

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة العليا للعلوم الفلاحية الحراش - الجزائر

Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach

## Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de magister en Sciences Agronomiques

Département : Botanique

Option : Phytopathologie

## Thème

Mise au point d'une technique moléculaire de détection de *Xanthomonas campestris* et validation d'une procédure de détection dans les semences basée sur la PCR

Présenté par : LAALA Samia

Soutenu devant le Jury composé de :

<b>Président :</b>	<b>Pr Z. Bouznad</b>	INA-EL Harrach (Alger)
<b>Promoteur :</b>	<b>D<sup>r</sup> C. Manceau</b>	INRA Angers (France)
<b>Co-promoteur :</b>	<b>Mme S. Yahiaoui</b>	INA-EL Harrach (Alger)
<b>Examineurs :</b>	<b>D<sup>r</sup> M. Louanchi</b>	INA-EL Harrach (Alger)
	<b>D<sup>r</sup> A. Guezlane</b>	INA-EL Harrach (Alger)
<b>Invité:</b>	<b>Dr M. Kheddam</b>	CNCC - Harrach (Alger)

Année universitaire : 2008-2009

# Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mon promoteur, M<sup>r</sup> 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 accordé.

Je remerci sincèrement ma copromotrice M<sup>me</sup> Saléha Yahiaoui pour son aide, son amitié, ses précieux conseils et ses orientations.

J'exprime mes remerciements à Monsieur. Z. Bouznad qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma thèse.

Je remercie vivement M<sup>me</sup> M. Louanchi et M<sup>r</sup> A. Guezlane qui ont bien voulu être les examinateurs de cette thèse et d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

J'adresse mes remerciements à M.<sup>r</sup> Mohamed Kheddami pour l'aide qu'il m'a apporté et d'avoir accepté mon invitation et 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, Martine Devaux, Elisabeth De Lomenie, Jacky Guillaumes, Bruno Le Cam, Sophie Gérande, Bérénice Briand ; Perrine Potier, Marie-Agnès Jacques; Boureau Tristan, Jean-Pierre Paulin, Martial Briand et Jacqueline Gaudin, merci à vous pour votre soutien et vos encouragements.

J'exprime mes remerciements à mes collègues du C.N.C.C. pour leur aide et leur soutien en particulier Houria Belhadj, Rachida Telmat, Fatima Soufli, Branki Fatiha, Mokrani Chabana, Houcine Boulemnakhar, Samia Guendez et Rosa Boughris

Merci à tous mes amis qui ont beaucoup compté durant cette thèse : Nicol, Sofie, Mohamed, Wahiba, Adil, Jaques, Marie Noël, Kenza, Houda et Said.

Je n'oublie pas de remercier la défunte Nardjes pour son amitié et ses encouragements.

Merci à toute ma famille, mes parents, ma sœur, mes frères, mes neveux, mes nièces merci pour votre soutien et vos encouragements.

# LISTE DES ABREVIATIONS

## Divers

<b>A</b>	:	Adénine
<b>ADN</b>	:	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ADNg</b>	:	Acide désoxyribonucléique génomique
<b>ARN</b>	:	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	:	Acide ribonucléique messenger
<b>ATCC</b>	:	American Type Culture Collection
<b>BSA</b>	:	Bovine serum albumin
<b>C</b>	:	Cytosine
<b>CFBP</b>	:	Collection Française de Bactéries Phythopathogènes
<b>cfu</b>	:	Colonies formant unité
<b>cv.</b>	:	Cultivar
<b>ELISA</b>	:	Enzyme linked immunosorbent assay
<b>DEPC</b>	:	Diéthylpyrocarbonate
<b>DNase</b>	:	Désoxyribonucléase
<b>dNTP</b>	:	Deoxynucléotide triphosphate
<b>EDTA</b>	:	Ethylene diaminotetraacetic acid
<b>hrp</b>	:	Hypersensitive reaction and pathogenicity
<b>G</b>	:	Guanine
<b>M-MLV</b>	:	Moloney-murine leukemia virus
<b>OEPP</b>	:	Organisation Européenne et méditerranéenne pour la protection des végétaux.
<b>PCR</b>	:	Polymerase chain reaction
<b>PM</b>	:	Poids moléculaire
<b>PVP</b>	:	Polyvinylpyrrolidone
<b>RNase</b>	:	Ribonucléase
<b>RT-PCR</b>	:	Reverse transcriptase-PCR
<b>T</b>	:	Thymine
<b>Taq</b>	:	ADN polymérase
<b>TBE</b>	:	Tris-Borate-EDTA
<b>TE</b>	:	Tris-EDTA
<b>ATN</b>	:	Acides Nucleiques Totaux
<b>UV</b>	:	Ultra Violet
<b>YPGACvc</b>	:	Extrait de levure, Peptone, Glucose, Agare, cycloheximide, Vancomycine Céphaléxine
<b>var.</b>	:	Variété

## Unités de mesures

<b>µl</b>	:	Microlitre
<b>°C</b>	:	Degré Celsius
<b>bp</b>	:	paires de bases
<b>g</b>	:	Gramme
<b>h</b>	:	Heure
<b>l</b>	:	Litre
<b>M</b>	:	Molaire
<b>min</b>	:	Minute
<b>ml</b>	:	Millilitre
<b>mM</b>	:	Millimolaire
<b>sec.</b>	:	seconde
<b>rpm</b>	:	Tour par minute
<b>µM</b>	:	Micromolaire
<b>U</b>	:	Unité enzymatique
<b>V</b>	:	Volt
<b>Vol.</b>	:	Volume



# Glossaire

## ***Acide désoxyribonucléique (ADN)***

Polymère de désoxyribonucléiques

## ***Acide nucléique***

Polymère de nucléotides

## ***Acide Ribonucléique (ARN)***

Polymère de Ribonucléiques

## ***ADN complémentaire (ADNc)***

ADN simple brin, qui est une copie d'un ARN obtenu par transcription inverse

## ***ADN polymérase***

Enzyme catalysant la polymérisation (5' vers 3') des mononucléotides triphosphates qui constituent l'ADN

## ***Aérobie***

Bactérie qui nécessite de l'oxygène pour survivre

## ***Amplification en chaîne par polymérase (PCR)***

Procédé d'amplification exponentielle in vitro d'une séquence définie d'ADN, faisant intervenir des cycles successifs d'appariements d'oligonucléotides spécifiques et d'élongation à l'aide d'une polymérase

## ***Amorce***

Oligonucléotide qui, hybridé avec une matrice d'acide nucléique, permet à une polymérase d'initier la synthèse du brin complémentaire

## ***Anticorps (Ac)***

Molécule d'immunoglobuline définie par sa propriété d'interaction spécifique avec un antigène

## ***Antigénique (Ag)***

Molécule définie par sa propriété d'interaction spécifique avec un anticorps

## ***Antiserum***

Sérum issu d'un organisme immunisé, contenant des Ac contre l'Ag utilisé pour l'immunisation.

## ***ARN mesager (mRNA)***

ARN pouvant être traduit en protéine

**ARNr**

ARN ribosomique présent dans le ribosome

***Bacille***

Bacillium, bactérie en forme de bâtonnet

***Bactéricide***

Substance ou préparation ayant la propriété de tuer des bactéries

***Biotype***

Entité génétique d'un microorganisme pathogène, définie par rapport à son pouvoir pathogène sur différents cultivars (synonyme race)

***Cadre de lecture***

Ensemble de codons en phase correspondante à la synthèse d'une protéine

***Cystéine***

Acide aminé qui joue un rôle dans les phénomènes d'oxydoréduction

***Dégât***

Altération touchant la fonction de la plante, le produit de la culture ou le potentiel de production

***Diagnostic***

Démarche adoptée pour identifier la (ou les) cause (s) des symptômes observés

***DNase***

Désoxyribonucléase

***Épiphyte***

Qui vit à la surface d'un végétal sans provoquer de symptôme visible de maladie

***Epuration***

Élimination des déchets de culture dans une parcelle par incinération

***Extrémité 5' ou 3' terminale***

Début ou fin d'une chaîne de polynucléotides (ARN ou ADN)

***Famille***

Rang taxonomique situé entre Ordre et Genre

***Gène***

Fragment d'un chromosome qui détermine ou conditionne un ou plusieurs caractères héréditaires. C'est la plus petite partie fonctionnelle du matériel génétique.

***Génome***

Ensemble du matériel nucléaire héréditaire chez une cellule

**Genre**

Rang taxonomique situé entre Famille et Espèce

**Infection**

Etablissement d'une relation parasitaire entre un agent pathogène et une plante-hôte sensible

**Inoculum**

Pathogène, ou partie de celui-ci, pouvant provoquer une contamination.

**Latence (periode de)**

Période qui sépare l'infection de l'apparition des tissus infectieux

**Lésion**

Zone d'altération de tissus végétaux

**Lipopolysaccharides (LPS)**

Molécules complexes contenant à la fois des lipides et des glucides contenues dans la paroi des bactéries Gram-

**Maladie**

Anomalie du phénotype observée par rapport au phénotype attendu

**Marqueurs moléculaires**

Séquence d'ADN associée à un caractère donné du phénotype

**Matériel initial**

Matériel pour le quel l'absence de pathogène est contrôlée par des tests réalisés individuellement à l'aide des procédures les plus rigoureuses; il doit être constamment maintenu dans les conditions strictes garantissant l'absence de contamination.

**Matériel de propagation**

Matériel issu de la multiplication du matériel initial et maintenu dans les conditions garantissant l'absence de contamination.

**Matériel certifié**

Matériel produit à partir de matériel de propagation, dans des conditions adéquates et qui a fait l'objet d'un contrôle par un organisme certificateur. Il est destiné aux parcelles de production.

**Nucléotide**

Molécule résultant de l'union d'un ribose ou désoxyribose, et d'une base purique ou pyrimidique, et trois groupements phosphate

**Oligonucléotide**

Courte séquence d'acide nucléique (généralement inférieure à 100 bases)

**ORF**

Cadre ouvert de lecture dans un ARN messenger, qui code pour un polypeptide

***Pathovar (pv.)***

Entité taxonomique chez les procaryotes qui montre une spécificité parasitaire vis-à-vis d'une espèce hôte particulière

***Phénétiq***

Qualifie les classifications basées sur le degré de similitude des organismes

***Phénotype***

Aspect observable d'un organisme déterminé par son génotype et l'environnement

***Phylogénétique***

Qualifie les classifications basées sur les relations évolutives entre organismes

***Phytopathogène***

Qui cause une maladie chez les plantes

***Procaryote***

Organisme unicellulaire dépourvu de noyau individualisé

***Prophylaxie***

Ensemble de mesures prises pour prévenir l'apparition ou le développement d'une maladie

***Saprophyte***

Organisme qui se nourrit de matière organique morte

***Souche***

Descendant d'un isolat de microorganisme isolé (in vitro ou sur la plante)

***Symptôme***

Altération du phénotype par rapport au phénotype attendu

***Virulence***

Capacité d'un biotype (pathovar ou race) à surmonter la résistance d'une espèce, d'un groupe d'espèce ou d'une variété



# Table des matières page

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**INTRODUCTION..... 17**

**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE ..... 19**

**1. L'HOTE ET SON PATHOGENE : LES BRASSICACEES ET X. CAMPESTRIS..... 21**

    1. 1 LES BRASSICACEES ..... 21

        1.1.1 *L'importance économique des Brassicacées:* ..... 21

        1.1. 2 *Origine et Classification des Brassicacées :* ..... 23

        1.1.3 *Origine de la diversification de certains des Brassicacées cultivées :* ..... 25

        1.1.4 *Données botaniques* ..... 26

    1.2 LES MALADIES ET RAVAGEURS DES BRASSICACEES : ..... 28

        1.2.1 *Les ravageurs et les maladies virales :* ..... 28

        1.2.2 *Les maladies fongiques :* ..... 30

        1.2.3 *Les maladies bactériennes des Brassicacées cultivées* ..... 30

    1.3 LES BACTERIOSES DES BRASSICACEES CAUSEES PAR X. CAMPESTRIS ..... 33

        1.3.1 *Les maladies vasculaires*..... 33

        1.3.2 *Les maladies du parenchyme* ..... 33

    1.4 LES CARACTERISTIQUES CELLULAIRES DES XANTHOMONAS : ..... 35

        1.4.1 *Morphologie de la bactérie* ..... 35

        1.4.2 *La physiologie de la bactérie :* ..... 39

    1.5 POSITION TAXONOMIQUE DES XANTHOMONAS..... 39

        1.5.1 *Quelques généralités sur les bactéries phytopathogènes*..... 39

        1.5.2 *Taxonomie basée sur le pouvoir pathogène :* ..... 41

        1.5.3 *Taxonomie moléculaire et évolutive du genre Xanthomonas :* ..... 42

        1.5.4 *Classification intra spécifique des X. campestris*..... 46

    1.6 LE CYCLE INFECTIEUX DE X. CAMPESTRIS (FIGURE 1.22) ..... 51

1.7 LES MOYENS DE LUTTE CONTRE <i>X. CAMPESTRIS</i> :.....	54
1.7.1 <i>Traitement des semences</i> :.....	54
1.7.2 <i>La culture des variétés résistantes ou tolérantes</i> :.....	55
1.7.3 <i>La Lutte biologique contre X. campestris</i> :.....	56
1.7.4 <i>Le contrôle phytosanitaire des semences</i> :.....	57
1.8 LES TECHNIQUES DE DETECTION.....	57
1.8.1 <i>Les tests biologiques</i> .....	58
1.8.2 <i>Les tests biochimiques</i> .....	58
1.8.3 <i>Les tests sérologiques</i> .....	59
1.8.4 <i>Les techniques moléculaires</i> .....	60
1.9 LES OUTILS DISPONIBLES POUR LA DETECTION DU <i>XANTHOMONAS</i> .....	65
<b>INTERETS ET OBJECTIFS .....</b>	<b>67</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>69</b>
<b>CHAPITRE 1.....</b>	<b>71</b>
<b>MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE MOLECULAIRE DE DETECTION DE L'ARNm DES BACTERIES PHYTOPATHOGENES DANS LES SEMENCES.....</b>	<b>71</b>
1.1 INTRODUCTION :.....	71
1.2 MATERIELS ET METHODES .....	71
1.2.1. <i>Souches bactériennes</i> .....	71
1.2.2 <i>Amorces utilisées</i> .....	75
1.2.3 <i>Préparation des suspensions bactériennes</i> .....	75
1.2.4 <i>Extraction rapide de l'ADN bactérien</i> .....	77
1.2.5 <i>Extraction des acides nucléiques totaux (TNA)</i> :.....	77
1.2.6 <i>Purification des ARN</i> .....	81
1.2.7 <i>Amplification d'ADN par PCR</i> .....	82
1.2.8 <i>Amplification des ARN par Reverse Transcriptase-PCR</i> .....	82
1.3 RESULTATS.....	84
1.3.1 <i>Sélection des amorces</i> .....	84

---

<i>1.3.2 Optimisation de la Reverse transcriptase PCR sur le gène rrs (16S RNA) .....</i>	<i>91</i>
<i>1.3.3 Optimisation des protocoles d'extraction des acides nucléiques.....</i>	<i>95</i>
<i>1.3.4 Optimisation de RT-PCR sur les ARNm.....</i>	<i>99</i>
<i>1.3.5 Vérification de l'expression des gènes cibles avec les amorces sélectionnées.....</i>	<i>102</i>
<i>1.3.6 Stabilité des ARNm : .....</i>	<i>104</i>
<b>1.4 DISCUSSION .....</b>	<b>104</b>
<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>110</b>
<b>VALIDATION D'UNE PROCEDURE DE DETECTION DE XANTHOMONAS</b>	
<b>CAMPESTRIS DANS LES SEMENCES DE BRASSICACEES BASEE SUR LA PCR</b>	
<b>(BIO-PCR) .....</b>	<b>110</b>
2.1 INTRODUCTION .....	110
2.2 MATERIELS ET METHODES .....	111
2.2.1 Souche bactériennes :.....	111
2.2.2 Lots de semences :.....	111
2.2.3 : Milieux de cultures.....	111
2.2.4 Extraction des bactéries :.....	112
2.2.5 Enrichissement des bactéries sur milieu sélectif : .....	112
2.2.6 Extraction de l'ADN selon le protocole basé sur la lyse par NaOH .....	113
2.2.7 Amplification de l'ADN par Polymerase chain reaction (PCR) :.....	113
2.3 RESULTATS : .....	116
2.3.1 Sélectivité du milieu YPACcv pour la microflore des semences de crucifères: ....	116
2.3.2 Efficacité de la Bio PCR en multiplex :.....	117
2.4 : DISCUSSION :.....	121
<b>CHAPITRE 3.....</b>	<b>123</b>
<b>MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE DETECTION DES</b>	
<b>BACTERIES VIVANTES DANS LES SEMENCES : LA SEED-PCR EN TEMPS</b>	
<b>REEL .....</b>	<b>123</b>
3.1 INTRODUCTION :.....	123
3.2 MATERIELS ET METHODES .....	125

