.....	67
Figure 2.4	: Aspect des colonies jaunes typiques de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> sur milieu GYCA : Isolat Xcc DZ114.10.....	73
Figure 2.5	: Nécroses rapides autour du point d'inoculation sur feuille de tabac.....	73
Figure 2.6	: PCR réalisée avec les amorces DLH120 et DLH125 (Berg <i>et al.</i> , 2005) et 1052-F et Bac-R (Eden <i>et al.</i> , 1991) sur les différentes souches isolées en Algérie.....	74
Figure 2.7	: Test du pouvoir pathogène réalisé sur un lot de semence de la variété Arizona.....	76

Figure 2.8	: Détection des produits amplifiés par PCR par électrophorèse sur gel d'agarose pour les 4 gènes de ménage.....	78
Figure 2.9	: Arbre phylogénétique en Neighbor-Joining construit de séquences partielles du gène <i>gyrB</i>	85
Figure 2.10	: Arbre phylogénétique en Neighbor-Joining construit de séquences partielles du gène <i>rpoD</i>	86
Figure 2.11	: Arbre phylogénétique (Neighbor-Joining) construit à partir des données concaténées de séquences partielles des deux gènes de ménage (<i>gyrB</i> <i>rpoD</i>).....	87

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ATCC	: American Type Culture Collection
CFBP	: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes
cfu	: Colonies formant unité
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
dNTP	: Deoxynucléotide triphosphate
OEPP	: Organisation Européenne et méditerranéenne pour la protection des végétaux.
PSM	: Poste de Sécurité Microbiologique
PCR	: Polymerase chain reaction
Taq	: ADN polymérase
TBE	: Tris-Borate-EDTA
UV	: Ultra Violet

Introduction générale

Introduction générale

L'Algérie importe annuellement plus de 120 000 tonnes de semences, dont 700 tonnes de semences potagères. Les superficies cultivées en cultures potagères sont de l'ordre de 499103 ha (MADR, 2014).

De nombreux agents pathogènes (virus, procaryotes et champignons) des plantes peuvent être transmis par semences. Cette transmission pose de nombreux problèmes aussi bien pour le producteur que pour l'utilisateur des semences. Ainsi, la présence d'un pathogène sur la graine pourra se traduire très précocement par la mort des plantules issues de la germination, impliquant des conséquences sanitaires dramatiques avec des pertes de rendement importantes. Des attaques plus tardives peuvent également déprécier la qualité du produit récolté et provoquer un risque d'infection pour les nouvelles semences.

Malgré l'utilisation croissante des moyens de lutte phytosanitaire et les progrès considérables dans ce domaine, la fin du vingtième siècle s'est caractérisée par le développement soudain de certaines maladies affectant les cultures ou les produits de récolte. Parmi les facteurs qui expliquent ce phénomène, on peut citer : l'accroissement en volume et en vitesse des échanges internationaux et intercontinentaux, les échanges commerciaux de semences contaminées, l'introduction de cultures nouvelles et de nombreux agents pathogènes qui ont créé des foyers épidémiques dans des zones de culture jusque-là indemnes.

La prise en compte de ces risques impose à la filière semence d'assurer la qualité sanitaire des lots commercialisés par la mise en place de méthodes de lutte visant à diminuer la propagation des semences contaminées. Ceci n'est possible que par l'application de bonnes pratiques culturales ainsi que par la mise au point de méthodes de surveillance sanitaire visant à identifier et éliminer les lots de semences contaminés.

Parmi les légumes cultivés en Algérie, les brassicacées cultivées représentent une part importante de la production nationale : 4,3 % de la production totale des cultures maraîchères (MADR, 2014). Les espèces ayant une importance particulière en Algérie sont les navets (*Brassica rapa*), représentant 40,34% de la production nationale, suivi des choux fleurs (*Brassica oleracea var. botrytis*) avec

38,56 et 21,09 % pour le chou vert (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* est responsable de la nervation noire des crucifères. C'est la bactérie qui cause le plus de dégâts sur les brassicacées au niveau mondial ; cette bactérie est transmise par les semences. En Algérie, des foyers de nervation noire ont été observés pour la première fois en 2011 dans plusieurs parcelles de production de choux et de choux fleurs, dans l'algérois dans la région de Rouïba.

Les semences contaminées constituent un moyen de conservation et une voie de transmission chez les bactéries phytopathogènes (Blakeman, 1991). Chez les brassicacées, les semences infectées par *X. campestris* constituent une source d'inoculum primaire de la maladie et représentent la principale source de contamination (Cook *et al.*, 1952; Schaad *et al.*, 1980 ; Schultz and Gabrielson, 1986).

L'importance des enjeux économiques liés au contrôle phytosanitaire impose la recherche de nouvelles méthodes de diagnostic et de détection des agents phytopathogènes avec comme objectif l'amélioration des critères principaux permettant d'évaluer l'intérêt potentiel d'une technique, à savoir la sensibilité, la spécificité, et la facilité d'emploi des tests.

Dans le cadre du contrôle phytosanitaire et quelle que soit la technique utilisée, les résultats d'analyses conditionnent le classement des parcelles de multiplication (matériel initial, de propagation et/ou certifié).

A ce niveau deux types d'erreurs peuvent se produire.

1/ Un résultat faussement positif si un lot de semences sain est déclaré infecté à l'issue de l'analyse par manque de spécificité du diagnostic. Cette situation peut engendrer le déclassement ou le refus du lot, alors que son niveau d'infection est au-dessous de la norme fixée par la réglementation.

2/ Un résultat faussement négatif si le test conclu par manque de sensibilité, l'absence de l'agent pathogène alors que le lot de semences est contaminé.

Cette situation peut conduire à accepter le lot, alors que son niveau d'infection réel est supérieur au seuil autorisé par la réglementation.

Tout protocole d'analyse réalisé aux laboratoires chargés du contrôle phytosanitaire, doit prendre en compte ces deux types d'erreurs. En effet la

fiabilité de l'analyse repose à la fois sur les caractéristiques de sensibilité et de spécificité du test de diagnostic et sur l'adéquation de l'échantillonnage.

Les outils de diagnostic disponibles pour la détection de *Xanthomonas* sont basés sur l'isolement direct sur milieux appropriés des bactéries suspectes et leur identification finale par la mise en place d'un test de pouvoir pathogène sur plante indicatrice. Ces tests sont souvent longs et coûteux. Pour cela des tests sérologiques et moléculaires ont été développés pour certifier les lots de semences.

Les anti-séras développés contre le *Xanthomonas* n'ont pas eu un niveau de spécificité suffisant pour détecter spécifiquement les pathovars. Des réactions croisées avec des *Xanthomonas* non pathogènes existants limitent leur utilisation dans les procédures de détection.

La PCR utilise comme substrat l'ADN qui est une molécule stable. L'obtention de résultat positif par ce type de technique ne rend pas compte, théoriquement de la viabilité des micro-organismes dans l'échantillon analysé. Ce qui peut entraîner l'obtention de «faux positifs» en terme de contamination de l'échantillon par des bactéries phytopathogènes.

-La première partie : de nos travaux de recherche a pour objectif de mettre au point une technique moléculaire permettant la détection des cellules vivantes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, bactérie responsable de la nervation noire des crucifères, et transmise par les semences.

L'étude que nous envisageons de réaliser est donc le développement d'un outil moléculaire qui allie sensibilité, spécificité et rapidité. Devant les exigences de la législation internationale vis-à-vis du contrôle phytosanitaire des semences qui va imposer de renseigner sur la viabilité des bactéries dans les lots de semences. Cette méthode est basée sur un enrichissement par germination des semences contaminées couplée à une PCR en temps réel (**seed -qPCR**).

La deuxième partie de notre travail a été consacrée à la prospection, l'échantillonnage, l'identification et à la caractérisation de souches de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolées à partir de parcelles présentant

des symptômes similaires à la nervation noire des crucifères cultivées dans différentes régions de l'Algérie.

Cent soixante dix isolats ont été identifiés et caractérisés par des tests biochimiques, biologiques et moléculaires. L'étude de la diversité génétique au sein des souches algériennes isolées a été réalisée par la méthode moléculaire à haut débit **MLSA** (Multilocus Sequence Analysis). Cette approche est basée sur l'analyse du polymorphisme des gènes de ménage (housekeeping-genes) sur un nombre important de souches (Gevers *et al.*, 2005). Ces gènes sont présents au niveau de toutes les souches et codent pour des protéines indispensables pour la survie des organismes.

Nous avons analysé notre collection de souches par le séquençage nucléotidique de deux gènes de ménage en l'occurrence le gène *gyrB* qui code pour la sous-unité B de l'ADN gyrase et le gène *rpoD* qui code pour le facteur sigma 70 de l'ARN polymérase.

2.1 Les Brassicacées

2.1.1 Généralités

Les brassicacées, anciennement nommées crucifères, constituent une importante famille des plantes dicotylédones, aussi bien par le nombre d'espèces qu'elles regroupent que par son importance économique. Cette famille comprend, environ, 3700 espèces réparties en 338 genres (Al-Shehbez *et al.*, 2006). Les brassicacées appartiennent à la classe des *Magnoliopsida*, la sous-classe des *Dilleniidae* et à l'ordre des *Capparales* (Bailey *et al.*, 2006). Ce sont essentiellement des plantes herbacées présentes surtout dans les régions tempérées de l'hémisphère nord.

2.1.2 Importance économique des brassicacées

Les brassicacées forment l'une des familles les plus importantes sur le plan économique. Les espèces cultivées du genre *Brassica*, notamment, affichent une grande diversité et constituent des sources de légumes, d'huiles, de légumes condimentaires, de fourrage et d'espèces ornementales. Les brassicacées représentent une proportion importante des productions maraîchères. La production mondiale de chou est de 70 millions de tonnes, c'est le troisième légume le plus cultivé derrière la pomme de terre (325 millions de tonnes) et la tomate (120 millions de tonnes) (source FAO, 2012). Les principaux pays producteurs sont la Chine (34,1 millions de tonnes) et l'Inde (6 millions de tonnes) (source FAO, 2012). La culture des brassicacées en Algérie occupe une part importante de la production nationale. Les superficies cultivées sont en perpétuelles augmentation et peuvent atteindre 19 537 ha (Figure 2.1) avec une production totale estimée à 4038919 quintaux par an (MADR, 2014).

Tableau 2.1 : Récapitulatif des superficies, des productions et des rendements des principales brassicacées cultivées en Algérie (Données statistiques agricole, 2014).

Espèces	Superficie (ha)	Production.(qx)	Rendement qx/ha
Choux verts	3740	852009	227,8
Choux fleurs	6967	1557610	223,6
Navets	8830	1629300	184,4

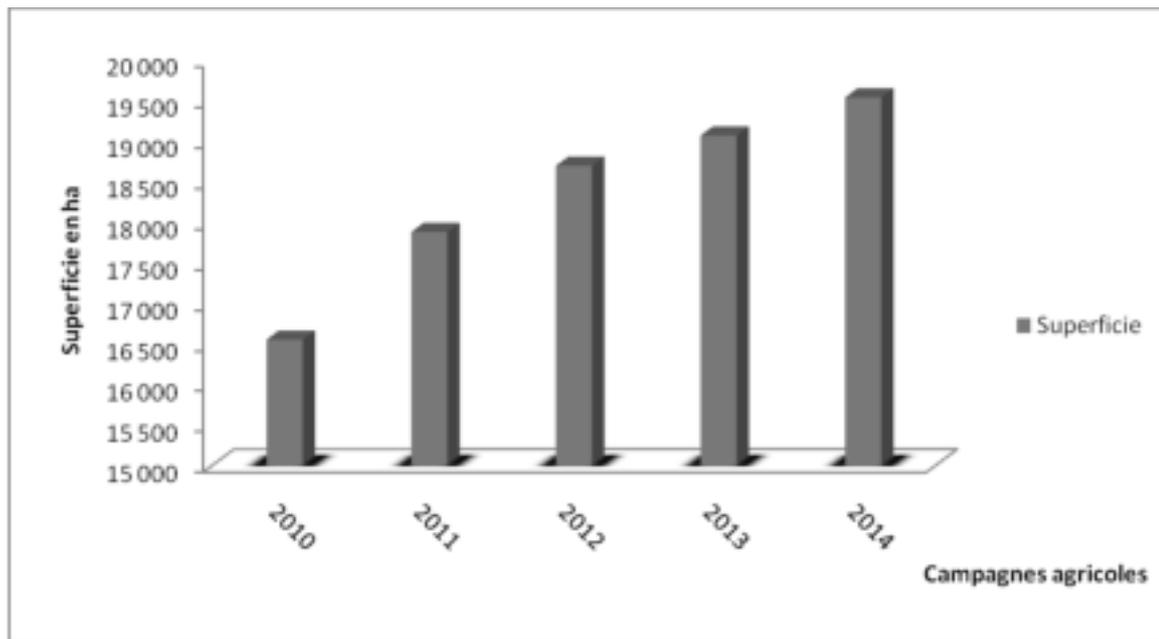


Figure 2.1 : Evolution des superficies plantées en crucifères en Algérie

2.1.3 Origine et classification des brassicacées

L'étude phylogénétique réalisée sur la famille des brassicacées a mis en évidence 338 genres répartis en 25 tribus (Figure 2.2). La plus étudiée est celle des *Brassicaceae* en raison de son importance économique (Hedge, 1976; Al-Shehbaz 1984; Appel and Al-Shehbez, 2003 et Al-Shehbez, 2006). Elle regroupe, en effet, 46 genres et environ 230 espèces (Al-Shehbez *et al.*, 2006). Cette tribu contient les genres *Brassica*, *Raphanus* et *Eruca*. Le genre *Brassica* présente le polymorphisme le plus important observé chez les plantes cultivées. Ce genre fournit l'huile avec le colza (*B. napus*), les moutardes, la moutarde noire (*B. nigra*), la moutarde indienne ou brune (*Brassica juncea*) et la moutarde éthiopienne (*Brassica carinata*), les navets et les choux chinois (*B. rapa*; syn. *B. campestris*). L'espèce *B. oleracea* offre une très grande variété de légumes dont le chou-fleur (*B. o. var. botrytis*), le chou pommé (*B. o. var. capitata*), le chou-rave (*B. o. var. gongylodes*), le chou fourrager (*B. o. var. acephala*), les choux de Bruxelles, (*B. o. var. gemmifera*) et le brocoli (*B. o. var. italica*) (Figure 2.3). Cette grande diversité au sein de ce genre est favorisée par la plasticité de son génome (Bailey *et al.*, 2006) car tous les choux sont inter-fertiles (Paterson *et al.*, 2006).

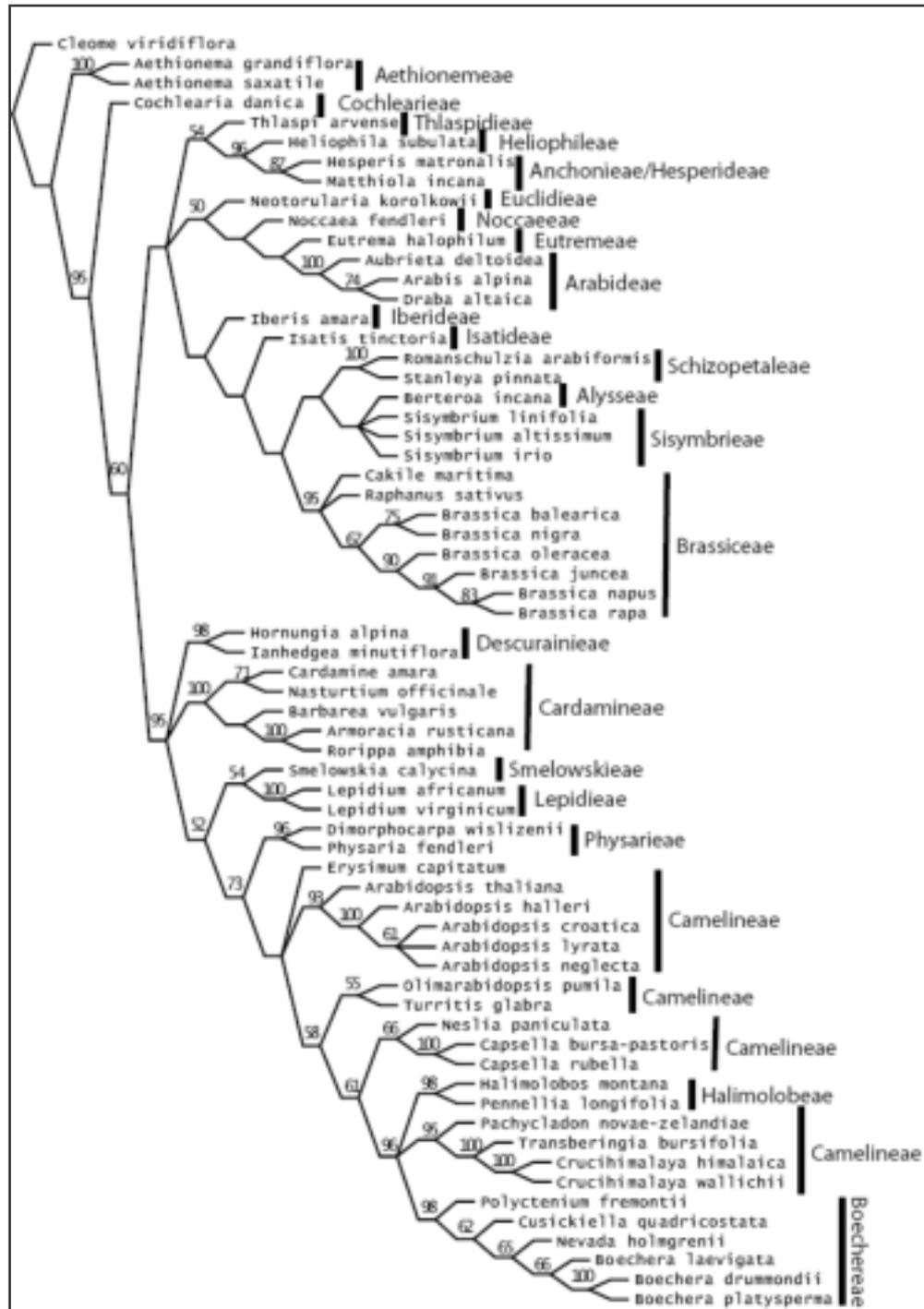


Figure 2.2 : Arbre construit avec les données de séquences des gènes (*adh 1*, *atpB*, chalcone synthase, ITS, *matK*, *ndhF*, pistillata intron 1, *rbcL*, *leafy*, and *trnL-F*) présentant les relation phylogénétique entre quelques tribus appartenant à la famille des brassicacées (Bailey *et al.*, 2006)

Les brassicacées sont probablement apparues depuis plus de 50 millions d'années (Koch *et al.*, 2003). La dispersion des espèces dans le monde a été réalisée au cours des siècles par les migrations, les guerres et les échanges commerciales entre les peuples des différents continents. La moutarde noire (*Brassica nigra*) est une plante indigène de la région méditerranéenne et la navette (*Brassica rapa*) plante indigène de l'Europe et d'Asie étaient à l'origine, des plantes adventices associées aux céréales depuis le début de l'agriculture au néolithique (Sauer, 1993). Leur dispersion dans le monde s'est faite à travers les contaminations des lots de semences de céréales, (Sauer, 1993). Le chou, est à l'origine, une plante sauvage cultivée sur les terres occidentales qui s'est répandue dans les terres de la Méditerranée. De nos jours, les brassicacées sont cultivées dans la plupart des régions du monde, plus particulièrement dans les zones tempérées de l'hémisphère nord, du bassin méditerranéen à l'Asie centrale (Stevens, 2001).

2.1.4 La diversification des brassicacées cultivées

La plupart des légumes cultivés ont été sélectionnés pour obtenir de nouvelles plantes, améliorées en fonction du choix d'un critère donné et suivant l'organe consommé. Ces améliorations peuvent être portées sur les graines, les portes graines, les fruits ou les racines. L'espèce *Brassica oleracea* affiche particulièrement une grande diversité. Les formes ont été sélectionnées pour agrandir les méristèmes végétatifs de l'apex (chou) ou les feuilles axillaires (chou de Bruxelles), pour obtenir des formes avec une prolifération des méristèmes floraux (chou-fleur) ou des boutons floraux (brocoli), (Peterson *et al.*, 2006).

Le genre *Brassica* est le plus proche d'*Arabidopsis*. Le pourcentage d'identité nucléotidique est plus de 85% (Cavell *et al.*, 1998). *Arabidopsis thaliana* ou Arabette des Dames est la plante modèle des biologistes et des généticiens ; elle est la plus utilisée dans les laboratoires de recherche. Elle possède le plus petit génome végétal connu ; elle fut également la première espèce végétale à avoir son génome séquencé (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

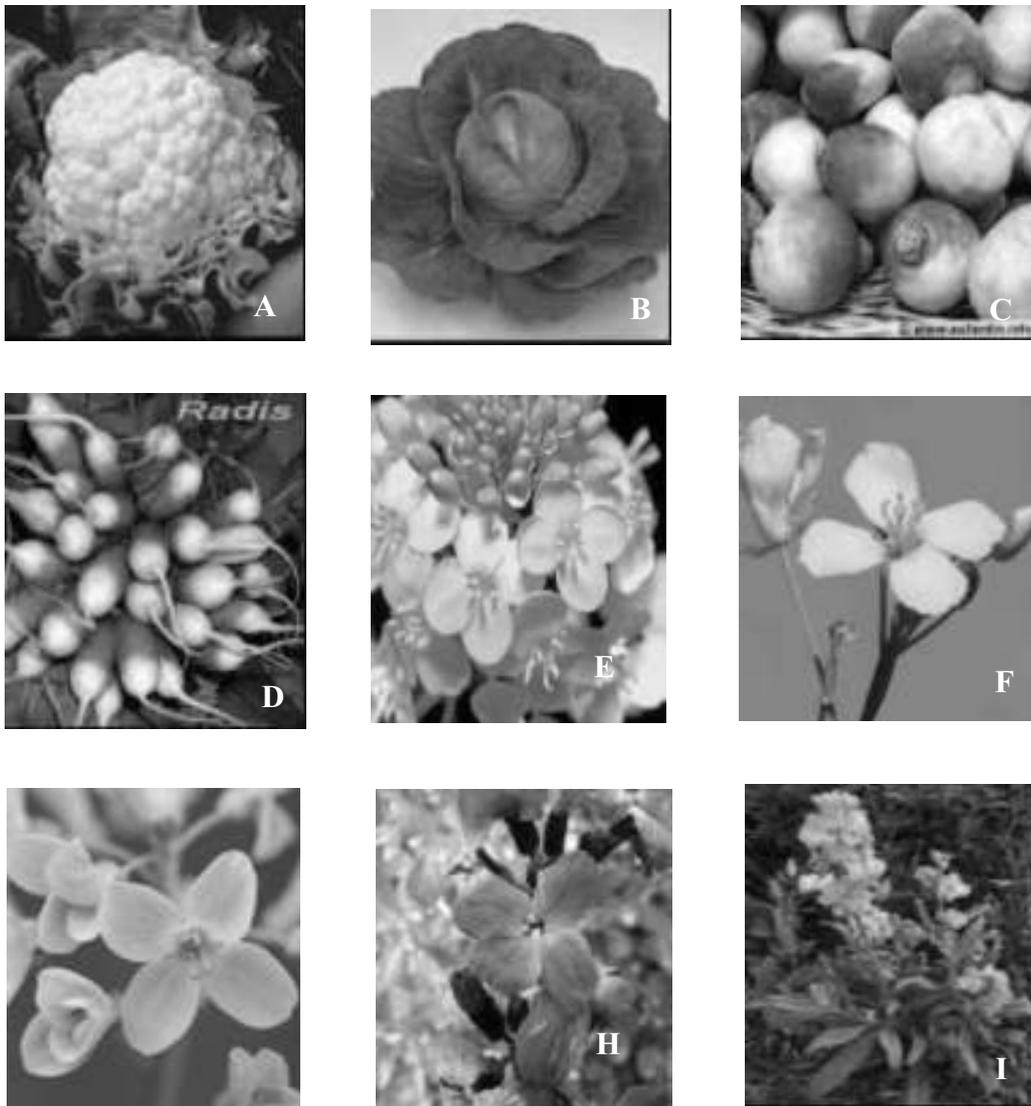


Figure 2.3 : Photos de quelques brassicacées

Chou fleur (*Brassica olearacea* var. *Botrytis*), **B**) Chou pommé (*Brassica olearacea* var. *capitata*), **C**) Navet (*Brassica rapa*), **D**) Radis, (*Raphanus sativus*). **E**) Colza (*Brassica napus*), **F**) Moutarde blanche (*Sinapis alba*), **G**) Cardamine des prés (*Cardamine pratensis*) **H**) Giroflée (*Cheiranthus cheiri*), **I**) Violler (*Matthiola sinuata*).

Cette plante modèle est utilisée en laboratoire pour étudier les mécanismes d'interaction entre les plantes et les pathogènes dans le cadre des programmes d'amélioration génétique pour définir les caractères de sélections (Parker *et al.*, 1993; Lan and Paterson, 2000; O'Neil and Bancroft, 2000).

2.1.5 Données botaniques

L'appareil végétatif

Les brassicacées sont des plantes annuelles ou vivaces, rarement arbustives et terrestres. L'appareil végétatif se développe la première année et l'appareil reproducteur l'année suivante. Le feuillage est alterne à stipules réduits et caducs. La floraison nécessite une période de vernalisation. (Watson and Dallwitz, 1992 ; Stevens, 2001). L'appareil végétatif est riche en essence sulfurée d'où la saveur piquante.

L'appareil reproducteur (fleurs)

Les crucifères sont des plantes herbacées, leurs fleurs sont parfaites, incluant étamines et pistils; elles possèdent 4 pétales libres aux limbes en croix, insérés à un même cercle, 4 sépales avec deux verticilles de 2 sépales présentés en croix d'où le nom de crucifère; elles sont bisexuées et assemblées en grappes. Elles sont composées de six étamines dont deux plus courtes, un androcée didyname, deux carpelles soudés avec des placentas pariétaux reliés par une membrane séparant l'ovaire (Chalandre, 2000).

Les fruits Parker *et al.*, 1993

Les fruits sont allongés (siliques) ou presque aussi larges que longs (silicules). Ils s'ouvrent, généralement, par une valve de chaque côté du fruit, libérant les graines à maturité, et ne laissant que la cloison transversale qui séparait les 2 loges du fruit. Les silicules sont parfois comprimées et de formes variées (Dupond et Guignard, 2007).

2.2 Les ravageurs et les maladies des brassicacées

Les brassicacées peuvent être attaquées par de multiples maladies et ravageurs durant leur cycle de développement. Les dégâts engendrés peuvent non seulement entraîner des pertes de rendement importantes, mais aussi déprécier la valeur commerciale des légumes, surtout lorsque la variété utilisée est sensible et que les conditions de l'environnement sont favorables au développement des agents pathogènes.

2.2.1 Les ravageurs

Les ravageurs sont des ennemis redoutables des brassicacées maraîchères dont la plupart appartiennent aux diptères, coléoptères, lépidoptères et pucerons (Figure 2.4). Ils causent des dégâts importants et affectent la qualité commerciale des crucifères cultivées. Des infestations importantes provoquent des déformations foliaires et peuvent empêcher la croissance des jeunes plantes. Des infestations faibles peuvent réduire la qualité des pommes de choux de Bruxelles et de choux pommés et des plantes cultivées pour leurs racines. Lorsque les tissus sont endommagés, les plantes deviennent plus sensibles aux infections fongiques et bactériennes secondaires (Walker, 2005).

2.2.2 Maladies

2.2.2.1 Les maladies virales

Les maladies virales sont souvent transmises par vecteurs, tels que les *Brevicoryne brassicae* et *Myzus persicae* qui transmettent la mosaïque du chou fleur (Cauliflower mosaic virus, **CaMV**) (Figure 2.5 A) et la mosaïque du navet (Turnip mosaic virus, **TuMV**) (Figure 2.5 B). Les plantes sont parfois très sérieusement atteintes et présentent des lésions nécrotiques, des feuilles des cœurs recroquevillés et rabougris et les dégâts peuvent atteindre les 100% (Anonyme, 1998). Selon Messiaen *et al.*(1991), trois virus transmis par des coléoptères sont également rapportés : l'agent de la mosaïque jaune du navet (Turnip yellow mosaic virus, **TYMV**), le virus de la rosette du navet (Turnip rosette virus, **TRV**) et le virus de la mosaïque du radis.