---

3.2.1 Souches bactériennes .....	125
3.2.2 Lot de semences : .....	125
3.2.3 Contamination artificielle d'un lot de semences.....	125
3.2.4 Germination des semences contaminées .....	125
3.2.5 Etude de la sensibilité de la Seed-PCR en temps réel.....	126
3.2.6 Mise au point d'une méthode de germination adapté pour 10 000 Graines : .....	127
3.2.7 Comparaison entre la méthode de détection en BIO-PCR et en SEED-PCR en temps réel dans des semences naturellement contaminée.....	128
3.2.8 Etude du seuil de sensibilité de la SEED- PCR .....	129
3.3 RESULTATS.....	129
3.3.1 Mise au point d'un système de contamination artificiel des semences de chou ...	129
3.3.2 Etude de l'efficacité de détection par Seed -PCR en temps réel lorsque les tests sont réalisés sur les semences contaminés par des suspensions bactériennes à différentes charges. ....	132
3.3.4 Mise au point d'une méthode de germination adaptée pour 10 000 graines.....	135
3.3.5 Comparaison entre la méthode de détection en YPGACvc / BIO-PCR et la SEED-PCR en temps réel dans des semences naturellement contaminées par <i>X.c.pv campestris</i>	
3.3.6 Seuil de sensibilité de la SEED-PCR en temps réel.....	138
3.4 DISCUSSION : .....	139
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>141</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>143</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>161</b>
<b>Résumé</b>	

## Liste des figures

Page

### Partie bibliographique

<b>Figure 1.1</b>	: Quelques Brassicacées cultivées.....	22
<b>Figur 1.2</b>	: Brassicacées d'ornement.....	22
<b>Figure 1.3</b>	: Relation phylogénétique entre quelques unes des tribus appartenant à la famille des Brassicacées.....	24
<b>Figure 1.4</b>	: <i>Arabidopsis Thaliana</i> .....	26
<b>Figure 1.5</b>	: Schéma représentant les différents organes d'une Brassicacée.....	27
<b>Figure1.6</b>	: Les ravageurs des Brassicacées cultivées .....	29
<b>Figure1.7</b>	: Symptômes causés par les maladies virales.....	29
<b>Figure1.8</b>	: Symptômes de pourriture molle causée par <i>Erwinia</i> spp sur chou.....	32
<b>Figure1.9</b>	: Symptômes de tache bactérienne sur feuille de chou.....	32
<b>Figure1.10</b>	: Symptômes de la nervation noire causés par <i>X. c. pv campestris</i> .....	32
<b>Figure 1.11</b>	: A) Lésions en forme de « V » typique de nervation noir causées par <i>X.c. pv. campestris</i> .....	34
	B) La maladie du dépérissement des giroflées induite par <i>X. c. pv incanae</i> .	
<b>Figure 1.12</b>	: 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>	34
<b>Figure 1.13</b>	: Bactérie du genre <i>Xanthomonas</i> mobile par un flagelle polaire	36
<b>Figure 1.14</b>	: Cultures bactériennes de <i>X. c. pv. campestris</i> jaune et muqueuse sur un milieu riche gélosé.....	36
<b>Figure 1.15</b>	: Structure de la Xanthomonadine.....	36
<b>Figure 1.16</b>	: Structure chimique de l'unité de base du xanthane.....	38
<b>Figure 1.17</b>	: Le gène de synthèse de la xanthomonadin (xanthomonadin gene cluster) Chez <i>X. c. pv. campestris</i> .....	38
<b>Figure 1.18</b>	: Portrait de Erwin Frink Smith (James, 1927).....	40
<b>Figure 1.19</b>	: Evolution de la nomenclature des <i>Xanthomonas</i> (Vauterin <i>et al.</i> , 1995).....	43
<b>figure 1.20</b>	: Représentation schématique des réarrangements de la taxonomie du genre <i>Xanthomonas</i> selon (Radmarker <i>et al.</i> , 2005).....	45
<b>Figure 1.21</b>	: Localisation schématique des 7 gènes de ménages au niveau du chromosome <i>X. c. pv. campestris</i> souche ATCC 33913.....	48

<b>Figure 1.22</b>	: Cycle infectieux des <i>Xanthomonas campestris</i> .....	53
<b>Figure 1.23</b>	: Localisation des hydathodes : Voies naturelles d'entrées de la bactérie <i>X. campestris</i> qui se trouvent à l'aboutissement des nervure à l'extrémité des feuilles.....	53
<b>Figure 1.24:</b>	: Modèle génétique de l'interaction gène pour gène .....	56
<b>Figure 1.25</b>	: Examen visuel après 7,10, et 14 jours suivant l'inoculation des plantules de chou avec la bactérie <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	59
<b>Figure 1.26</b>	: Schéma d'une amplification exponentielle d'un gène par PCR.....	63
<b>Figure 1.27</b>	: Activité de l'ADN polymérase dans la PCR avec une sonde TaqMan.....	64

**Partie expérimentale**

<b>Figure 1.1</b>	: Ampoule en verre contenant une souche bactérienne lyophilisée.....	72
<b>Figure 1.2</b>	: Test de sensibilité des amorces.....	87
<b>Figure 1.3</b>	: Efficacité du traitement à la DNase sur les acides nucléiques extraits selon le Kit Promega.....	93
<b>Figure 1.4</b>	: Détection par RT-PCR en une seule étape réalisée avec le couple d'amorces EmiRib5/EmiRib6 du gène <i>rrs</i>	94
<b>Figure 1.5</b>	: Détection par RT-PCR en deux étapes réalisée avec le couple d'amorces EmiRib5/EmiRib6 du gène <i>rrs</i> .....	94
<b>Figure 1.6</b>	: Intégrité des ARN extraits selon les différents protocoles d'extraction testés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.....	96
<b>Figure 1.7</b>	: Détection par RT-PCR en deux étapes sur les extraits d'acides nucléiques traités à la DNase.....	98
<b>Figure 1.8</b>	: Détection par RT-PCR en 1 seule étape réalisée avec le couple d'amorces Emirpo19/Emirpo21 du gène <i>rpoD</i> .....	100
<b>Figure 1.9</b>	: Détection par RT-PCR en deux étapes réalisée avec le couple d'amorces Emirpo19/Emirpo21 du gène <i>rpoD</i> .....	100
<b>Figure 1.10</b>	: Détection par RT-PCR en deux étapes réalisée avec le couple d'amorces Emigr5/Emigr8 du gène <i>gyrB</i> . .....	102
<b>Figure 2.1</b>	: Représentation schématique de la BIO-PCR.....	113
<b>Figure 2.2</b>	: Photo représentant la sélectivité du milieu Y.P.A.C.cv (a) vis-à-vis de la microflore bactérienne d'un lot de semence de chou comparée au milieu Y.P.A	115
<b>Figure 2.3</b>	: Détection de <i>X. campestris</i> par PCR multiplex (amorces spécifiqueS/amorces universelles).....	118

<b>Figure 2.4</b>	: Détection de <i>X. c. pv. raphani</i> par PCR Multilexe (amorces DLH à 441 pb amorces zup 370 pb).....	119
<b>Figure 3.1</b>	: Photos de symptômes sur plantules de chou contaminées par la souche (CFBP 5241) 14 jours après semis.....	130
<b>Figure 3.2</b>	: Influence du protocole d'extraction de l'ADN.....	132
<b>Figure 3.3</b>	: Efficacité de la détection de <i>X.c. pv. campestris</i> par SEED -PCR en Temps réel après trois jours de germination.....	132
<b>Figure 3.4</b>	: Dynamique de croissance des bactéries au cours de la germination estimée par PCR en temps réel.....	133
<b>Figure 3.5</b>	: Comparaison entre trois méthodes de germination pour 10 000 graines.....	133

## Liste des tableaux

Page

### Partie bibliographique

<b>Tableau 1.1</b>	: Récapitulatif des superficies, des productions, des rendements et des taux d'accroissement des principales Brassicacées cultivées en Algérie (Données statistiques agricole, 2006). .....	23
<b>Tableau 1.2</b>	: Les maladies fongiques des Brassicacées cultivées d'après Wukasch(1990) OEPP, (1998), Collin and Serpeille (2000) et Walker (2005).....	30
<b>Tableau 1.3</b>	: Informations générales sur les génomes séquencés ou en cours de séquençage de souches appartenant au genre <i>Xanthomonas</i> .....	50

### Partie expérimentale

<b>Tableau 1.1</b>	: Liste des souches bactériennes utilisées dans notre étude selon la classification de Vauterin (1995)	73
<b>Tableau 1.2</b>	: Amorces utilisées pour la détection spécifique de <i>X. c. pv. campmestris</i>	76
<b>Tableau 1.3</b>	: Dilution des suspensions bactériennes	77
<b>Tableau 1.4</b>	: Les oligonucléotides utilisés pour la synthèse du ADNc (Fislage <i>et al.</i> , 1997)	83
<b>Tableau 1.5</b>	: Les conditions d'amplification pour chaque couple d'amorces.....	85
<b>Tableau 1.6</b>	: Spécificité des amorces utilisées dans notre étude.....	89
<b>Tableau 2.1</b>	: Résultats des tests obtenus par BIO-PCR sur les lots de semences .....	117
<b>Tableau 3.1</b>	: Niveau d'infection estimé sur les graines après inoculation.....	128
<b>Tableau 3.2</b>	: Pourcentage des plantules issues de graines contaminées exprimant des symptômes après germination.....	127
<b>Tableau 3.3</b>	: Comparaison entre trois méthodes de germination pour 10 000 graines	
<b>Tableau 3.4</b>	: Comparaison entre deux méthodes d'enrichissement bactérien la BIO-PCR et la SEED-PCR .....	136
<b>Tableau 3.5</b>	: Etude du seuil de sensibilité de la SEED-PCR.....	137
<b>Tableau 3.6</b>	: Comparaison de la moyenne des Ct par groupe homogène...	138







## **Introduction**

L'Algérie importe annuellement plus de 100 000 tonnes de semences, soit 3473 tonnes de semences potagères. Les superficies cultivées en semences potagères sont de l'ordre de 195616 ha (MADR, 2009).

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 du 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 énormes de la culture. Des attaques plus tardives peuvent également déprécier la qualité du produit récolté.

Malgré l'utilisation croissante des moyens de lutte phytosanitaire et les progrès considérables dans ce domaine, la fin du vingtième siècle se caractérise 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 des 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 surveillances sanitaire visant à identifier et éliminer les lots de semences contaminés.

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.

C'est dans cette perspective que s'inscrit notre thème dont l'objectif est 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.

Le présent travail a pour but de :

1. Mettre au point une technique qui permet de caractériser la viabilité des bactéries dans les semences. Pour cela nous tenterons d'identifier des gènes spécifiques qui s'expriment de façon constitutive dans l'organisme, de valider un protocole d'extraction des ARN et d'utiliser une transcription inverse couplée à une amplification par PCR (**RT-PCR**) pour la détection des ARN messagers (ARNm) qui seront utilisés comme cibles et marqueurs des bactéries vivantes.
2. Valider une procédure de détection de *X.campestris* dans les semences naturellement contaminées, basée sur un enrichissement des bactéries dans un milieu semi sélectif suivi d'une PCR (**BIO-PCR**).
3. Mettre au point une nouvelle technique de détection des cellules vivantes de *X.campestris* dans les semences de chou basée sur un enrichissement des bactéries par germination des semences contaminées couplé à une PCR en temps réel (**SEEd -rt-PCR**).

## **Partie Bibliographique**



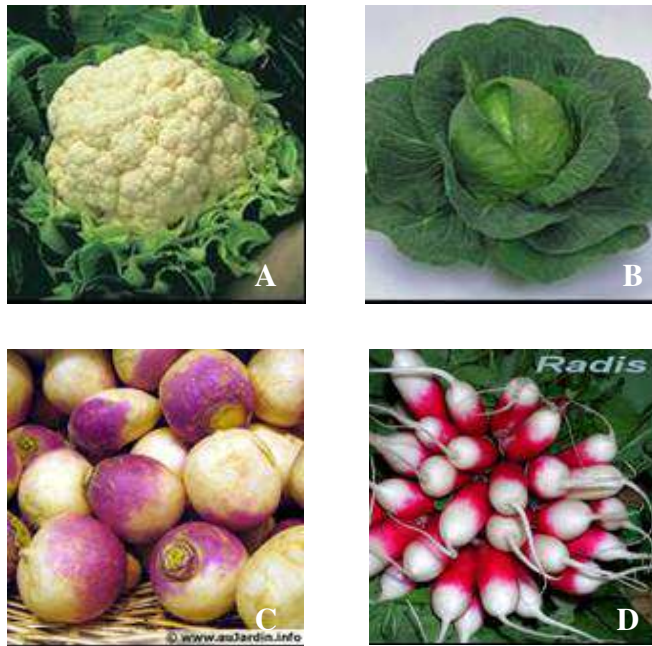
# **1. L'hôte et son Pathogène : Les Brassicacées et *X. campestris***

## **1.1 Les Brassicacées**

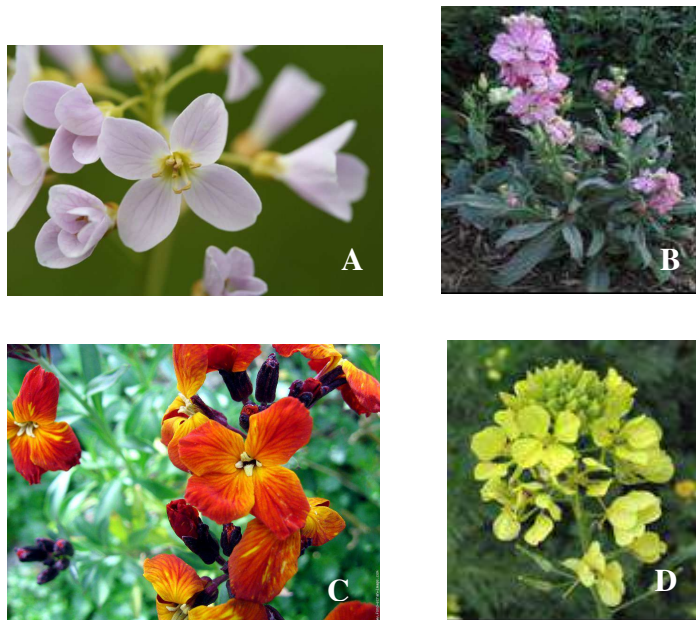
Les Brassicacées, anciennement nommées Crucifères, constituent une importante famille des plantes dicotylédones, aussi bien par le nombre d'espèces qu'elles regroupent que par son importance économique. Cette famille comprend, environ, 3700 espèces réparties en 338 genres. Les Brassicacées appartiennent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

### **1.1.1 Importance économique des Brassicacées**

Les Brassicacées forment l'une des familles les plus importantes sur le plan économique. Les espèces cultivées de *Brassica*, notamment, affichent une grande diversité et constituent des sources de légumes, d'huiles, de légumes condimentaires, de fourrage et d'espèces ornementales (Figure 1.1) et (Figure 1.2). La production mondiale de crucifères et particulièrement celle du chou est de 69,8 millions de tonnes, c'est le quatrième légume le plus cultivé derrière la pomme de terre (321 millions de tonnes), la betterave sucrière (242,6 millions de tonnes) et la tomate (125 millions de tonnes) (source FAO, 2005). Les principaux pays producteurs sont la Chine (34,1 millions de t) et l'Inde (6 millions de t) (source FAO, 2005). Parmi les légumes cultivés en Algérie, les Brassicacées cultivés représentent une part importante de la production nationale : 3,51 % de la production totale des cultures maraîchères (MADR, 2006).



**Figure 1.1 :** Quelques Brassicacées cultivées:  
A) Chou fleur (*Brassica olearacea* var. *Botritis*), B) Chou pommé (*Brassica olearacea* var. *capitata*), C) Navet (*Brassica rapa*), D) Radis, (*Raphanus sativus*).



**Figure 1.2** Brassicacées d'ornement:  
A) Cardamine des prés (*Cardamine pratensis*), B) Violier (*Mathila sinuata*),  
C) Giroflée (*Cheiranthus cheiri*), D) Moutarde blanche (*Sinapis alba*),  
([www.visoflora.com](http://www.visoflora.com))



## 1.1 Les Brassicacées

Les espèces ayant une importance particulière en Algérie (Tableau 1.1), sont les navets (*Brassica rapa*), représentant **58,80%** de la production nationale, suivi du chou fleurs (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) avec 24,87 et 16,33% pour le chou vert (*Brassica oleracea* var. *capitata*).

**Tableau 1.1** : Récapitulatif des superficies, des productions, des rendements et des taux d'accroissement des principales Brassicacées cultivées en Algérie (Données statistiques agricole, 2006).

	2005			2006			Taux d'accroissement % 2006 /2005		
	Sup.ha	Prod.qx	Rdt qx/ha	Sup. ha	Prod.	Rdt qx/ha	Sup. ha	Prod. qx	Rdt qx/ha
Choux verts	2 910	335 115	115,2	2 916	390 616	134,0	0	17	16
Choux fleurs	4 267	514 810	120,6	4 476	591 264	132,1	5	15	9
Navets	8 534	1 512 000	177,2	8 837	1 102 888	124,8	4	-27	-30

### 1.1. 2 Origine et Classification des Brassicacées :

L'étude phylogénétique réalisée sur la famille des Brassicacées a mis en évidence que les 338 genres qui la constituent sont eux même répartis en 25 tribus (Figure 1.4). La plus étudiée est celle des Brassiceae 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 en viron 230 espèces (Al-Shehbez *et al.*, 2006). Cette tribu contient les genres *Brassica*, *Raphanus* et *Eruca*. Le genre *Brassica* présente probablement le polymorphisme le plus important observé chez les plantes cultivées et est exploité par l'Homme pour des usages très variés. Ce genre fournit l'huile avec le colza et le canola (*B. napus*), les navets et les choux chinois (*B. rapa* ; syn. *B. campestris*), les moutardes, la moutarde noire (*B. nigra*), la moutarde indienne ou brune (*Brassica juncea*) et la moutarde éthiopienne (*Brassica carinata*). L'espèce *B. oleracea* fournit à elle seule une très grande variété de légumes dont le chou-fleur (*B.o.* var. *botritis*), 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*). Cette grande diversité au sein de ce genre est favorisée par la plasticité de son génome. En effet, tous les choux sont inters fertiles (Paterson *et al.*, 2006) et certaines de ces espèces résultent d'un croisement interspécifique spontané très ancien.