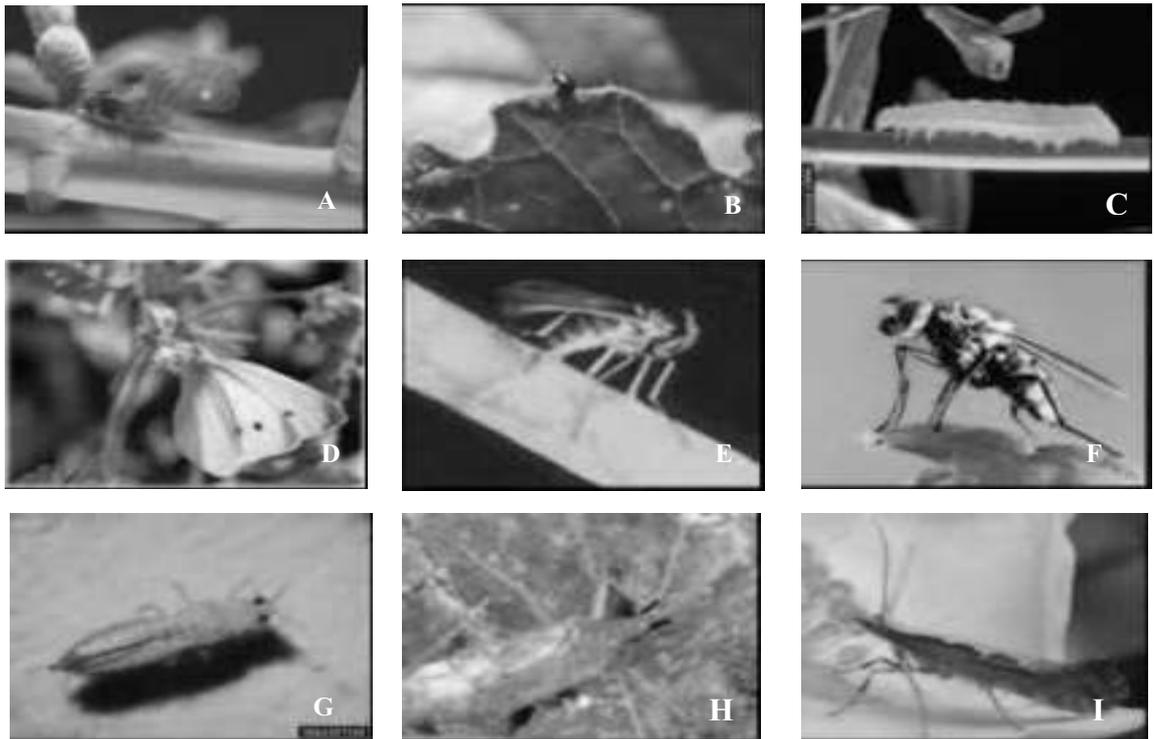


Figure 2.4 : Les ravageurs des Brassicacées cultivées :

A) Le puceron cendré du chou (*Brevicoryne brassicae*; **B)** L'Altise des crucifères (*Phyllotreta spp*) ;
C) L'Arpenteuse de la luzerne (*Autographa californica*) ; **D)** La Pieride-chou (*Pieris rapae*);
E) La Cécidomyie des crucifères (*Contarinia nasturtii*) ; **F)** La mouche du chou (*Delia radicum*);
G) Les thrips (*Thrips tabaci*, **H)**; L'Aleurode du chou (*macrolophus aleurode*) ; **I)** La fausse teigne des brassicacées (*Plutella-xylostella*) (Chaput, 2000).

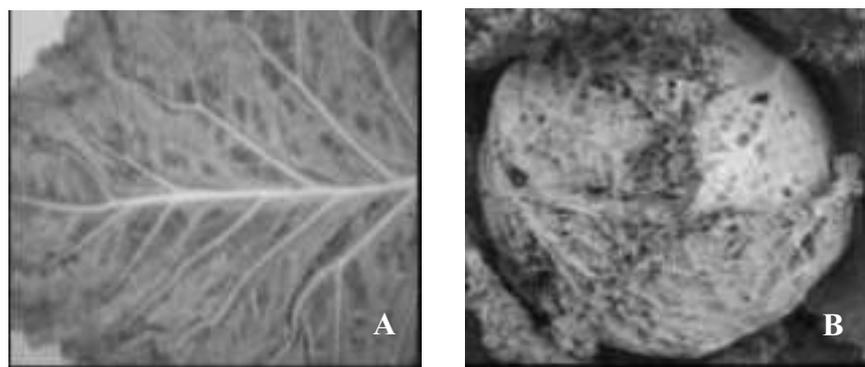


Figure 2.5 : Symptômes causés par les maladies Virales

A) Virus de la mosaïque du chou-fleur (Caulifmower Mosaic Virus **CaMV**) sur chou-fleur (Shahraeen *et al.*, 2003)

B) Virus de la mosaïque du navet (Turnip mosaic virus **TuMV**) sur Chou (Korkmaz *et al.*, 2006).

2.2.2.2 Les maladies fongiques

Les pathogènes fongiques peuvent causer de sérieux problèmes sur les crucifères cultivées partout dans le monde. Ils peuvent attaquer les plantes tout au long de leur croissance au champ mais aussi lors de l'entreposage. Ils se propagent à partir des semences contaminées, d'adventices ou par les blessures. Sous les conditions climatiques propices, les plantes peuvent être sévèrement atteintes et ne sont plus commercialisables Wukasch (1990), Walker (2005). Les maladies les plus dangereuses inféodées aux crucifères sont, le mildiou causé par *Peronospora parasitica* (Figure 2.6) et l'alternariose causée par *Alternaria brassicae* et *A. brassicicola* (Figure 2.7)

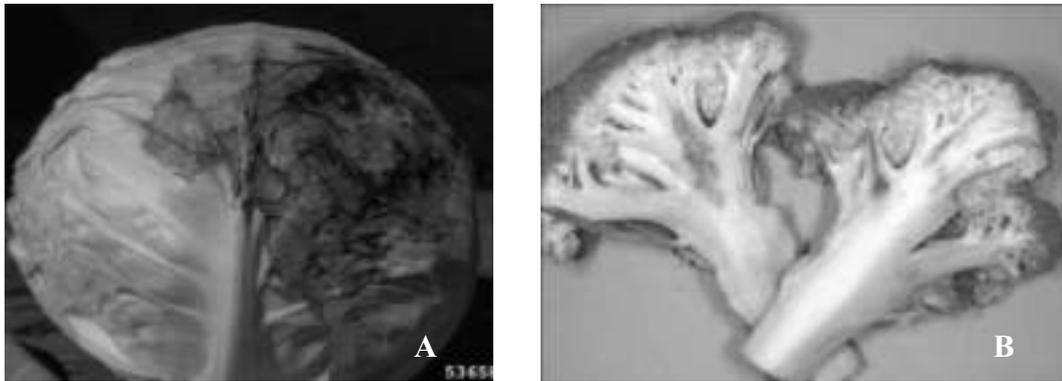


Figure 2.6 : Symptômes de mildiou causés par *Peronospora parasitica*
A) sur feuilles de chou **B)** sur la pomme du brocoli (<http://www.ipmimages.org/>)

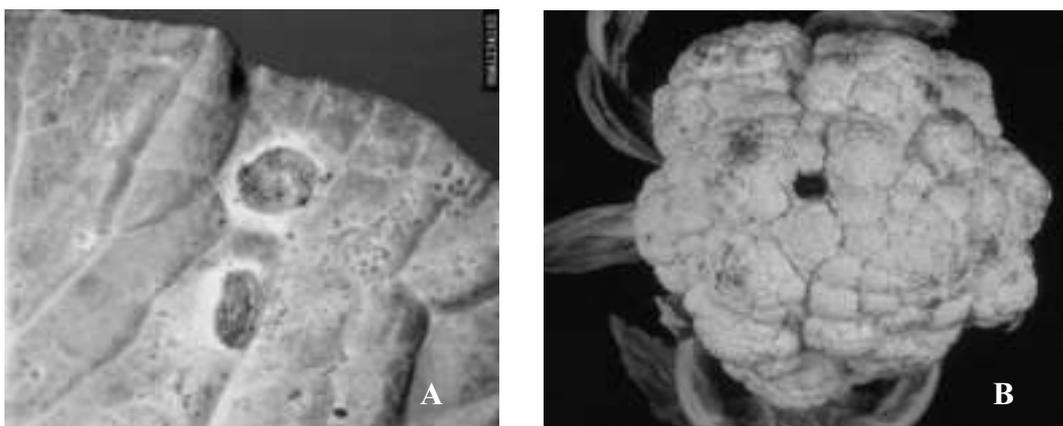


Figure 2.7 : Symptômes de l'Alternaria causés *Alternaria brassicae* **A)** sur feuilles de chou **B)** sur chou-fleur (<http://www.ipmimages.org/>)

2.2.2.3 Les maladies bactériennes des brassicacées cultivées

De nombreuses maladies bactériennes peuvent être responsables de pertes de rendement considérables chez les brassicacées cultivées.

La pourriture molle causée par *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas cichorii* et *P. marginalis*. Cette maladie est très communément observée sur de nombreuses cultures de choux, qu'ils soient cultivés pour leur feuillage, leur inflorescence ou leur racine. Elle peut provoquer des dégâts particulièrement importants sur les choux pommés en conservation, les choux chinois, les choux fleurs, les choux verts et les navets. Toutes les parties de la plante peuvent être atteintes par les pourritures molles, y compris les tissus internes des tiges et des racines. L'invasion bactérienne a généralement lieu, à la suite de dégâts dus au gel, à des attaques de ravageurs et de maladies ou à des blessures mécaniques, et se développe surtout dans des conditions chaudes. Les tissus sont rapidement décomposés en une masse molle, visqueuse, qui dégage une odeur nauséabonde (Anonyme, 1998). Selon Wukasch (1990), la maladie peut occasionner des pertes aussi bien en entrepôt, durant le transport que dans les champs (Figure 2.8).

La tache bactérienne causée par *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*)

Le pathogène est principalement transmis par les semences, il est véhiculé à la surface ou à l'intérieur de celle-ci. La contamination se fait via les stomates ou les blessures provoquées par les insectes, le gel ou les dégâts mécaniques (Anonyme, 1998). Cette maladie bactérienne est importante sur choux-fleurs, en particulier sur les zones côtières, mais sa gamme d'hôtes comprend également le brocoli et le chou de Bruxelles. Les autres *B. oleracea* sont moins sensibles (Messiaen *et al.*, 1991). Les symptômes peuvent apparaître, en pépinière, sous forme de petites lésions aqueuses, anguleuses ou rondes, devenant par la suite plus sombres et entourées d'un halo chlorotique. Les lésions peuvent se rejoindre et former des taches allongées plus importantes. Des contaminations sévères des plantules peuvent provoquer la mort des plantes. Des symptômes similaires se produisent en plein champ. De plus, de nombreuses taches de 5-7 mm de diamètre entourées d'une zone aqueuse peuvent se former à la face inférieure des feuilles. Ces taches noircissent par la suite et s'entourent d'un halo jaune. Les feuilles



Figure 2.8 : Symptômes de pourriture molle causés par *Erwinia* spp sur chou (Wukasch, 1990)

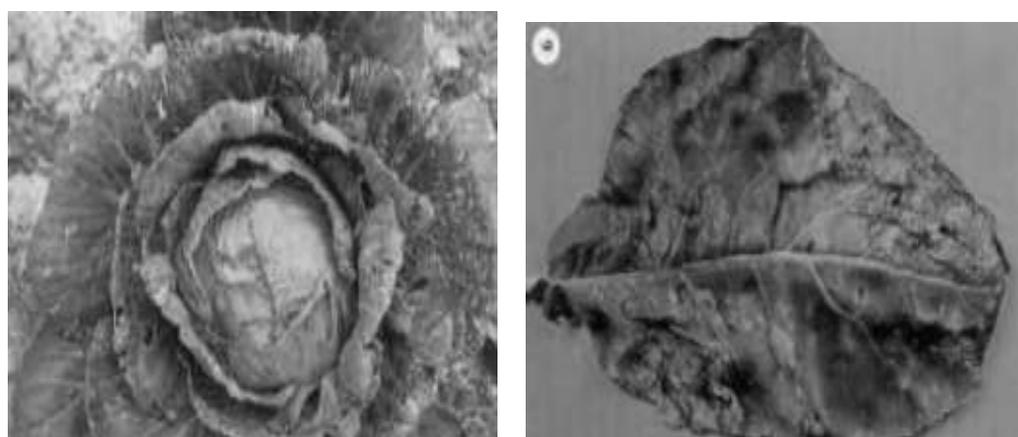


Figure 2.9 : Symptômes de tache bactérienne sur feuille de chou (Wukasch, 1990)

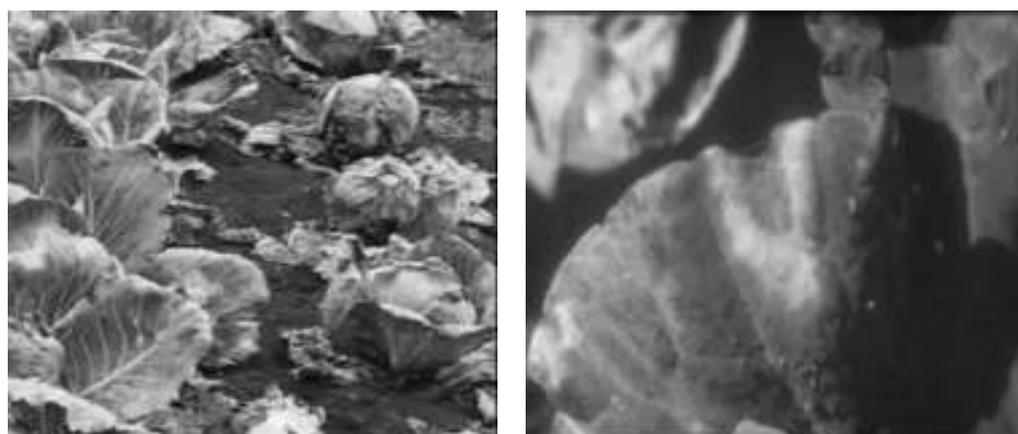


Figure 2.10 : Symptômes de la nervation noire causés par *X.c. pv. campestris* (FARC, 2005)

malades sont crispées et déformées donnant à la plante un aspect déchiqueté (Figure 2.9).

La nervation noire

La nervation noire est causée par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Elle est de distribution mondiale, et considérée comme l'une des plus destructives des brassicacées cultivés (Figure 2.10) (Williams, 1980).

2.3 Les bactérioses des brassicacées causées par

Xanthomonas campestris

2.3.1 Les maladies vasculaires

Deux bactérioses vasculaires dues à des *X. campestris* sont inféodées aux *Brassicaceae*. Il s'agit de la nervation noire due à *X. c.* pv. *campestris* et le dépérissement des giroflées due à *X. c.* pv. *incanae*. Cette maladie a été décrite pour la première fois par Pammel en 1895 sur le rutabaga (*Brassica napus* var. *napobrassica*). Les symptômes se caractérisent par des lésions jaunes en forme de «V» sur le bord des feuilles accompagnées d'un noircissement des nervures qui peut s'étendre jusqu'au pétiole et la tige (Figure 2.11 A). Une maladie similaire a été décrite par Burkholder en 1941 sur brassicacées sauvages notamment la barbarée vulgaire (*Barbarea vulgaris*). La bactérie décrite est très proche de *X. c.* pv. *campestris* de point de vue morphologique, cependant elle ne provoque de symptômes que sur son hôte d'isolement (Bradburly, 1986). Ce pathogène est actuellement connu sous le nom de *X. c.* pv. *barbareae*. Une étude récente (Fargier et Manceau, 2007) a montré que ces souches doivent être classées chez *X. c.* pv. *campestris*.

Une autre maladie a été décrite sur giroflées, dont les symptômes ressemblent à *X. c.* pv. *campestris* (Hall, 1900; Faber, 1907). Cependant l'étude du pouvoir pathogène (Kendrick and Baker, 1942) de la bactérie isolée a montré que bien que ce pathogène ressemble morphologiquement à *X. c.* pv. *campestris*, les symptômes qu'il engendre sur giroflées sont différents. Ils se caractérisent principalement par un flétrissement des feuilles ainsi que des nécroses sur la tige (Figure 2.11 B). Cette maladie est causée par *X. c.* pv. *incanae*.

2.3.2 Les maladies du parenchyme

Les symptômes de feuilles maculées sur raiforts ont été observés pour la première fois aux USA en 1926 (McCulloch, 1929). La bactérie semble avoir de nombreuses caractéristiques en commun avec *X. c. pv. campestris* mais ne provoque pas de maladie vasculaire mais plutôt une maladie du parenchyme.

Elle est actuellement connue sous le nom de *X. c. pv. armoraciae*, dont les symptômes se caractérisent par l'apparition de petites taches vertes foncées sur la face inférieure des feuilles qui s'étendent sur la face supérieure à un stade avancé (McCulloch, 1929 (Figure 2.12.A).

White and Gardner (1929) ont décrit une bactériose qui provoque des taches sur radis et navet. Le pathogène, *X. campestris pv. raphani*, cause sur les feuilles des taches circulaires noires qui deviennent par la suite marron clair et le plus souvent auréolées d'une zone jaunâtre. Les lésions peuvent s'étendre jusqu'au pétiole (White, 1930). D'après White et Gardner (1929), ce pathogène a une large gamme d'hôtes. Il provoque des symptômes similaires sur chou, chou frisé, chou-fleur, chou de Bruxelles mais également sur tomate, tabac et poivron. *X. campestris pv. raphani*, est différent de *X. c. pv. campestris* car il ne provoque pas d'infection vasculaire (Figure 2.12.B) (White, 1930).

X. c. pv. aberrans responsable de la maladie des taches foliaires du chou-fleur décrit pour la première fois par Knôsel (1961) (Figure 2.12.C). Ce pathogène est reclassé sous le nom *X. c. pv. raphani* du fait de leur convergence pathologique et moléculaire (Fargier et Manceau, 2007).

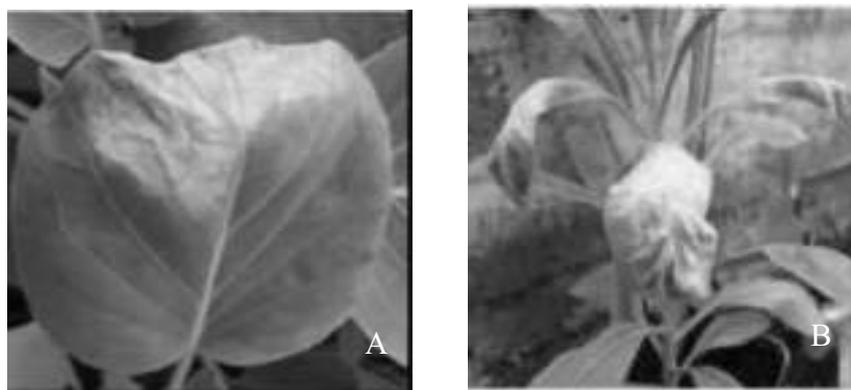


Figure 2.11 : (A) Lésion en forme de « V » typique de nervation noire causée par *X. c. pv. campestris* (B) La maladie du dépérissement des giroflées induite par *X. c. pv. incanae*). (Fargier and Manceau, 2007).

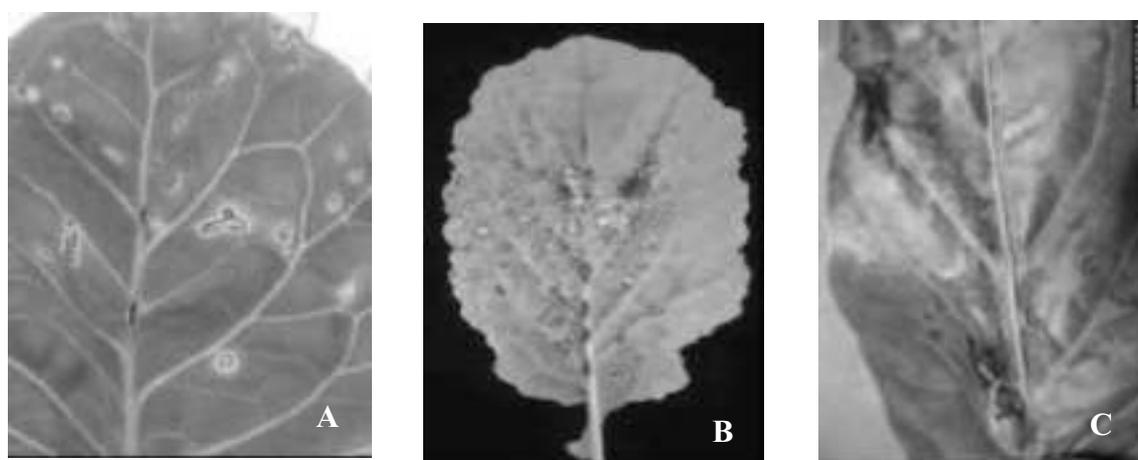


Figure 2.12 : Maladie des taches foliaires sur brassicacées provoquée par : (A) *X. c. pv armoraciae*, (B) *X. c. pv raphani* et (C) *X. c. pv abberans* (Vicente, et al., 2006).

2.4 Les caractéristiques morphologiques et physiologiques des *Xanthomonas*

Les *Xanthomonas campestris* sont des bactéries de type bacille, gram négatif, d'une taille d'environ 0,4 à 0,6 µm de large et 0,8 à 2 µm de long (Swing et Civerole, 1993), mobiles par un flagelle polaire (Saddler and Bradbury, 2005) (Figure 2.13). Elles se retrouvent le plus souvent seules, par paires ou regroupées sous forme de chaîne (Swing et Civerole, 1993).

Leur métabolisme respiratoire est aérobie stricte. Les *Xanthomonas* sont catalase positive, oxydase négative et ne réduit pas les nitrates. Ils sont riches en acides gras où les lipides représentent 20% du poids de la bactérie (Lechevalier and Lechevalier, 1988); plus de 99% des *Xanthomonas* contiennent 9 acides gras parmi lesquelles, trois acides gras 11 :0 iso, 11 :0 iso 3OH et 13 :0 iso 3OH sont caractéristiques du genre et ne sont pas détectés chez d'autres bactéries phytopathogènes (Yang *et al.* 1993, Swing *et al.*, 1993).

Les cellules de *Xanthomonas* se cultivent à un optimum thermique compris entre 25 et 30°C et d'un pH voisin de 6,5. Elles ne se développent pas à un pH inférieur à 4,5 et à des températures inférieures à 4°C. Elles sont incapables de se développer en présence de 6 % de NaCl et 30% de glucose (Swing, 1993).

Les *Xanthomonas* sont chimio-organotrophes, c'est-à-dire qu'ils puisent leur énergie à partir de composés organiques (Saddler & Bradbury, 2005)

Les colonies sont la plupart du temps jaunes sur un milieu riche gélosé, YDC (yeast extract dextrose carbonate) (Figure 2.14).

Les *Xanthomonas* ont la particularité de produire des caroténoïdes appelées xanthomonadines qui pigmentent les colonies en jaune. Cette pigmentation est probablement essentielle pour la survie des *Xanthomonas* en phase épiphyte, ce qui est un facteur important dans le cycle de vie de la bactérie et aurait également un rôle de protection contre les agressions photobiologiques (Poplawsky *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 2002).

La bactérie produit des polysaccharides extracellulaires (EPS), dont le constituant principal est le xanthane; ils donnent un aspect mucoïde à la colonie. La production des EPS est associée à la virulence chez *X. campestris* (Daniels *et al.*, 1984; Poplawsky and Chun, 2002; Shaw *et al.*, 1988).



Figure 2.13 : Bactérie du genre *Xanthomonas* mobile par un flagelle polaire (www.inra.fr)



Figure 2.14 : Cultures bactériennes de *X. c. pv. campestris* jaunes et muqueuses sur un milieu riche gélosé (Roberts *et al.*, 2006)

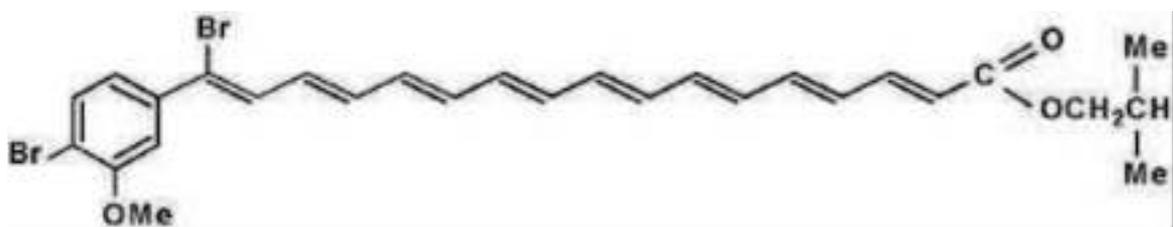


Figure 2.15 : Structure de la Xanthomonadine (Andrewes *et al.*, 1976)

La biosynthèse de la xanthomonadine et celle des EPS est assurée par la sous unité *pigB* du cluster de gènes xanthomonadine (xanthomonadin gene cluster) (Figure 2.16), (Poplawsky and Chun, 1997; Poplawsky and Chun, 1998; Barber *et al.*; 1997). Leur régulation est contrôlée par une phéromone extracellulaire DF (Diffusible Factor) (Poplawsky *et al.*, 2005). Les EPS jouent un rôle important dans la tolérance à la dessiccation, permettent l'attraction de l'eau et des ions au niveau des espaces intracellulaires de façon à ce que les bactéries ne se dessèchent pas (Wilkinson 1958; Roberson and Firestone, 1992).

Le xanthane est aussi un produit industriel et sa production dans le monde est estimée à plus de 20 000 tonnes. L'utilisation du xanthane en industrie pétrolière, alimentaire, textile et en cosmétique, s'est établie grâce aux propriétés physiques du polysaccharide (Becker *et al.*, 1998).

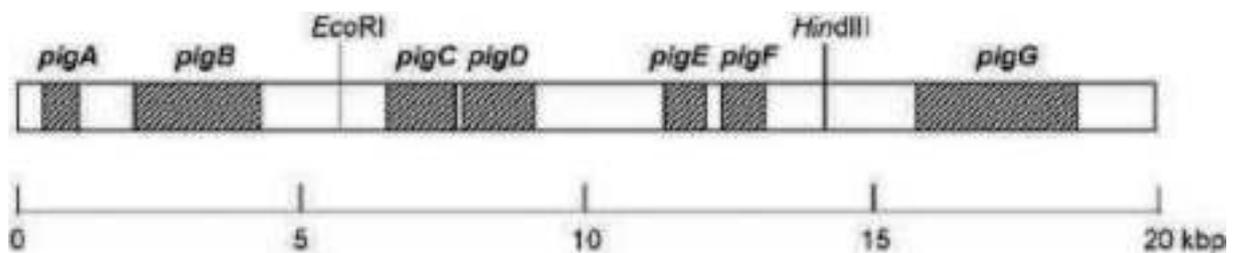


Figure 2.16 : Le gène de synthèse de la xanthomonadine (xanthomonadin gene cluster) Chez *X. c. pv. campestris* (Poplawsky *et al.*, 1997).

2.5 Position taxonomique des *Xanthomonas*

2.5.1 Quelques généralités sur les bactéries phytopathogènes

Les bactéries phytopathogènes sont des micro-organismes associées aux végétaux et qui sont capables de provoquer des maladies dont les répercussions économiques peuvent être catastrophiques sur les cultures. Les bactéries phytopathogènes sont pour la plupart de forme bacillaire, Gram négatif et appartiennent au phylum des *Proteobacteria*. Quelques unes, cependant sont Gram positif et appartiennent aux phyla des *Firmicutes* et des *Actinobacteria*. Les maladies bactériennes chez les végétaux sont décrites depuis l'Antiquité :

pourritures, nécroses, jaunissements, dépérissements, chancres (Paulin *et al.*, 2001). Ce n'est qu'en 1878 qu'un savant français, Edouard Prillieux, mit en évidence pour la première fois chez un végétal l'étiologie bactérienne d'une infection parasitaire en attribuant la maladie du blé rose à *Micrococcus tritici* aujourd'hui dénommée (*Erwinia rhapontici*) (Maurin *et al.*, 1999). Cette étude fut poursuivie par la description de la maladie du feu bactérien sur des poiriers et des pommiers par Burrill en 1882, de la maladie jaune des hyacinthes par Wakker, en 1883 et de la maladie de la tuberculose de l'olivier décrite par Savastano en 1886 (Paulin *et al.*, 2001). Les microbiologistes pensaient que les bactéries étaient des parasites secondaires et qu'elles ne colonisaient la plante qu'après une attaque des champignons. En 1905, Erwin Frink Smith (Figure 2.17) phytopathologiste et bactériologiste américain fut le premier à prouver que les bactéries comme les champignons étaient capables de provoquer des maladies sur les plantes en publiant un article sur le pouvoir pathogène des bactéries chez les plantes. Depuis, l'importance que l'on donne aux maladies causées par les bactéries phytopathogènes n'a cessé de croître. En 1923, fut créée la première édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*; elle regroupa les bactéries phytopathogènes dans la tribu des *Erwinieae* qui était à son tour subdivisée en deux genres : *Erwinia* et *phytomonas*. A présent, on estime à près de 350 le nombre d'espèces ou de pathovars de procaryotes provoquant des maladies sur les végétaux dont le pouvoir pathogène est vérifié (Maurin *et al.*, 1999 et Paulin *et al.*, 2001).



Figure 2. 17 : Portrait de Erwin F. Smith (1854-1938) père fondateur de la phytobactériologie (Janse, 2005).

2.5.2 Taxonomie basée sur le pouvoir pathogène

Burkholder (1930) a fait une étude comparative de bactéries contenues dans le genre *Phytomonas* et propose des regroupements d'espèces, l'un de ces groupes formera le genre *Xanthomonas* (Dawson, 1939).

En 1974, Dye et Elliot dans *le Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology* ont réparti les espèces du genre *Xanthomonas* en cinq entités : *X. campestris* (espèce type), *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis* et *X. ampelina*. En 1976, le code international de la nomenclature des bactéries (Lapage *et al.*, 1975) est révisé et a fourni de nouvelles règles de nomenclature à appliquer et précise que seuls les noms publiés dans *Approved Lists of Bacterial Names* de l'ICSP après le 1^{er} Janvier 1987 seront valides.

Pour les *Xanthomonas*, seules les espèces publiées dans la 8^{ème} édition de *Bergey's Manual* (1974) se trouvent dans les *Approved Lists*. Cependant, la plupart des espèces nouvellement décrites ont été regroupées dans l'espèce *Xanthomonas campestris*. Cette nouvelle nomenclature a très vite posé problème car les pathogènes ne pouvaient plus être différenciés au sein de l'espèce (Young *et al.*, 1978); Ce qui a incité le Comité Exécutif de la Société Internationale de Pathologie des plantes (ISPP) à créer le comité de Taxonomie des Bactéries Phytopathogènes qui a pour objectif la révision des listes des bactéries phytopathogènes. Ainsi une nouvelle nomenclature a été proposée et subdivise les espèces en pathovars (Young *et al.*, 1978), terme utilisé pour désigner les organismes sur la base de leur gamme d'hôtes et de leur pouvoir pathogène. La liste a été publiée sous le nom de « *International Standards for Naming Pathovars of phytopathogenic Bacteria* » (Dye *et al.*, 1980). Cette nomenclature a joué un rôle important dans la classification des bactéries Phytopathogènes.

2.5.3 Taxonomie moléculaire et évolutive du genre *Xanthomonas*

D'après la dernière édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005), le genre *Xanthomonas* appartient au domaine ou empire des *Eubacteria*, phylum des *Proteobacteria* (XIV), classe des *Gammaproteobacteria* (III), ordre des *Xanthomonadales* (III) et à la famille des *Xanthomonadaceae* (I) (Saddler and Bradbury, 2005).

Le genre *Xanthomonas* était composé auparavant de 5 espèces (Dye and Lelliot, 1974) : *X. campestris* (espèce type), *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis* et *X. ampelina*. Le nombre d'espèces ainsi que leur position taxonomique au sein du genre *Xanthomonas* ont été largement discutés, notamment celle de *X. ampelina*. L'étude de sa structure taxonomique interne ainsi que ses relations supra génétiques a montré que l'espèce *X. ampelina* n'appartenait pas au genre *Xanthomonas* (Willems *et al.*, 1987). Elle est maintenant classée dans un rang taxonomique supérieur formant un nouveau genre *Xylophilus* différent dont elle est pour l'instant la seule représentante : *Xylophilus ampelinus*. Par contre *Xanthomonas populi*, agent du chancre du peuplier qui appartenait au genre *Aplanobacter*, devient une nouvelle espèce de *Xanthomonas* (De Vos and De Ley, 1983). En 1990, Van den Mooter et Swings étudient les caractères phénotypiques de plus de 268 souches appartenant au genre *Xanthomonas* et montrent que *X. campestris* pv. *graminis* et pv. *oryzae* sont clairement différents des autres pathovars de l'espèce *X. campestris*. Ils proposent alors que le genre soit composé de huit espèces : *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. graminis*, *X. oryzae*, *X. maltophilia* et *X. populi*. L'espèce la plus complexe reste *X. campestris* qui regroupe 123 pathovars (Dye *et al.*, 1980). La classification devient de plus en plus complexe et ne reflète pas les relations génomiques au sein de *Xanthomonas* (Vauterin *et al.*, 1990).

Pour remédier à ces divergences, le comité de réévaluation de l'espèce bactérienne recommande la technique des hybridations ADN-ADN (Wayne *et al.*, 1987) pour délimiter les espèces génomiques. Ces données moléculaires ont profondément bouleversé la classification générale des procaryotes et entraîné des modifications importantes dans la taxonomie du genre *Xanthomonas*. Vauterin *et al.* (1995) réalisent des hybridations ADN-ADN sur 183 souches du genre *Xanthomonas*. Ils identifient 20 groupes d'homologie ADN et proposent que le genre *Xanthomonas* soit divisé en 20 espèces (Figure 2.18). Cependant, un très grand nombre de pathovars restaient encore non attribués à une espèce, et étaient placés par défaut dans l'espèce type *X. campestris*.

Les hybridations ADN-ADN permettent d'identifier des groupes génomiques, les relations phylogénétiques entre les différentes espèces du genre ont été déterminées par le séquençage de l'ADNr16S en mesurant le degrés de similitude

entre les séquences d'ADNr (Hauben *et al.*, 1997). en se basant sur l'histoire évolutif des espèces. Leur analyse a révélé un faible degré de divergence parmi les *Xanthomonas* et ne permet pas de discriminer les groupes génomiques définis par hybridation ADN-ADN.

Rademaker *et al.* (2005) ont adopté une approche basée sur le typage moléculaire : BOX-PCR (conserved repetitive sequences-PCR), ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR), et REP-PCR (repetitive extragenic palindromic-PCR) afin d'affiner le schéma de classification de *Xanthomonas* existant. Plus de 339 souches ont été typées : certaines appartenant aux 20 groupes préalablement identifiés par (Vauterin *et al.*, 1995; Vauterin *et al.*, 2000) et 160 souches n'ayant pas été caractérisées par hybridation ADN-ADN. Les profils génétiques obtenus par rep-PCR confirment l'existence de vingt groupes distincts du genre *Xanthomonas* précédemment identifiés par homologie ADN-ADN. Cette technique a permis également de caractériser la diversité intra-spécifique pour les espèces *X. hortorum*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. oryzae*, *X. campestris*, et *X. translucens*.

Les techniques de typages basées sur le séquençage multiples des gènes, la MLST (Multi Locus Sequence Typing) a surpassé toutes les autres techniques. Elle permet d'évaluer les relations génétiques entre les individus et de mesurer leur diversité génétique par l'utilisation des séquences nucléotidiques d'une large gamme de bactéries pathogènes appartenant à des espèces différentes (Maiden *et al.*, 1998 et Maiden *et al.*, 2006). Les travaux réalisés sur 62 souches par Young *et al.*, 2008 et Fargier *et al.*, 2011 par la technique MLSA/MLST ont utilisant 4 gènes ménage ont reclassé les espèces non classé par Vauterin *et al.* (1995) et ont mis en évidence 5 espèces *X. campestris*, *X. vesicatoria*, *X. arboricola*, *X. hortorum*, *X. axonopodis* et *X. oryzae*.

2.5.4 Classification intra spécifique des *X. campestris*

Partant d'une approche ancienne essentiellement phénétique, le fondement des classifications modernes des procaryotes et des *Xanthomonas* a évolué vers une approche phylogénétique basée essentiellement sur les comparaisons nucléotidiques. L'espèce *Xanthomonas campestris* était divisée en 123 pathovars (Dye *et al.*, 1980), n'ayant pas de relation de parenté particulière.

Ce n'est qu'en 1995 que Vauterin et ses collaborateurs lui restaurent son statut d'espèce à part entière. Les hybridations ADN-ADN entre les individus du genre montrent que les *Xanthomonas* dont l'écologie est associée aux brassicacées forment une seule espèce telle que la définissent Wayne *et al.* (1987). Vauterin *et al.*, 1995 ont ainsi divisé l'espèce *X. campestris* en 20 espèces. *Xanthomonas campestris* regroupe maintenant une partie des souches qui constituaient l'espèce *X. campestris* définie par Dye *et al.* (1980). Cette classification reste en parfait accord avec la spécificité de l'hôte et montre que l'espèce *X. campestris* est restreinte à six pathovars isolés des plantes crucifères : *X. c. pv. aberrans* et *X. c. pv. campestris* isolés du chou (*Brassica*), *X. c. pv. armoraciae* isolé du raifort (*Armoracia lapathifolia*), *X. c. pv. barbareae* isolé de la barbarée vulgaire (*Barbarea vulgaris*), *X. c. pv. raphani* isolé du radis (*Raphanus sativus*) et *X. c. pv. incanae* isolé de la giroflée (*Matthiola incana*). Au sein de l'espèce *X. campestris*, la classification en pathovars est surtout basée sur l'hôte d'isolement de la bactérie et ne prend que peu en compte la symptomatologie des maladies qu'elles engendrent ou de la gamme d'hôtes. Les pathovars de l'espèce *X. campestris* ont une gamme d'hôtes plus large que celle spécifiée par leur nom. De nombreux auteurs ont eu des doutes sur la synonymie de certains de ces pathovars notamment des pathovars *aberrans et campestris*, et des pathovars *armoraciae et raphani* (Alvarez *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1995; Vicente *et al.*, 2001, 2006).

Avant la reclassification

Après reclassification (Vauterin *et al.*, 1995)

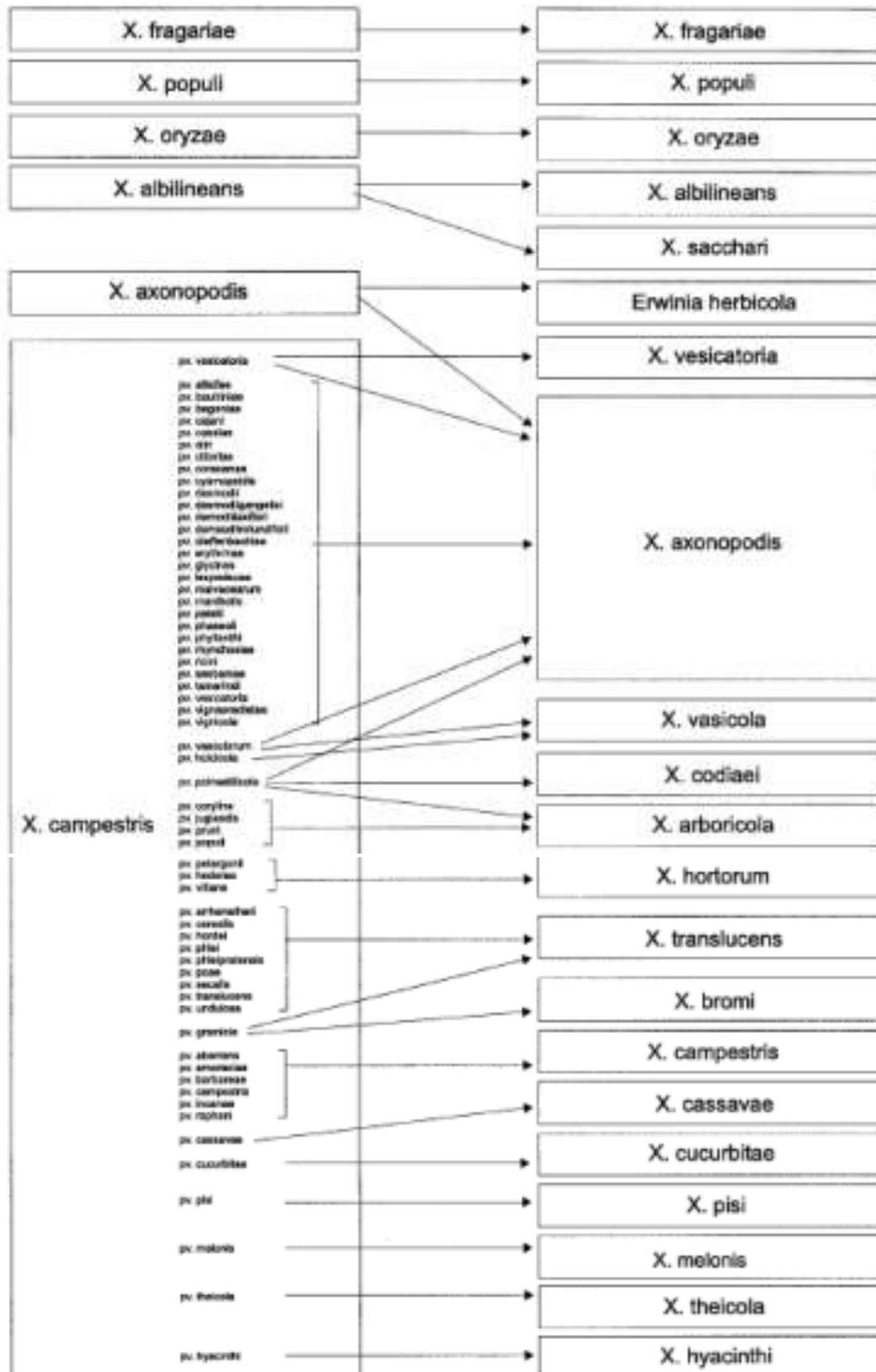


Figure 2.18 : Evolution de la nomenclature des *Xanthomonas* (Vauterin *et al.*, 1995)

De nombreux travaux ont été réalisés pour identifier et définir les différents pathovars au sein de l'espèce *X. campestris* sans pour autant passer par des tests de pouvoir pathogènes, en déterminant leurs profils moléculaires par RFLP, AFLP ou rep-PCR (Alvarez *et al.*, 1994, Zhao *et al.*, 2000, Massomo *et al.*, 2003, Tsygankova *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2006 et Valverde *et al.*, 2007). Ces études ont mis en évidence l'existence d'une grande diversité au sein de l'espèce et des pathovars. Néanmoins ces techniques ne sont pas totalement satisfaisantes car aucune n'est parvenue à proposer un outil de diagnostic efficace pour identifier les pathovars.

Afin de clarifier la taxonomie de l'espèce *X. campestris* et de pouvoir distinguer les pathovars et les races au sein de cette espèce, des travaux ont été entrepris en adoptant deux approches. La première approche est basée sur les tests du pouvoir pathogène (Fargier et Manceau, 2007). La 2ème approche est basée sur la méthode de typage moléculaire par le séquençage multiple de gènes **MLST/MLSA** (Multilocus Sequence Typing et Multilocus Sequence Analysis) (Fargier *et al.*, 2011). Cette dernière est basée sur le typage et l'analyse de polymorphisme des gènes de ménage avec comme principal objectif, la reconstitution phylogénétique de l'histoire des organismes.

Classification des *X. campestris* basé sur le pouvoir pathogène

L'étude du pouvoir pathogène a été réalisée en utilisant 6 souches types de différents pathovars parmi eux, les deux souches de *X. c. pv. campestris* dont le génome a été entièrement séquencé sur une gamme d'hôtes différentielle du genre des brassicacées : *Brassica*, *Raphanus*, *Matthiola*, *Cheiranthus*, *Iberis* et *Barbarea*, mais également des plantes appartenant à la famille des *Solanaceae*.

Classification intra des *X. campestris* basé sur le typage moléculaire

Le typage moléculaire par MLST a été réalisé par l'analyse de 7 gènes de ménages codant pour des protéines essentielles à la survie de la bactérie (Hanage *et al.*, 2006) ainsi qu'un gène qui code pour une protéine transmembranaire (Figure 2.19) séquencés chez 42 souches appartenant à l'espèce *X. campestris*. Les résultats de cette étude sont en parfait accord avec ceux obtenus par les tests

du pouvoir pathogène et montrent que l'espèce *X. campestris* est subdivisée en trois pathovars capables de provoquer une maladie : *X. c. pv. campestris* agent de la nervation noire des brassicacées, *X. c. pv. raphani* maladie des taches foliaires des brassicacées et *X. c. pv. incanae* maladie du dépérissement des giroflées. Ils montrent également que *X. c. pv. campestris* peut être subdivisé en 9 races alors que *X. c. pv. raphani* est subdivisé en 3 races selon leur virulence sur les différentes espèces et cultivars. Ils confirment la synonymie entre *X. c. pv. armoraciae* et *X. c. pv. raphani*. Les souches qui n'induisent aucun symptôme sur les brassicacées perdent leur nomenclature en pathovars et sont nommées *X. campestris* seulement.

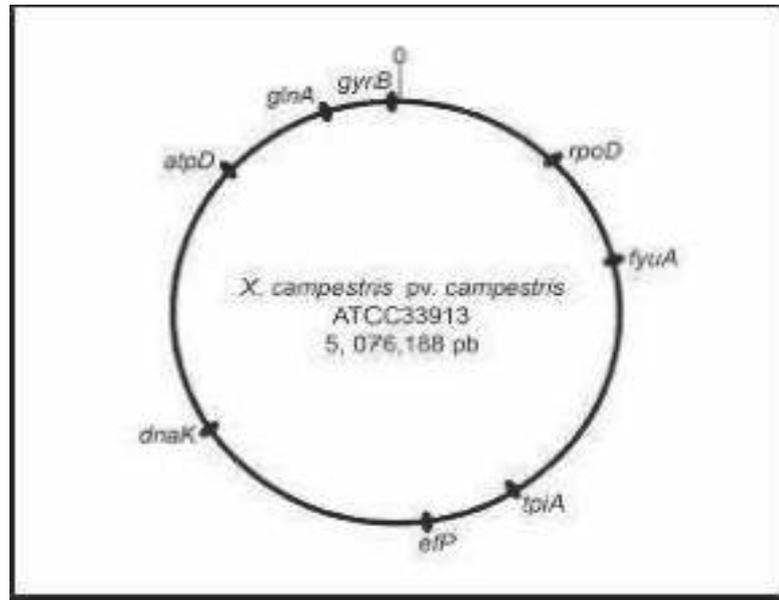


Figure 2. 19: Localisation schématique des 8 gènes de ménages sur le chromosome de la souche séquencée de *X. c. pv. campestris* souche CFBP 5241 ATCC 33913: (*atpD* (XCC0554); *dnaK* (XCC1474); *efP* (XCC2272), *glnA* (XCC0185); *gyrB* (XCC0004); *rpoR* (XCC3736); *tpiA* (XCC2531) et le gène *fyuA* (XCC3358) codant pour la protéine transmembranaire Fargier *et al.*, 2011)

2.5.5 Les génomes séquencés pour le genre *Xanthomonas*

Les génomes de neuf bactéries appartenant au genre *Xanthomonas* ont été séquencés : *X. axonopodis* pv. *citri* souche 306 (Da Silva *et al.*, 2002), *X. campestris* pv. *campestris* souche ATCC 33913 (Da Silva *et al.*, 2002), *X. campestris* pv. *campestris* souche 8004 (Qian *et al.*, 2005), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* souche 85-10 (Thieme *et al.*, 2005), *X. oryzae* pv. *oryzae* souche KACC10331 (Lee *et al.*, 2005) et *X. oryzae* pv. *oryzae* souche MAFF 311018 (Ochiai *et al.*, 2005), *X. campestris* pv. *campestris* souche B100 (Vorhölter *et al.*, 2008), *X. oryzae* pv. *oryzae* souche PXO99A (Salzberg *et al.*, 2008) et un plasmide de *X. axonopodis* pv. *glycines* (Kim *et al.*, 2006). Trois autres génomes sont en cours de séquençage : *X. oryzae* pv. *oryzicola* souche BLS256, *X. campestris* pv. *armoraciae* souche 756C et *X. albilineans* souche GPE PC73.

Le génome du genre *Xanthomonas* est composé d'un chromosome circulaire unique, dont le pourcentage en G + C varie entre 63 et 69,7% (Saddler and Bradbury, 2005). La taille des génomes séquencés est relativement similaire au sein du genre *Xanthomonas* allant de 4 831 739 paires de bases (p.b.) pour la souche BLS256 de *X. oryzae* pv. *oryzicola* à 5178466 P.B. pour *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* souche 85-10. Les régions codantes représentent entre 79 et 87% de la taille du chromosome.

2.6 Le cycle infectieux de *X. campestris*

2.6.1 Transmission par la semence contaminée

Les semences contaminées constituent un moyen de conservation et une voie de transmission chez les bactéries phytopathogènes (Blackeman, 1991, Weller et Saettler, 1980). Chez les brassicacées, les semences infectées par *X. campestris* constituent un foyer primaire de la maladie (figure 2.20) et représentent la principale source de contamination (Cook *et al.*, 1952 ; Schaad *et al.*, 1980 ; Schultz and Gabrielson, 1986) . La présence de trois à cinq graines infectées sur 10 000 suffit pour causer une incidence élevée au champ (Schultz and Gabrielson, 1986). Les bactéries sont présentes à la surface de la graine, dans les funicules et dans les débris des récoltes précédentes (Dzhalilov et Tiwari, 1995). Lors de la

germination, la bactérie se multiplie et colonise la plante grâce au relargage de nutriments dans la spermosphère (Nelson ,2004). Les jeunes plantules contaminées meurent rapidement et deviennent ainsi une source d'inoculum (Rat et Chauveau, 1985, Kocks et Zadoks, 1996). A ce stade, *X. c. pv. campestris* a une phase de vie épiphyte au cours de laquelle il peut coloniser de nombreuses plantules saines dans la pépinière. Cette phase de colonisation, en pépinière, semble être particulièrement importante car elle conditionne, en partie l'évolution ultérieure de la maladie en augmentant les possibilités de pénétration du pathogène par les stomates et les blessures causées par quelques insectes tels que la mouche du chou, les vers gris et les larves de lépidoptères (Rat et Chauveau, 1985).

2.6.2 Conservation dans le sol

L'agent pathogène de la nervation noire peut se conserver dans les débris végétaux présents dans le sol (Schaad and Kendrick, 1975). A la fin de la culture, les débris végétaux enfouis dans le sol peuvent conserver la bactérie dans le sol pendant environ deux années et peut servir d'inoculum entre les cultures, (Dzhalilov et Tiwari, 1995, Kocks et Zadoks, 1996). Le pathogène peut également survivre dans le sol pendant 40 à 60 jours (Schaad and White, 1974).

2.6.3 Les plantes adventices

Un grand nombre de crucifères adventices peuvent être infectées par *X. c. pv. campestris*, elles assurent la multiplication et la conservation de l'agent pathogène toute l'année, et constituent une troisième source d'inoculum, notamment en bordure des parcelles (Young, 1969). Ces hôtes ne présentent que rarement des symptômes et sont naturellement infectés même à des distances de 30 km des foyers potentiels par les champs de production de semences (Schaad et Dianese, 1981 ; Gitaitis and Walcott, 2007).

2.6.4 Les voies d'entrées des bactéries

Les voies naturelles de pénétration de la bactérie sont les **hydathodes** (Hugouvieux *et al.*, 1998) (Figure 2.21) appelées également les stomates aquifères qui interviennent dans la régulation des flux, mais aussi par les blessures causées

par quelques insectes tels que la mouche du chou, les vers gris et les larves de lépidoptères (Rat et Chauveau, 1985). Les hydathodes sont situées à l'extrémité des nervures en marge des feuilles. Elles assurent le phénomène de la guttation qui se produit dans des conditions d'humidité élevée (Ruissen and Gielink, 1992). Les bactéries présentes à la surface des feuilles sont incorporées dans ces gouttes; lorsque la transpiration s'accélère et que les stomates s'ouvrent, les gouttes sont réabsorbées, ce qui permet au pathogène de pénétrer dans la feuille (Williams, 1980; Kendrick and Baker, 1942).

2.6.5 Les conditions favorables pour la dissémination de la maladie

La dissémination de la bactérie est conditionnée par les conditions climatiques de température et d'humidité. *X. campestris* est une bactérie épiphyte, elle peut se trouver sur les parties aériennes de la plante sans provoquer de symptômes (Kuan *et al.*, 1986). Lorsque les conditions deviennent favorables au développement de l'infection, cette dernière pénètre par les voies naturelles ou par les blessures puis colonise l'intérieur des tissus (Hayward, 1974). Une température se situant entre 25 et 28°C avec une d'humidité élevée favorisent le développement de la nervation noire. Dans ces conditions idéales, les symptômes font leur apparition entre huit et dix jours après l'infection. Par ailleurs, la pénétration et l'évolution de la bactérie sont également possibles à des températures se situant entre 16 et 18°C mais le développement de la maladie se fera plus lentement (Hunter *et al.*, 1975). Lorsque le temps est sec, les lésions s'assèchent et la progression des symptômes est arrêtée (Schaad et Alvarez, 1993)

2.7 Les moyens de lutte contre *X. campestris*

Les moyens de lutte contre la nervation noire des crucifères se basent sur un ensemble de mesures prophylactiques qui visent à diminuer les risques de contamination. Plusieurs mesures sont préconisées telles que : i) l'utilisation de semences saines ayant subi un contrôle sanitaire, ii) l'élimination des plantes infectées en serre, iii) l'éradication des adventices, en particulier, les crucifères spontanées, iv) l'épuration des cultures en enfouissant au maximum les résidus après la récolte pour éviter leur dissémination par le vent ou les roues du tracteur,

v) pratiques de rotations des cultures sur trois ans, en alternance, avec des cultures autres que les brassicacées.