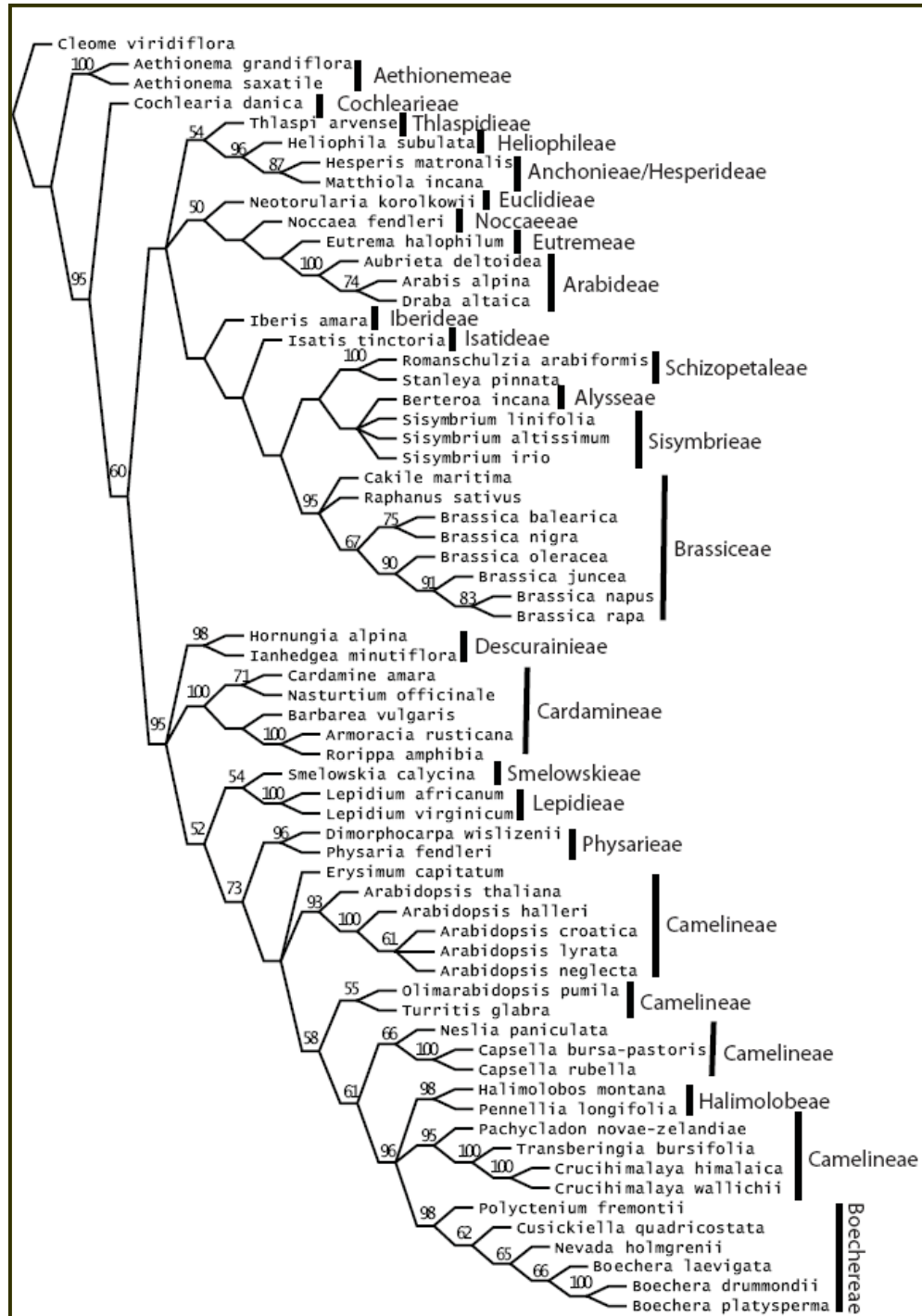


Figure 1.3 : Relation phylogénétique entre quelques une des tribus appartenant à la famille des Brassicacées (Bailey *et al.*, 2006).

Les Brassicacées sont probablement apparus 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 relations 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 probablement 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 répondeue 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).

### 1.1.3 Origine de la diversification de certaines des Brassicacées cultivées :

La plupart des légumes cultivés ont été sélectionnés pour obtenir de nouvelles plantes améliorées généralement, par le choix d'un critère donné 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), mais encore des formes avec des tiges renflées (kohlrabi ou chou-rave). Le genre *Brassica* a la particularité d'être le genre le plus proche d'*Arabidopsis* partageant plus de 85% d'identité nucléotidique (Cavell *et al.*, 1998). *Arabidopsis thaliana* ou Arrabette des Dames (Figure 1.4 ) étant la plante modèle des biologistes et la plus utilisée dans les laboratoires. 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).

Cette plante modèle est utilisée pour comprendre la biologie des végétaux et les mécanismes d'interaction entre les plantes et les pathogènes (Parker *et al.*, 1993). Ce lien de parenté a facilité des approches relatives aux programmes d'amélioration génétique pour définir les caractères de sélections (Lan and Paterson, 2000 ; O'Neil and Bancroft, 2000).



**Figure 1.4:** *Arabidopsis thaliana*

#### **1.1.4 Données botaniques**

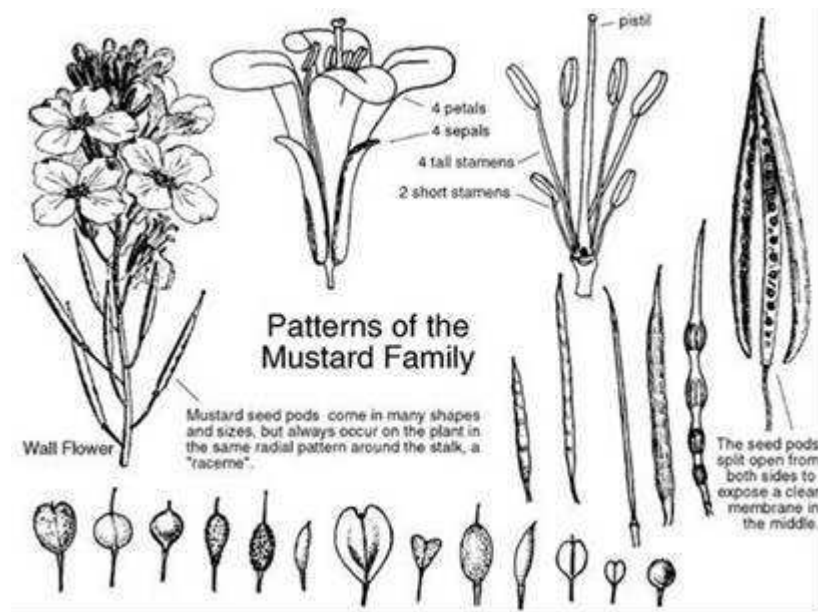
##### **L'appareil végétatif :**

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 voire absents. Pour leur floraison, une période de vernalisation est généralement nécessaire (Watson and Dallwitz, 1992 ; Stevens, 2001).

L'appareil végétatif est toujours riche en essence sulfurée d'où la saveur piquante. L'utilisation condimentaire est aussi justifiée par la présence de cette d'essence.

##### **L'appareil reproducteur (Les 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) (Figure 1.5).



**Figure 1. 5 :** Schéma représentant les différents organes d'une Brassicacée (Wildflowers & Weeds, 2006).

### Les fruits :

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 sépare les 2 loges du fruit. Les silicules sont parfois comprimées et de formes variées (Dupond et Guignard, 2007).

## **1.2 Les maladies et ravageurs des Brassicacées :**

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

### **1.2.1 Les ravageurs des Brassicacées:**

Les ravageurs sont des ennemis redoutables des Brassicacées maraîchères. Ils causent des dégâts importants et affectent la qualité commerciale des crucifères cultivées (Figure 1.6). 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). Les ravageurs sont également vecteurs de maladies, tel que les *Brevicoryne brassicae* et *Myzus persicae* qui transmettent la mosaïque du chou fleur (Cauliflower mosaic virus, **CaMV**) (Figure 1.7 A) et la mosaïque du navet (Turnip mosaic virus, **TuMV**) (Figure 1.7 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.

## 1.2 Les maladies et ravageurs des Brassicacées



**Figure 1.6:** 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) L'Arpenteuse du chou (*Trichoplusia ni*) ; G) La mouche du chou (*Delia radicu*), H) Les thrips (*Thrips tabaci*), I) L'Aleurode du chou (*macrolophus aleurode*) ; J) La fausse teigne des Brassicacées (*Plutella-xylostella*) (Chaput, 2000).



**Figure 1.7:** Symptômes causés par les maladies Virales

A) Virus de la mosaïque du chou-fleur (Cauliflower 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).

### 1.2.2 Les maladies fongiques :

Les pathogènes fongiques (tableau 1.2) peuvent causer de sérieux problèmes sur 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 infestées, 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)).

**Tableau 1.2** : Les maladies fongiques des Brassicacées cultivées d'après Wukasch (1990), Collin and Serpeille (2000) et Walker (2005).

Maladies fongiques	Les pathogènes
La nécrose du collet	<i>Leptosphaeria maculans, Phoma lingam</i>
La hernie des crucifères	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
La maladie des taches noires	<i>Mycosphaerella brassicicola</i>
Le mildiou	<i>Peronospora parasitica</i>
La rouille blanche des crucifères	<i>Albugo candida</i>
L'Alternarioses (La tache grise et tache noire)	<i>Alternaria brassicae</i> et <i>A. brassicicola</i>
La cylindrosporiose	<i>Pyrenopeziza brassicae</i>
La pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>
Rhizoctone (tige noire)	<i>Rhizoctonia solani</i>
La fonte des semis	<i>Pythium spp</i>
La pourriture racinaire des choux	<i>Phytophthora spp</i>
La verticilliose	<i>Verticillium dahliae</i>
La jaunisse fusarienne	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.
La pourriture sclérotique	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

### 1.2.3 Les maladies bactériennes des Brassicacées cultivées

Plusieurs maladies bactériennes sont également responsables de pertes importantes dans la production de Brassicacées cultivées.

**La pourriture molle** : (*Erwinia carotovora, Pseudomonas cichorii* et *P. marginalis*). La pourriture molle 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, les navets et les rutabagas. 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. Les bactéries responsables des pourritures molles sont le plus souvent : *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas cichorii* et *P. marginalis* qui sont des pathogènes communs du sol. Les effets de leurs attaques sont accentués par des conditions humides et certaines saisons présentent donc plus de risques (Anonyme, 1998). Selon Wukasch, 1990, la maladie peut occasionner des pertes aussi bien en entrepôt, durant le transport que dans les champs (Figure 1.8).

**La tache bactérienne :** (*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 malades sont crispées et déformées. A un stade avancé de la maladie, les petites taches fusionnent en de larges plages brunes à bordure jaune qui se déchirent facilement, donnant à la plante un aspect déchiqueté (**Figure 1.9**).

**La nervation noire** (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)

La nervation noire est causée par *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. Elle est de distribution universelle, et considérée comme l'une des plus destructives des Brassicacées cultivés (Figure 1.10) (Williams, 1980).



**Figure 1.8** : Symptômes de pourriture molle causés par *Erwinia* spp sur chou (Wukasch et Dhanvantari, 1990)



**Figure 1.9** : Symptômes de tache bactérienne sur feuille de chou (Wukasch et Dhanvantari, 1990)



**Figure 1.10** : Symptômes de la nervation noire causés par *X.c.* pv *campestris* (FARC, 2005)

## 1.3 Les bactérioses des Brassicacées causées par *X. campestris*

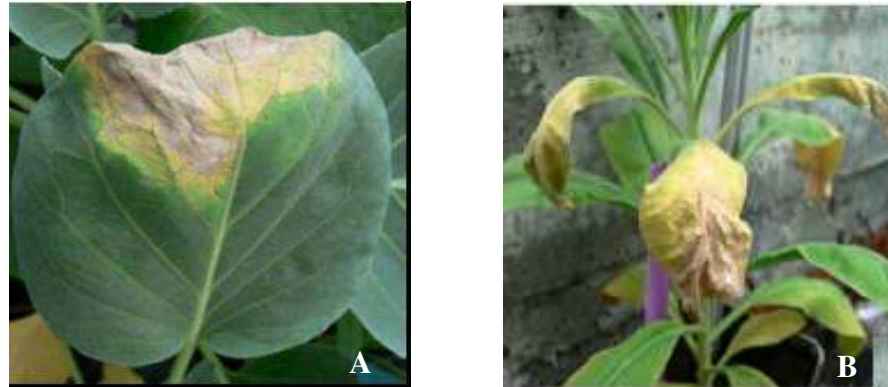
### 1.3.1 Les maladies vasculaires

Deux bactérioses vasculaires dues à des *X. campestris* sont recensées sur les 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 1.11 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* du point de vue morphologique. Cependant, cette bactérie ne provoque de symptômes que sur son hôte d'isolement et très peu voire aucun sur chou-fleur (Bradburly, 1986). Ce pathogène est actuellement connu sous le nom *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 troisième maladie a été décrite sur giroflées, dont l'origine initiale des symptômes était attribuée à *X. c. pv. campestris* (Hall, 1900; Faber 1907). Cependant l'étude du pouvoir pathogène (Kendrick and Baker, 1942) de la bactérie isolée a démontré 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 1.11 B). Cette maladie est causée par *X. c. pv. incanae*.

### 1.3.2 Les maladies du parenchyme

Trois bactérioses entraînant des symptômes sur le parenchyme de Brassicacées sont décrites dans la littérature. Il s'agit de la maladie des taches foliaires du chou-fleur causée par *X. c. pv. aberrans* (Bradbury, 1986), de la maladie des taches foliaires du raifort due à *X. c. pv. armoraciae* (McCulloch, 1929) et de la maladie,



**Figure 1.11.** (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 1.12 :** 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).

## 1.4 Les caractéristiques cellulaires des *Xanthomonas*

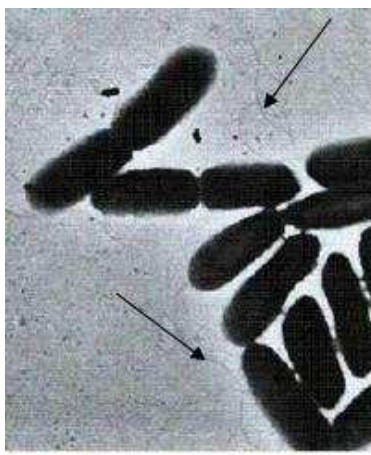
des taches foliaires du radis consécutive aux attaques de *X. c. pv. raphani* sur radis et navets (White, 1930). En 1926, une nouvelle maladie est observée sur des raiforts. Les feuilles de raifort sont maculées de taches et de nombreuses colonies bactériennes jaunes sont isolées de ces taches (McCulloch, 1929). La bactérie semble avoir de nombreuses caractéristiques en commun avec *X. c. pv. campestris* hormis sa réaction particulière avec l'hôte. McCulloch (1929) explique que ce pathogène, actuellement connu sous le nom de *X.c. pv. armoraciae*, a la particularité de ne pas provoquer de maladie vasculaire comme *X. c. pv. campestris* mais plutôt une maladie du parenchyme. Les premiers symptômes de la maladie sont l'apparition de petites taches vertes foncées sur la face inférieure des feuilles. A un stade plus avancé, les taches deviennent visibles sur la surface supérieure des feuilles (Figure 1.12.A) (McCulloch, 1929).

Une autre bactériose provoquant des taches foliaires a été rapportée sur radis et navet (White and Gardner, 1929). Le pathogène, *X. c. pv. raphani*, cause sur les feuilles des taches circulaires irrégulières noires qui deviennent par la suite marron clair et le plus souvent auréolées d'une zone jaunâtre. Bien souvent, lorsque les lésions s'étendent, le pétiole se déchire (White, 1930). White et Gardner (1929) rapportent que ce pathogène provoque des symptômes similaires sur chou, chou frisé, chou-fleur, chou de Bruxelles mais également sur tomate, tabac et poivron. White (1930) montre dans ses travaux que ce pathogène du radis est différent de *X. c. pv. campestris* car il ne provoque pas d'infection vasculaire. Il diffère également de *X. c. pv. armoraciae* du fait de sa plus large gamme d'hôtes (Figure 1.12.B) (White, 1930). Bradbury (1986) rapporte l'existence d'un variant de *X. c. pv. campestris* nommé *X. c. pv. aberrans*. Knôsel (1961) explique que ce pathogène est beaucoup plus agressif sur chou-fleur et qu'il a tendance à provoquer de nombreuses taches nécrotiques plutôt que de la nervation noire ; il nomme cette bactériose la maladie des taches foliaires du chou-fleur (Figure 1.12.C). Toutes ces bactéries ont été reclassées sous le terme *X.c. pv raphani* du fait de leur convergence pathologique (Fargier et Manceau, 2007).

## 1.4 Les caractéristiques cellulaires des *Xanthomonas* :

### 1.4.1 Morphologie de la bactérie

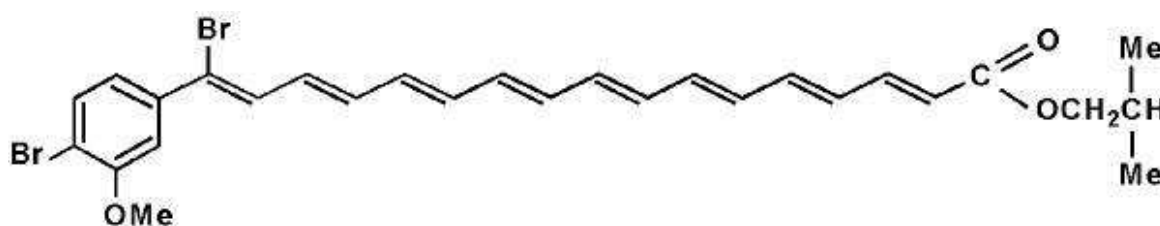
Les *Xanthomonas campestris* sont des bactéries de type bacille, gram négatif, d'une taille d'environ 0,4 à 0,6µm de large et X 0,8 à 2 µm de long (Swing et Civerole, 1993),



**Figure 1.13 :** Bactérie du genre *Xanthomonas* mobile par un flagelle polaire (www.inra.fr)



**Figure 1.14 :** Cultures bactériennes de *X. c. pv. campestris* jaunes et muqueuses sur un milieu riche gélosé (Roberts *et al.*, 2006)



**Figure 1.15 :** Structure de la Xanthomonadine (Andrew *et al.*, 1976)

#### 1.4 Les caractéristiques cellulaires des *Xanthomonas*

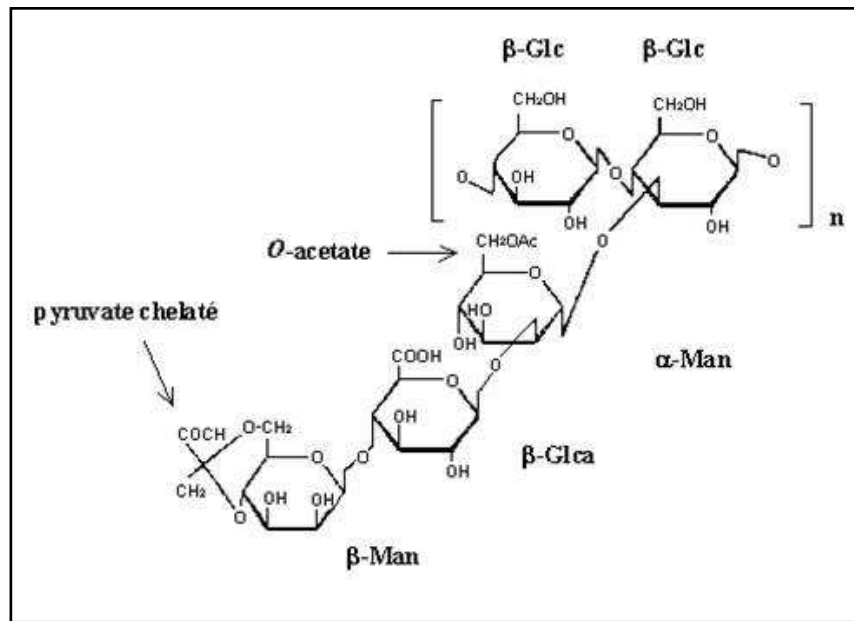
---

mobiles par un flagelle polaire (Saddler and Bradbury, 2005) (Figure 1.13). Elles se retrouvent le plus souvent seules, par paires ou regroupées sous forme de chaîne (Swing et Civerole, 1993). Sur le plan métabolique, elle est aérobie stricte, catalase positive, oxydase négative ou faiblement positive et ne réduit pas les nitrates. Les *Xanthomonas* sont riches en acides gras, les lipides représentent 20% du poids de la bactérie (Lechevalier and Lechevalier, 1988), plus de 99% des *Xanthomonas* contiennent 9 acides gras : 11 : 0 iso, 11 : 0 iso 3OH, 12 : 0 3OH, 13 : 0 iso 3OH, 15 : 0 iso, 16 : 1 cis 9, 16 : 0, 17 : 1 iso F et 17 : 0 iso. 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). Sur un milieu riche gélosé, YDC (yeast extract dextrose carbonate) elle produit un abondant mucus donnant des colonies isolées de couleur jaune (Figure 1.14). Le pigment intervenant dans cette coloration est la xanthomonadine (Figure 1.15). La pigmentation jaune 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 (Poplawsky *et al.*, 2000), et aurait également un rôle de protection contre les agressions photobiologiques (Chun *et al.*, 2002). La bactérie produit des polysaccharides extracellulaires (EPS), dont le constituant principal est le xanthane (Figure 1.16). Ces composés 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).

La biosynthèse de la xanthomonadine et celle des EPS est assurée par la sous unité *pigB* du cluster de gènes xanthomonadine (xanthomonadin gène cluster) (Figure 1.17), (Poplawsky and Chun, 1997), Barber *et al.* ; 1997). Leur régulation est contrôlée par une phéromone extracellulaire DF (Diffusible Factor) (Poplawsky *et al.*, 2005). L'association du xanthomonadine et des EPS est importante pour la survie *X. c. pv campestris* sur les feuilles et pour l'infection de l'hôte (Poplawsky and Chun, 1998). Les EPS jouent un rôle important dans la tolérance à la dessiccation permettent l'attraction de l'eau et des ions au niveau.

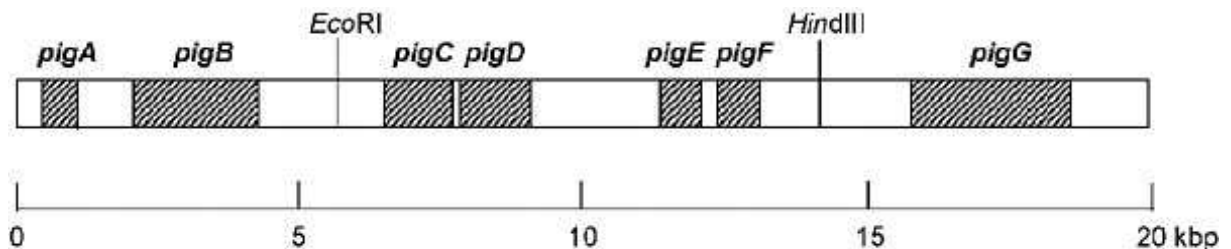
des espaces intracellulaires de façon à ce que les bactéries ne se dessèchent pas. (Wilkinson 1958; Roberson and Firestone, 1992).

Le xanthane est aussi un produit industriel. Sa production dans le monde est estimée à plus de 20 000 tonnes. L'utilisation du xanthane en industrie pétrolière, alimentaire textile en cosmétique, s'est établi grâce aux propriétés physiques du polysaccharide. Il est utilisé comme agent viscosant permettant de stabiliser les émulsions (Becker *et al.*, 1998).



**Figure 1.16** : Structure chimique de l'unité de base du xanthane.

Le xanthane est un hétéropolysaccharide produit de la bactérie *Xanthomonas campestris*. Sa structure est constituée d'une chaîne principale de  $\beta$ -D-glucoses liés en  $\beta$  (1,4), semblable à la cellulose. Une molécule de glucose sur deux porte une chaîne latérale trisaccharidique composée d'un  $\alpha$ -D-mannose, d'un acide  $\beta$ -D-glucuronique et d'un  $\beta$ -D-mannose terminal. (Laneuville, 2004).



**Figure 1.17** : Le gène de synthèse de la xanthomonadine (xanthomonadin gene cluster) Chez *X. c. pv. campestris* (Poplawsky *et al.*, 1997).



### 1.4.2 La physiologie de la bactérie :

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 chimioorganotrophes, c'est-à-dire qu'ils puisent leur énergie à partir de composés organiques. Les milieux de culture doivent contenir des minéraux, du nitrate d'ammonium, une source de carbone telle que le glucose, et des suppléments en acides aminés. La plupart du temps, le glutamate et la méthionine sont nécessaires à la croissance bactérienne (Saddler, 2005).

## 1.5 Position taxonomique des *Xanthomonas*

### 1.5.1 Quelques généralités sur les bactéries phytopathogènes

Les bactéries phytopathogènes sont des micro-organismes qui ont une écologie liée aux végétaux et qui sont capables d'attaquer des plantes. Bien que moins importantes en terme de nombre d'espèces que les bactéries pathogènes de l'Homme et des animaux, les bactéries pathogènes des plantes provoquent 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 phylums des *Firmicutes* et des *Actinobacteria*. Les maladies bactériennes chez les végétaux sont décrites depuis l'Antiquité : pourritures, nécroses, jaunissement, dépérissement, chancres. Cependant 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 (Burrill, 1882), de la maladie jaune des hyacinthes (Wakker, 1883) et de la maladie de la tuberculose de l'olivier (Savastano 1886). 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 1.18) 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*. Actuellement, on estime à près de trois cent le nombre d'espèces ou de pathovars de procaryotes dont le pouvoir pathogène est vérifié (Maurin *et al.*, 1999).



**Figure 1. 18** E. F/ Smith (1854-1938) père fondateur de la phytobactériologie (Janse, 2006)

### 1.5.2 Taxonomie basée sur le pouvoir pathogène :

L'une des caractéristiques des *Xanthomonas* est leur grande diversité pathologique. Il possède de très nombreux pathovars qui se distinguent les uns des autres par leur spécificité d'hôte. En effet, *X. campestris* est inféodé à la famille des Brassicacées ; *X. c. pv begoniae* attaque le bégonia; *X. axonopodis .pv citri* a comme hôtes divers citrus, *X. axonopodis. pv. phaseoli*, colonise le haricot.

C'est Burkholder en 1930 qui 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 Manual of Determinative Bacteriology* répartit les espèces du genre *Xanthomonas* en cinq : *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 seul les noms publiés dans *Approved Lists of bacterial Names* de l'ICSP après le 1<sup>er</sup> Janvier 1987 seront valides. Pour les *Xanthomonas*, seules les espèces publiées dans la 8<sup>ème</sup> 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 International 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'hôte et de leur pouvoir pathogène. La liste a été publiée sous le nom de « *International Standarts for Naming Pathovars of phytopathogenic Bacteria*» (Dye *et al.*, 1980). Cette nomenclature a joué un rôle important dans la classification des bactéries Phytopathogènes.

### 1.5.3 Taxonomie moléculaire et évolutive du genre *Xanthomonas* :

Selon 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 ces relations supra génétiques a montré que *X. ampelinus* 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. Par contre *Xanthomonas populi*, agent du chancre du peuplier 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 reflètent pas les relations génomiques au sein de *Xanthomonas* (Vauterin *et al.*, 1995) (Figure 1.19).

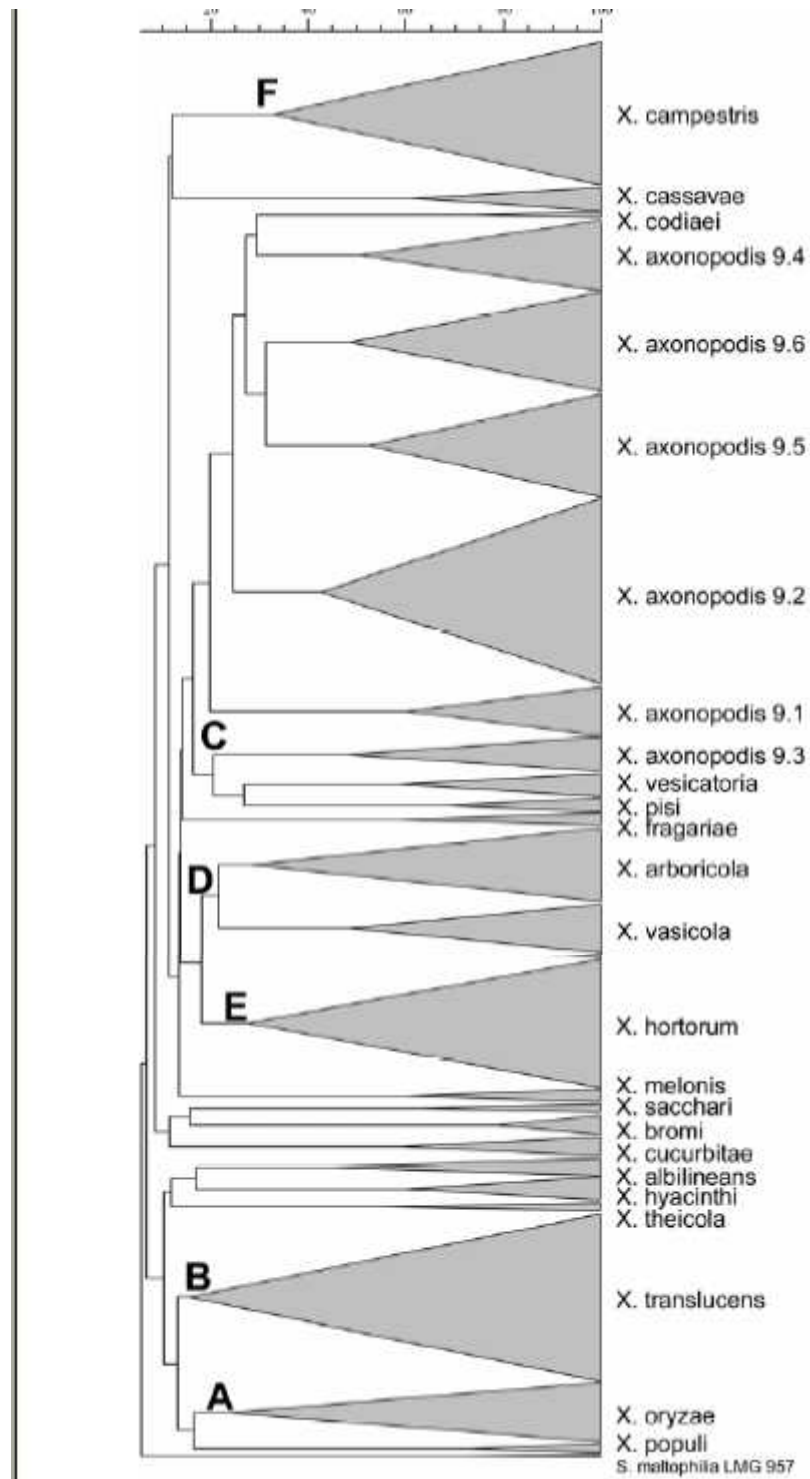


Pour remédier à ces divergences, le comité de réévaluation de l'espèce bactérienne recommande la technique des hybridations ADN-ADN (Wayne *et al.*, 1987) pour délimiter les espèces génomiques. Ces données moléculaires ont profondément bouleversé la classification générale des procaryotes et entraîné 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 1.19). Leurs travaux ont grandement amélioré la taxonomie des *Xanthomonas*. Néanmoins 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 différents espèces du genre ont été déterminées par le séquençage de l'ADNr16S (Hauben *et al.*, 1997).

Rademaker *et al.* (2005) ont adopté récemment 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) et 160 souches n'ayant pas été caractérisées par hybridation ADN-ADN. Les profils génétiques obtenus par rep-PCR (**Figure 1.20**), 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 intraspécifique pour les espèces *X. hortorum*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. oryzae*, *X. campestris*, et *X. translucens*.

## 1.5 Position taxonomique des *Xanthomonas*



**Figure 1.20 :** Représentation schématique des réarrangements de la taxonomie du genre *Xanthomonas* selon (Radmarker *et al.*, 2005).

#### **1.5.4 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 al.* 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 d'après Vauterin *et al.* (1995), 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 la gamme d'hôte. Les pathovars de l'espèce *X. campestris* ont une gamme d'hôte 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) et que la subdivision de l'espèce *Xanthomonas campestris* en 6 pathovars était floue et que les six pathovars ne correspondent pas aux pathovars tel que Young *et al.*, 1978 le définissent (Vicente, 2006).

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



### 1.5 Position taxonomique des *Xanthomonas*

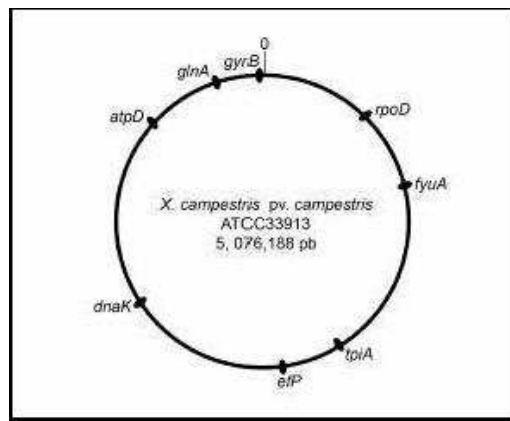
---

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. Les techniques de typage des souches basées sur l'obtention de profils moléculaires sont en pratique lourde et manquent parfois de pouvoir discriminatoire ce qui ne permet pas de comparer les résultats entre les laboratoires (Maiden *et al.*, 1998). 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 (Multi Locus Sequence Typing) (Fargier *et al.*, 2007).

L'étude du pouvoir pathogène a été réalisée en utilisant 6 souches types de différent pathovars parmi eux, les deux souches de *X. c. pv. campestris* dont le génome a été entièrement séquencé (tableau 1.3) et *X. c. pv. armoraciae* C750 en cours de séquençage sur une gamme d'hôte différentielle du genre *Brassicacées* : *Brassica*, *Raphanus*, *Matthiola*, *Cheiranthus*, *Iberis* et *Barbarea*, mais également des plantes appartenant à la famille des Solanaceae.