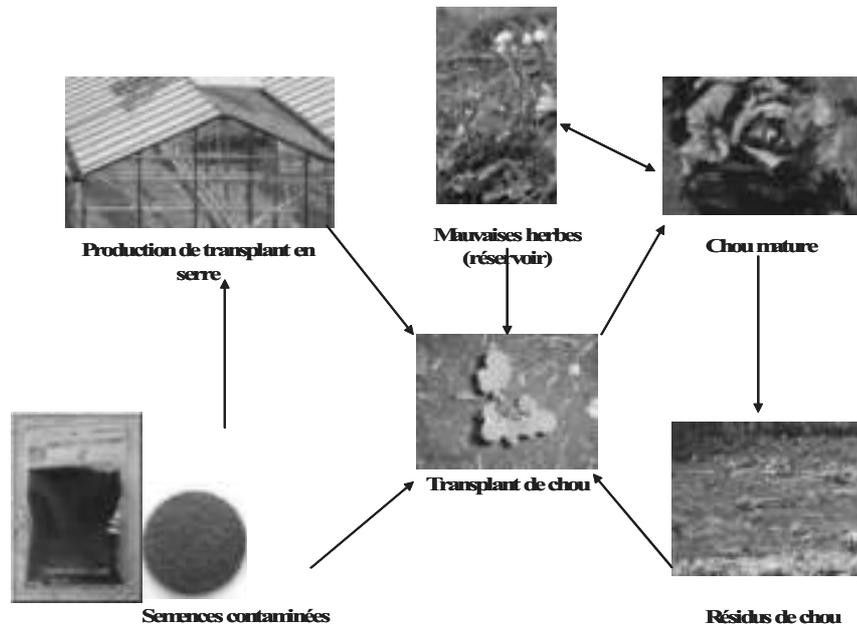


Figure 2.20 : Cycle infectieux de la nervation noire des crucifères

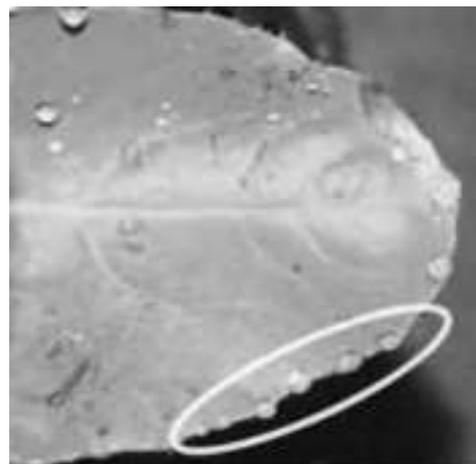


Figure 2.21 : Localisation des hydathodes : Voies naturelles d'entrées de la bactérie *X. campestris* qui se trouvent à l'aboutissement des nervures à l'extrémité des feuilles (FARC, 2005).

2.7.1 Le traitement des semences

La lutte chimique par des dérivés du cuivre n'est pas parfaite car elle permet juste d'éliminer les populations bactériennes épiphytes (Rat et Chauveau, 1985).

Ils n'ont qu'une action bactériostatique qui permettent de ralentir la croissance et la reproduction des bactéries, mais ne les tuent pas (Messiaen *et al.*, 1991). Dans certain cas, l'utilisation de ces produits peut avoir des effets phytotoxiques pour certaines plantes (Xiong *et al.*, 2006).

D'autres traitements à base de sels de mercure ou antibiotiques ont été étudiés, mais n'ont pas été autorisés en culture (Schaad and Dianese, 1981). Ainsi en absence de bactéricides applicables à grande échelle dans la pratique, contre les bactérioses en général et en particulier celles qui sont transmises par semences, la lutte s'est orientée très tôt vers le contrôle sanitaire des semences (Masmoudi, 1994). Cette orientation est confirmée avec la tendance de limitation des traitements chimiques en agriculture. Les traitements de semences qui sont utilisés actuellement sont : l'eau chaude, le peroxyde d'hydrogène, l'acétate de cuivre et le sulfate de zinc, etc (Walker 1952 ; Humaydan *et al.*, 1980 ; Schaad *et al.*, 1980 ; Huang and Lee, 1988). Le traitement des semences à l'eau chaude est recommandé à savoir 50°C pendant 25 min pour les semences de choux, de choux Bruxelles et 15 min pour les semences de choux – fleurs, navet, et choux frisé. Toutefois ce traitement n'est pas accepté par l'industrie puisqu'il peut nuire au pouvoir germinatif et à la vigueur de la semence et n'élimine pas complètement les bactéries (Williams 1980 ; Patel *et al.*, 1949).

2.7.2 La culture de variétés résistantes

Lorsque les variétés résistantes existent, elles peuvent représenter la solution la plus simple et la moins coûteuse pour le producteur. Cependant plusieurs facteurs peuvent limiter la généralisation de l'emploi de variétés résistantes : La principale difficulté pour sélectionner des cultivars résistants est d'identifier les gènes de résistance et d'associer la résistance aux autres caractéristiques agronomiques requises tels que le rendement et les propriétés technologiques. Les premiers travaux de sélection variétale pour la résistance à la nervation noire, n'ont pas été efficaces car ils ont été entrepris sans que soit connue l'existence des variantes

pathogéniques (race) chez *X. c. pv. campestris* (Ignatov *et al.*, 1998 ; Vicente *et al.*, 2002). Par la suite, le nombre de races chez le pathogène a été un facteur limitant l'efficacité de la sélection (Kamoun *et al.* 1992 ; Vicente *et al.*, 2001). Les études actuelles portent sur l'identification de gènes de résistance (Figure 2.22) correspondant aux différentes races du pathogène (Soengas *et al.*, 2007). Par contre les variétés tolérantes peuvent être infectées et servir de réservoir de germes et donc de sources de contamination pour les variétés sensibles. Par ailleurs la tolérance contrarie l'épuration phytosanitaire car les symptômes sont peu visibles (Lepoivre, 2003).

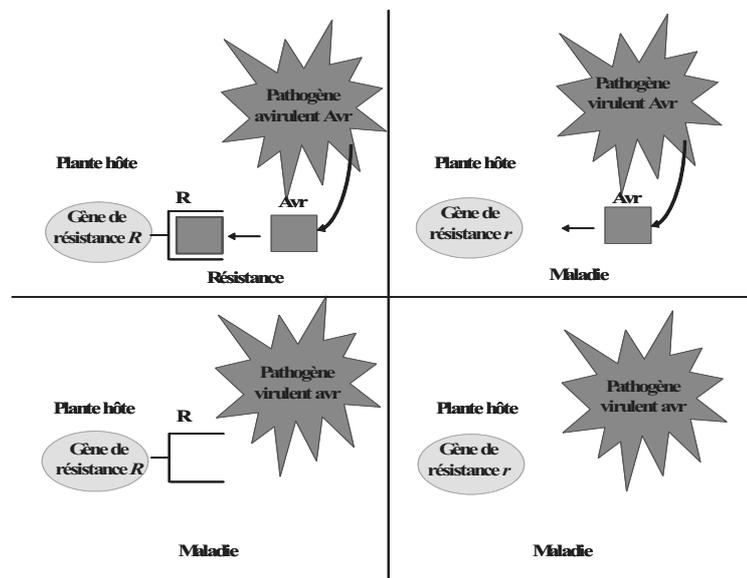


Figure 2.22 : Modèle génétique de l'interaction gène pour gène

La résistance est induite uniquement si la plante exprime le gène de résistance *R* dont le produit reconnaît le produit du gène d'avirulence *Avr* exprimé par l'agent pathogène. Dans les autres cas la maladie se développe avec *R*, *Avr* : gène dominant, *r*, *avr* : gène récessifs *R* : produit du gène *R*. *Avr* : produit du gène *Avr* (Buhot, 2003)

2.7.3 La Lutte biologique contre *X. campestris*

Selon l'OILB (Organisation Internationale de Lutte Biologique), la lutte biologique consiste à utiliser les organismes vivants pour prévenir ou réduire les dommages causés par les ravageurs et les pathogènes. Elle est principalement

adoptée par les entomologistes. Pour lutter contre *X. campestris*, des bactéries antagonistes appartenant au genre *Bacillus* ont été utilisées (Wulff *et al.*, 2002 ; Massomo *et al.*, 2003). Ce sont des bactéries endophytes non pathogènes qui peuvent coloniser une plante sans conséquences négatives pour la plante (Samish *et al.*, 1963). Toutefois, en condition très favorable à la maladie, leurs actions restent limitées (Wulff *et al.*, 2002 ; Massomo *et al.*, 2003 and 2004). Malgré les progrès considérables ces dernières années, le nombre de cas concrets d'application en phytopathologie reste marginal et devra relever plusieurs défis pour démontrer son caractère opérationnel (Lepoivre, 2003).

2.7.4 La sélection phytosanitaire des semences

Le contrôle phytosanitaire des semences est régi par une autorité qualifiée qui garantit et certifie que le lot de semence est indemne de toute maladie couverte par la réglementation phytosanitaire en vigueur. La qualité phytosanitaire des semences est un critère important pour leur commercialisation. C'est l'un des moyens majeurs pour développer une agriculture durable et respectueuse de l'environnement. Pour les *Brassica spp.*, le taux de contamination ne doit pas excéder une graine sur 30 000 dans les lots de semences commercialisés (Franken *et al.*, 1991). Les procédures de détection qui sont proposées par l'ISTA

(International Seed Testing Association) reposent sur des techniques microbiologiques, c'est à dire basées sur l'isolement de la bactérie sur milieu nutritif sélectif. Elles doivent être réalisées par des laboratoires publics ou les laboratoires des établissements semenciers agréés. Le milieu sélectif ne permet pas à lui seul d'identifier le pathogène, l'isolement des bactéries suspectes est suivi de tests de pouvoir pathogène sur plantes sensibles pour compléter le diagnostic (Roberts and Koenraadt, 2006).

2.8 Les techniques de détection

En plus de l'échantillonnage et la distribution de la bactérie dans le plant, un ensemble de facteurs conditionnent le choix d'une technique de détection. Parmi ces facteurs, on peut citer : i) La sensibilité de la technique, ii) La spécificité, iii) La polyvalence (reconnaissance de l'ensemble des souches du pathogène) et iv) La facilité de réalisation de l'analyse. L'isolement des bactéries sur des milieux de

culture gélosés généraux ou différentiels demeure souvent l'étape préliminaire pour la détection des bactéries dans les lots de semences. A la suite de leur mise en culture, les bactéries sont identifiées par les tests biologiques, biochimiques, sérologiques et moléculaires.

2.8.1 Les tests biologiques

Cette technique consiste en un isolement direct sur milieux semi-sélectifs des bactéries suspectes et leur identification finale par la mise en place d'un test de pouvoir pathogène sur plante indicatrice, dans les conditions d'environnement favorables à l'infection. Cette méthode qualitative s'applique à la détection des bactéries dans les lots de semences ; elle est utilisée pour toutes les analyses réglementaires (International Seed Health Initiative, 2015).

2.8.2 Les tests biochimiques

Bien que les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, ils demeurent utiles pour la détermination de certaines espèces et sous espèces de bactéries phytopathogènes. Grâce à ces tests, il est possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées (Schaad, 2001).

2.8.3 Les tests sérologiques

L'utilisation d'anticorps spécifiques pour le diagnostic des maladies bactériennes représente une méthode spécifique et rapide. Ces techniques peuvent être utilisées pour détecter les bactéries directement dans les tissus végétaux ou pour identifier une espèce bactérienne isolée sur milieu gélosé. Le test sérologique le plus utilisé pour la détection des bactéries phytopathogènes est le **IF (Test d'immunofluorescence)**. Il est basé sur l'utilisation d'un marqueur fluorescent (isothiocyanate de fluorescéine) conjuguée à un anticorps. Grâce à l'observation microscopique sous lumière ultraviolet, il est possible de visualiser les bactéries. Les cellules bactériennes émettent une fluorescence vert brillant grâce à l'isothiocyanate de fluorescéine. Cette technique offre une meilleure sensibilité que le test ELISA (10^5 cfu/ml) puisque elle permet la détection des bactéries vivantes à une charge de 10^2 cfu/ml (Schaad, 2001).

2.8.4 Les techniques moléculaires

2.8.4.1 La Réaction de polymérisation en chaîne «PCR»

La technique PCR, brillamment imaginée par Kary Mullis a été développée par Henri Herlich et ses collaborateurs de la compagnie CETUS (Californie, USA) en 1985. Cette technique est utilisée pour amplifier une séquence de nucléotides connue et située entre deux régions d'ADN en utilisant une paire d'amorces oligonucléotidiques; chacune complète chaque extrémité de la séquence cible de l'ADN. Celles ci sont allongées l'une vers l'autre par une ADN polymérase thermostable dans un cycle de réaction à trois étapes : la dénaturation, l'hybridation des amorces et l'élongation (Turner *et al.*, 2000).

La première étape de la PCR consiste à chauffer le mélange réactionnel, contenant les amorces oligonucléotidiques, l'enzyme, les quatre nucléotides précurseurs ainsi que l'ADN cible à une température de 94 °C, supérieure à la température de fusion des molécules d'ADN.

Cette première étape de dénaturation thermique permet de séparer complètement les chaînes antiparallèles de la double hélice d'ADN et libérer les molécules d'ADN simple brin servant de matrice à l'ADN polymérase. Le refroidissement permet ensuite aux séquences des amorces de s'apparier aux séquences complémentaires présentes dans la molécule d'ADN cible. Pour l'élongation, la synthèse de l'ADN se déroule à la température optimum de l'enzyme, à partir de l'extrémité 3' de chacune des amorces. Cette étape d'élongation se termine lorsque la température est à nouveau amenée au dessus du point de fusion des molécules d'ADN bicaténares, soit à l'étape de dénaturation du deuxième cycle de PCR (Lepoivre, 2003). Après le premier cycle, le produit d'amplification correspond à un segment d'ADN double brin dont les extrémités 5' sont constituées par les amorces. Ces produits d'amplification néosynthétisés vont à leur tour, après dénaturation, devenir des matrices et fixer des amorces qui seront étendues par l'ADN polymérase, générant ainsi de nouvelles molécules. Le cycle de dénaturation, d'hybridation des amorces et d'élongation est répété de trente à soixante fois et se traduit par une accumulation exponentielle du fragment d'ADN cible (Larzul, 1993).

L'utilisation de la PCR a connu un essor considérable dans l'étude des maladies des plantes et dans bien d'autres disciplines, avec l'introduction en 1988 d'une ADN polymérase (Taq) isolée à partir de la bactérie *Thermus aquaticus*. Cette enzyme reste stable aux températures de dénaturation de l'ADN, ce qui élimine la nécessité de la remplacer après chaque cycle de synthèse, et permet une automatisation des cycles thermiques (Henson, 1993).

Analyse des produits amplifiés :

L'analyse des produits amplifiés peut être réalisée par électrophorèse sur gel polyacrylamide ou gel d'agarose, dans un tampon salin adéquat de migration (Nolasco *et al.*, 1993). Le champ électrique appliqué permet la migration et la séparation des fragments d'ADN chargés électriquement le long du gel en fonction de leur taille, c'est à dire de leur poids moléculaire. Un marqueur de poids moléculaires migre simultanément avec les échantillons et sert de référence pour évaluer la taille des bandes d'ADN. Les bandes sont généralement révélées au bromure d'éthidium pour les gels d'agarose observées et photographiées sous ultra-violet, ou au nitrate d'argent pour les gels de polyacrylamide (Paradies, 1999; Nolasco *et al.*, 2002).

2.8.4.2 La PCR en temps réel (Real time PCR)

La PCR en temps réel peut être réalisée grâce à un appareil composé d'un thermocycleur et d'un détecteur optique permettant la mesure de la fluorescence. Cet appareil assure une double fonction, d'une part, l'amplification par PCR de séquences d'acides nucléidiques cibles et d'autre part, la détection des produits d'amplification en temps réel au fur et à mesure que se déroule cette amplification. Au cours de chaque cycle PCR, les tubes contenant les produits d'amplification sont irradiés avec une source lumineuse. Il s'ensuit une émission de fluorescence qui est détectée par une caméra. Les données recueillies sont alors transmises à un ordinateur pour être analysés. Parmi les systèmes proposés, le système TaqMan (Applied Biosystem) repose sur l'utilisation d'une sonde dite «TaqMan». Cette sonde spécifique à la cible à amplifier porte à ses extrémités deux molécules fluorescentes, le reporter R et le quencher Q. Lorsque la sonde n'est pas hybridée, la fluorescence émise par le reporter est absorbée par le

quencher. Au cours de la réaction PCR, cette sonde TaqMan s'hybride à l'une des fibres d'ADN cible au niveau d'une région située entre les deux amorces PCR. Lorsque l'enzyme (Taq DNA polymérase) rencontre la sonde TaqMan, elle casse cette dernière grâce à son activité nucléase, ce qui éloigne le fluorophore «Reporter» du «Quencher». La fluorescence émise par le «Reporter» peut alors être détectée (Heid *et al.*, 1996). Cette technique offre beaucoup d'avantages tel que : le gain de temps et une diminution du risque lié à la manipulation puisque il n'y a plus d'étape de détection post- PCR. La mesure de la fluorescence se fait en temps réel, l'analyse quantitative est plus simple à mettre en œuvre qu'avec un système PCR classique

2.8.4.3 Technique LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) mis au point par Notomi *et al.*(2000) est basée sur une amplification d'acide nucléique à partir de 4 amorces spécifiquement conçues pour reconnaître six zones (séquences) différentes de l'ADN cible et une ADN polymérase. La réaction d'amplification se déroule à une température constante (60-65°C) pendant 1H. Cette technique est très sensible et moins onéreuse car elle ne nécessite pas l'utilisation d'un thermocycleur. La révélation des produits d'amplification ne requiert pas de migration sur gel; elle peut se faire par détection colorimétrique utilisant un agent intercalant (SYBR Green I) ou l'hydroxy naphthol blue (HNB) (Notomi *et al.*, 2000); (Goto *et al.*, 2009)

Chapitre 1

Mise au point d'une nouvelle technique de détection des cellules vivantes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* dans les semences de Brassicacées : seed-qPCR

1.1 Introduction :

La nervation noire des crucifères est une maladie causée par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* transmise par les semences. Elle est de distribution mondiale et est considérée comme la plus destructive des crucifères (Williams, 1980). Un faible taux de semences contaminées peut aboutir à l'apparition d'un foyer de maladie en culture. Une semence contaminée parmi 10 000 saines peut suffire pour entraîner des pertes considérables dans la culture issue du semis (Schaad, 1980, Cook *et al.* 1952). La nouvelle classification des espèces au sein du genre *Xanthomonas* est basée sur l'homologie de leur génome, déterminée par la technique d'hybridation ADN/ADN (Corza *et al.*, 1973). Vauterin *et al.* (1995) ont décrit l'espèce *Xanthomonas campestris* et y ont assigné six pathovars : *X. c.* pv. *aberrans*, *X. c.* pv. *armoraciae*, *X. c.* pv. *barbarae*, *X. c.* pv. *raphani*, *X. c.* pv. *campestris* et *X. c.* pv. *incanae*.

L'étude du pouvoir pathogène réalisée récemment (Fargier et Manceau, 2007, Young *et al.*, 2008) avec une large collection de souches des différents pathovars de *X. campestris* sur une gamme d'hôtes différentielle de la famille des brassicacées, a montré que l'espèce *X. campestris* comprend trois pathovars : *X. c.* pv. *campestris*, *X. c.* pv. *raphani* et *X. c.* pv. *incanae* et des souches non pathogènes. Actuellement, les techniques préconisées par les laboratoires officiels pour la détection de ce pathogène sont essentiellement basées sur des tests microbiologiques. La méthode de référence adoptée par ISTA (International Seed Testing Initiative) consiste en l'isolement sur milieu sélectif des bactéries suspectes suivi d'un test de pouvoir pathogène (Koenraad *et al.*, 2005; Roberts et Koenraad, 2014). Ces tests sont longs et coûteux pour être utilisés en routine (Chitarra *et al.*, 2002; Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005 et 2006).

A l'inverse, les techniques de détection moléculaires représentent une alternative permettant d'améliorer la rapidité et la fiabilité de détection. Plusieurs procédures basées sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) ont été développées pour la détection de *X. campestris* dans les semences, (Rijlaarsdam *et al.*, 2004; Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005) et par PCR en temps

réel (Berg *et al.*, 2006). Cependant les techniques basées seulement sur l'amplification de l'ADN ne rendent pas compte de la viabilité du pathogène dans l'échantillon analysé. En effet, l'ADN est une molécule stable dans certains milieux et peut rester intègre après la mort des cellules. Ceci peut entraîner l'obtention de faux positifs par l'amplification de l'ADN de cellules mortes (Josephson *et al.*, 1993; Masters *et al.*, 1994). Par ailleurs d'autres outils ont été récemment développés pour la détection des cellules vivantes qui sont basés sur un enrichissement des bactéries sur un milieu semi sélectif suivi d'une amplification spécifique par PCR de l'ADN (BIO-PCR) (Schaad *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1998; Weller *et al.*, 2000 et Fargier *et al.*, 2007).

Durant cette étude nous avons développé une méthode de détection des cellules vivantes de *X. c. pv. campestris* dans les semences de crucifères : La seed-qPCR basée sur un enrichissement en bactéries par une germination des semences, suivie d'une amplification par PCR en temps réel de l'ADN extrait du macérât des plantules obtenues. Cette technique a été optimisée sur des lots de semences de 30 000 graines naturellement contaminées et des lots de semences désinfectés. L'efficacité de la seed-qPCR a été testée sur des lots de semences artificiellement contaminés par *X. c. pv. campestris* à raison d'une graine sur 10 000 graines.

1.2 Matériel et méthodes

1.2.1 Souches bactériennes

Deux souches de *X. c. pv. campestris* fournies par la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France, ont été utilisées au cours de cette étude. Il s'agit de la souche CFBP 1121 et la souche CFBP 5241 (ATCC 33913). Ces bactéries ont été remises en suspension dans du milieu LP (extrait de levure 7g/L, peptone 7g/L) et régulièrement repiquées sur milieu LPGA (extrait de levure 7g/L, peptone 7g/L, glucose 7g/L et agar 15g/L, pH 7). Elles sont conservées à -20°C dans de l'eau stérile pour une courte période. Le milieu semi spécifique LPGA Cvc (cycloheximide 100 mg/L, céfalexine 25 mg/L et de la vancomycine à 0,5 mg/L) à 27 °C a été utilisé pour l'isolement des bactéries à partir des semences.

1.2.2 Lots de semences utilisés

Six lots de semences de *Brassicacées* infectés et sains ont été utilisés durant cette étude (tableau 1.3). Ils ont été fournis par le GEVES-SNES Angers France. Leur état sanitaire avait été préalablement vérifié selon la procédure analytique de l'ISTA (ISTA Seed Health Method 7-409) et par la méthode BIO-PCR (dans cette étude).

1.2.3 Contamination artificielle des lots de semences

Pour être proche des conditions réelles, nous avons utilisé des semences contaminées artificiellement par *X. c. pv. campestris* (souche CFBP 1121 et souche CFBP 5241). Chaque souche a été inoculée à un lot formé de 3000 graines de *Brassica oleracea*.

Les semences ont été trempées respectivement dans 300 ml de suspensions bactériennes à différentes concentrations (10^5 , 10^6 , 10^7 et 10^8 cfu/ml) et de l'eau distillée stérile comme témoin négatif. Afin de permettre l'introduction des bactéries dans les semences, les flacons contenant les graines, ont été placés dans un dessiccateur sur lequel on applique une pression sous vide égal à -0,098 bars pendant 1 min. Les graines ont ensuite été séchées sur du papier filtre pendant

2 heures dans un P.S.M. Les graines ont été pesées avant et après l'inoculation de la suspension bactérienne afin d'évaluer la quantité de l'inoculum retenu par chaque graine. Les graines ont été stockées à température ambiante dans des boîtes de Pétri stériles pour une utilisation ultérieure

1.2.4 Germination des semences contaminées

Quatre types de test de germination ont été effectués selon nos objectifs.

Afin d'évaluer la méthode d'inoculation des semences, des échantillons de 100 semences chacun issus des graines contaminées préparés comme décrit précédemment, ainsi qu'un lot de semences non contaminé utilisé comme témoin négatif ont été mis à germer.

Les graines ont été semées dans des boîtes transparentes en polystyrène contenant du papier buvard plissé avec 50 plis (Schleicher et Schull) humidifié avec 40 ml d'eau stérile. Les graines ont été semées à raison de deux graines par pli. Les boîtes sont ensuite placées dans un germoir à 20°C à raison de 8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité à 30 °C par jour, (International Seed Testing Association, 2006). L'observation des symptômes a été réalisée au bout du 7^{ème} et du 14^{ème} Jours.

Trois sous échantillons de semences de chou composés de 10 000 graines chacun ont été mis à germer selon trois méthodes. Il s'agit de l'échantillon nommé ADAR 3 naturellement contaminé par *X. c. pv. campestris* fourni par le GEVES-SNES.

Le taux d'infection de ce lot de semence avait été estimé à $1,4 \times 10^2$ cfu par graine par comptage de colonies sur un milieu LPGA. La taille de l'échantillon minimum recommandé par l'ISTA est égale à 30 000 graines subdivisées en trois sous lots de 10 000 graines (Roberts et Koenraad 2014).

Les trois sous-échantillons de semences (10 000 graines) ont été semés selon trois conditions.

La première méthode consiste à faire germer les 10 000 graines dans une boîte en polyéthylène de 25 X 25 cm avec couvercle, en prenant comme substrat un papier buvard (référence N° 426994) placé au fond de la boîte et imbibé d'eau distillée stérile. La boîte est placée dans un germoir (20-30 °C) à raison de 8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité par jour. Le papier est maintenu humide afin d'avoir une ambiance propice pour la germination.

Les sous-échantillons 2 et 3 ont été trempés chacun dans un erlenmeyer contenant 100 ml d'eau distillée stérile puis placé sous une agitation de 150 rpm pendant 1h. Au bout de ce temps l'eau de lavage est retirée, les erlenmeyers sont fermés et incubés dans un germoir à 25°C 8/ 16 h jour/nuit (**méthode 2**) ou à l'obscurité dans un incubateur à 27°C (**méthode 3**). Le temps d'incubation est de 3 jours pour les méthodes testées.

1.2.5 Macération des graines germées

Après trois jours d'incubation, les plantules issues de la germination selon les trois méthodes ont été placées dans un sac en plastique stomacher muni d'un filtre de dimension approprié (BIOREBA Suisse) avec une solution saline stérile additionnée au Tween 20 (0,02% v/v), à raison de 3ml /g d'échantillon. Le tout est placé sous une agitation de 150-200 rpm pendant 2h. Un ml du macérât obtenu a été prélevé dans un microtube de 1,5 ml pour une utilisation ultérieure.

1.2.6 Préparation de l'ADN et amplification par PCR

L'extraction d'ADN a été réalisée selon deux protocoles afin d'évaluer celui qui offre un meilleur rendement en acides nucléiques. Il s'agit du protocole décrit par Llop *et al.* (1999) basé sur une précipitation des acides nucléique à l'isopropanol et du protocole basé sur un tampon à base de soude. Ce dernier consiste à prélever 1 ml de macérât dans un microtube de 1,5 ml puis à le centrifuger à 8000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension avec 500 µl de NaOH à 0,5 N. Le tout est incubé à 65°C sous une agitation de 100 rpm pendant 10 min. Cinq µl de cette solution sont transférés dans un microtube de 1,5 ml contenant 495 µl TRIS HCl (20 mM) puis conservé à -20 °C avant de réaliser la PCR. L'ADN extrait selon les deux protocoles d'extraction a été amplifié par PCR en temps réel.

Les couples d'amorces utilisés durant cette étude ont été préalablement décrits dans la littérature (Eden *et al.*, 1991 ; Berg *et al.*, 2005, 2006). Les amplifications ont été réalisées par PCR en multiplex dans un mélange réactionnel de 20 µl. Il comprend 1X Green GoTaqFlexi Buffer (promega), 1,5 mM de MgCl, 0,2 mM de dNTP, 0,5 µM de chaque amorce spécifique,

DLH 120 (5'CCGTAGCACTTAGTGCAATG3') et DLH 125 (5'GCATTTCCATCGGTCACGATTG 3'), 0,05 µM de chaque amorce universelle : 1052-F (5'GCATGGTTGTCGTCAGCTCGT3') et BacR (5'TACGGCTACCTTGTTACGACT 3'), 0,05U de la GoTaq Flexi Buffer DNA polymérase et 3µl d'ADN cible. Le programme d'amplification consiste en une dénaturation de 3 min. à 95°C suivi de 35 cycles de 40 sec de dénaturation à 95°C, 40 sec d'hybridation des amorces à 63°C (touchdown à 58°C au cours des 6 premiers cycles) et 40 sec d'élongation à 72°C. Les produits d'amplification obtenus sont analysés sur un gel d'agarose à 2% dans du tampon TBE 0,5 X. La migration des produits amplifiés est visualisée à l'aide d'un transilluminateur à UV GelDoc 2000 Bio-RAD, après coloration au bromure d'éthidium.