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 1.22) 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 noir des Brassicacées, *X.c.pv. raphani* maladie des tache foliaire des Brassicacées et *X. c. pv. incanae* maladie du dépérissement des giroflées et

montrent également que *X. c. pv. campestris* peut être subdivisé en 9 races alors que *X. c. pv. raphani* et subdivisé en 3 races suivant 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 symptômes sur les Brassicacées perdent leur nomenclature en pathovars et sont nommée *X.campestris* seulement.



**Figure 1.21:** 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.

### Les génomes séquencés pour l'espèce *X. campestris*

Les génomes de neuf bactéries appartenant au genre *Xanthomonas* ont été séquencés, il s'agit de : *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

### 1.5 Position taxonomique des *Xanthomonas*

---

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 (Tableau 1.3).

Bactéries Souche	<i>X. a. pv Citri</i> 306	<i>X. a. pv Vesicatoria</i> 85-10	<i>X. o. pv Oryzae</i> MAFF311018	<i>X. o. pv Oryzae</i> KACC10331	<i>Oryzae</i> PXO 99A	<i>Oryzicola</i> BLS256	<i>X. c. pv Compestris</i> ATCC33913	<i>X. c. pv Campestris</i> 8004	<i>X. c. pv Campestris</i> B100	<i>X. a. pv Glycines</i> pAG1
Ref de la séquence NC	NC_003919	NC_007508	NC_007705	NC_006834	NC_010717	-	NC_003902	NC_007086	NC_01688	NC_010872
Ref de la séquence (ncbi)	AE008923	AM039952	AP008229	AE01598	CP000967		AE008922	CP000050	AM920689	AY780631
Longueur (pb)	5 175 554	5 178 466	4 940 217	4 941 439	5240075	4 831 739	5 076 188	5 148 708	5079002	15143
GC %	64%	64%	63%	63%	63%	64%	65%	64%	65%	62%
Régions codantes	85%	87%	83%	79%	81%	86%	84%	84%	87%	82%
Séquences codantes potentielles	4312	4487	4372	4637	4988	4626	4181	4273	4467	16
ARNs de structure	62	58	59	60	60	60	61	61	62	-
Séquences d'insertion	108	58	386	207		ND	109	115		
Plasmides	pXAC33, pXAC64	pXCV2 pXCV19, pXCV38, pXCV183	0	0		0	0	0		pXAG81 pXAG81

**Tableau 1.3 :** Informations générales sur les génomes séquencés ou en cours de séquençage de souches du genre *Xanthomonas*

## 1.6 Le cycle infectieux de *X. campestris* (Figure 1.22)

### Les semences ou contamination à longue distance :

Les semences contaminées constituent un moyen de conservation et une voie de transmission fréquente chez les bactéries Phytopathogènes (Blackeman, 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 et Schultz and Gabrielson, 1986). La présence de trois à cinq graines infectées sur 10 000 suffit pour causer une incidence élevée aux champs (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, 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 tel que la mouche du chou, les vers gris et les larves de lépidoptères (Rat et Chauveau, 1985).

### Conservation dans le sol :

Le pathogène est capable de survivre pendant l'hiver dans les débris végétaux contaminés des récoltes précédentes (Schaad and Kendrick, 1975). A la fin de la culture, les débris végétaux sont enfouis dans le sol et peuvent conserver la bactérie dans le sol pendant environs deux années tant que les résidus de culture ne sont pas décomposés. Ils constituent ainsi, une nouvelle source d'infection (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).

**Les Brassicacées 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). Les plantes adventices de la famille des Brassicacées sont communes dans les champs de production de choux et sont des réservoirs d'inoculum importants.

**Les voies d'entrées des bactéries :**

Les voies naturelles de pénétration de la bactérie sont les **hydathodes** (Figure 1.23) appelées également les stomates aquifères qui interviennent dans la régulation des flux, mais aussi par les blessures causées par quelques insectes tel 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 et une pression racinaire combinée à un faible niveau d'évapotranspiration (Ruissen and Gielink, 1992). Lorsque la plante gutte, de multiples gouttelettes suintent en marge des feuilles. 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). Alors que les hydathodes constituent la voie d'entrée par excellence de *X. c. pv. campestris* et de *X. c. pv. incanae* (Williams, 1980 ; Kendrick and Baker, 1942), *X. c. pv. armoraciae* pénètre dans la plante préférentiellement par les stomates, provoquant les symptômes caractéristiques de taches sur feuilles (Hugouvieux *et al.*, 1998).

.

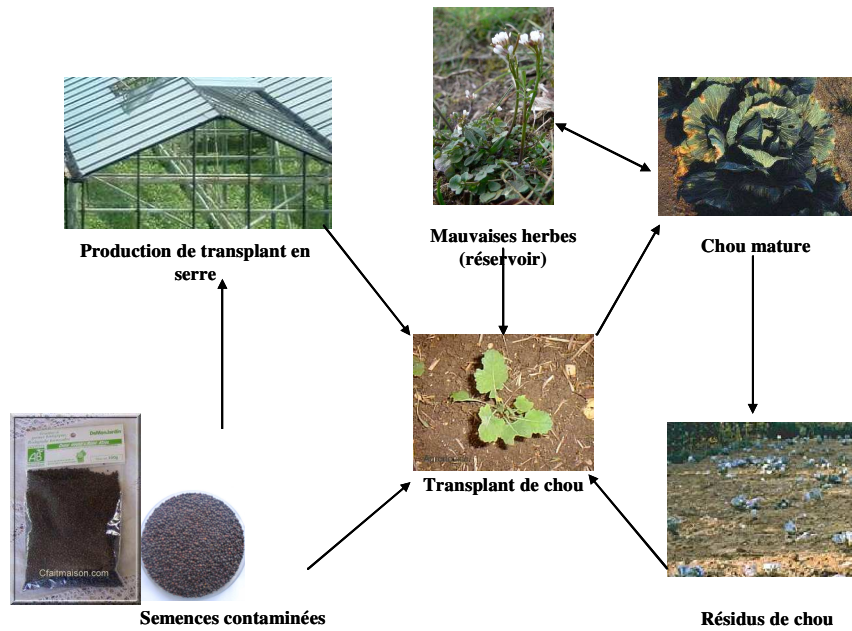


Figure 1.22 : Cycle infectieux des *Xanthomonas campestris*



Figure 1.23 : 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).

### **Les conditions favorables à la maladie :**

*X. campestris* est une bactérie épiphyte, elle est capable de coloniser les parties aériennes des plantes sans toutefois causer de symptômes (Kuan *et al.*, 1986). Lorsque les conditions environnementales deviennent propices à l'infection, la bactérie pénètre dans la plante par les voies d'entrées naturelles ou les blessures, puis colonise l'intérieur des tissus en provoquant l'apparition des symptômes caractéristiques de la maladie (Hayward, 1974). Une température se situant entre 25 et 28°C, un niveau d'humidité élevé et des conditions pluvieuses 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. Néanmoins 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).

### **1.7 Les moyens de lutte contre *X. campestris* :**

Les moyens de lutte contre la nervation noire des crucifères sont basés 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) faire des rotations des cultures sur trois ans, en alternance, avec des cultures autres que les Brassicacées.

#### **1.7.1 Traitement des semences :**

La lutte chimique aux moyens de 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, leur action permettent de ralentir



la croissance et la reproduction des bactéries, mais ne les tuent pas (Messiaen *et al.*, 1999). 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. Cependant, plusieurs traitements de semences sont utilisés : eau chaude, peroxyde d'hydrogène, acétate de cuivre et 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 (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).

### 1.7.2 La culture des variétés résistantes ou tolérantes :

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 conférant cette 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 variants 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 1.24) correspondant aux six races du pathogène (Soengas *et al.*, 2007). Par contre les variétés tolérantes peuvent être infectées et servir de réservoir de germes et donc de source de contamination pour les variétés sensibles. Par ailleurs la tolérance contrarie l'épuration phytosanitaire car les symptômes sont peu visibles (Lepoivre, 2003).

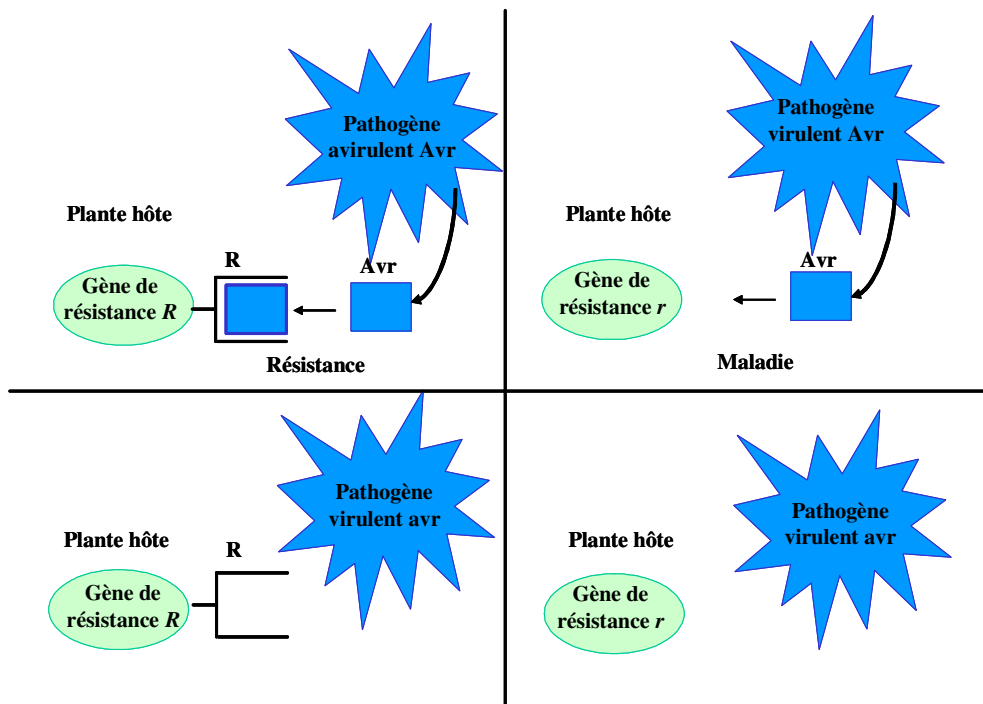


Figure 1.24 : Modèle génétique de l'interaction gène pour gène

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  $R, Avr$  : gènes dominants,  $r, avr$  : gènes récessifs.  $R$  : produit du gène  $R$ .  $Avr$  : produit du gène  $Avr$  (Buhot, 2003)

### 1.7.3 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 les bactérioses induites par *X. campestris*, des bactéries antagonistes, des souches appartenant au genre *Bacillus*,

sont utilisées. Ces antagonistes sont des bactéries endophytes : bactéries omniprésentes chez la plupart des espèces végétales et colonisant l'intérieur des tissus végétaux sans effet préjudiciable pour la plante (Hollis, 1951; Samish *et al.*, 1963). Wulff *et al.* (2002) et Massomo *et al.* (2003) ont montré que des souches appartenant au genre *Bacillus* ont un bon potentiel antagoniste contre la nervation noire (Wulff *et al.*, 2002 ; Massomo *et al.*, 2003). Néanmoins, en condition très favorable à la maladie, leurs actions restent limitées (Wulff *et al.*, 2002 ; Massomo *et al.*, 2003).

Toutefois, 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).

#### **1.7.4 Le contrôle 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 sont réalisées par des laboratoires publiques ou les laboratoires des établissements semenciers agréés. Le milieu sélectif ne permet pas à lui seul d'identifier le pathogène, et l'isolement des bactéries suspectes est suivi de tests de pouvoir pathogène sur plantes sensibles pour compléter le diagnostic. (Roberts and Koenraadt, 2006).

### **1.8 Les techniques de détection et d'identification**

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 suivants :

- Tests biologiques
- Tests biochimiques
- Tests sérologiques
- Tests moléculaires

### **1.8.1 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.

Le test biologique utilisé pour le diagnostic de *X. c. pv. campestris* (nervation noire des crucifères) consiste à inoculer des plantules de chou au stade 2 à 3 feuilles par une suspension bactérienne et à observer de symptômes différentiels après 7 à 14 jours (International Seed Health Initiative, 2000), (Figure 1. 25).

### **1.8.2 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).



**Figure 1. 25 :** Examen visuel après 7,10, et 14 jours suivant l'inoculation des plantules de chou avec la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*.

La flèche montre des symptômes typiques de *X. c.* pv. *campestris* qui se caractérisent par un jaunissement à la marge de la feuille, accompagné d'un noircissement des nervures (Alvarez *et al.*, 1994).

### 1.8.3 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.

#### 1.8.3.1 La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent–Assay )

D'une manière générale, cette technique comprend 4 étapes : La sensibilisation des plaques en polystyrène par des anticorps spécifiques de la bactérie recherchée, l'ajout de la suspension bactérienne, l'ajout d'un anticorps spécifique couplé à un enzyme, la phosphatase alcaline et finalement l'ajout d'un substrat (p-nitrophényl phosphate) qui est transformé alors par la phosphatase alcaline en P-nitrophenol lequel est un composé jaune. La densité optique est mesurée par spectrophotométrie à 405 nm. Cependant la technique ELISA ne peut être utilisé que si le tissu contaminé contient une charge bactérienne supérieure à  $10^5$  cfu/ml (Schaad *et al.*, 2001).

### **1.8.3.2 Test d'immunofluorescence IF**

L'immunofluorescence est utilisée pour la détection des bactéries phytopathogènes. L'utilisation d'un marqueur fluorescent (isothiocyanate de fluorescéine) conjuguée à un anticorps constitue la base de cette technique. Grâce à l'observation microscopique sous lumière ultraviolette, 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 ELISA puisque elle permet la détection des bactéries vivantes à une charge de  $10^2$  cfu/ml (Schaad, 2001).

### **1.8.4 Les techniques moléculaires**

#### **1.8.4.1 La Réaction de polymérisation en chaîne «PCR»**

La technique PCR, brillamment imaginée par Kary Mullis et développée par Henri Herlich et ces collaborateurs de la compagnie CETUS (Californie, USA) en 1985. Cette technique est utilisée pour amplifier une séquence de nucléotides connue située entre deux régions d'ADN en utilisant une paire d'amorces oligonucléotiques. 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 d'une PCR consiste à chauffer le mélange réactionnel, contenant les amorces oligonucléotiques, 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. L'acide nucléique cible peut être de l'ADN mono ou bicaténaire ou de l'ARN. Dans ce dernier cas, on utilise l'ARN cellulaire total ou l'ARNm pour fabriquer un ADNc (ADN complémentaire) qui sert ensuite de matrice à la PCR.

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 bicaténaires, 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) (Figure 1.26). Néanmoins cette technique ne permet pas de détecter les bactéries vivantes. Elle peut engendrer de faux positifs car elle amplifie aussi l'ADN des cellules mortes et ne rend donc pas compte de la viabilité des bactéries.

### 1.8.4.2 La RT-PCR (Reverse transcriptase PCR)

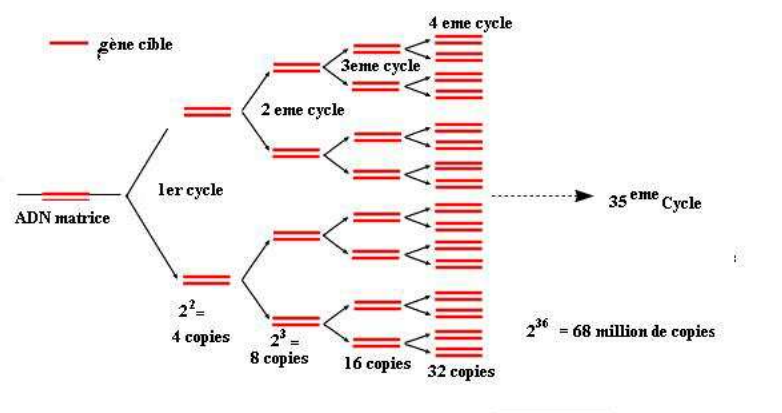
Cette technique a été mise au point pour utiliser les ARN comme matrice d'amplification de la PCR. Elle est certainement la méthode la plus sensible pour détecter et éventuellement quantifier, les ARN messagers au niveau d'un tissu ou d'une cellule (Helmut *et al.*, 2003). La Taq polymérase étant une enzyme ADN dépendante, dans le cas des ARN, la PCR doit être précédée d'une phase de rétrotranscription en ADN complémentaire (ADNc) effectuée en présence d'une transcriptase inverse : enzyme capable de synthétiser un brin d'ADN à partir d'un modèle ARN (Bagastra *et al.*, 1997).

L'amorçage de la réaction enzymatique peut se faire à l'aide d'une amorce spécifique qui s'allonge lors de la formation d'une copie moule de l'ARNm matrice (Turner *et al.*, 2000), ou encore d'amorces hexamériques qui vont se fixer de façon aléatoire à la séquence cible d'ARNm. Après la rétrotranscription, l'ADNc est utilisé comme cible pour la PCR. Néanmoins des adaptations permettent dans certains cas la réalisation des différentes étapes du processus (rétrotranscription et amplification de l'ADNc) en une seule étape et dans un seul tube (Nolasco *et al.*, 2002).

L'une des difficultés de cette méthode concerne la préparation de l'ARN qui peut être très facilement contaminés par l'ADN génomique qui entre en compétition avec l'ADNc lors de l'étape de l'hybridation des amorces (Helmut *et al.*, 2003).