La PCR en temps réel a été réalisée dans un mélange réactionnel de 20 µl. Il comprend du tampon de réaction 1x (Real time Master Mix probe Eurogentec), 400 nM de chaque amorce **DLH 153** (5'GTAATTGATACCGCACTGCAA3') et **DLH 154** (5'CACCGCTCCAGCCATATT3'), 200 nM de la sonde **Taq-Man P7** (5'ATGCCGGCGAGTTTCCAACG3') et 2µl de l'ADN cible. L'amplification des fragments d'ADN a été réalisée selon les conditions suivantes : 2 mn 30 sec à 94°C, suivi de 35 cycles de deux étapes : 20 s à 94°C et 40 s à 60 °C. Les résultats de l'amplification ont été visualisés grâce au logiciel iCycleriQ Real Time (BIORAD).

1.2.7 Mise au point d'une méthode de germination adaptée pour 10 000 Graines

La concentration bactérienne de chaque lot de semences a été évaluée par étalement du macérât dilué au 1/10, 1/100 et 1/1000 sur un milieu LPGA et par comptage de colonies. Après 3 jours de germination, les semis ont été macérés dans un sac d'extraction stomacher (Bioreba) contenant 3 ml de solution saline stérile (0,85%, 0,02% de Tween 20) par g et agités à 150 à 200 tours par minute pendant 2 heures. Un ml de macérât a été prélevé dans un microtube de 1,5 ml, pour une éventuelle extraction de l'ADN bactérien.

1.2.8 Comparaison entre la méthode de détection en BIO-PCR et en seed-qPCR en temps réel dans des semences naturellement contaminées

Une analyse comparative par BIO-PCR et seed-qPCR a été menée sur des lots de semences de chou naturellement infectés par *X. c. pv. campestris* (ADAR 3) et des

lots sains. Chaque lot a été subdivisé en trois lots de 10 000 graines et testé par BIO-PCR. La BIO-PCR a été réalisée selon la procédure décrite par Fargier et Manceau (2007). Cent microlitres du macérât de semences ont été étalés à l'aide d'un étaloir sur milieux LPGACvc. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 45 h à 28° C. Au bout de ce temps, la surface des boîtes est lavée avec 3 ml de solution saline stérile (0,85% de NaCl). La suspension bactérienne obtenue a été homogénéisée à l'aide d'une pipette et un aliquote (1 ml) est prélevé dans un micro tube de 1,5 ml pour l'extraction d'ADN. L'extraction a été réalisée selon le protocole de lyse par le tampon à base de soude. Concernant la seed-qPCR, l'extraction et l'amplification ont été réalisées en utilisant les protocoles précédemment décrits.

1.2.9 Evaluation du seuil de sensibilité de la seed- qPCR

Des semences de choux ont été contaminées artificiellement par une suspension bactérienne de *X. c. pv. campestris* à 8×10^8 cfu/ml (8×10^4 bactéries par graine). La confection des lots de semences consiste à regrouper des graines par lot en mélangeant une graine contaminée avec des graines saines à différents taux d'infection de 1 :10, 1 : 100 et 1 :10 000 à raison de trois répétitions par lot. Les lots ainsi formés ont été semés selon la **méthode 1** de germination décrite précédemment. Après trois jours, les plantules obtenues ont été prélevées dans un sac (stomacher Bioreba) avec une solution saline stérile et du tween 20 puis placées sous une agitation constante pendant 2h. Le macérât obtenu a été récolté dans 3 micro tubes de 1,5 ml par échantillon puis analysé en PCR en temps réel après extraction de l'ADN.

1.3 Résultats

1.3.1 Contamination artificielles des semences de chou

Le but de cette étude était de mettre au point un système de contamination artificielle des semences saines par trempage dans une suspension bactérienne de *X. c. pv. campestris* (CFBP 1121 et CFBP 5241). Cet essai pourrait nous rapprocher des conditions réelles de contamination ainsi que des charges bactériennes de *X. c. pv. campestris*, que la graine pourrait transmettre à la plante.

L'extraction des bactéries a été réalisée par macération dans une solution saline et elle a été menée sur trois échantillons de chaque lot de semences contaminées. La concentration de *X. c. pv. campestris* par graine a été évaluée par étalement sur milieu LPGA Cvc et par comptage de colonies. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.1.

Les graines contaminées par une suspension bactérienne de 1×10^8 cfu/ml étaient porteuses d'une population bactérienne d'environ 1×10^3 cfu/graine (souche CFBP 1121) et $1,6 \times 10^3$ cfu /graine (souche CFBP 5241) en moyenne. Aucune colonie n'a été isolée à partir des graines contaminées par les suspensions de concentrations plus faibles (10^7 , 10^6 et 10^5 cfu/ml) et l'eau distillée stérile.

Le volume de l'inoculum absorbé par les graines a été évalué à $0,1 \mu\text{l}$ par graine. En effet, le poids de 1000 graines a augmenté d'environ $100 \mu\text{g}$ après infiltration et séchage. Par conséquent, soit une partie seulement des cellules bactériennes a survécu à l'inoculation ou une partie de l'inoculum bactérien a été éliminée des graines après leur lavage, ou bien il faut plus d'une cellule bactérienne pour former une colonie sur le milieu LPGACvc.

Trois séries de 100 graines de chaque lot ont été mises à germer sur papier filtre.

Le développement de la population bactérienne introduite a été suivi par des observations régulières des symptômes de la nervation noire. Sept jours après le semis (première notation), les premières plantules malades ont été repérées. Le taux était de l'ordre de 40% pour les graines inoculées avec une suspension bactérienne de concentrations $10^8, 10^7, 10^6$ cfu/ml et de 20 % pour la concentration à 10^5 cfu/ml. Au bout du quatorzième jour, les plantules de tous les lots contaminés étaient malades alors que le témoin négatif ne présentait aucun symptôme de la maladie (tableau 1.1, Figure 1.1).

1.1 Niveau d'infection estimé sur les graines après inoculation

Concentration de l'inoculum (cfu/ml)	1×10^8		1×10^7		1×10^6		1×10^5		0 (Eau)	
Souches	CFBP1121	CFBP5241	CFBP1121	CFBP5241	CFBP1121	CFBP5241	CFBP1121	CFBP5241		
Niveau d'infection (cfu/graine)										
Évalué 1 jour après inoculation	1000+/-2 ^a	1600 +/-3	≤ 0,4 ^b	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	
Pourcentage de plantules avec symptômes	7 ^c	45+/-1.72	40+/-2.26	38+/-2.99	42+/-2.84	42+/-2.35	40+/-1.13	25+/-1.72	15+/-1.95	0
	14 ^c	100	100	100	100	100	100	100	100	0

^a nombre moyen de cfu/graine après inoculation)

^b limite inférieure de détection des bactéries (cfu par graine)

^c Le pourcentages de plantules malades évalué après 7 et 14 jours de germination.

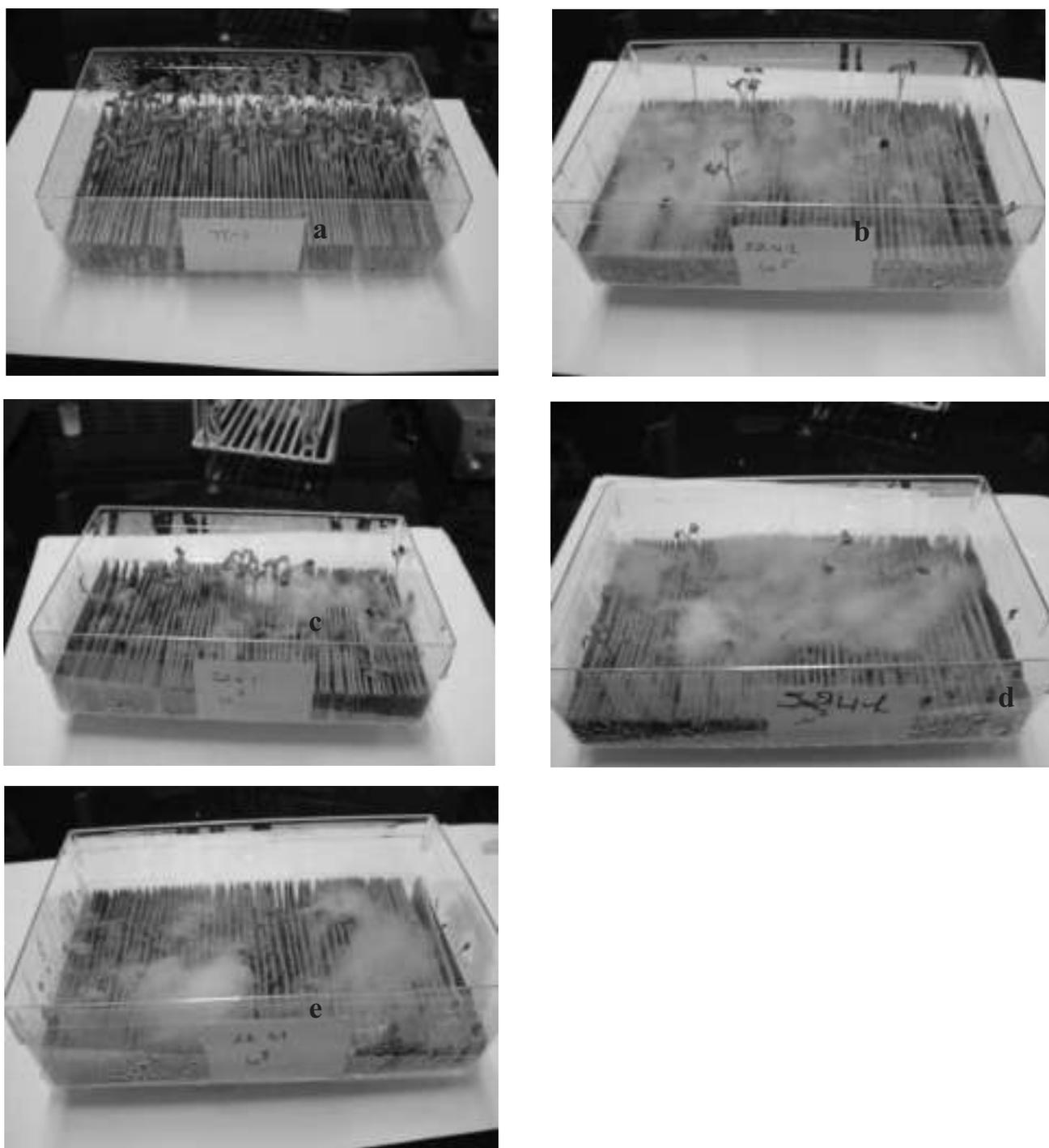


Figure : 1.1 Photos de symptômes sur plantules de chou contaminées par la souche (CFBP 5241) 14 jours après semis

(a) : Plantules saines ou témoin négatif trempées dans de l'eau distillée stérile. Les photos de b à e représentent les plantules malades issues des semences contaminées par des suspensions bactériennes (CFBP 5241) allant de 10^5 à 10^8 cfu ml⁻¹). Un développement de champignon est apparu suite à l'infection bactérienne des plantules.

1.3.2 Evaluation de la sensibilité de la détection de *X. c. pv. campestris* dans les semis par seed-qPCR

La bactérie a été détectée dans les échantillons quel que soit le protocole d'extraction d'ADN utilisé. En effet, les lots de semences inoculés avec une suspension bactérienne de 1×10^4 à 1×10^8 cfu ml⁻¹ par les deux techniques ont abouti à la même conclusion (Figure. 2). Théoriquement, cette technique que nous avons appelé "seed-qPCR», permet la détection de 1 cfu de *X. c. pv. campestris* par graine. C'est le nombre de cfu infiltré par semence selon le volume absorbé par graine lors de l'infiltration sous vide (0,1 µl) avec une concentration de l'inoculum égale à 1×10^4 cfu ml⁻¹.

La figure 1.2 montre que des signaux de détection positifs (Ct < Ct de l'eau) ont été observés pour les échantillons de semences inoculées avec des suspensions bactériennes à des concentrations égales ou supérieures à 1×10^4 ufc ml⁻¹. Selon le volume de la suspension inoculée (0,1 µl par semence), les graines inoculées par une suspension bactérienne égale à 1×10^4 ufc ml⁻¹ ont été inoculés avec une cellule bactérienne. Le Ct de l'eau n'a pas été significativement différent de Cts des échantillons inoculés avec une suspension égale ou inférieure à 1×10^3 cfu ml⁻¹, mais supérieure aux Cts d'échantillons de semences inoculées avec des suspensions bactériennes à concentrations égales ou supérieures à 1×10^4 cfu ml⁻¹.

1.3.3 Dynamique de croissance des bactéries au cours de la germination estimée par PCR en temps réel

La dynamique de croissance de *X. c. pv. campestris* CFBP 1121 a été mesurée sur huit lots de semences de 300 graines chacun contaminés par des suspensions bactériennes allant de 10 cfu/ml à 1×10^8 ml⁻¹ (Figure 1.3). Des valeurs de Ct égales à environ 18 sont observées sur les lots inoculés avec les fortes concentrations de bactéries traduisant une contamination forte des plantules. Les concentrations ont été extrapolées à partir de la courbe de régression, en utilisant un standard avec des concentrations de suspensions bactériennes connues de 1×10^2 à 1×10^8 cfu ml⁻¹ à chaque réaction.

Trois jours après la mise en culture, le niveau de contamination des plantules observé est proportionnel à la concentration des suspensions bactériennes utilisées

pour l'inoculation des graines. Pour les lots inoculés avec des concentrations inférieures à 1×10^7 cfu/ml, la charge bactérienne augmente au cours du temps traduisant une croissance de la population bactérienne dans les plantules.

Cependant, nous avons constaté qu'au bout de 6 et 7 jours après la germination, les concentrations bactériennes étaient plus faibles dans les graines inoculées avec une suspension bactérienne de 10^1 et 10^2 cfu ml⁻¹. Cela est éventuellement, causé par l'hétérogénéité de l'infection des semences dans les échantillons inoculés par de faibles concentrations d'inoculum (Figure. 1.3).

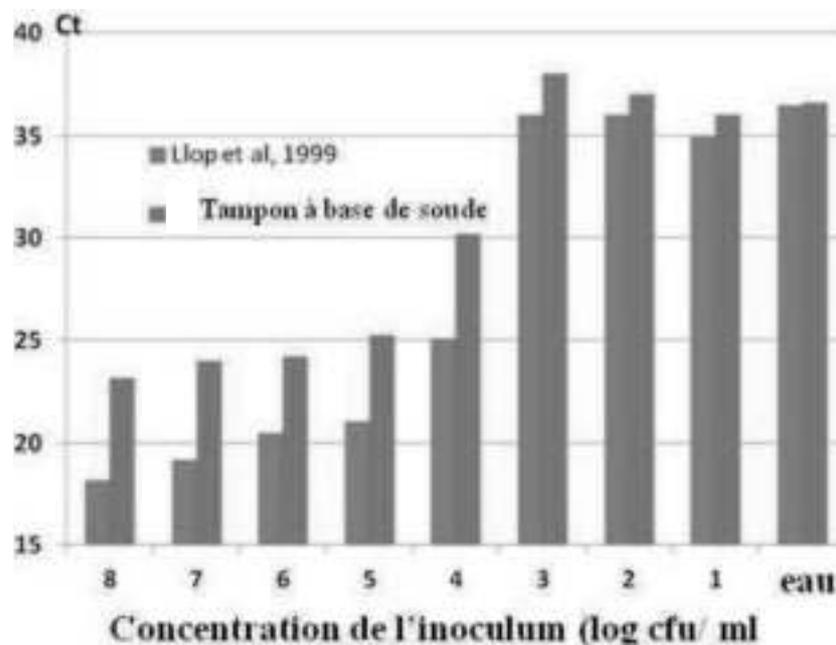


Figure.1.2 : L'évaluation de la sensibilité de la seed-qPCR pour la détection de *X. c. pv. campestris* (souche CFBP1121) dans les plantules selon deux protocoles d'extraction d'ADN:

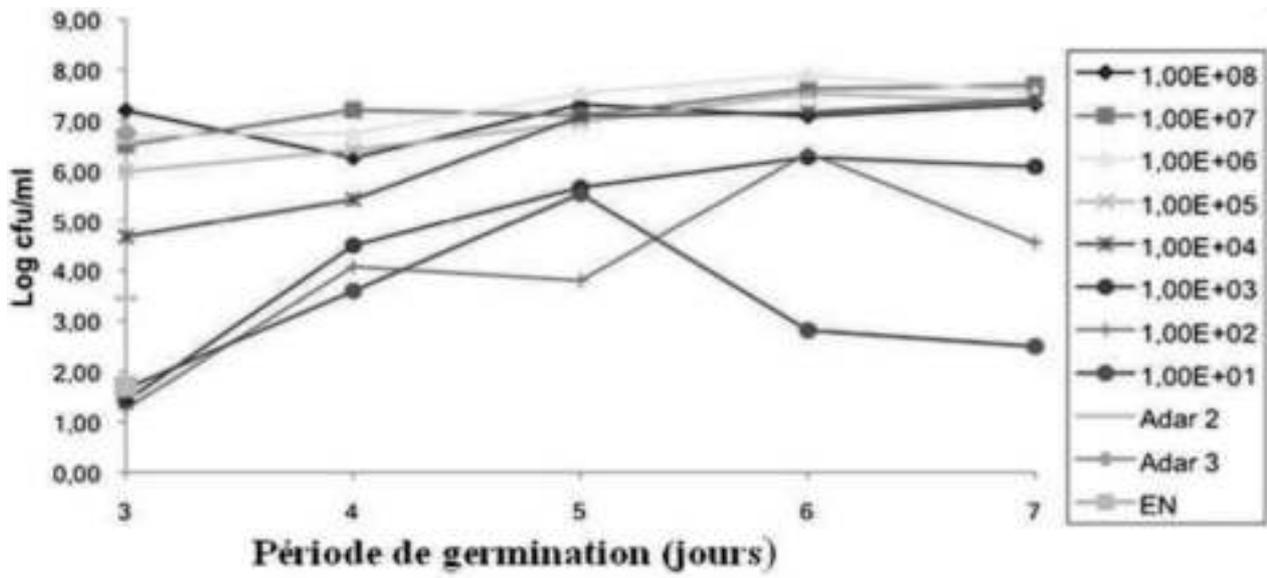


Figure 1.3 : Dynamique de croissance des bactéries au cours de la germination estimée par PCR en temps réel (seed-qPCR).

1.3.4 Mise au point d'une méthode de germination adaptée pour 10 000 graines

Trois lots de semences formés chacun de 10 000 graines de chou (ADAR 3) contaminées naturellement par *X. c. pv. campestris* ($1,4 \times 10^2$ cfu par graine) ont été utilisés pour ce test. La charge bactérienne a été estimée par comptage de colonies sur milieu L.P.G.A. à partir du lavât de semences récoltées.

Les lots de semences ont été mis à germer pendant 3 jours selon les trois méthodes décrites précédemment, afin d'évaluer celle qui permet d'obtenir une germination homogène de toutes les graines semées avec une augmentation de la population bactérienne initiale.

La première méthode s'inspire de la méthode de germination de référence de l'ISTA (International Seed Testing Association). Trois jours plus tard, le dénombrement réalisé sur les plantules obtenues, permet de révéler une faculté germinative d'environ 100%. La photo **a** de la Figure 1.4 montre un gain en germination après trois jours de semis avec un développement de chaque plantule (racine, tige et feuilles). A l'inverse, les graines semées selon les méthodes 2 et 3 ont germées mais la racine ne s'est pas développée (Figure 1. 4 **b, c**).

Une seed-qPCR a été effectuée sur l'ADN extrait à partir des graines germées selon les trois méthodes testées. Les résultats ainsi obtenus sont présentés au tableau 1.2. Les valeurs des Ct obtenus par seed-qPCR sur les plantules issues selon la première méthode de germination, traduit une multiplication de la population bactérienne par un facteur 100. Elle est passée de $1,4 \times 10^2$ à $1,15 \times 10^4$ cfu/graine. Les bactéries se multiplient aussi dans les semences en erlenmeyer mais d'un facteur 3 seulement. Nous avons donc choisi de retenir la première méthode de germination pour le reste de notre étude.

Tableau 1.2 : Comparaison entre trois méthodes de germination pour 10 000 graines

.Concentration de départ cfu/graine	Concentration bactérienne après 3 jours de germination					
	Méthode 1 Procédure de germination (ISTA)		Méthode 2 Dans un erlen avec (8/16) de photopériodisme		Méthode 3 Dans un erlen à l'obscurité	
$1,4 \times 10^2$	23,84 ^a	$1,15 \times 10^4$ ^b	28,11 ^a	$3,42 \times 10^2$ ^b	27,96 ^a	$3,26 \times 10^2$ ^b

^a Valeur des Ct

^b Concentration bactérienne cfu/graine déduite grâce à la courbe de régression $y = - 2,727x + 40$ calculée à partir d'une suspension bactérienne témoin souche (CFBP 1121) de concentration connue allant de 1×10^8 à 10 cfu/ml

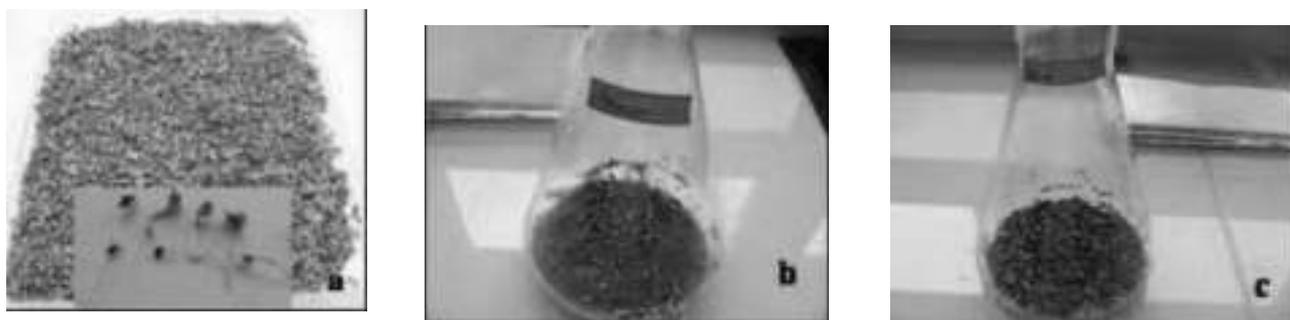


Figure 1.4 : Germination des semences (10 000 graines) 3 jours après le semis selon 3 méthodes testées

- a) Méthode 1 :** germination des graines dans une boîte en polyéthylène munie d'un papier buvard et incubé dans un phytotron
- b) Méthode 2 :** germination des graines dans un Erlen et incubé dans un phytotron
- c) Méthode 3 :** germination des graines dans un Erlen et incubé dans à l'obscurité

1.3.5 Comparaison entre la méthode de détection en LPGACvc / BIO-PCR et la seed-qPCR en temps réel dans des semences naturellement contaminées par *X. c. pv. campestris* :

Une étude comparative a été menée sur des lots de semences naturellement infectées par *X. c. pv. campestris*. Les lots de semences ont été testés par BIO-PCR (Fargier et Manceau 2007) et par seed-qPCR comme décrit ci-dessus.

Les résultats montrent l'efficacité de seed-qPCR comparée à la BIO-PCR (Tableau 1.3). Les valeurs des Ct obtenues par seed-qPCR dénotent la sensibilité de celle-ci, elle permet en effet de révéler la présence de *X. c. pv. campestris* dans certains échantillons révélés négatifs par la BIO-PCR conventionnelle, cas du 3^{ème} sous échantillon du lot E-41-661 (ADAR 3)

Le lot E 16-725 qui avait été désinfecté lors du traitement à l'usine s'est révélé infecté, remettant en cause l'efficacité du traitement. La détection de bactéries dans ce lot ne peut pas être attribuée à la présence de l'ADN à partir de cellules mortes dans la graine, car la détection est encore positive par BIO-PCR qui est une technique dans laquelle la culture sur milieu gélosé hydrolyse l'ADN libre dans l'échantillon.

1.3.6 Seuil de sensibilité de la seed-qPCR en temps réel

La sensibilité de la seed-qPCR a été évaluée sur des graines naturellement et artificiellement infectées par *X. c. pv. campestris*. Des lots constitués chacun de 100, 1000, 10 000 graines ont été contaminés artificiellement par une graine de charge bactérienne de 10⁵cfu/ graine. L'analyse par seed-qPCR a permis de révéler la présence de *X. c. pv. campestris* dans tous les lots y compris ceux avec un taux de contamination égal à une graine infectée par 10 000 graines saines. Les valeurs de Ct sont similaires pour les 3 répétitions de chacun des lots testés (tableau 1.4).

Tableau 1.3 : Comparaison entre deux méthodes d'enrichissement bactérien la BIO-PCR et la seed-qPCR

N° du lot de semences		seed -qPCR		LPGACvc / BIO-PCR		LPGACvc /BIO-PCR
		en temps réel		en temps réel		conventionnel
E41660 (ADAR 2)	Lot N° 1	30,55 ^a	2,84 x10 ^{3 b}	nt ^c		++ ^d
	Lot N° 1	23,4	1.76x10 ⁶	35,8	3.75.10	+ -
E 41-661 (ADAR 3)	Lot N° 2	27,6	3.26x10 ⁴	27,9	6.6x10 ³	+ -
	Lot N° 3	20,28	5,68 x10 ⁶	nt ^c		--
ADAR 5	Lot N° 1	-	-	-	-	--
E41-667 (ADAR 9)	Lot N° 1	25,96	1.54x10 ⁵	nt ^c		++
	Lot N° 2	35,20	2.641x10	nt ^c		++
E 16-725	Lot N° 1	29,7	4.76x10 ³	34,3	1.47x10 ²	++
	Lot N° 2	27,9	2.50x10 ⁴	25,2	7.1x10 ⁵	++
Lot désinfecté	Lot N° 3	28,2	1.91x10 ⁴	26,3	2.48x10 ⁵	++
Témoin Positif		19,4	2,20X10 ⁸			++

a : Valeur des Ct obtenue par PCR en temps réel en utilisant les amorces (DLH 153/ DLH154/Taq-Man P7)

b : Concentration bactérienne cfu/ml évaluée grâce à la courbe de régression $y = - 2,426x + 38,593$ obtenue avec une suspension bactérienne CFBP 1121 de concentration connue allant de 10^8 à 10^4 cfu/ml.

c. Non testé

d : Détection d'un amplicon par électrophorèse sur gel d'agarose avec un poids moléculaire à la taille attendu à raison de deux répétitions par échantillon.

Tableau 1.4 : Evaluation du seuil de sensibilité de la seed -qPCR

N° Echantillon	Taux d'infection	PCR en temps réel Valeur du Ct
1.1	1 : 100	+(22,7)
1.2	1 : 100	+(22,5)
1.3	1 : 100	+(21,4)
2.1	1 : 1000	+(22,3)
2.2	1 : 1000	+(20,5)
2.3	1 : 1000	+(20,0)
3.1	1 : 10 000	+(24,2)
3.2	1 : 10 000	+(25,2)
3.3	1 : 10 000	+(22,4)
Témoin positif	1 : 1	+(29)
Suspension bactérienne CFBP 1121	10 ⁸ cfu/ml	+(18,5)
Témoin négatif		-(39,1)

Une graine infectée (8×10^4 cfu par graine) a été rajoutée à des de lots de semences saines de 100, 1000 et 10 000 graines.

1.4 Discussion et conclusion :

La méthode conventionnelle adoptée par l'ISTA repose essentiellement sur les techniques microbiologiques. Ces tests consistent en l'isolement direct sur milieux appropriés des bactéries suspectes et leur identification finale par la mise en place d'un test de pouvoir pathogène pour valider le diagnostic (Roberts et Koenraadt 2006 ; Grimault *et al.*, 2013 ; Roberts et Koenraadt, 2014). Cette technique bien qu'elle soit fiable reste lourde et contraignante pour la routine (Berg *et al.*, 2005, 2006).

L'objectif de cette étude est de mettre au point un outil de détection moléculaire fiable et rapide des cellules vivantes de *X. campestris* dans les semences de brassicacées. Cette technique est basée sur un enrichissement bactérien par germination, couplé à une amplification de l'ADN cible par PCR en temps réel. Elle utilise le processus naturel de colonisation des plantules par les bactéries lors

de la germination puisque les bactéries se multiplient dans un tissu végétal physiologiquement vivant et permet d'augmenter ainsi la quantité initiale des bactéries.

Berg *et al.* (2006) ont développé un couple d'amorces combiné avec une sonde Taq-man identifiée dans le gène *hrpF* (hypersensitive response and pathogenicity) qui code pour le système de sécrétion de type III. L'enrichissement des bactéries par la germination des graines conjugué avec une Taq-Man-PCR en temps réel avec le couple d'amorces DLH ont fourni un protocole rapide et fiable pour détecter jusqu'à 1 cfu de *X. c. pv. campestris* par graine.

La période de germination proposée est de 3 jours, temps nécessaire pour une germination régulière de toute graine semée et une multiplication de *X. c. pv. campestris* pour atteindre un nombre de molécules d'ADN bactérien détectable par PCR. En outre, l'ADN des cellules mortes est hydrolysé par les ribonucléases libérées au cours de la germination des semences et la multiplication des bactéries.

L'efficacité de la seed-qPCR a été comparée à LPGACvc BIO-PCR en temps réel et LPGACvc BIO-PCR conventionnelle sur des lots de semences contaminés naturellement, désinfectés et sains. Les résultats ont montré que les deux techniques sont efficaces et permettent la détection jusqu'à 10 cfu ml⁻¹. La seed-qPCR a l'avantage d'être peu coûteuse et ne nécessite aucune préparation de milieu. La sensibilité de la seed-qPCR a été évaluée sur des lots de semences (*B. oleracea*) infectées artificiellement à des taux différents de 1: 100, 1: 1000 et 1: 10 000. La seed-qPCR peut détecter une seule semence infectée par *X. c. pv. campestris* parmi 10 000 graines saines.

L'observation des symptômes de la maladie sur tous les lots de plants inoculés par infiltration sous vide indique que la contamination artificielle par cette méthode était très efficace vu que l'infiltration de 10 cellules bactériennes par semence (1 x 10⁵ cfu / ml), a engendré des plantules infectées après 14 jours du semis. Aussi, elle a indiqué que les tests basés sur l'isolement des bactéries et effectués sur les graines avant le semis, a considérablement sous-estimé le niveau d'infection des semences, du moment que *X. c. pv. campestris* n'a été détecté que dans les lots de semences inoculés avec une concentration de 1 x 10⁸ cfu ml⁻¹.

Théoriquement, ces graines ont été inoculées avec une suspension bactérienne de 1×10^4 bactéries par semence. La première hypothèse proposée ci-dessus (la mortalité bactérienne au moment de l'inoculation) peut être écartée parce que les symptômes sont apparus sur toutes les plantules, 14 jours après l'inoculation, même dans le lot de semences inoculées avec 10^5 cfu ml⁻¹. L'inoculation des semences par cette méthode est très efficace. Elle peut être utilisée pour infecter des plants afin d'étudier la colonisation des plantes par des semences infectées et d'évaluer la vulnérabilité des plantes vis-à-vis des bactéries transmises par les semences.

Nous avons montré que les cellules de *X. c. pv. campestris* n'ont pas pu être isolées par macération à partir des semences infectées, étant donné qu'aucune colonie de *X. c. pv. campestris* n'a pu être détectée alors que les plantules issues de la germination de ces semences ont développé des symptômes au bout de 7-14 jours après l'inoculation. La méthode seed-qPCR combine l'extraction la plus efficace, la technique la plus sensible pour la détection de bactéries dans les échantillons extraits à ce jour.

Chapitre 2

Caractérisation des premiers isolats de la nervation noire des Brassicacées en Algérie, cas du chou et chou-fleur

2.1 Introduction

La maladie de la nervation noire est causée par la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Elle a été décrite pour la première fois aux Etats-Unis en 1895 par Pammel (Swing and Civerolo, 1993). Elle présente une distribution universelle et est considérée comme une des plus destructives sur les crucifères (Williams, 1980). Lorsque la maladie se développe tôt dans la saison, les plants infectés sont souvent invendables et très sensibles aux pourritures molles causées par d'autres agents pathogènes. Sous des conditions climatiques propices d'humidité et de température, la nervation noire peut être la cause de pertes importantes qui peuvent atteindre les 100 % chez les variétés sensibles (Mgongia et Swai 2000; Massomo *et al.*, 2004 Janse et Wenneker, 2002). Plusieurs espèces de crucifères peuvent être inféodées à cette maladie : chou, chou-fleur, chou frisé, brocolis, navet, radis, choux rave et moutarde. Cependant, le chou, le chou-fleur et le chou frisé sont les plus sensibles (Kocks et Zadoks, 1996). Un grand nombre d'adventices peuvent être également infectées : passerage, navette, ravenelle, capselle, bourse de pasteur, moutarde noire et radis sauvage. Elles assurent la conservation de l'agent pathogène toute l'année, et constituent une source d'inoculum, notamment en bordure des parcelles (Rat et Chauveau, 1985., Schaad et Kendrick, 1975). *X. campestris* pv. *campestris* est transmis par semences (Cook *et al.*, 1952; Schaad *et al.*, 1980; Schultz et Gabrielson, 1986). Les moyens de lutte sont essentiellement basés sur des mesures prophylactiques, notamment l'utilisation de lots de semences certifiés pathogen-free et l'élimination du commerce des lots positifs (Taylor, 1993; Janse et Wenneker, 2002; Taylor *et al.*, 2002), avec un renforcement de la lutte intégrée.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* agent causal de la nervation noire des brassicacées n'a jamais été signalé en Algérie. L'étude réalisée par Emmanouilidis remonte à 1976; elle a révélé l'absence de cette maladie sur le territoire Algérien. Néanmoins, des symptômes similaires à la nervation noire ont été observés sur plusieurs parcelles de production de choux et de choux fleurs, dans l'Algérois dans la région de Rouiba (Figure 2.1). Les symptômes observés se caractérisent

par des lésions très caractéristiques; couleur jaunâtre en forme de U ou V à l'extrémité des feuilles, taches d'apparence graisseuse suivi d'un noircissement des nervures.

L'objectif de notre travail a été de rechercher la présence éventuelle de *X. c. pv. campestris* dans les cultures de choux dans les principales zones de production du Nord de l'Algérie, de caractériser la diversité des populations bactériennes présentes en comparaison avec les souches de références et d'identifier l'origine ou la source probable de l'inoculum. Cent soixante-dix isolats ont été identifiés et caractérisés par des tests biochimiques, biologiques et moléculaires. Soixante-dix-sept isolats ont été sélectionnés pour étudier leur diversité génétique par la méthode moléculaire à haut débit la **MLSA** (Multilocus Sequence Analysis) en utilisant 2 gènes de ménage, le gène *gyrB* qui code pour l'ADN gyrase B et le gène *ropD* qui code pour le facteur sigma 70.



Figure 2.1 : Parcelle de choux- (variété Arizona) présentant des symptômes typiques de la nervation noir sur une parcelle de choux dans la région de Tipaza.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Prélèvement des échantillons

Trois cent quinze échantillons de feuilles présentant des symptômes typiques de la nervation noire des brassicacées (lésions couleur jaunâtre en forme de U ou V à l'extrémité des feuilles) (Figure 2.2) ont été prélevés de 2011 à 2014.

Le prélèvement a été réalisé au niveau de 76 parcelles de production de choux (*Brassica oleracea* spp. *capitata*) et chou-fleur (*Brassica oleracea* spp. *Botrytis*) dans plusieurs wilayas du nord algérien (Boumerdès, Alger, Tipaza, Ain Defla, Skikda, Mostaganem, Tizi Ouzou) (Figure 2.3). Les échantillons de feuilles ont été codifiés par un numéro unique dans des sacs en plastique puis transportés au laboratoire phytosanitaire du CNCC et stockés à 4 °C jusqu'à leur utilisation. La région, l'espèce, la variété et la date de prélèvement sont mentionnés dans le tableau 2.6 (annexe1).

2.2.2 Isolement et purification des isolats :

Cent soixante dix souches ont été isolées selon le protocole décrit par Schaad *et al.* (2001); l'échantillon prélevé est rincé à l'eau du robinet puis séché. Le tissu prélevé est choisie à la limite de la zone saine/zone malade. Les fragments sont déposés dans une boîte de Pétri contenant 2 ml d'eau distillée stérile puis dilacérés finement à l'aide d'un scalpel stérile et maintenus en macération pendant 20 min à température ambiante. Une série de dilutions au 1/10^{ème} allant de 10⁻¹ à 10⁻⁸ a été effectuée. Cinquante microlitre de chaque dilution sont étalés à l'aide d'un étaloir sur toute la surface du milieu gélosé LPGACvc (extrait de levure 7g/L, peptone7g/L, glucose7g/L et agar bactériologique 15g/L associé à la Cycloheximide 100 mg/L, la céfalexine 25 mg/L et de la vancomycine 0,5 mg/L). Les bactéries sont ensuite incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours.

Les colonies caractéristiques (couleur et forme) sont purifiées par dilution de chaque type observé. Vingt microlitres sont alors étalés par épuisement en 3 secteurs sur milieu LPGA et sur milieu GYCA (extrait de levure 5g/L, glucose 10g/L, CaCO₃ 40g/L et agar bactériologique 15g/L) à 28 °C afin obtenir des cultures pure.

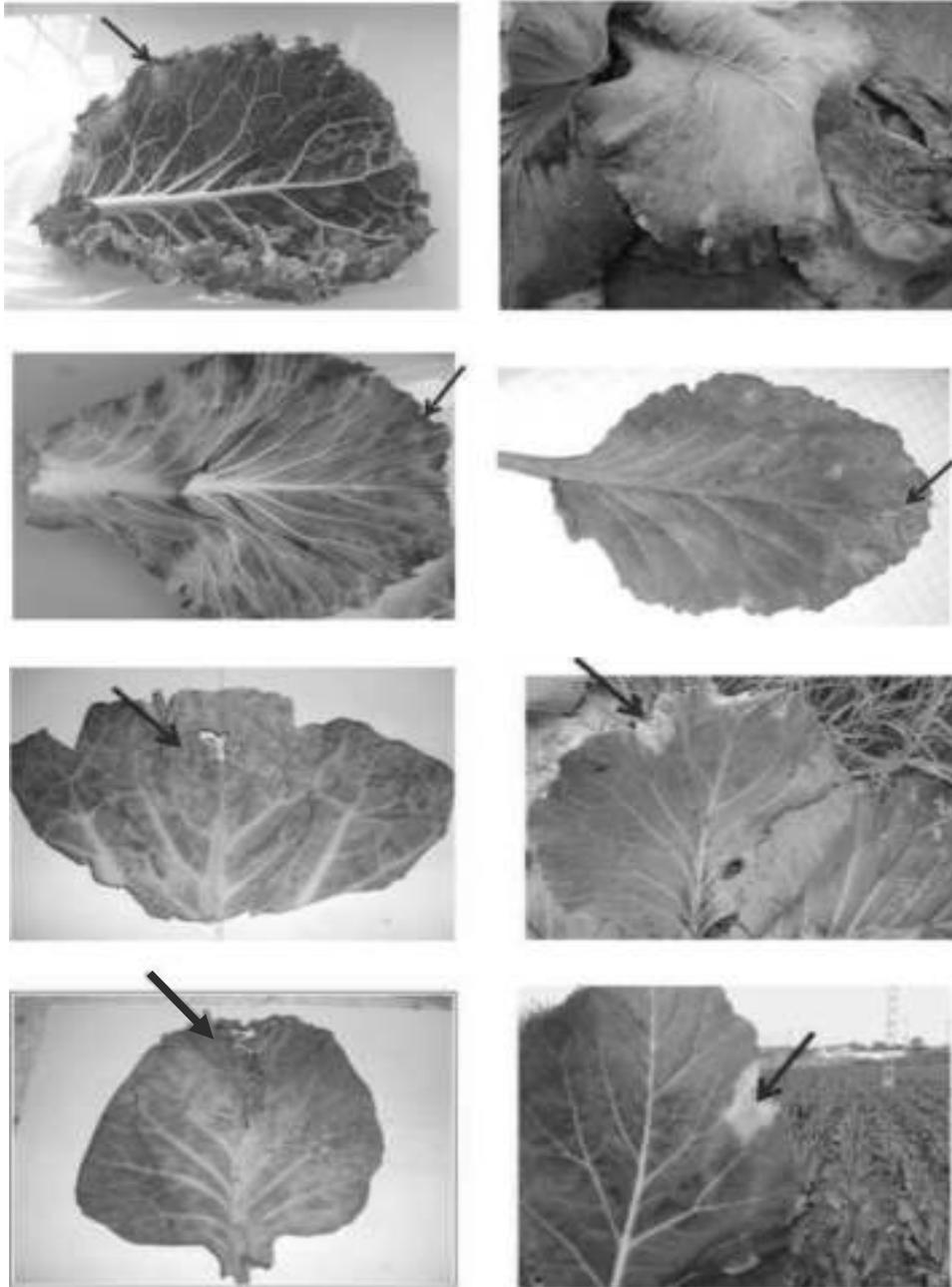


Figure 2.2 Exemples d'échantillons présentant des symptômes typiques (lésions sous forme de U ou V à l'extrémité des feuilles présentées par une flèche bleu) ayant servi à l'isolement des souches de *X. c. pv. campestris* en Algérie.

Les deux souches de références utilisées durant notre étude proviennent de la Collection Française de Bactéries Associées aux Plantes, Beaucozéz, France (CIRM-CFBP). Il s'agit de la souche CFBP 5241 (ATCC 33913) et la souche CFBP 1121. Les colonies obtenues ont été identifiées par des observations physiologiques, des tests biochimiques, biologiques et moléculaires puis conservées à + 4°C et à - 20°C dans du glycérol à 20 %.

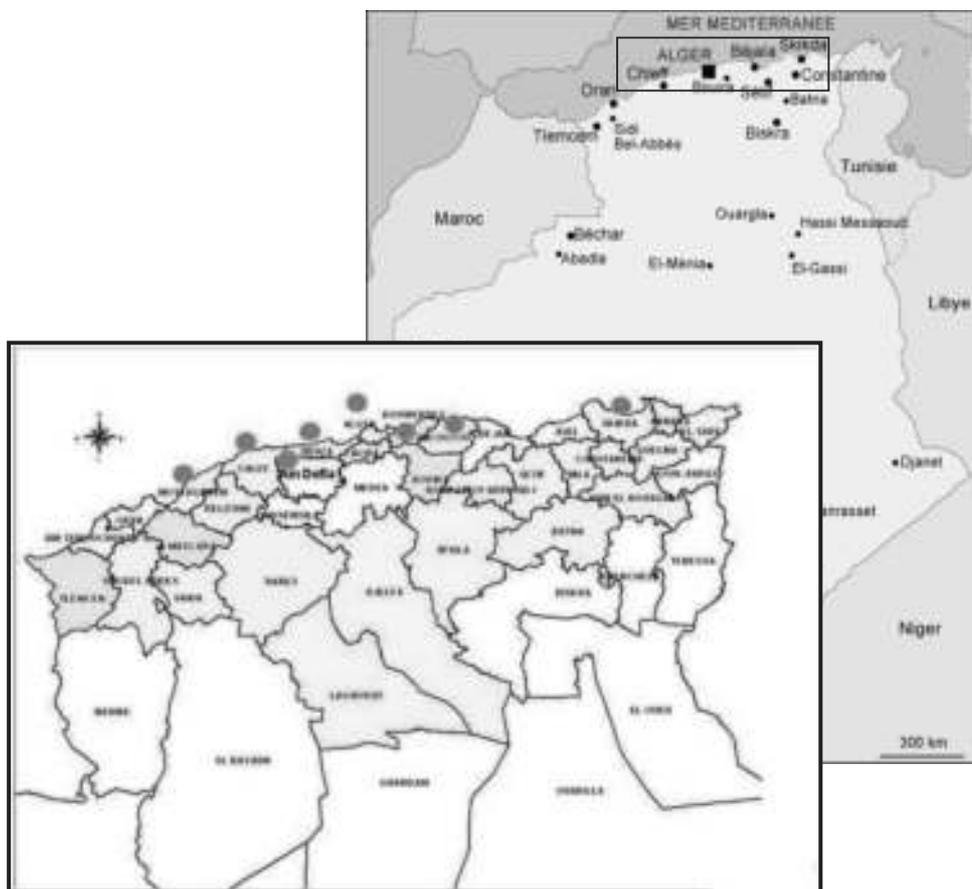


Figure 2.3 : Zones de prospection et de collecte des échantillons (cercles en rouges)

2.2.3 Identification biochimique :

Cent soixante-dix isolats obtenus ont été testés pour leur caractéristiques morphologique sur milieu LPGA et GYCA, leur activité oxidative-fermentative vis-à-vis du glucose, catalase and oxydase (Klement et *al.*, 1990), esculine (Lelliott et al, 1987), la réduction du nitrate. Deux souches de références (CFBP 1121 et CFBP 5241) ont été utilisées comme témoins pour valider nos résultats.

2.2.4 Hypersensibilité sur tabac.

Les bactéries suspectées d'être du *X. campestris* pv. *campestris* ont été testées vis-à-vis du test d'hypersensibilité sur tabac (*Nicotiana tabacum*). Deux anses de culture bactérienne ont été mises en suspension dans 4,5 ml d'eau stérile. Cette suspension bactérienne (environ 10^9 cfu/ml) a été infiltrée dans le limbe de feuille de tabac. La réaction de la plante a été observée 24 h et 72 h après infiltration.

2.2.5 Amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR) :

L'ADN est extrait à partir de 1 ml de suspension bactérienne (environ 10^6 cellules/ml) préparée à partir de bactéries cultivées pendant 24h sur du milieu LPA (extrait de levure 7g/L, peptone 7g/L et agar bactériologique 15g/L) à 27°C. Les tubes sont incubés à 100°C pendant 10 min. Ils sont ensuite placés dans la glace, puis centrifugés à 10 000 tours pendant 5 min. Le culot est éliminé alors que le surnageant contenant l'ADN est conservé à -20°C dans des microtubes de 1,5 ml pour une utilisation future. Les amplifications ont été réalisées par PCR en multiplex dans un mélange réactionnel de 20 µl ciblant le gène *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity). Ce dernier comprend le tampon 1X Green GoTaq Flexi Buffer (Promega), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,5 µM de chaque amorce spécifique DLH120 et DLH125 (Berg et *al.*, 2005), 0,05µM de chaque amorce universelle : **1052-F** et **Bac-R** (Eden et *al.*, 1991) (tableau 2.1), 0,05U de la GoTaq Flexi Buffer DNA polymérase et 3µl d'ADN cible. L'amplification des fragments d'ADN a été effectuée à l'aide du thermocycleur de type C1000 Touche Thermal (Bio-Rad) selon un programme qui consiste en une dénaturation de 3 min à 95°C suivi de 35 cycles de 40 sec de

dénaturation à 95°C, 40 sec d'hybridation des amorces à 63°C (touchdown à 58°C au cours des 6 premiers cycles) et 40 sec d'élongation à 72°C.

2.2.6 Analyse des produits amplifiés

Au terme de la PCR, les produits d'amplification obtenus sont analysés sur gel d'agarose à 1,5 % dans du tampon TBE 0,5 X. Dix microlitres de chaque produit d'amplification ont été chargés dans des puits de gel correspondants avec 7 µl d'un marqueur de poids moléculaire à 100 paires de base. L'ensemble est soumis à une électrophorèse sous un voltage constant (100 V) pendant 30 min. Les produits amplifiés sont visualisés à l'aide d'un transilluminateur à UV GelDoc 2000 Bio-RAD, après coloration au bromure d'éthidium (5µg ml⁻¹).

2.2.7 Test du pouvoir pathogène :

Le pouvoir pathogène été réalisé sur les isolats algériens suspectés d'être du *Xcc* conformément à la procédure décrite (Laala *et al.*, 2015). Des semences de chou-fleur de la variété Arizona ont été contaminées par des suspensions bactériennes à raison de 10⁷ cfu/ml. Les souches de référence (CFBP 1121 et CFBP 5241) ont été utilisées comme témoins positifs ainsi que des semences inoculées avec de l'eau distillée stérile (témoin négatif) pour valider le test. Les semences ont été mises à germer pendant 14 j afin de tester leur état sanitaire.

2.2.8 Amplification et séquençage des gènes de ménage :

Trois isolats à savoir, le *Xcc* DZ114.10, *Xcc* DZ11 3.5 et *Xcc* DZ1388.2 ont été séquencés afin d'évaluer leur niveau d'homologie vis-à-vis des souches disponibles dans la banque de données NCBI (Altschul *et al.*, 1990). Quatre gènes de ménage ont été utilisés pour chacun des trois isolats : *atpD* (synthase beta chain), *dnaK* (heat shock protein 70, molecular chaperone DnaK), *gyrB* (DNA gerase subunit B) et *rpoD* (RNA polymerase sigma-70 factor).

La PCR a été réalisée en utilisant 4 couples d'amorces : P-X-ATPD-F/P-X-ATPD-R, P-X-DNAK-F /P-X-DNAK-R, emirgyrB1-F/emirgyrB1-R et emirpoD13/emirpoD11 respectivement pour chacun des 4 gènes (tableau 2.1) (Fargier *et al.*, 2011).

Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur (Icycler Biorad USA) avec un mélange réactionnel de 20 µl qui contient le tampon 1X Green GoTaq Flexi Buffer (Promega), 1,5 µl de 25 Mm MgCl₂, 0,2 Mm de dNTP, 0,5 µm de chaque amorce et 1U de GoTaq Flexi Buffer DNA polymérase (Promega) et 3µl d'ADN cible. Le programme d'amplification consiste en une dénaturation de 5 min à 95°C suivi de 35 cycles de 30 sec de dénaturation à 95°C, 45 sec d'hybridation des amorces à 63°C et 1,30 min d'élongation à 72°C. Le dernier cycle est suivi d'une extension finale de 5 min à 72°C. Les produits PCR obtenus ont été analysés sur gel d'agarose à 1,5%. Les 2 brins des amplicons obtenus des 3 isolats préalablement cités, ont été séquencés par le laboratoire GATC Biotech Germany. Les Chromatogrammes obtenus ont été analysés par le logiciel 4 peaks 1.7.2 (<http://nucleotype.com/4peaks/>). Les séquences d'ADN ont été alignées à l'aide du logiciel Multalin (Corpet, 1988 <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). Les séquences partielles ainsi obtenues ont été comparées à celles de la base de données disponibles dans BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) dans la base de données NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tableau 2.1 : Amorces utilisées pour la détection et le séquençage des isolats algériens

Gènes cibles	Amorces	T _m (°C)	Séquences (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	Références
<i>hrP</i>	DLH120 ^a	63°	CCGTAGCACTTAGTGCAATGGCA	619	Berg <i>et al.</i> , 2005
	DLH125 ^b		TTCCATCGGTCACGATTG		
Amorces universelles	1052-F ^a	63°	GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTTA	441	Eden <i>et al.</i> , 1991
	Bac-R ^b		CGGCTACCTTGTTACGACT		
<i>atpD</i>	P-X-ATPD-F ^a	62	GGGCAAGATCGTTCAGAT	868	Fargiet <i>et al.</i> , 2011
	P-X-ATPD-R ^b		GCTCTTGGTCGAGGTGAT		
<i>dnaK</i>	P-X-DNAK-F ^a	62	GGTATTGACCTCGGCACCAC	1034	Fargiet <i>et al.</i> , 2011
	P-X-DNAK-R ^b		ACCTTCGGCATAACGGGTCT		
<i>gyrB</i>	emigyrB1F ^a	63	TGCGCGCAAGATCCTCAAC	904	Fargiet <i>et al.</i> , 2011
	emigyrB4R ^b		GCGTTGTCTCGATGAAAGTC		
<i>rpoD</i>	emirpo11F ^a	63	ATGGCCAACGAACGTCCTGC	1313	Fargiet <i>et al.</i> , 2011
	emirpo13R ^b		AACTTGTAACCGCGACGGTATTC G		

T_m : température d'hybridation, **a** : amorce sens, **b** : amorce antisens

2.2.9 Analyse de la diversité génétique par MLSA (Multilocus Sequences Analysis)

L'objectif de cette approche consiste à étudier la diversité génétique des gènes de ménage des souches isolées en Algérie et de les comparer aux souches mondiales afin et d'identifier la source éventuelle de l'inoculum isolé.

Dans ce contexte, 96 souches ont été sélectionnées parmi les 170 souches caractérisées par rapport à leur activité microbiologique, biochimique et moléculaire pour une étude phylogénétique. Deux gènes de ménage ont été désignés pour réaliser cette étude. Le gène *gyrB* et le gène *rpoD* préalablement cités qui codent respectivement pour ADN gyrase B et le facteur sigma 70. Le gène *gyrB* est un bon marqueur de spécificité entre les espèces, tandis que le gène *rpoD* est un bon marqueur de discrimination au sein d'une même espèce (Fischer-Le Saux, communication personnelle). Le protocole et les conditions d'amplification sont les mêmes que celles définies précédemment.

La qualité et la quantité des amplifiats obtenus ont été testées sur gel d'agarose à 1,5 % et par Nano Drop ND-2000 (thermo Scientific). Les amplicons des 96 souches prédites pour chacun des deux gènes ont été séquencés au niveau du laboratoire GATC Biotech Germany. Les séquences ainsi obtenues ont été analysées par le logiciel 4 peaks 1.7.2. et alignées par le programme Bioedit (Hall, 1999). Les séquences ayant une longueur supérieure à 500 pb ont été retenues pour la suite de nos travaux.

Pour une évaluation plus approfondie de la diversité génétique au sein des souches isolées en Algérie, les données de séquences d'ADN des 2 gènes ont été concaténées par ordre alphabétique, à savoir le gène *gyrB* suivi du gène *rpoD* en utilisant le logiciel GENI-OUS version 4.8.5 (BIOMATTERS). L'analyse du polymorphisme entre les souches a été réalisée sur chaque gène ainsi que sur les séquences des 2 gènes concaténés en utilisant le logiciel DnaSp (DNA Sequence polymorphisme) version 5.10 (Rosas *et al.*, 2010). Cette analyse est basée sur la méthode Tajima's (Tajima, 1996), permettant la comparaison des séquences d'ADN deux à deux. La différenciation entre les haplotypes formés se base sur la présence d'un seul nucléotide différent par séquence (wicher *et al.*, 2012, Tancos *et al.*, 2015).

La construction de l'arbre phylogénétique a été réalisée avec le logiciel Mega version 6.06 (Tamura et al., 2013) basé sur la méthode de maximum de vraisemblance (Maximum likelihood ML) (Tamura and Nei, 1993). Ce logiciel permet une analyse rapide d'un nombre important de séquences. Il permet la reconstruction phylogénétique évolutive basée sur une analyse statistique de bootstrap à 1000 répliques.

L'arbre est construit avec les séquences de chacun des deux gènes et également avec les séquences des deux gènes concaténées. Des séquences de *X. c. pv. campestris* publiées sur la base de données NCBI ont été intégrées pour les comparer à notre collection. La séquence de la souche *X. c. pv. vesicatoria* 85-10 (Thieme et al., 2005) a été utilisée comme référence externe afin d'enraciner l'arbre.

2.3 Résultats

2.3.1 Caractérisation physiologique et biochimique des souches isolées en Algérie :

Parmi les 315 échantillons symptomatiques prélevés entre 2011 et 2014, 170 isolats se sont avérés similaires aux souches de référence de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* fournis par la collection française de bactérie associées aux plantes (CIRM-CFBP). Après trois jours d'incubation, les souches suspectes présentent des colonies rondes, convexes et jaunes sur milieux LPGA et CYCA (Figure 2.4).

Elles sont Gram négatif et répondent aux caractéristiques biochimiques décrites dans la littérature par (Lelliott et Stead, 1987; Schaad, 1980). Elles utilisent le glucose de façon oxydative (Hugh and Leifson, 1953), elles possèdent une levane-sucrase, et une activité catalase. Elles sont dépourvues de cytochrome oxydase (bandelettes d'oxydase strips (Fluka Analytical Suisse) et ne réduisent pas les nitrates (tableau 2.2).

2.3.2 Réaction d'hypersensibilité sur tabac

Les souches isolées ainsi que les souches de référence inoculées ont induit une réaction d'hypersensibilité sur les feuilles de tabac qui s'est traduite par l'apparition d'une nécrose autour du point d'inoculation (Figure 2.5).