#### 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 permet de contrôler les 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).

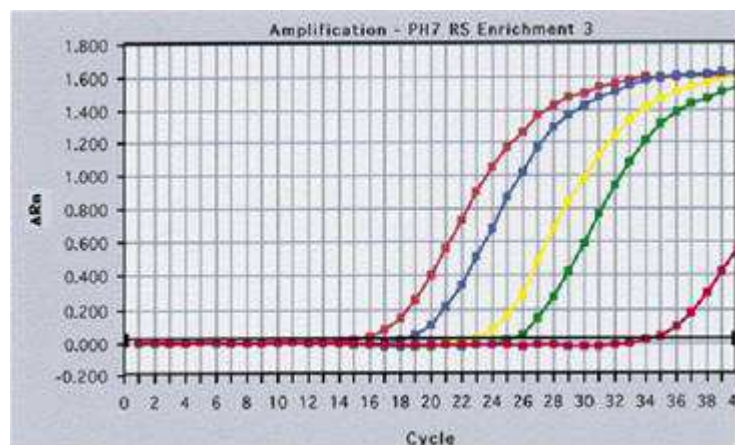
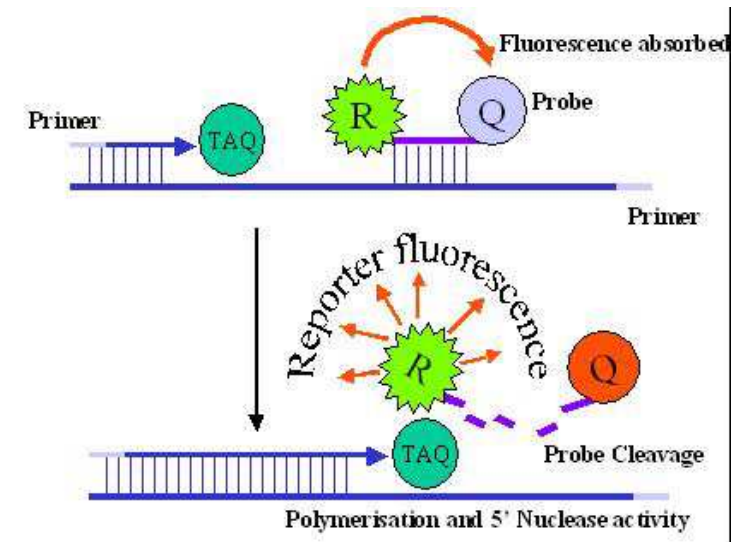


**Figure 1.26** Schéma d'une amplification exponentielle d'un gène par PCR (Vierstracte A., 1999) <http://allserv.rug.ac.be/%7Eavierstr/principles/pcr.html>





### 1.8.4.3. 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 nucléiques 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 (TaqDNA 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) (Figure 1.27). 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



**Figure 1.27:** Activité de l'ADN polymérase dans la PCR avec une sonde TaqMan. ([www.probes.com/handbook/Figure/0710.html](http://www.probes.com/handbook/Figure/0710.html))

 Le reporter

 Le quencher

## 1.9 Les outils disponibles pour la détection du *Xanthomonas*

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), 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. 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 sur plante indicatrice, dans les conditions d'environnement (t°, HR) favorables à l'infection. Le test biologique utilisé pour le diagnostic du *X. c. pv. campestris* (nervation noire des crucifères) consiste à l'inoculation des plantules de chou au stade première feuille par une suspension bactérienne et à l'observation de symptômes typiques 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. Pour cela on voit se développer des techniques sérologiques voir moléculaires pour contrôler l'absence de bactéries phytopathogènes dans le matériel végétal de multiplication.

Les antisérums développés contre le *Xanthomonas* n'ont pas eu un niveau de spécificité suffisante pour détecter spécifiquement les pathovars. Des relations croisées avec des *Xanthomonas* non pathogènes existants limitent leur utilisation dans les procédures de détection. Ils ne sont vraiment utilisés dans les procédures de détection que dans le cas du *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* sur des boutures de pélagonium (Van Doorn *et al.*, 1999).

Les réactifs moléculaires utilisables dans une procédure de détection basée sur la PCR sont en cours de développement. Un couple d'amorces spécifique de *X. campestris* a été développé dans l'UMR PaVé (Manceau, non publié). Ces amorces sont complémentaires de séquences du gène *galA* qui codent pour une arabino-galactane endo-1,4- $\beta$ -galactosidase. La spécificité de ce couple d'amorces a été vérifiée sur une large collection de bactéries phytopathogènes (Fargier, 2003). Elles reconnaissent tous les pathovars de l'espèce *X. campestris* définis par Vauterin *et al.* (1995).

Rijlaardsdam *et al.* (2004) ont décrit deux couples d'amorces spécifiques pour la détection du *X. c. pv. campestris* par PCR dans les semences des crucifères. Il s'agit du couple Zup 2309/Zup 2310 et Zup 2311/Zup 2312 qui ont été définis sur le gène *XCC2585* qui code pour une protéine hypothétique AAM 41857 (numéro d'accès est AE012370).

D'autres procédures basées sur la PCR ont été récemment développées pour la détection du *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. Pour cela des améliorations de la méthode de détection sont nécessaire pour pouvoir certifier l'absence de bactéries pathogènes dans un échantillon.

## **Intérêts et Objectifs**

Dans le cadre de la certification 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 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.

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 microorganismes dans l'échantillon analysé. Ce qui peut entraîner l'obtention de «faux positifs» en terme de contamination de l'échantillon par un microorganisme infectieux.

L'étude que nous envisageons de réaliser a donc pour objectif, 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.

Les démarches que nous projetons de suivre au cours de cette étude sont les suivantes :

La première partie consiste à mettre au point une technique moléculaire de détection de l'ARNm des bactéries phytopathogènes dans les semences.

- Validation d'un protocole d'extraction des acides nucléiques qui offre le meilleur rendement en ARNm.
- Définir les gènes spécifiques qui s'expriment de façon constitutive dans l'organisme.

Les gènes candidats définis comme cibles sont : le gène *galA* qui code pour l'arabino-galactane endo-1,4- $\beta$ -galactosidase, le gène *rpoD* qui code pour le facteur sigma ( $\sigma$ ) 70, le gène *gyrB* qui code pour la subunité B de l'ADN gyrase et le gène *XCC2585* qui code pour un polypeptide. La séquence 16S nous servira de témoin pour évaluer la fiabilité des protocoles utilisés.

La deuxième partie consistera à valider une procédure de détection de *X. campestris* dans les semences naturellement contaminées, basée sur un enrichissement des bactéries dans un milieu semi sélectif suivi d'une PCR (**BIO-PCR**).

La troisième partie portera sur la mise au point d'une nouvelle technique de détection des bactéries vivantes dans les semences basée sur un enrichissement par germination des semences contaminées couplée à une PCR en temps réel (**SEED –PCR**).

# **Parties experimentales**





# **Chapitre 1**

## **Mise au point d'une technique moléculaire de détection de l'ARNm des bactéries phytopathogènes dans les semences**

### **1.1 Introduction :**

La certification phytosanitaire des lots de semences est basée sur des techniques microbiologiques longues et coûteuses. A l'inverse, les méthodes de détection moléculaire apportent une réponse rapide. Cependant, celles utilisant la PCR engendrent de faux positifs car elles amplifient aussi l'ADN des cellules mortes et ne rendent pas compte de la viabilité des bactéries. L'ARN est l'acide nucléique le plus adapté pour développer une technique de détection des cellules vivantes. En effet, les ARN messagers intermédiaires de la synthèse des protéines sont rapidement dégradés par l'organisme. Ils sont donc présents que dans les cellules vivantes (Klein et Juneja, 1997 ; Sheridan *et al.*, 1998). La technique RT-PCR (Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction) utilise l'ARN comme matrice ; elle synthétise dans un premier temps un ADN complémentaire à partir de l'ARN puis elle amplifie cet ADNc.

### **1.2 Matériels et méthodes**

#### **1.2.1. Souches bactériennes**

La plus part des souches bactériennes utilisées au cours de cette étude appartiennent à la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France). Quelques souches de *Xanthomonas* récemment reçu par le laboratoire ont

## Chapitre 1. Détection des *X. campestris* dans les semences par RT-PCR

---

été ajoutées à la collection de ce travail. Elles sont classées selon Vauterin (1995) (tableau 1.1).

Quatre vingt seize souches appartenant au genre *Xanthomonas* nous ont été fournies sous forme lyophilisée (Figure 1.1). Ces bactéries ont été remises en suspension dans du milieu LP (extrait de levure 7g/L, peptone 7g/L). Cinquante µl de ce bouillon de culture ont été prélevés et étalés en trois secteurs sur milieu LPGA (extrait de levure 7g/L, peptone 7g/L, glucose 7g/L et agar 15g/L). Les bactéries ont été incubées à 27 °C pendant 48 h, sauf la souche CFBP 1817 (*Xanthomonas populi*) qui a été incubée à 18-20 °C pendant 5 jours. Les colonies isolées ont été régulièrement repiquées sur milieu LPGA. Elles peuvent être conservées à + 4 °C, à -20 °C dans de l'eau distillée ou bien à + 17°C sur du milieu GYCA (extrait de levure 5g/L, glucose 5g/L, Carbonate de calcium ordinaire 40 g/L et agar 15g/L).



Figure 1.1: Ampoule en verre contenant une souche bactérienne lyophilisée

## 1.2 Matériels et méthodes

**Tableau 1.1 :** Liste des souches bactériennes utilisées dans notre étude selon la classification de Vauterin (1995)

Numéro (CFBP)	Genre	Espèce	Pathovar	Hôte d'isolement	Isolat	
					Année	Origine
147 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>			
1119	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var <i>botrytis</i>	1967	France
1121	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> cv. <i>Bullita gemmifera</i>	1967	France
1124	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var <i>botrytis</i>	1967	France
1710	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France
1711	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var <i>botrytis</i>	1975	France
1712	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> cv. <i>capitata</i>	1975	France
1713	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France
1869	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i>	1996	C. d'Ivoire
4952	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>cortes</i>	1999	Belgique
4953	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>cortes</i>	1999	Belgique
4954	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>Aviso</i>	1999	Belgique
4955	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>Aviso</i>	1999	Belgique
4956	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>spacestar</i>	1999	Belgique
5127	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica</i> sp	2000	France
5128	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica</i> sp	2000	France
5129	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica</i> sp	2000	France
5130	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica</i> sp	2000	France
5241	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	1957	R.-Uni
5683	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i>	1979	France
5814	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Espagne
5815	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Espagne
5816	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Espagne
5817	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2001	Espagne
5818	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2001	Chili
5820	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>		
6650	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1958	R.-Uni
3838	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>armoraciae</i>	<i>Ibers</i> sp.	1954	Tanzani
6863	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>aberrans</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1958	Allemagne
6865 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>aberrans</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1975	Australie
5824	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>armoraciae</i>	<i>Armoracia lapathifolia</i>	1939	Etats-Unis
5825	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>barbarae</i>	<i>Barbarea vulgaris</i>	1939	Etats-Unis
5826	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>barbarae</i>	<i>Barbarea vulgaris</i>	1939	Etats-Unis
1371	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>incanae</i>	<i>Matthiola incana</i>	1972	France
1438	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>incanae</i>	<i>Matthiola incana</i>	1949	Etat-Unis
1606	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>incanae</i>	<i>Matthiola incana</i>		France
2527	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>incanae</i>	<i>Matthiola incana</i>	1950	Etat-Unis
5686	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>incanae</i>			
5827	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>raphani</i>	<i>Raphanus sativus</i>	1940	Etats-Unis
5828	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>raphani</i>	<i>Raphanus sativus</i>		Etats-Unis
5829	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>raphani</i>	<i>Raphanus sativus</i>		Etats-Unis
5852	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i> <sup>a</sup>	pv. <i>betae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	1973	Brésil
3135	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i> <sup>a</sup>	pv. <i>bilvae</i>	<i>Feronia elephantacum</i>	1984	Inde
3136	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i> <sup>a</sup>	pv. <i>bilvae</i>		1980	Inde
2523	<i>Xanthomonas</i>	<i>albilineans</i>		<i>Saccharum officinarum</i>	1961	Fiji
1846	<i>Xanthomonas</i>	<i>arboricola</i>	pv. <i>corylina</i>	<i>Corylus avellana</i>	1975	France
2528	<i>Xanthomonas</i>	<i>arboricola</i>	pv. <i>juglandis</i>	<i>Juglans regia</i>	1956	N. Zélande
2535	<i>Xanthomonas</i>	<i>arboricola</i>	pv. <i>pruni</i>	<i>Prunus salicina</i>	1953	N. Zélande
3123	<i>Xanthomonas</i>	<i>arboricola</i>	pv. <i>populi</i>	<i>Populus X euramericana</i> cv. <i>Robusta</i>	1979	Pays Bas

**Chapitre 1. Détection des *X. campestris* dans les semences par RT-PCR**

Numéro (CFBP)	Genre	Espèce	Pathovar	Hôte d'isolement	Isolat	
					Année	Origine
3836	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>alfalfae</i>	<i>Medicago sativa</i>		Soudan
3528	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>aurantifolii</i>	<i>Citrus limon</i>	1988	Argentine
6107	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>allii</i>	<i>Allium fistulosum</i>	1998	Japon
4924 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>axonopodis</i>	<i>Axonopus scoparius</i>	1949	Colombie
2524	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>begoniae</i>	<i>Begonia</i> sp.	1962	N. Zélande
2866	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>citri</i>	<i>Citrus aurantiifolia</i>	1982	Brésil
3369	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>citri</i>		1989	Etats-Unis
3371	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>citrumelo</i>		1989	
1559	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>glycines</i>	<i>Glycine hispida</i>		
2526	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>glycines</i>	<i>Glycine hispida</i>	1956	Soudan
2603	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	1972	Colombie
2530	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>malocearum</i>	<i>Gossioypium hirsutum</i>	1958	Soudan
2533	<i>Xanthomonas</i>	<i>hortorum</i>	pv. <i>pelargonii</i>	<i>Pelargonium peltatum</i>	1974	N. Zélande
4834	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodi</i>	pv. <i>phaseoli</i>		2000	Réunion
JW162-11 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		2000	Réunion
JW355-5 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		2000	Réunion
JW214-3 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		2000	Réunion
JW162-2 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		2000	Réunion
JW162-1 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		2000	Réunion
JW353-1 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		2000	Réunion
412	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>		Etat-Unis
1815	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	1978	Grèce
1505	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1967	Allemagne
1845	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	1978	Grèce
2604 /2534	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>		Etat-Unis
6155	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>	<i>Prunus persica</i>	1978	France
6167	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	1954	Etats-Unis
1604	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Capsicum annuum</i>		Guadeloupe
2484	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1980	Guadeloupe
3629	<i>Xanthomonas</i>	<i>bromi</i>		<i>Bromus stichensis</i>	1993	France
4690 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>codiaeae</i>		<i>Codium variegatum</i>	1987	Etats-Unis
4642 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>cassavae</i>		<i>Manihot esculenta</i>	1951	Malawi
2542 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Cucurbitae</i>		<i>Cucurbita maxima</i>	1968	N. Zélande
4210	<i>Xanthomonas</i>	<i>cynarae</i>		<i>Senebiera</i> sp.	1996	France
2157 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>fragariae</i>		<i>Fragaria</i> sp.	1960	Etat-Unis
4997	<i>Xanthomonas</i>	<i>hortorum</i>	pv. <i>Carotae</i>	<i>Daucus carota</i> var. <i>sativa</i>	1956	Hongrie
410	<i>Xanthomonas</i>	<i>hortorum</i>	pv. <i>Taraxaci</i>	<i>Taraxacum kok-sahgyz</i>		
1156	<i>Xanthomonas</i>	<i>hyacinthi</i>		<i>Hyacinthus orientalis</i>	1958	Bays-Bas
4644 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>melonis</i>		<i>Cucumis melo</i>	1974	Brésil
2286 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>oryzae</i>	pv. <i>oryzicola</i>	<i>Oryza sativa</i>	1964	
1817 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>populi</i>		<i>Populus x euramericana</i>	1957	France
4643 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>pisi</i>		<i>Pisum sativum</i>	1957	Japon
2053	<i>Xanthomonas</i>	<i>translucens</i>	pv. <i>graminis</i>			
2054	<i>Xanthomonas</i>	<i>translucens</i>	pv. <i>translucens</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	1933	Etat-Unis
1545	<i>Xanthomonas</i>	<i>vesicatoria</i>		<i>Lycopersicon esculentum</i>	1973	France
2537 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>vesicatoria</i>		<i>Lycopersicon esculentum</i>	1955	N. Zélande
2625	<i>Xanthomonas</i>	<i>vesicatoria</i>			1986	Réunion

**a** : N'appartient pas à la classification de Vauterin mais à celle de Dowson

**b** : Cette souche n'appartient pas à la CFBP

**T** : souche type

### 1.2.2 Amorces utilisées

Les amorces utilisées pour amplifier nos séquences sont présentées dans le tableau 1.2. Il s'agit du couple d'amorces (Xc5a et Xc5b) spécifique de *X. campestris* qui a été développé dans l'UMR PaVé (Manceau, non publié). Ces amorces sont complémentaires de séquences du gène *galA* qui codent pour une arabino-galactane endo-1,4- $\beta$ -galactosidase.