Tableau 2.2 : Caractérisation physiologiques et biochimiques des isolats algériens échantillonnés entre 2011 à 2014 en comparaison avec des souches de référence

Isolats	Origine	Réaction de Gram	Colonies jaunes sur LPGA et GYCA	Tabac	Esculine	oxydase	Levane	Nitrate réductase
Xcc Isolats	DZ Algérie	-	+	+	+	-	+	-
CFBP 1121	France	-	+	+	+	-	+	-
CFBP 5214 (ATCC 33913)	R.Uni	-	+	+	+	-	+	-



Figure 2.4: Aspect des colonies jaunes typiques de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur GYCA : Isolat Xcc DZ114.10



Figure 2.5 : Nécroses rapides autour du point d'inoculation sur feuille de tabac induit par les isolats algériens typique d'une réaction d'hypersensibilité
Exemple souche *Xcc*DZ114.10

2.3.3 Amplification de l'ADN par Polymerase chain reaction (PCR) :

Les résultats des produits amplifiés obtenus par PCR multiplex avec le couple d'amorces développées par Berg *et al.*, 2005 ciblant le gène *hrp* ont mis en évidence la présence d'amplifiât à la taille attendue c'est à dire 619 paires de bases pour les 170 isolats testés (Figure 2.6). Par ailleurs, le profil électrophorétique permet de visualiser une bande à une taille de 441 pb qui correspond au couple d'amorces (1052-F/Bac-R). Ce couple d'amorces nommées amorces universelles (Eden *et al.*, 1991) sont utilisées comme témoin interne de la réaction PCR afin de valider la réaction et pour éviter les faux négatifs engendrés par la présence éventuelle d'inhibiteurs de PCR.



Figure 2.6 : Migration sur gel d'agarose à 1,5 % des produits PCR réalisés avec les amorces DLH120 et DLH125 (Berg *et al.*, 2005) et 1052-F et Bac-R (Eden *et al.*, 1991) sur les différentes souches isolées en Algérie

M : Marqueur de poids moléculaire à 100 p.b. (Promega)

TP souche de référence *X. c. pv. campestris* CFBP 5241,

TN-Témoin négatif eau, 1-14 : souches isolées en Algérie.

2.3.4 Test du pouvoir pathogène :

Les graines contaminées par une suspension bactérienne appartenant à la collection algérienne (souche Xcc DZ) et la souche 5241 à 1×10^7 cfu/ml ainsi qu'un lot de semences inoculé par de l'eau distillée stérile (témoin négatif), ont été mises à germer. Le développement de la population bactérienne introduite a été suivi par des observations régulières des symptômes. Sept jours après le semis (première notation), les premières plantules malades ont été repérées. Au bout du quatorzième jour, les plantules de tous les lots contaminés étaient malades. Le témoin négatif ne présentait aucun symptôme de la maladie (Figure 2.7).

Un isolement a été de nouveau réalisé sur milieu LPGACvc à partir des plantules germées et a conduit à l'apparition de colonies typiques de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

2.3.5 Amplification des gènes de ménage :

Trois isolats de *X. c.* pv. *campestris* (Xcc DZ114.10, Xcc DZ113.5 et XccDZ1388.2) ont été amplifiés en utilisant 4 gènes de ménage à savoir le gène *gyrB*, le gène *rpoD*, le gène *atpD* et le gène *dnaK* (Fargier et al., 2011). Les résultats de la PCR ont révélé la présence des 4 bandes aux tailles attendues, respectivement de 904 bp et 1013 pb, 868pb et 1034 pb (Figure 2.8 A et 2.8 B).

Les séquences d'ADN nucléotidiques des 4 gènes de ménages séquencés à partir des 3 souches isolées en Algérie ont montré un pourcentage d'homologie allant de 98 à 100 % avec les séquences présentes dans la banque de gènes de NCBI (Tableau 2.3). Les séquences partielles des isolats Xcc DZ114.10, Xcc DZ113.5 et Xcc 13 88.2 ont été déposées respectivement dans la banque de données NCBI sous les numéros d'accès suivants : le gène *atpD* (KU556302- KU556304), gène *dnaK* (KU556305- KU556307), gène *gyrB* (KU556308- KU556310) et *rpoD* (KU556311- KU556312) (annexe 2).

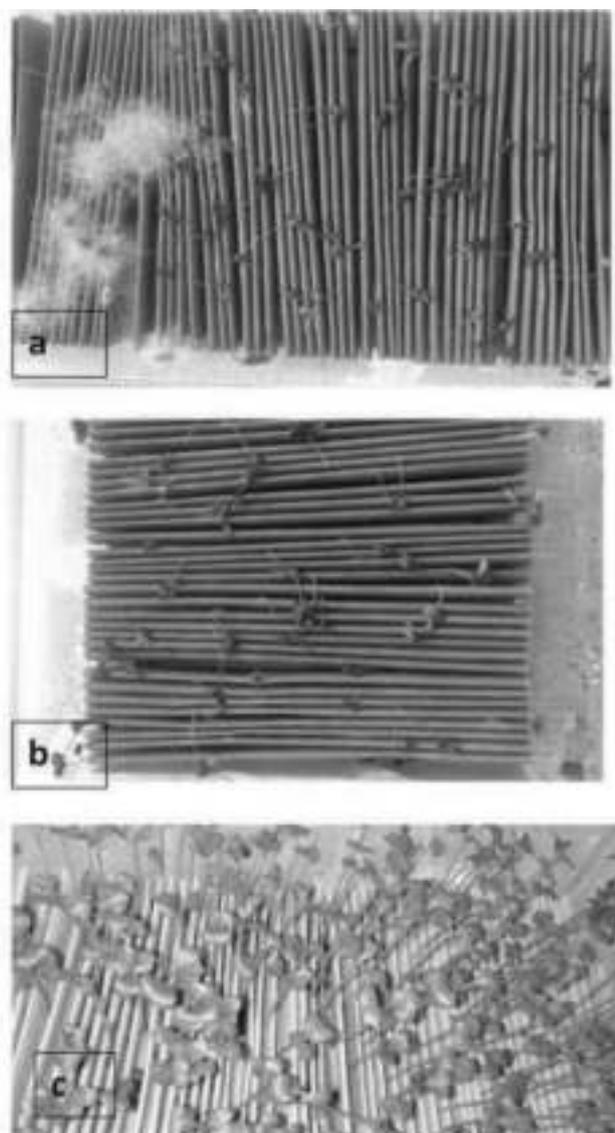


Figure : 2.7 Test du pouvoir pathogène réalisé sur un lot de semence de la variété Arizona.

(a) : Plantules contaminées avec une suspension bactérienne d'une souche de référence (CFBP 5241), **(b)** : Plantules contaminées avec une suspension bactérienne d'une souche isolée en Algérie (XccDZ114.10), **(c)** plantules inoculées par de l'eau distillée stérile (témoin négatif).

Tableau 2.3 : Comparaison entre les séquences d'ADN des 4 gènes de ménage des isolats algériens avec les autres espèces de *Xanthomonas*

Isolats algériens	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	<i>atpD</i>	<i>dnak</i>
XccDZ114.0	Xcc ATCC 33913 ^a	Xcc-C-168	Xcc ATCC 33913	Xcc ATCC 33913
	734/735 ^b (99%) ^c	574/577 (99%)	661/667(99%)	778/779 (99%)
	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> str. 85-10	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10
	639/736(87%)	539/578(93%)	630/666 (95%)	736/779 (94%)
XccDZ113.5	Xcc ATCC 33913	Xcc-C-168	Xcc ATCC 33913	Xcc ATCC 33913
	734/735 (99%)	577/577(100%)	663/667 (99%)	777/779 (99%)
	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10
	639/736 (87%)	639/736 (87%)	542/578 (94%)	735/779 (94%)
XccDZ1388.2	Xcc ATCC 33913	Xcc-C-168	Xcc ATCC 33913	ATCC 33913
	734/735 (99%)	576/577(99%)	663/667 (99%)	776/779 (99%)
	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10	<i>X. c. pv. vesicatoria</i> 85-10
	639/736 (87%)	541/578 (94%) ^b	630/666(95%)	734/779 (94%)

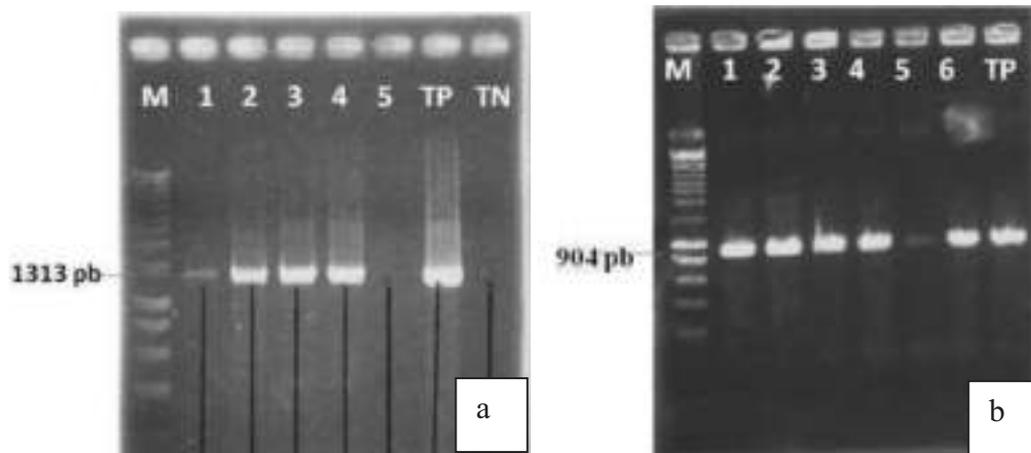


Figure 2.8 A: Détection des produits amplifiés par PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%

M : Marqueur de poids moléculaire à 100 p.b. (Smart ladder Eurogentec),

TP souche de référence *X. c. pv. campestris* CFBP 5241, TN-Témoin négatif eau PCR

(a) : Produits d'amplification avec le couple d'amorces emirpo11F/emirpo13R (gène *rpoD*)

(b) : Produits d'amplification avec le couple d'amorces X-gyrB1F/X-gyrB1R (gène *gyrB*)

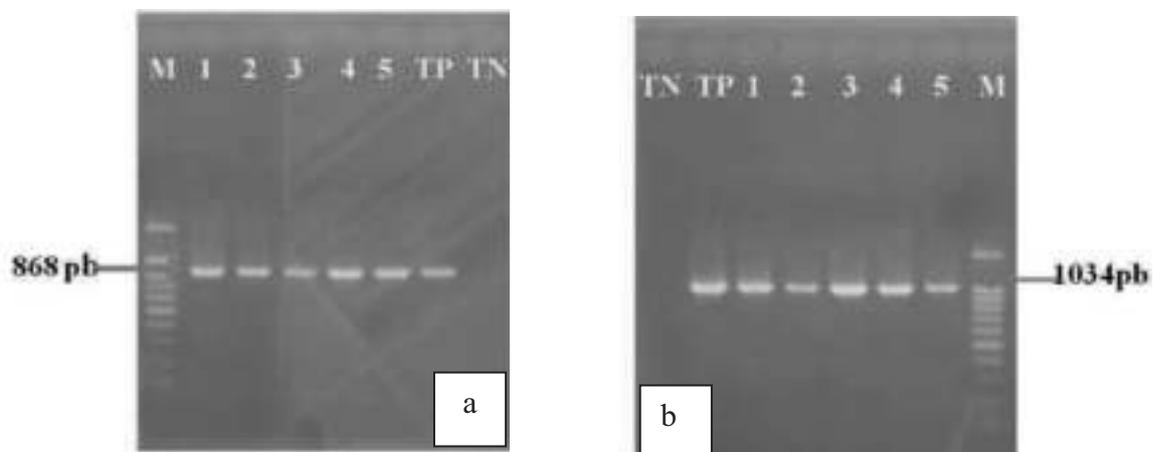


Figure 2.8 B: Détection des produits amplifiés par PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%

TP : souche de référence *X. c. pv. campestris* CFBP 5241,

TN : Témoin négatif eau PCR

(a) : Produits d'amplification avec le couple d'amorces P-X-ATPD-F/ P-X-ATPD-R (gène *atpD*)

(b) : Produits d'amplification avec le couple d'amorces P-X-DAK-F/ P-X-DNAK-R (gène *dnaK*)

2.3.6 Etude de la diversité génétique par la méthode MLSA (Multilocus Sequence Analysis)

Parmi les 170 souches de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolées et testées par les tests biochimiques et moléculaires, 96 souches représentatives de toutes les régions échantillonnées ont été sélectionnées pour l'étude de la diversité génétique. Cette étude a été réalisée par la méthode MLSA sur deux gènes de ménage à savoir, le gène *gyrB* et le gène *rpoD*

A cet effet, les produits PCR obtenus (protocole décrit précédemment) pour chacun des deux gènes ont été séquencés. Les séquences nucléotidiques ainsi obtenues ont été analysées et nettoyées par le logiciel 4 peaks. Seules les séquences dont la taille est supérieure à 500 paires de base ont été retenues pour notre étude. Ce qui a permis d'obtenir 94 séquences de 735 pb chacune pour le gène *gyrB* et 83 séquences de 577 pb chacune pour le gène *rpoD*.

L'analyse phylogénétique effectuée par le logiciel Dnasp (DNA Sequence Polymorphism) (Rozas *et al.*, 2010) sur les deux gènes a révélé la présence d'une diversité au sein des souches isolées en Algérie.

L'analyse des séquences du gène *gyrB* a fait ressortir 6 haplotypes, avec un haplotype majoritaire. Cet haplotype regroupe 85 souches soit 95% des souches isolées. Ces dernières ont été isolées à partir de 36 parcelles prospectées pendant une période qui s'étale de 2011 à 2014. L'haplotype 2 comprend une seule souche isolée à partir d'une seule plante malade issue d'une parcelle de chou de variété Chebli dans la région de Sidi Fredj. L'haplotype 3 regroupe 3 souches issues d'une même parcelle dans la wilaya de Tizi Ouzou. Trois souches partagent le même haplotype (H4) alors qu'elles ont été isolées à partir de trois échantillons prélevés au niveau de deux zones différentes : La souche *XccDZ14105.75* isolée à partir d'un échantillon prélevé dans la région de Zéralda sur une parcelle de chou-fleur de variété solo, tandis que les souches *XccDZ14106.127* et *XccDZ14106.129* ont été isolées au niveau de la région de Ain Defla sur une parcelle de chou-fleur de variété Arizona. Par ailleurs, les souches *XccDZ14106.126* et *XccDZ14106.130* prélevées à partir d'une même parcelle se dissocient en deux haplotypes différents.

L'analyse du polymorphisme réalisé sur le gène *rpoD* montre que ce dernier offre un meilleur pouvoir discriminant, ce qui corrobore les études de MLSA publiées par Fargier *et al.*, (2011) et Lange *et al.*, (2015). En effet, 20 haplotypes ont été obtenus pour ce gène avec un taux de sites variables atteignant 10,6 % alors qu'il est de 1,22% pour le gène *gyrB* (Tableau 2.4).

L'étude du polymorphisme réalisée sur les 83 séquences du gène *rpoD* regroupe 54 souches dans un même haplotype soit 65% souches isolées. Alors que 16 haplotypes sont formés chacun par un seul isolat. Les souches *XccDZ14105.75*, *XccDZ14106.127* et *XccDZ14106.129* sont groupées dans un même haplotype.

Afin d'analyser plus finement la diversité génétique et obtenir un meilleur pouvoir discriminant, les données de séquences des 2 gènes ont été concaténées pour 77 isolats sélectionnés. La concaténation des 2 loci regroupe les 77 souches en 20 haplotypes avec 68 sites polymorphes (Tableau 2.4).

Parmi les 20 haplotypes formés, 14 sont associés chacun à un seul isolat. Tandis que l'haplotype 1 nommé H1 regroupe 50 souches isolées à partir d'échantillons appartenant à des zones géographiques différentes et prélevés pendant une période qui s'étale de 2011 à 2014 (Tableau 2.5).

Tableau 2.4 Diversité génétique des isolats de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* déterminée par MLSA

Gène	Taille du fragment séquencé	Nombre d'isolats	Nombre d'haplotypes	Nombre de sites polymorphes	% de sites variables (polymorphisme)
<i>gyrB</i>	737	94	6	9	1,22%
<i>rpoD</i>	575	83	20	61	10,6 %
Séquences. Concaténées (<i>gyrB</i> et <i>rpoD</i>)	1312	77	20	68	5,18 %

Tableau 2.5. : Liste des haplotypes formés à partir des séquences de 77 souches de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* concaténées

Isolats	Hôte		Origine		N° de parcelle	Année de prélèvement	N° d'haplotype
	Espèce	Variété	région				
XccDZ111	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Smilla	Staoueli	ITCMI	Serre 1	5/05/2011	H1
XccDZ112	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Yebouze	Staoueli	ITCMI	Serre 2	5/05/2011	H1
XccDZ112.6	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Rouiba		2	10/10/2011	H1
XccDZ11272	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Rouiba		2	10/10/2011	H1
XccDZ113.1	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Solo	Rouiba		3	10/10/2011	H1
XccDZ113.5	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Solo	Rouiba		3	10/10/2011	H1
XccDZ114.9	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Bitch	Rouiba		4	10/10/2011	H1
XccDZ114.10	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Bitch	Rouiba		4	10/10/2011	H2
XccDZ115.1	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Arizona	Tipaza		5	27/10/2011	H1
XccDZ116.1.	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Arizona	Tipaza		6	27/10/2011	H3
XccDZ116.2	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Arizona	Tipaza		6	27/10/2011	H3
XccDZ1230.2	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Chebli	Sidi Fredj		30	07/01/2012	H4
XccDZ1230.3	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Chebli	Sidi Fredj		30	07/01/2012	H4
XccDZ1230.4	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Chebli	Sidi Fredj		30	07/01/2012	H4
XccDZ1230.5	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Chebli	Sidi Fredj		30	07/01/2012	H1
XccDZ1241.3	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Smilla	Staoueli		41	06/04/2012	H1
XccDZ1242.3	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Chebli	Sidi Fredj		42	06/04/2012	H5
XccDZ1243.1	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Chebli	Staoueli		43	06/04/2012	H6
XccDZ1243.2	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Chebli	Staoueli		43	06/04/2012	H1
XccDZ1243.3	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Chebli	Staoueli		43	06/04/2012	H1
XccDZ1244.1	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Spacestar	Staoueli		44	06/04/2012	H1
XccDZ1244.2	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Spacestar	Staoueli		44	06/04/2012	H1
XccDZ1244.3	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Spacestar	Staoueli		44	06/04/2012	H7
XccDZ1246.1	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Yerbouze	Staoueli		46	06/04/2012	H1
XccDZ1246.2	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Yerbouze	Staoueli		46	06/04/2012	H1
XccDZ1358	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Standard	Boumerdès		58	21/02/2013	H1
XccDZ1360	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Canapatchi	Khemis El Khechna		60	18/03/2013	H1
XccDZ1360.1	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Canapatchi	Khemis El Khechna		60	18/03/2013	H1
XccDZ1375.2	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Yerbouze	Aïn Taya		75	23/06/2013	H1
XccDZ1375.3	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Yerbouze	Aïn Taya		75	23/06/2013	H8
XccDZ1375.6	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Yerbouze	Aïn Taya		75	23/06/2013	H1
XccDZ1376.9	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Capitata</i>	Yerbouze	Aïn Taya		76	23/06/2013	H9
XccDZ1382.2	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>capitata</i>	Yerbouze	Ouled Moussa		82	23/06/2013	H1
XccDZ1384.3	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>capitata</i>	Yerbouze	Ouled Moussa		84	23/06/2013	H1
XccDZ.1388.2	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>capitata</i>	Arizona	Mostaganem		88	25/03/2013	H20
XccDZ1388.4	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>capitata</i>	Arizona	Mostaganem		88	23/03/2013	H1
XccDZ1490.43	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Atlas	Zéralda		90	17/01/2014	H1
XccDZ1490.54	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Atlas	Zéralda		90	17/01/2014	H1
XccDZ1493.12	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Spacestar	Zéralda		93	17/01/2014	H10
XccDZ1493.31	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Spacestar	Zéralda		93	17/01/2014	H1
XccDZ1493.32	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Spacestar	Zéralda		93	17/01/2014	H9
XccDZ1493.34	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Spacestar	Zéralda		93	17/01/2014	H1
XccDZ1493.51	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Spacestar	Zéralda		93	17/01/2014	H1
XccDZ1493.54	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Spacestar	Zéralda		93	17/01/2014	H1
XccDZ14100.6	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>capitata</i>	Sakata	Aïn Taya		100	06/05/2014	H1
XccDZ14101.20	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>capitata</i>	Raissa	Aïn Taya		101	06/05/2014	H1
XccDZ14101.21	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>capitata</i>	Raissa	Aïn Taya		101	06/05/2014	H1
XccDZ14101.22	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>capitata</i>	Raissa	Aïn Taya		101	06/05/2014	H7
XccDZ14101.27	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>capitata</i>	Raissa	Aïn Taya		101	06/05/2014	H1
XccDZ14102.28	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Taya		102	06/05/2014	H1
XccDZ14102.29	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Taya		102	06/05/2014	H1

Tableau 2.5 (Suite1)

Isolats	Espèce	Hôte		Région	Origine	Année de prélèvement	N° d'haplotype
		Variété	N° de parcelle				
XccDZ14/102.30	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Taya	102	06/05/2014	H1	
XccDZ14/102.34	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Taya	102	06/05/2014	H7	
XccDZ14/102.38	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Taya	102	06/05/2014	H1	
XccDZ14/104.60	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H1	
XccDZ14/104.61a	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H11	
XccDZ14/104.61b	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H12	
XccDZ14/104.61c	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H13	
XccDZ14/104.64	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H1	
XccDZ14/104.66a	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H14	
XccDZ14/104.66b	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H1	
XccDZ14/104.67	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H1	
XccDZ14/104.68	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H1	
XccDZ14/104.69a	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H1	
XccDZ14/104.69b	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H1	
XccDZ14/104.69e	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Tizi Ouzou	104	25/06/2014	H15	
XccDZ14/105.75	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Solo	Zéralda/Azur plage	105	12/09/2014	H16	
XccDZ14/106/126	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Dafla	106	16/11/2014	H17	
XccDZ14/106/127	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Dafla	106	16/11/2014	H16	
XccDZ14/106/129	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Dafla	106	16/11/2014	H16	
XccDZ14/106/130	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Dafla	106	16/11/2014	H18	
XccDZ14/106/131	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Dafla	106	16/11/2014	H1	
XccDZ14/106/132	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Dafla	106	16/11/2014	H1	
XccDZ14/106/134	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Dafla	106	16/11/2014	H1	
XccDZ14/106/135	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Dafla	106	16/11/2014	H19	
XccDZ14/106/136	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Dafla	106	16/11/2014	H1	
XccDZ14/106/137	<i>Brassica oleracea</i> spp. <i>Botrytis</i>	Arizona	Aïn Dafla	106	16/11/2014	H1	
CFBP1121	<i>Brassica oleracea</i> cv. <i>Bullata gemmifera</i> .	/	France	/	1967		
CFBP 5241 (ATCC 33915)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>		R.Uni	/	1957		

Les données des séquences nucléotidiques partielles des deux gènes ont été utilisées pour construire un arbre phylogénétique de type Maximum likelihood ML réalisé avec la méthode de vraisemblance maximum et 1000 réplifications bootstrap.

Afin d'étudier la relation phylogénétique qui existe entre notre collection de souches et celles des autres pays, des souches de *X. campestris* pv. *campestris* de référence ont été incluses à notre analyse. Ces souches ont été isolées en Afrique, en Europe, en Amérique et en Nouvelle Zélande dont les séquences nucléotidiques sont publiées sur ncbi.

L'arbre phylogénétique construit avec les séquences partielles du gène *gyrB* montre une forte homologie entre les souches algériennes et les 33 souches mondiales sélectionnées. Par ailleurs la souche *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 se positionne à part dans l'arbre. (Figure 2.9).

Les séquences partielles du gène *rpoD* se répartissent en 2 groupes (figure 2.10). Les souches algériennes se positionnent au niveau du groupe 1. Elles sont associées à 13 souches de références isolées de par le monde. Cependant, aucune souche isolée en Algérie ne figure dans le groupe 2.

Par ailleurs, on remarque que *X. campestris* pv. *vesicatoria* se situe au milieu des *X. campestris* pv. *campestris* et est soutenue par une forte valeur de bootstrap. Ceci pourrait être expliqué par la présence d'un événement de recombinaison entre les pathovars de *Xanthomonas* au sein du gène *rpoD* (figure 2.10).

Un troisième arbre phylogénétique a été construit avec les séquences concaténées des deux gènes. Des isolats de référence publiés dans la banque de gène **ncbi** et dont les deux gènes sont séquencés ont été intégrés à notre analyse.

L'arbre phylogénétique issu de cette analyse révèle que les isolats algériens sont répartis en 3 sous-groupes au sein du groupe 1 (figure 2.11). Le premier sous-groupe renferme la majorité des isolats avec 13 haplotypes. Il regroupe également deux souches isolées en Inde (Singh et al., 2011; Singh et al., 2015). Le sous groupe 2 rassemble 4 haplotypes ainsi que les souches ICMP 6541 et la souche 0407 isolées respectivement en Nouvelle-Zélande et dans l'Etat de New York. Le sous-groupe 3 est formé par 3 haplotypes ainsi que la souche *Xcc* 0470 isolée aux Etats-Unis et la souche ICMP 13 isolée en Grande Bretagne. On outre, on

remarque que la souche 0407 et la souches 0470 se positionnent dans deux sous groupes distincts ce qui est en concordance avec l'étude réalisée par Lange *et al.*, (2015) sur les souches isolées aux Etats-Unis.

Cette étude montre que les 20 haplotypes ainsi obtenus ont une homologie avec des souches isolées à travers le monde. On remarque que les isolats algériens groupés dans l'haplotype 1 (H1) montre une forte similarité avec la souche Xcc-168 isolée en Inde (Singh *et al.*, 2015), la souche ICPM 6541 isolée en Nouvelle-Zélande (Young *et al.*,2008) avec l'haplotype 7 (H7) (figure 2.11). Cependant, aucune souche isolée en Algérie ne figure dans le groupe 2 ce qui suggère que les populations isolées en Algérie ne couvrent pas la totalité de la diversité mondiale.

2.4 Discussion et conclusion

Cette étude a été menée suite à l'observation de symptômes typiques de la nervation noire sur une parcelle de choux dans la région de Rouiba durant l'année 2011. A cet effet, une prospection a été conduite au cours des années 2011 à 2014 au niveau plusieurs régions du pays, dans des parcelles de production de choux et des choux-fleurs. La majorité des parcelles de choux ou de choux-fleurs prospectées, présentait des symptômes typiques de la nervation noire des brassicacées. Ceci est probablement dû à la présence de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* bien avant 2011.

Cent soixante-dix souches ont été isolées à partir des échantillons présentant des symptômes typiques de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Les souches suspectes isolées ont été identifiées et caractérisées par leur activité physiologique et biochimique. La mise en évidence de *X. c.* pv. *campestris* a été confirmée par un test moléculaire PCR-multiplex et par un test de pouvoir pathogène réalisé sur une variété de chou-fleur sensible (Arizona).

Quatre gènes de ménage (housekeeping genes) appartenant à trois souches isolées en Algérie ont été séquencés. Il s'agit du gène *gyrB*, du gène *rpoD*, du gène *atpD* et du gène *dnaK* qui sont des gènes indispensables à la vie de la cellule bactérienne (Maiden *et al.*, 1998; Maiden *et al.*,2006). Les séquences partielles d'ADN de chacune des souches isolées à savoir, la souche XccDZ114.10, XccDZ3.5 et Xcc1388.2 ont montré une similarité de 98 à 100% avec les séquences disponibles dans la banque de donnée de NCBI.

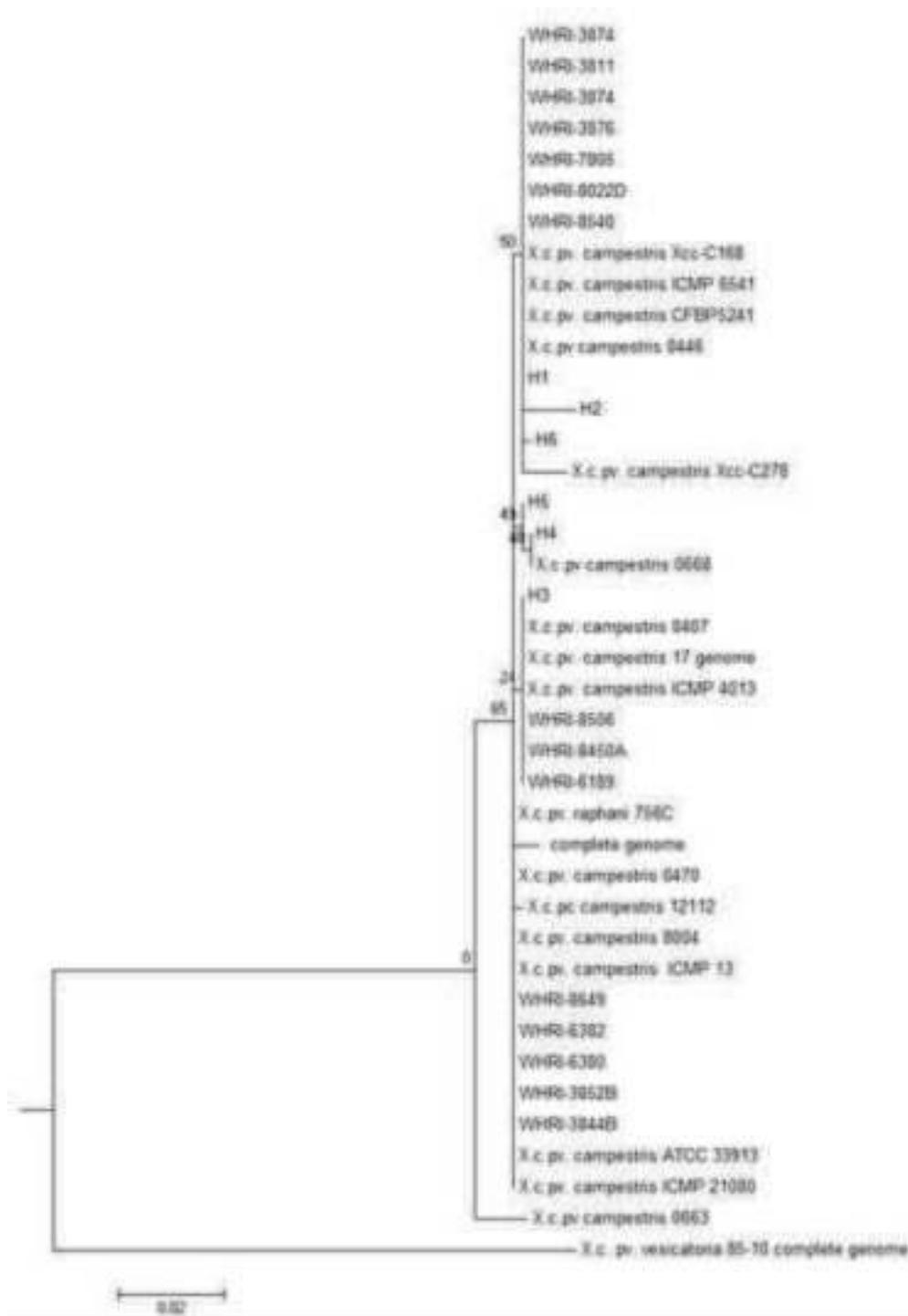


Figure 2.9 : Arbre phylogénétique (Maximum likelihood ML) construit à partir des séquences partielles du gène *gyrB*. Les valeurs (%) des bootstrap après 1000 simulations sont représentées sur chaque nœud.

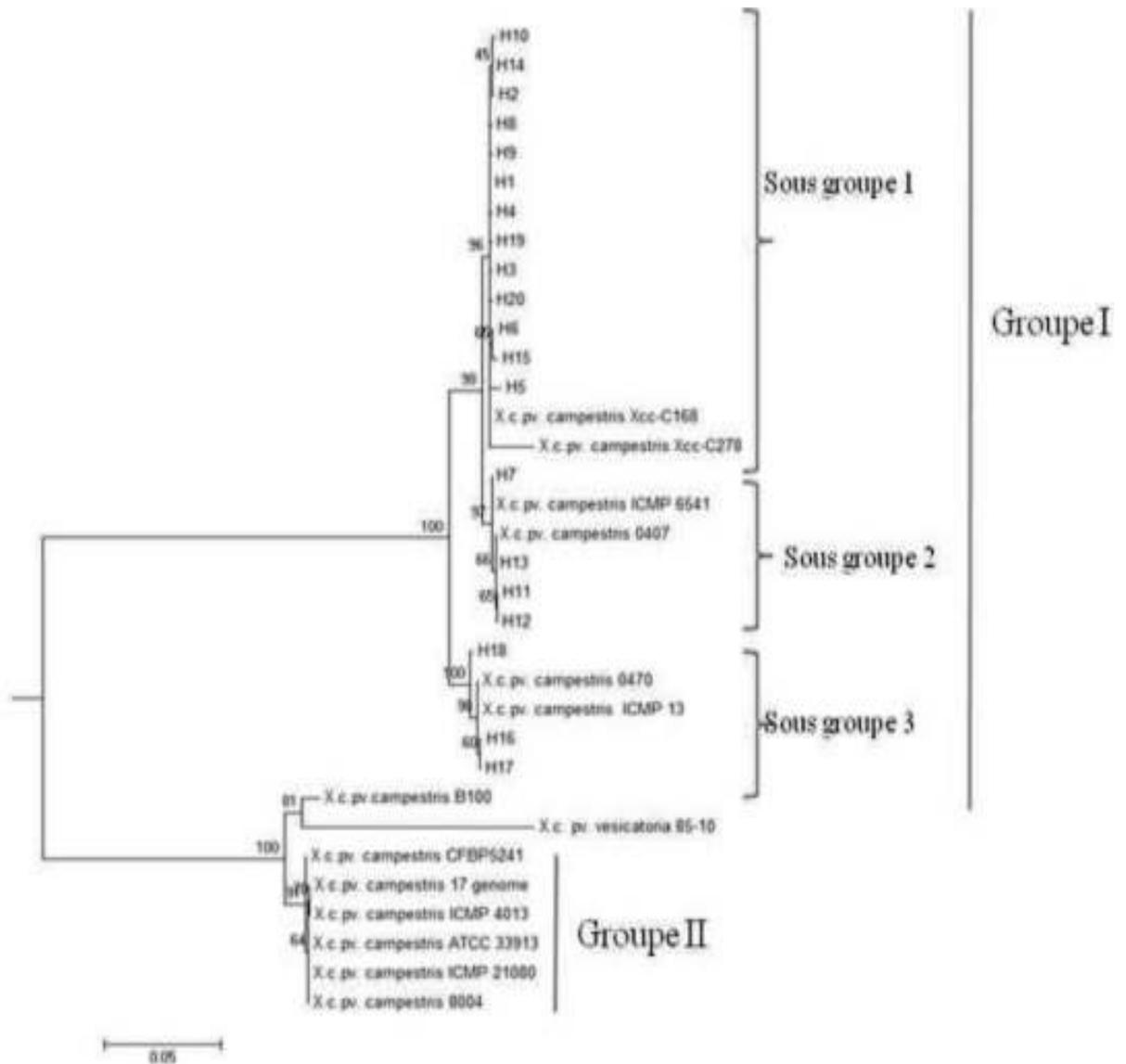


Figure 2.11 : Arbre phylogénétique (Maximum likelihood ML) construit à partir des données concaténées de séquences partielles des deux gènes de ménage (*gyrB* et *rpoD*). Les valeurs (%) des bootstrap après 1000 simulations sont représentées sur chaque nœud

Les résultats d'analyses obtenus durant ce travail ont permis de signaler pour la première fois la présence de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en Algérie au niveau des parcelles de production des choux et de choux-fleurs. Cette étude a permis également de tracer la distribution de cette bactérie dans les principales zones de production des brassicacées en Algérie dans le temps et dans l'espace. En effet, les 170 souches ont été isolées à partir de plants symptomatiques prélevés au niveau de 45 parcelles infectées pendant une période allant de 2011 à 2014 (tableau 2.6) annexe 1. Ces résultats ont motivé l'étude de la diversité génétique entre les souches isolées en Algérie en comparaison avec celles isolées dans monde et d'identifier l'éventuelle source de l'inoculum isolé.

A ce titre, une étude basée sur l'analyse de polymorphisme des gènes de ménage a été conduite. La méthode MLSA (Multilocus Sequence Analysis) est une approche qui vise l'analyse les relations phylogénétiques entre les individus par l'analyse de séquences de 1 ou plusieurs gènes de ménage d'un nombre important de souches bactériennes (Parkinson et al., 2007, Young et al., 2008).

Les résultats préliminaires de cette analyse obtenue à partir des séquences de gène individuel ou de séquences partielles des deux gènes concaténées ont révélé la présence d'une diversité génétique au sein des isolats algériens.

L'étude du polymorphisme basée sur les séquences nucléotidiques du gène *gyrB* n'a pas été discriminante. Les souches se regroupent en 6 haplotypes avec 9 sites polymorphes. Les séquences de ce gène affichent une grande similarité avec celles des souches isolées de par de monde. Le pourcentage d'identité est de 99 à 100%. A l'inverse, le gène *rpoD* se distingue par 61 sites polymorphes et 20 haplotypes, ce qui dénote du pouvoir discriminant qu'offre ce dernier.

L'analyse du polymorphisme réalisée sur les séquences des deux gènes concaténées a permis une meilleure compréhension de la diversité au sein de notre population. Néanmoins, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'appartenance à un haplotype par rapport à la variété, l'année d'isolement ou l'origine géographique. En effet l'haplotype 1 (H1) regroupe une cinquantaine de souches de variétés différentes isolées à partir de 21 parcelles entre 2011 et 2014. Il contient également 2 souches à savoir la souche *XccDZ11.1* isolée à partir d'un transplant de chou-fleur de variété *smilla* et la souche *XccDZ11.2* isolées à partir d'un transplant de chou variété de *Yerbouze* (tableau 2.6) (annexe 1). Ces deux

isolats sont probablement issus de lot de semences hybrides contaminées par un même inoculum. En outre, d'autres souches ont été isolées d'un même plant mais ne partagent pas le même haplotype. C'est le cas des souches *Xcc*DZ 114.10 et *Xcc*DZ114.9. La souche *Xcc*DZ114.9 est parmi les 50 souches appartenant à l'haplotype H1 alors que la souche *Xcc*DZ114.10 forme l'haplotype (H2) dont elle est la seule représentante. Ce plant a été soit contaminé par deux souches différentes présentes dans l'environnement au cours de la culture soit par une ou des souches issue d'un lot de semence contaminé.

L'arbre phylogénétique construit suite aux données de séquences nucléotidiques des deux gènes concaténées pour chacun des 77 isolats algériens montre que ces derniers sont subdivisés en trois sous-groupes soutenus par de fortes valeurs de bootstrap. La majorité des isolats partage le sous groupe 1. Il comprend en effet 13 haplotypes isolés dans des zones de production différentes. Il inclut également deux souches de référence isolées en Inde, la souche *Xcc* C-168 et la souche *Xcc* C-278 isolées sur des plants de choux (Singh *et al.*, 2011).

Le sous groupe 2 quant à lui comporte 4 haplotypes (H7, H11, H12 et H13) ainsi que les souches ICMP 6541 isolée en Nouvelle Zélande et 0407 isolée aux Etat Unis sur un transplant de chou (variété Fresco) (Lange *et al.*, 2015).

Le sous groupe 3 rassemble 3 haplotypes (H16, H17et H18). Ce groupe englobe également la souche 0470 isolée aux Etat Unis en 2004 sur un plant de chou (variété Kaitlin) (Lange *et al.*, 2015) et la souche ICMP 13 (CFBP 2350) isolée en 1957 en grande Bretagne sur un plant de chou de Bruxelles (Landecare, 1997).

Notre analyse phylogénétique réalisée sur les souches algériennes en comparaison avec des souches isolées dans le monde, montre une grande similarité entre certaines d'entre elles. Les souches formant l'haplotype 1 (H1) ont une homologie de 100% avec la souche isolée en Inde (*Xcc* C-168), les souches de l'haplotype 13 avec une souche isolées aux Etat unis (0470). L'haplotype 17 (H17) quant à lui est homologue avec la souche ICMP 6541, isolée en Nouvelle Zélande en 1978 sur un plant de chou –fleur (Figure 2.11). Toute fois aucune souche isolée en Algérie ne figure au sein du groupe 2. Notre population couvre la moitié de la diversité mais ne couvre pas la diversité mondiale.

Plusieurs études similaires conduites, visent à retracer l'origine des isolats de *Xcc* dans les parcelles de brassicacées, par des techniques de caractérisation

moléculaire (Ignatov *et al.*, 2007; Zaccartelli *et al.*, 2008; Mulema *et al.*, 2011; Lema *et al.*, 2012 ; Lange *et al.*, 2015), mais aucune d'entre elles n'est parvenue à retracer la source d'inoculum isolé. Ceci est probablement dû à un brassage de souches qui est le résultat de circulation de lot de semences contaminées à travers les échanges commerciaux internationaux. Aussi, une parcelle peut contenir des souches de plusieurs origines suite à la conservation des inoculum dans des débris végétaux car la bactérie peut survivre plusieurs années sur des débris végétaux (Schaad et Dianese 1981) ou par des souches associées aux crucifères adventices qui peuvent constituer un réservoir d'inoculum important.

Les résultats préliminaires obtenus à l'issue du séquençage des deux gènes de ménage montrent qu'il existe une diversité au sein des souches isolées en Algérie. Néanmoins, l'utilisation de 2 gènes ménage ne s'est pas révélée assez discriminante pour pouvoir étudier la traçabilité et évaluer la diversité entre les souches isolées en Algérie en relation avec l'origine de la semence, les zones de production des brassicacées et l'année d'isolement. D'autres analyses sont en cours de réalisation et consistent à concaténer les séquences de 4 gènes de ménage à savoir les gènes *gyrB*, *rpoD*, *atpD* et *dnaK* pour une étude en MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis) (Vogler *et al.*, 2006; Buithingoc *et al.*, 2009) afin de réaliser une analyse à grande échelle de la diversité des populations et de déterminer la race dans laquelle se classe les souches isolées en Algérie et l'origine des inoculum isolés.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de cette étude était d'une part, le développement d'un nouvel outil moléculaire fiable et rapide pour la détection des bactéries vivantes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* dans les semences de chou, et d'autre part, l'étude de la diversité génétique des souches de *X. c.* pv. *campestris* présentes en Algérie.

Le contrôle de la qualité phytosanitaire des lots de semences est un critère important pour leur commercialisation. L'utilisation d'un lot de semence indemne de pathogènes reste le moyen le plus efficace pour lutter contre la propagation des maladies transmises par les semences. C'est un des principaux leviers du développement d'une agriculture durable et respectueuse de l'environnement.

L'identification avec exactitude des pathogènes et notamment des souches de bactéries est capitale pour la surveillance épidémiologique et pour mettre au point des stratégies de lutte efficaces. L'élimination de *X. c.* pv. *campestris* des lots de semences s'avère difficile (Robert *et al.*, 1999) et les lots de semences indemnes de bactéries ne sont pas toujours disponibles.

Divers outils de diagnostic ont été étudiés, expérimentés puis appliqués pour la détection des *Xanthomonas* dans les lots de semences des crucifères.

Les techniques d'identification, ainsi que leurs normes d'utilisation sont définies par l'OEPP (Organisation Européenne de Protection des Plantes), l'ISTA (International Seed Testing Association) et l'ISHI (International Seed Health Initiative). Les laboratoires qui sont chargés du contrôle phytosanitaire doivent recourir aux techniques préconisées par ces organismes. Actuellement les techniques officielles adoptées dans les protocoles de contrôle sont essentiellement basées sur les tests microbiologiques : ISHI /ISTA (International Seed Testing Association) disponible sous le nom : « 7-019 : Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* on *Brassica* spp. » (Robert and Koenraadt, 2006). Ces tests sont souvent longs et coûteux.

D'autres procédures basées sur la PCR ont été récemment développées pour la détection de *Xanthomonas campestris* dans les lots de semences par Berg *et al.* (2005) et Berg *et al.* (2006). Cependant ces techniques, basées sur l'amplification

de l'ADN ne renseignent pas sur la viabilité des germes présents dans l'échantillon testé.

Dans cette étude nous avons mis au point une nouvelle méthode de détection de *X. c. pv. campestris* dans les lots de semences de brassicacées. Elle est basée sur un enrichissement utilisant le processus naturel de colonisation de *X. campestris* lors de la germination des plantules issus de semences contaminées, suivi d'une PCR en temps réel (seed- qPCR). Nous avons démontré qu'un temps de germination de 3 jours est suffisant pour détecter jusqu'à une graine contaminée parmi 10 000 graines saines. Cette durée est nécessaire pour permettre une germination homogène de toutes les semences semées et une prolifération de la bactérie. Cette technique a prouvé son efficacité pour détecter des lots de semences naturellement infectées.

Par ailleurs, la méthode d'inoculation des semences que nous avons mise au point est très efficace. Elle peut être utilisée pour infecter les semences afin d'évaluer la colonisation des plantes via les semences infectées et d'étudier la vulnérabilité des plantules vis-à-vis des bactéries transmises par semences. Nous avons montré que toutes les cellules de *X. c. pv. campestris* à l'intérieur des graines ne sont pas toutes capables d'être isolées à partir de graines macérées étant donné qu'aucune colonie de *X. c. pv. campestris* n'a été détectée sur des semences inoculées par des suspensions à faibles concentrations, tandis que les plantules ont développé des symptômes 7-14 jours après l'inoculation.

Les résultats de mise au point de la seed-qPCR laisse apparaître une efficacité comparable à celle de la BIO-PCR. La seed-qPCR a l'avantage d'être peu onéreuse et ne nécessite aucune préparation de milieu.

La méthode seed-qPCR est adaptée au traitement d'un grand nombre d'échantillons et peut être proposée dans le cadre d'un programme de certification phytosanitaire des semences.

Dans une deuxième partie de nos travaux nous avons montré l'importance de la maladie de la nervation noire en Algérie. Elle a été observée sur la plupart des parcelles de choux et de choux fleurs prospectées.

La mise en évidence des souches de *X. c. pv. campestris* isolées a été confirmée par des tests microbiologiques, biochimiques et moléculaires.

Les résultats de recherches menées durant ce travail ont permis de signaler pour la première fois la présence de *X. c. pv. campestris* en Algérie au niveau des parcelles de production des choux et choux-fleurs.

Les séquences d'ADN nucléotidiques de 4 gènes de ménages séquencés à savoir le gène *gyrB*, *rpoD*, *atpD* et *dnaK* sur 3 souches isolées en Algérie ont montré 98 à 100% d'homologie avec les séquences présentes dans la banque de gènes de NCBI. Les souches XccDZ4.10, XccDZ82.2 et XccDZ2.6 ont été déposées dans la banque de gène NCBI.

L'analyse de la diversité génétique a été réalisée par une méthode moléculaire la **MLSA** à haut débit. Cette méthode se caractérise par une grande reproductibilité inter-laboratoire sur la base de données de séquences d'un ou de plusieurs gènes de ménage (Parkinson *et al.*, 2007, Parkinson *et al.*, 2009). Elle est basée sur l'analyse du polymorphisme des gènes de ménage avec comme objectif la reconstitution phylogénétique de l'histoire des organismes (Gevers *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus à l'issue du séquençage des deux gènes de ménage des souches isolées en Algérie ont montré une diversité au sein des souches isolées en Algérie. L'analyse du polymorphisme a mis en évidence 20 haplotypes au sein des souches algériennes. Cette structuration est indépendante de la variété, l'année d'isolement ou l'origine géographique.

L'arbre phylogénétique obtenu à partir des données concaténées des séquences partielles des gènes *gyrB* et *rpoD* montre que les souches algériennes partagent trois sous groupes. Des souches d'origine très diverse (Inde, Europe, USA) sont réparties parmi les isolats algériens et présentent une grande similitude génétique avec ces derniers. Ce qui montre une diversité des isolats algériens de dimension proche de la diversité mondiale.

Cette grande diversité est sans doute dû au commerce international actif de semences et par la même occasion des semences qui hébergent des bactéries phytopathogènes. Ce qui a permis leur dispersion et leur pérennité.

L'utilisation de 2 gènes de ménage ne s'est pas révélée assez discriminante pour pouvoir étudier la traçabilité et pouvoir évaluer la diversité entre des souches isolées en Algérie en relation avec l'origine de la semence et les zones de production des brassicacées et l'année d'isolement. D'autres analyses sont en cours de réalisation qui consistent à concaténer 4 gènes de ménage le gène *gyrB*,

rpoD, *atpD* et *dnaK* sur 77 isolats sélectionnés afin de pouvoir tracer le profil allélique ou « *sequence type ST* » de chaque souche isolée en Algérie.

Par ailleurs, une étude basée sur la méthode **MLVA** (multilocus variable number tandem repeat analysis) a été entamée. Cette dernière exploite comme source de polymorphisme la variation du nombre de motifs dans des répétitions en tandem.

Elle est particulièrement utilisée dans le cadre du typage des bactéries et pourrait être appliquée à l'analyse à grande échelle de la diversité des populations, afin de pouvoir déterminer l'origine de l'inoculum détecté dans les parcelles en Algérie et les relations entre foyers observés.

Bien que la nervation noire ne soit pas classée sur la liste des pathogènes de quarantaine, celle-ci est considérée comme la maladie la plus grave qui affecte les crucifères et peut causer des pertes importantes de rendements.

L'arrêté ministériel du N° 7 du 23 Janvier 2005 relatif à la protection phytosanitaire fixant les normes phytotechniques et phytosanitaires à l'importation des semences et plants des espèces maraîchères, arboricoles, viticoles et des grandes cultures, impose le traitement des semences importées. Nous avons montré lors de notre étude que le traitement des semences n'est pas efficace. C'est le cas du lot E16-725 qui avait été traité lors de l'usinage et qui s'est révélé infecté par les tests de BIO-PCR et par seed-qPCR.

L'Algérie doit donc mettre au point une stratégie de lutte appropriée pour éviter l'introduction et la dissémination des pathogènes transmis par semences.

Les règlements techniques relatifs au contrôle et la certification des semences potagères sont en cours de promulgation. Leur application devra permettre un contrôle phytosanitaire plus rigoureux avec un respect des bonnes pratiques culturales.

Résumé

Xanthomonas campestris provoque des maladies chez les plantes de la famille des Brassicacées. L'une de ces maladies est la nervation noire. Elle est de distribution universelle et considérée comme la plus destructive des crucifères.

Bien que les sources de contamination sont multiples, la semence reste la source principale de la transmission des pathogènes. S'assurer de leur qualité sanitaire est le moyen de lutte le plus efficace contre les bactérioses. Actuellement les techniques officielles adoptées dans les procédures de contrôle des lots de semences sont essentiellement basées sur les techniques microbiologiques. Ces techniques sont longues et coûteuses pour être utilisés en routine. La PCR utilise comme substrat l'ADN qui est une molécule stable, ne rend pas compte de la viabilité des bactéries dans l'échantillon analysé.

Le présent travail avait deux principaux objectifs :

proposer un nouvel outil moléculaire de détection fiable et rapide de *Xanthomonas campestris* vivants dans les semences de Brassicacées « la seed-qPCR ». Cette technique est basée sur un enrichissement par germination des semences contaminées couplée à une Taq-man PCR en temps réel après extraction de l'ADN cible. Elle est peu onéreuse et permet de détecter jusqu'à 1 graine contaminée parmi 10 000 graines saines.

La deuxième partie consiste à caractériser les souches de *X. c. pv. campestris* isolées à partir des parcelles infectées en Algérie identifiées pour la première fois. Cent-soixante-dix isolats ont été identifiés et caractérisés par des tests biochimiques, biologiques et moléculaires. 77 isolats ont été sélectionnés pour étudier leur diversité génétique par la méthode MLSA (multilocus sequence analysis) en utilisant 2 gènes de ménage, le gène *gyrB* et le gène *ropD*.

Mot clés : *Xanthomonas campestris*, bactérie vivante, semence, détection, seed- qPCR, MLSA, gènes de ménage

Abstract

The *Xanthomonas campestris* causes diseases in the Brassicaceae family. One of these diseases is the black rot. It is a seed born bacterium and considered as the most destructive cruciferous world wide. Although the sources of contamination are various, the seed remains the main source of transmission of pathogens. Ensure the seed lot sanitary quality is the most efficient control strategy against bacterial diseases. Currently the procedures adopted in the control of seed lots are mainly based on microbiological techniques which are consuming time and money. PCR uses DNA as a substrate molecule, does not care about the viability of bacteria in the sample analyzed.

The aim objective of this study is to propose a new molecular tool that permits a fast and reliable detection of viable *Xanthomonas campestris* in the seeds. Three molecular methods were studied and tested to assess their potential for detection of *Xanthomonas campestris*. seed-qPCR. This technique is based on an enrichment of contaminated seed by germination coupled with real-time Taq-man PCR after extraction of the target DNA. It is an inexpensive technique and can detect down to 1 contaminated seed among 10 000 healthy seeds even when the seed is contaminated at low level.

The second part is to characterize the strains of *X. c. pv. campestris* isolated from infected samples in Algeria identified for the first time. Hundred-seventy is 170 isolates were identified and characterized by biochemical, biological and molecular assays. 77 isolates were selected to study their genetic diversity through the MLSA method (multilocus sequence analysis) using two housekeeping genes, the *gyrB* gene and the gene *ropD*.

Keywords : *Xanthomonas campestris*, detection living bacteria, seed, seed q-PCR, MLSA, housekeeping genes

ملخص

Xanthomonas campestris يسبب عدة أمراض عند النباتات لعائلة *Brassicacées* واحد من هذه الأعراض هي التعفرفق السوداء يعتبر هذا المرض الأكثر انتشارا حول العالم و الأكثر تدمير رغم أن هذه البكتريا تنقل عبر عدة وسائل و لكن تبقى البذور المصدر الرئيسي لانتقاله. ضمان الجودة و الصحة هي الوسيلة الوحيدة و الأكثر فعالية ضد الأمراض الجرثومية حاليا الوسائل المعمول بها رسميا في مخابر مراقبة البذور هي التقنيات المكر وبيولوجية و لكن هذه التقنيات تعتبر مكلفة و تستهلك وقت طويل لكي تستعمل بصورة روتينية تفاعل PCR هي تقنية تعتمد على استعمال جزئء الحمض النووي (DNA) لكن هذه التقنية لا تترك قدرة البكتيريا الحية في العينة. *Xanthomonas campestris* وكان هذا العمل هدفين رئيسيين : اقتراح أداة جزيئية جديدة سريعة و موثوق بها للكشف عن البكتيريا الذين يعيشون في بذور الكرنب هذه التقنية تعتمد على عن طريق إنبات البذور الناقلة للبكتيريا في الوقت الحقيقي بعد استخراج الحمض النووي الهدف . أنها غير مكلفة و يمكن الكشف عن ما يصل الى بذرة ناقلة للبكتيريا واحدة من بين 10000 بذور صحية. الجزء الثاني هو لتوصيف السلالات للجرثومة المعزولة من أقسام أرض ناقلة للمرض في الجزائر حددت لأول مرة. وقد تم تحديد و تمييز مائة و سبعين *X. c. pv. campestris* العزلات عن طريق الاختبارات البيوكيميائية، البيولوجية و الجزيئية. وقد تم اختيار 77 عزلات لدراسة التنوع الوراثي من خلال طريقة MLSA (multilocus sequence analysis) باستخدام 2 جينات (gyrB و ropD)

الكلمات الرئيسية : الكشف بذور، البكتيريا الحية

Xanthomonas campestris, seed qPCR, MLSA, housekeeping genes