Les couples Zup 2309/Zup 2310 et Zup 2312/Zup 2311 du gène *XCC2585* spécifiques pour la détection du *X. c. pv. campestris* ont été définis par Rijlaardsdametal.(2004),([http://www.eppo.org/MEETINGS/2004\\_meetings/diag\\_posters/poster\\_deKoning2.pdf](http://www.eppo.org/MEETINGS/2004_meetings/diag_posters/poster_deKoning2.pdf)). Une étude du polymorphisme de la séquence des gènes *rpoD* et *gyrB* a été réalisée chez les *Xanthomonas* (Fargier *et al*, 2007) afin de mettre en évidence les séquences spécifiques de ces derniers. Les amorces issues de cette étude ont été analysées. Les réactions de séquençage ont été réalisées à la station biologique CNRS FR2424 (Ouestgenopole®, Roscoff, France) à partir des produits PCR. Six couples d'amorces ont été définis sur la séquence du gène *rpoD* : Le couple Emirpo19/ Emirpo21, Emirpo19/ Emirpo22, Emirpo20/ Emirpo21, Emirpo20/ Emirpo22, Emirpo23/ Emirpo24 et Emirpo23/ Emirpo25. Sept couples d'amorces ont été définis de la même manière dans le gène *gyrB*. Il s'agit du:EmigyrB5/EmigyrB8, EmigyrB5/EmigyrB9, EmigyrB6/EmigyrB8, EmigyrB7/EmigyrB11, EmigyrB7/EmigyrB12, EmigyrB10/EmigyrB15, EmigyrB13/EmigyrB15.

Un couple d'amorces EmiRib5 /EmiRib6 définie sur le gène *rrs* qui code pour l'ARN ribosomal 16S a servi de témoin pour optimiser nos protocoles.

### 1.2.3 Préparation des suspensions bactériennes

La souche CFBP 5241 est la souche type de *X. c. pv. campestris*, elle est aussi appelée ATCC 33913 (American Type Culture Collection). Son génome a été entièrement séquencé et Figure sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dont le numéro d'accès AE012483. La souche CFBP1121 est une souche isolée en France par Prunier en 1967 (CFBP, 2006) dont le pouvoir pathogène a été testé sur plusieurs espèces de crucifères.

**Tableau 1.2 :** Amorces utilisées pour la détection spécifique de *X. c. pv. campestris*

Nom de la bactérie	N° de lasouche	Gène cible	Amorces	Type	Séquences	% CG	Tm	
<i>X. c. pv. campestris</i>	1121 CFBP	<i>rrs</i>	EmiRIB 5	Sens	5'-TCAGCTCGTGTCGTGAGATG-3'	55	59,4	
			EmiRIB 6	antisens	5'-CACCTTCCTCCGGTTTGTCA-3'	55	59,4	
		<i>galA</i>	Xc5a	Sens	5'-AGAACCAGCGGAAGTTGGCG-3'	61,4	61,4	
			Xc5b	Antisens	5'-CAGTCATTTCGGTGGCCAGC-3'	63,4	63,4	
		<i>Xcc2585</i>	ZUP 2310	Sens	5'-TCCGGCCAGGGTCGATACAGTG-3'	55,31	72	
			ZUP 2309	Antisens	5'-AAATCAGGGGGATGCGGTGG-3'	50,75	64	
			ZUP 2311	Sens	5'-GCAAAGCCCTCGTTCACGCA-3'	50,75	64	
			ZUP 2312	Antisens	5'-GGTGTGGCCGCTCTTCTCAT-3'	52,86	64	
		<i>rpoD</i>	Emirpo 19	Sens	5'-CGCTGGACACCGAAGGTGGT-3'	54,44	66	
			Emirpo21	Antisens	5'-AGGTCGTTGAAGCCGACCACG-3'	54,64	68	
			Emirpo22	Antisens	5'-TGGAAGCCGACCACGATCTCG-3'	53,13	66	
			Emirpo 20	Sens	5'-CGCTGGACACCGAAGGTGGTC-3'	56,16	70	
			Emirpo21	Antisens	5'-AGGTCGTTGAAGCCGACCACG-3'	54,64	68	
			Emirpo22	Antisens	5'-TGGAAGCCGACCACGATCTCG-3'	53,13	66	
			Emirpo23	Sens	5'-TGGTCGGCTTCAACGACCTGA-3'	53,13	66	
			Emirpo24	Antisens	5'CGTAGATCTTCTTGAAGTTG-3'	46,56	56	
			Emirpo25	Antisens	5'CCACATTCTTGTGCTCGGCG-3'	52,86	64	
			<i>gyrB</i>	EmigyrB5	Sens	5'-CAAGAGCGAGCTGTATCTC-3'	49,30	58
		EmigyrB6		Sens	5'-ACGCCTACCTGGCCAGCAGC-3'	56,02	68	
		EmigyrB8		Antisens	5'-CCTCCTTGGCGCCAGCGAA-3'	54,22	64	
		EmigyrB9		Antisens	5'-AATGGCCTCCTTGGCGCCA-3'	52,58	62	
		EmigyrB7		Sens	5'-ACTGCTGCTGTTGTTTCGCTG-3'	51,29	62	
		EmigyrB11		Antisens	5'-ATCCAGCGTGGGATGCACGT-3'	52,86	64	
		EmigyrB12		Antisens	5'-CATCCAGCGTGGGATGCAC-3'	52,58	62	
		EmigyrB10		Sens	5'-CGCCGCTGGACGTGGTGC-3'	55,51	64	
EmigyrB13	Sens	5'-TCGCTGGTGTTCGGTGGCGAA-3'		54,44	66			
EmigyrB14	Antisens	5'-AATTCCTCGCCCATGTGCTT-3'		49,71	60			
EmigyrB15	Antisens	5'-GCCTTCGCGCACCAAGCCA-3'		54,22	64			
5241 CFBP								

Les suspensions bactériennes ont été préparées à partir de colonies cultivées sur milieu LPA (extrait de levure 7g/L, peptone 7g/L, et agar 15g/L). Ce milieu de culture solide ne contient pas de glucose, il permet de limiter la production d'exopolysaccharides produits par les bactéries qui peuvent gêner l'extraction des acides nucléiques. A partir d'une suspension bactérienne (environ  $10^8$  cfu/ml), une série de dilution a été réalisée, dans de l'eau distillée stérile comme présenté dans le tableau 1.3.

**Tableau 1.3** : Dilution des suspensions bactériennes

N° de la souche	Echantillons en cfu/ml							
	Non dilués		Diluées					
<b>CFBP1121</b>	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$
<b>CFBP 5241</b>	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$

Les dilutions ainsi préparées sont analysées en PCR et en RT-PCR

### 1.2.4 Extraction rapide de l'ADN bactérien

L'ADN génomique a été extrait à partir des suspensions bactériennes de concentration variables ( $10^8$  à  $10^1$  cfu/ml). Les souches bactériennes ont été cultivées pendant 24 h sur milieu LPA à 27°C. Les tubes contenant les suspensions bactériennes ont été incubés dans un bain à 100°C pendant 10 min puis maintenus 5 min sur glace. Ils sont ensuite centrifugés à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot est éliminé, le surnageant est transféré dans un nouveau tube puis conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure.

### 1.2.5 Extraction des acides nucléiques totaux (ATN) :

Les acides nucléiques totaux de la souche CFBP 1121 et CFBP 5241 ont été extraits à partir de suspensions bactériennes de concentration variables, centrifugées à 13000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est éliminé alors que, le culot est conservé -20 °C.

La manipulation des acides nucléiques et notamment les ARN, nécessite un travail minutieux. Contrairement à l'ADN qui est une molécule stable, l'ARN à une durée de vie très courte et peut être facilement hydrolysé par les RNase du milieu. Les manipulations sont réalisées en portant des gants, en utilisant une

## *Chapitre 1. Détection des X. campestris dans les semences par RT-PCR*

---

vaisselle stérilisée et un matériel à RNase free. Les supports de manipulation doivent être nettoyés avec de l'éthanol à 100% puis avec de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avant chaque manipulation.

Six protocoles d'extractions ont été testés pour évaluer celui qui permet d'obtenir un bon rendement en ARN et sans contamination par l'ADN génomique.

### **Le Kit Total RNA Isolation System (Promega).**

Le culot contenant les cellules bactériennes est remis en suspension dans 100 µl de tampon Edward (200 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 2% PVP). Le tube est mis en incubation pendant 3 à 5 min à température ambiante. Au bout de ce temps, 75 µl de SV RNA Lysis Buffer et 350 µl de RNA Dilution Buffer sont rajoutés à la solution. Le tout est centrifugé à 12000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube auquel on rajoute 200 µl d'éthanol à 95%. Le tout est transféré dans une colonne (Spin Column Assembly) puis centrifugé à 12000 rpm pendant 1 min. L'éluât obtenu est jeté et la membrane Spin Basket est lavée avec la solution de lavage (SV Wash solution). L'ensemble est centrifugé à 12000 rpm pendant 2 min. L'éluât obtenu est à nouveau éliminé. Cinquante µl de la solution DNase (40 µl yellow Core Buffer, 5 µl MnCl<sub>2</sub> à 0,09 M et 5 µl de DNase I) sont rajoutés à la membrane Spin Basket puis incubée à température ambiante pendant 15 min. Au bout de ce temps, 200 µl de SV Stop Solution sont ajoutés à la membrane, le tout est centrifugé à 12000 rpm pendant 1min. L'éluât est éliminé et la membrane spin Basket est lavée 2 fois avec la solution de lavage (SV RNA Wash Solution). La Spin Basket est transférée dans un tube à élution. Cent µl de Nucléase Free Water sont ajoutés à la membrane et le tout est centrifugé à 12000 rpm pendant 1 min. L'éluât d'ARN obtenu subit une série de dilution avec de l'eau DEPC. L'ensemble est alors conservé à -80 °C.

### **Le kit RNeasy Mini Kit (Quiagen)**

Ce kit est basé sur l'utilisation d'une colonne contenant une membrane (RNeasy silica-membrane) qui permet d'éliminer tous les ADN sans traitement à la DNase. Le culot des cellules bactériennes est remis en suspension dans du tampon lysosyme TE Buffer puis incubé à température ambiante pendant 5min. Trois cent cinquante µl du RTL Buffer sont ajoutés à la solution. Après



homogénéisation du mélange, la solution est centrifugée à 13000 rpm pendant 2 min. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube auquel on ajoute 250 µl d'éthanol à 96-100 %. Sept cent µl de cette solution sont transférés sur RNeasy Mini Column Assemblé sur un tube centrifuge de 2 ml puis centrifugé à 10000 rpm pendant 15 s. Sept cent µl du Buffer RPE sont ajoutés à la RNeasy Column. Le tout est centrifugé à 10000 rpm pendant 15 s. Le filtrat est éliminé et la RNeasy Column est transférée sur un nouveau tube. Cinq cent µl de Buffer RPE sont ajoutés à la membrane et le tout est centrifugé à 10000 rpm pendant 15 s. Cinq cent µl de Buffer RPE sont de nouveau ajoutés à la membrane et le tout est centrifugé à 10000 rpm pendant 15 s. Le filtrat est éliminé et la RNeasy Column est placée sur un nouveau tube de 1,5 ml et 50 µl de RNase Free Water sont ajoutés à la membrane. L'ensemble est centrifugé à 10000 rpm pendant 1 min afin de récupérer les ARN. Les ARN subissent une série de dilutions avec l'eau DEPC puis sont conservés à -80 °C.

### **Le Kit Gram Negative Bacteria (Sigma)**

La lyse des cellules bactériennes est réalisée par l'ajout de 180 µl de la solution Lyse (Lysis Solution T) au culot de cellules bactériennes. Le tout est mis en incubation à température ambiante pendant 2 min. Pour éliminer les protéines enzymatiques, 20 µl de protéinase K sont ajoutés à la suspension bactérienne puis incubé à 37°C pendant 30 min. Au bout de temps, 200 µl de Lysis Solution C sont ajoutés au tube. Après 10 min d'incubation à 55°C, 200 µl d'éthanol sont alors ajoutés à la solution précédente. Le tout est transféré dans une Binding Column puis centrifugé à 7000 g pendant 1 min. La colonne est placée sur un nouveau tube et 500 µl de la solution Wash Solution O sont ajoutés à la membrane. Le tout est centrifugé à 7000 g pendant 1 min. Le filtrat est éliminé et la colonne est placée sur un nouveau tube et 500 µl de la solution de lavage sont ajoutés à la membrane. Le tout est centrifugé à 12000 g pendant 3 min. La colonne est placée sur un nouveau tube et 200 µl de Ulule Solution sont ajoutés à la membrane puis centrifugés à 7000 g pendant 1 min, pour récupérer les acides nucléiques. La solution contenant les acides nucléiques subit une série de dilutions avec l'eau DEPC puis conservé à -80 °C pour une utilisation ultérieure.

**Extraction des acides nucléiques totaux selon le protocole Llop *et al.* (1999)**

Le principe de ce protocole est basé sur la précipitation des acides nucléiques avec l'isopropanol. Le culot de cellules bactériennes est remis dans 500 µl du tampon Edwards (200 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 2% PVP). Après une agitation à 200 rpm pendant 1 heure à température ambiante, la solution est centrifugée pendant 10 min à 13000 rpm. Le culot est éliminé alors que 450 µl du surnageant sont transférés dans un nouveau tube avec 450 µl d'isopropanol. Le tout est mis en incubation à température ambiante pendant 1 heures. Au bout de ce temps, la solution subit une centrifugation à 13000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot est séché pendant 10 à 15 min sur du papier filtre ou dans un dessiccateur. Le culot est ressuspendu avec 50 µl d'eau DEPC puis conservé à -80°C.

**Protocole d'extraction selon le kit Ultra clean™ 15 MO BIO**

Ce protocole est basé sur l'utilisation de silice qui permet le piégeage des acides nucléiques. Le culot est remis en suspension dans 120 µl de tampon Edwards ((200 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS, 2% PVP). Le tube est mis à incuber pendant 10 min à température ambiante. Le tout est centrifugé à 13000 rpm durant 10 min à 4 °C. Cent microlitres du surnageant sont transférés dans un nouveau tube, en présence de 300 µl de SALT et 5µl de BIND. Le tout est incubé pendant 5 min à température ambiante en remuant de temps en temps par inversion des tubes. Le mélange est centrifugé avec la fonction «pulse» pendant 10 s. Le surnageant est éliminé alors que le culot est remis en suspension avec 1ml de la solution WASH. Le tout est centrifugé pendant 10 min avec la fonction «pulse». Le surnageant est à nouveau éliminé. Le culot est séché dans une étuve à 65 °C pendant 5 min. Au bout de ce temps, le culot est ressuspendu avec 100 µl d'eau DEPC, Puis centrifugé à 13000 rpm pendant 2 min. le culot est éliminé et le surnageant est conservé à -80 °C.

**Extraction des acides nucléiques totaux selon le protocole Sung *et al.* (2003) modifié**

Le culot de cellules bactériennes est lavé avec du tampon TE (annexe 2) puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 min. Le culot obtenu est remis en suspension dans 500 µl du tampon TE contenant 0,2% de Triton X-100. Le tout est incubé dans un bain à 100°C pendant 10 min puis maintenus dans la glace pendant 5min. Cinq cent µl de chloroforme et méthanol (1 :2 ou bien 2 :1) sont rajoutés dans chaque tube. Le contenu est homogénéisé en inversant les tubes 10 à 15 fois, puis centrifugé à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. La phase aqueuse est collectée dans un nouveau tube en présence d'un volume égale de chloroforme. Après centrifugation, les acides nucléiques sont précipités avec 30 µl de 3M d'acétate de sodium, (pH 5,2) et 700 µl d'éthanol absolu. L'ensemble est incubé à -20°C pendant 20 min. Au bout de ce temps, le précipité est collecté après une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min. Le culot obtenu est lavé 2 fois avec 1 ml d'éthanol à 70% et une fois avec 1 ml d'éthanol absolu. Après une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min, le surnageant est éliminé le culot est séché pendant 5 min sur du papier filtre ou dans un dessiccateur. Le culot est resuspendu avec 100 µl d'eau DEPC.

**1.2.6 Purification des ARN**

La purification des ARN est une étape essentielle pour la qualité de la Reverse Transcription. Le traitement des échantillons à la DNase permet la digestion des ADN et la stabilité des ARN. Les acides nucléiques des échantillons extraits selon ces différents protocoles d'extraction, ont été traités à la DNase afin d'éliminer l'ADN. Le traitement à la DNase a été réalisé en testant plusieurs temps d'incubation à 37 °C pendant 1h et pendant 1h 30 min. La DNase utilisée est la RQ1 RNase-Free DNase Promega à une concentration de 1µg/µl en présence de 400 mM Tris HCl (pH 8.0), 100 mM MgSO<sub>4</sub> et 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Après traitement, l'enzyme est inactivée par la chaleur, pendant 3 min à 80 °C. L'efficacité du traitement a été vérifiée en comparant les résultats obtenus par amplification des acides nucléiques avant et après traitement à la DNase.

### **1.2.7 Amplification d'ADN par PCR**

Les amplifications ont été réalisées dans un mélange réactionnel de 20 µl. Il comprend du tampon de réaction 10X reaction Buffer sans MgCl<sub>2</sub> 10X (10mM Tris-HCl pH 9,0 à 25°C, 50 mM KCl, 0,1% de Triton<sup>R</sup>X- 100), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM des dNTP (Promega), 20 µM de chaque amorce, 1 unité de Taq DNA polymérase (Promega) et 0,1mg/ml de BSA (Bovine Serum Albumine). Le volume est ajusté à 20 µl avec de l'eau ultra pure. Dix sept µl du mélange réactionnel sont déposés au fond de chaque tube auquel on ajoute, 3 µl d'acides nucléiques extraits. L'amplification des fragments d'ADN a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur GeneAMP PCR system 9700 (Applied Biosystem) avec une dénaturation de 3 min à 94°C suivi de 35 cycles. Chaque cycle est constitué d'une phase de dénaturation de 60 sec. à 94°C, d'une hybridation des amorces à leur séquences homologues de 60 sec. et d'une extension de 60 sec. à 72 °C. Le dernier cycle est suivi d'une extension finale de 7 min à 72°C. Les conditions de température utilisées pour chaque couple d'amorces sont présentées dans le tableau 1.5.

### **1.2.8 Amplification des ARNs par Reverse Transcriptase-PCR**

#### **1.2.8.1 RT-PCR en deux étapes**

##### **Synthèse de L'ADN complémentaire (ADNc )**

Un ADNc simple brin a été synthétisé à partir des ARN totaux extraits et en présence de l'enzyme transcriptase inverse "Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV Promega). La réaction a été réalisée dans un volume final de 17 µl comprenant 8 µl d'ARN, 10 µM d'amorces non spécifiques constitués d'un mélange d'oligonucléotides à 11 bases chacun (Fislage *et al.*, 1997) (tableau 1.4), des dNTP chacun à 2,5 mM, du tampon de réaction contenant 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3 à 25°C), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 75 mM de KCl, 10 mM de DTT et 100 unités de M-MLV Reverse Transcriptase. Afin de vérifier la non-contamination des ADNc par l'ADN génomique, un autre mélange RT nommé «RT négatif» a été préparé selon les mêmes conditions que le mélange RT mais sans la reverse:

transcriptase. Son volume est ajusté à 17 µl avec l'eau DEPC. La transcription inverse est faite pendant 1 heure à 42°C, l'enzyme est inactivée ensuite à 80°C pendant 10 min. L'ADN complémentaire a été également synthétisé en utilisant un Kit commercial (Iscript<sup>TM</sup> cDNA Synthetis Kit BIORAD).

Pour une réaction de 20 µl le mélange réactionnel devait contenir 4µl de 5X Iscript Reaction Mix, 1µl de Iscript Reverse Transcriptase, 1µg de total RNA ajusté à 20 µl avec de l'eau (Nuclease Free Water). Le mélange réactionnel a été incubé à 25°C pendant 5 min, 40 °C pendant 30 min et 85 °C pendant 5 min.

**Tableau : 1.4** Les oligonucléotides utilisés pour la synthèse de l'ADNc (Fislage *et al.*, 1997)

RT séquences	Séquences (5'-3')	% en CG
E1	TTTTATCCAGC	36
E2	ACTTTACGCAG	45
E3	TTTATCCAGCG	45
E4	TCAGCGTTTTA	36
E5	TTTCAGCGCCT	55
E6	TTTTTTCAGCA	27
E7	TCTTTTTTACC	27
E8	ATCATCCAGCA	45
E9	TTTTACCCAGC	45
E10	TTCAGCCAGCG	64

### Amplification d'ADNc

Les ADN complémentaires synthétisés ont été amplifiés selon les mêmes conditions utilisées pour l'amplification d'ADN génomique par PCR.

#### 1.2.5.2 RT-PCR en une seule étape

L'amplification des ARN par la RT-PCR directe permet un gain de temps et une diminution du risque de contamination puisque la réaction est réalisée en une seule étape et dans un seul tube. La réaction a été optimisée dans un volume final de 20 µl en présence de 3 µl d'ARN, 2,5 mM de dNTP (Promega), 2 µl du tampon Taq, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 40 unités de M-MLV Reverse Transcriptase, 0,2 µl d'ARNase Inhibitor à 40 U/µl, 0,1 mg/ml de BSA, 1 unité de Taq DNA polymerase (Promega) et 20 µM de chaque amorce. L'amplification des ARN a été réalisée en utilisant le même thermocycleur utilisé précédemment. La réaction transcriptase inverse a été incubée à une température de 38°C pendant 45 min. suivie d'un programme de 35 cycles de PCR.

### **Analyse des produits amplifiés**

Au terme de la PCR, les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose à 2% dans du tampon TBE 1X (annexe 2). Huit  $\mu$ l de chaque produit d'amplification mélangé à 2 $\mu$ l de tampon de charge (15 % Ficoll 400, 0,03% de bleu de Bromophénol, 0,03% Xylene cyanol FF, 0,4% orange G, 10mM Tris-HCl pH 7,5) ont été chargés dans des puits de gel correspondants avec 5  $\mu$ l d'un marqueur de poids moléculaire (100 paires de base, Promega). L'ensemble est soumis à une électrophorèse sous un voltage constant (100 V) pendant 30 min. 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

## **1.3 Résultats**

### **1.3.1 Sélection des amorces**

La qualité d'une amplification par PCR ou par rétrotranscription-PCR dépend de plusieurs paramètres et se caractérise par la sensibilité et la spécificité de la réaction. Le dessin des amorces est crucial pour optimiser la réaction. L'objectif de cet essai était de choisir les meilleurs couples d'amorces en terme de sensibilité et de spécificité qui seront retenus pour la suite de nos expériences.

#### **1.3.1.1 Optimisation des conditions d'amplification pour chaque couple d'amorces disponible**

La sensibilité des amorces sélectionnées a été testée par PCR sur une gamme de dilution de suspensions bactériennes. Les suspensions bactériennes ont été réalisées sur deux souches types *de X. c. pv. campestris* (CFBP 1121 et CFBP 5242) dont le pouvoir pathogène a été préalablement testé.

Une amplification par PCR a été réalisée avec chacun des couples d'amorces conçues afin de déterminer les plus performants. Pour améliorer l'efficacité et optimiser la PCR, les conditions d'amplification ont été variées pour chaque couple d'amorces. Les paramètres étudiés sont la concentration en  $MgCl_2$  et la température d'hybridation. La température d'hybridation ( $T_a$  ou annealing température) utilisée était inférieure de 2 à 5 °C par rapport à la température de

fusion ( $T_m$  ou Melting température) calculée. Cette température a été optimisée grâce à un thermocycler (Icycler BIORAD) à gradient thermique. Il permet de définir la température idéale pour atteindre une extrême amplification d'une séquence cible. Les conditions d'amplification utilisées pour chaque couple d'amorces sont présentées dans le tableau 1.5.

**Tableau 1.5 :** Les conditions d'amplification pour chaque couple d'amorces

Gène cible	Couple d'amorces	Concentration en $MgCl_2$ (mM)	Ta.en °C	Sensibilité (cfu/ml)
<i>rrs</i>	Emirib5/EmiRib6	2	60	$10^3$
<i>galA</i>	Xc5a/Xc5b	1,5	60	$10^4$
<i>rpoD</i>	Emirpo19/Emirpo21	2	66	$10^1$
	Emirpo19/Emirpo22	2	66	$10^5$
	Emirpo20/Emirpo21	2	64	$10^6$
	Emirpo20/Emirpo22	2	64	$10^7$
	Emirpo23/Emirpo24	2	60	$10^7$
	Emirpo23/ Emirpo25	2	64	$10^3$
<i>gyrB</i>	EmigyrB5/EmigyrB8	3	60	$10^5$
	EmigyrB5/EmigyrB9	2	60	$10^8$
	EmigyrB6/ EmigyrB8	3	64	$10^8$
	EmigyrB6 /EmigyrB9	2	62	$10^7$
	EmigyrB7 /EmigyrB11	2	64	$10^8$
	EmigyrB7/ EmigyrB12	1,5	60	$10^5$
	EmigyrB10 /EmigyrB14	1,5	60	$10^5$
	EmigyrB10 /EmigyrB15	2	64	$10^7$
	EmigyrB13/ EmigyrB15	2	64	$10^5$
<i>XCC2585</i>	Zup2309/Zup2310	2	66	$10^2$
	Zup2311/Zup2312	2	64	$10^2$

#### Le gène *galA* :

Le couple d'amorces Xc5a/Xc5b du gène *galA* a été testé sur une gamme de dilution de suspension bactérienne, allant de  $10^8$  à  $10^1$  cfu/ml. Les conditions d'amplification ont été préalablement optimisées au laboratoire. Cependant, la PCR de la Figure 1.2 A présente une interférence de bandes qui ne correspondent pas à la taille attendue (303 p.b).

Ceci est probablement lié à une concentration inadéquate en  $MgCl_2$  associée à une forte concentration d'ADN. Un certain nombre d'ajustement a dû être fait pour améliorer la qualité de l'amplification. Une diminution de la concentration en  $MgCl_2$  de (2 mM à 1,5 mM) associée à une température d'hybridation de 60°C a permis d'améliorer la spécificité du signal. La limite de détection de ce couple d'amorces est de  $10^4$  cfu/ml.

**Le gène *rrs* :**

Le couple d'amorces EmiRib5/EmiRib6 définis sur le gène *rrs* a permis de révéler la présence d'un signal à une concentration de  $10^3$ cfu/ml (Figure 1.2 B). Les conditions d'amplification pour de ce couple d'amorces ont été optimisées à une concentration de 2 mM de  $MgCl_2$  et une température d'hybridation de 60°C.

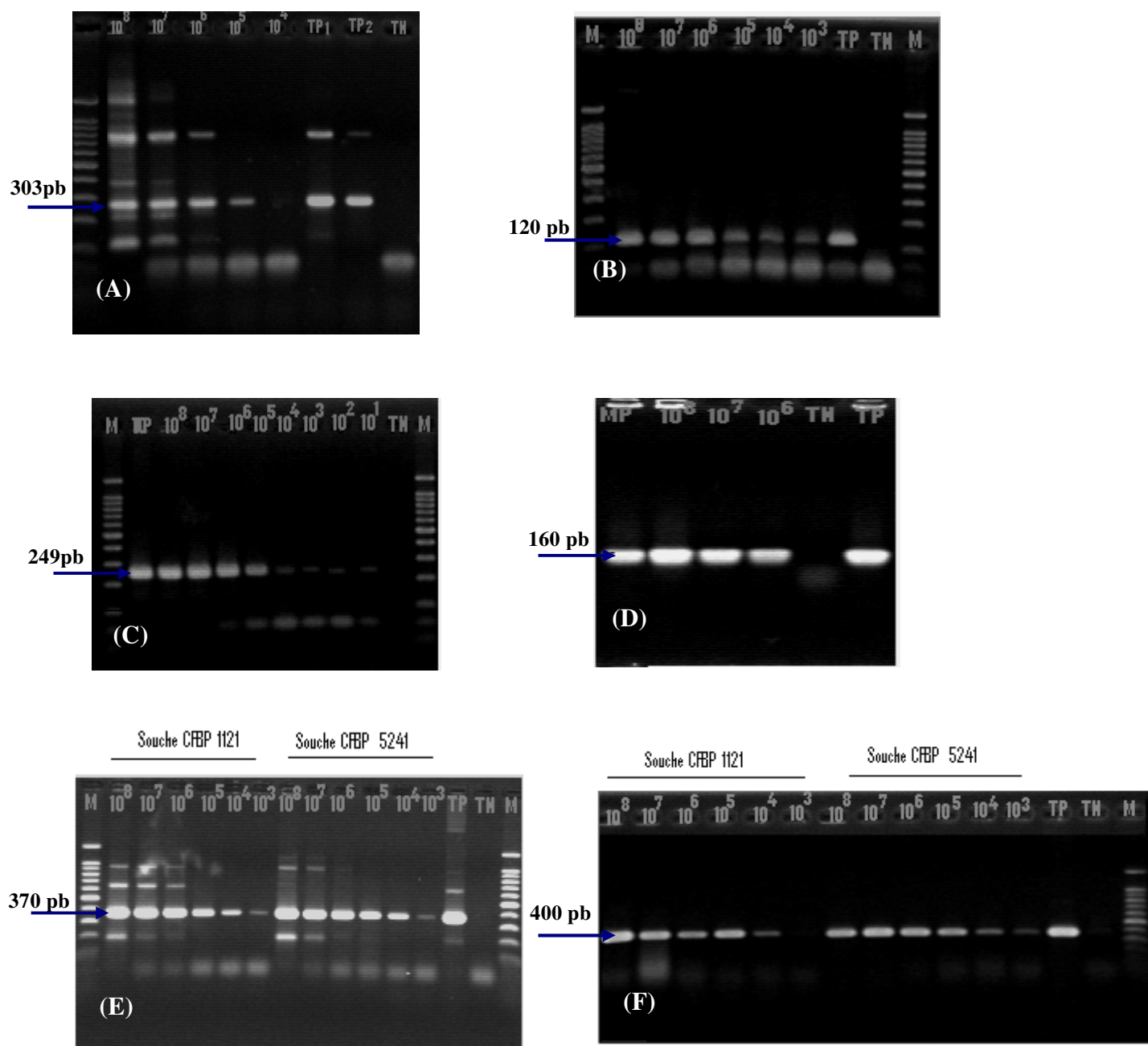
**Le gène *rpoD* :**

Pour le gène *rpoD*, les résultats des produits amplifiés par les amorces sélectionnées ont montré qu'à une température d'hybridation de 66°C et une concentration en  $MgCl_2$  de 2 mM, le couple d'amorces Emirpo19/Emirpo21 permet de révéler la présence d'un signal à la taille attendue (249 p.b.) à une concentration de 10 cfu/ml (Figure 1.2 C) Il sera donc retenu pour la suite de notre étude. Par contre, le couple Emirpo19/Emirpo22 dans les mêmes conditions que celui du couple Emirpo19/Emirpo21 ne permet pas la détection de cible au-delà de  $10^5$  cfu/ml. Les autres couples d'amorces : Emirpo20/Emirpo22 et Emirpo23/Emirpo24, engendrent des signaux de faible intensité même dans des conditions les plus favorables d'amplification. Leur limite de sensibilité étant de  $10^7$ cfu/ml.

**Le gène *gyrB* :**

Le profil électrophorétique des produits PCR amplifiés obtenus pour le gène *gyrB*, a mis en évidence des bandes à la taille attendue c'est à dire 160 pb. Les couples testés sur ce gène génèrent des signaux de faible intensité. Le seuil de détection des couples d'amorces EmigyrB6/EmigyrB8, EmigyrB6/ EmigyrB9 et EmigyrB7 EmigyrB11 ne dépasse pas une concentration de  $10^8$  cfu/ml. Il est de





**Figure 1.2** : Test de sensibilité des amorces.

La détection des produits amplifiés par PCR a été réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%

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

TP : Témoin positif souche CFPB5241

TN : Témoin négatif eau PCR.

TP1 et TP2, Représentent respectivement les amplifications après ajustement de la concentration en  $MgCl_2$  pour le gène *galA*

Chaque puits représente une concentration bactérienne en cfu/ml

(A) : Produits d'amplification avec le couple d'amorces Xc5a/Xc5b

(B) : Produits d'amplification avec le couple d'amorces EmiRib5/EmiRib6

(C) : Produits d'amplification avec le couple d'amorces Emirpo19/Emirpo21

(D) : Produits d'amplification avec le couple d'amorces EmigrB5/EmigrB8

(E) : Produits d'amplification avec le couple d'amorces Zup2309/Zup2310

(F) : Produits d'amplification avec le couple d'amorces Zup2311/Zup2312

10<sup>7</sup> cfu/ml pour les couples d'amorces EmigrB6/ EmigrB9 et EmigrB10/EmigrB15 et de 10<sup>5</sup> cfu/ml pour les couples d'amorces couples d'amorces EmigrB7/EmigrB12, EmigrB10/EmigrB14 et EmigrB13 EmigrB15. Le couple d'amorces EmigrB5/EmigrB8 semble être le plus performant. Dans des conditions d'amplifications ajustées à une concentration de 3 mM en MgCl<sub>2</sub> et à une température d'hybridation de 60°C, donne un signal de forte intensité pour une concentration de 10<sup>6</sup> cfu/ml (Figure 1.2 D).

**Le gène XCC2585 :**

Dans le cas des couples d'amorces Zup2309/Zup2310 et Zup2311/Zup2312, une PCR a été réalisée dans des conditions de 2 mM de MgCl<sub>2</sub> et à une température d'hybridation de 64°C. Les résultats obtenus pour ces deux derniers couples, montrent la présence de signaux aux tailles attendues c'est-à-dire 370 et 400 p.b. Leur seuil de détection s'étend à une concentration de 10<sup>2</sup> cfu/ml (Figure 1.2 E et 1.2 F). Ils seront donc retenus pour la suite de notre étude.

**2.3.1.2 Spécificité des amorces :**

Les couples d'amorces ainsi choisis (Emirpo19/Emirpo21, EmigrB5/EmigrB8, Zup2309/Zup2310 et Zup2311/Zup2312) ont été testés par PCR sur une population de 96 souches appartenant au genre *Xanthomonas* afin d'évaluer leur spécificité vis-à-vis des souches de *X. c. pv. campestris*. Les résultats des tests obtenus sont ordonnés dans le tableau 1.6. Le couple d'amorces Xc5a/Xc5b complémentaire de la séquence *galA* a été préalablement vérifié sur une collection de bactéries phytopathogènes (Fargier, 2003). Il reconnaît tous les pathovars de *X. campestris* définis par Vauterin *et al.* en 1995. Il pourra donc servir de référence pour juger la spécificité des autres couples d'amorces candidats. Le couple d'amorces Emirpo19/Emirpo 21 a permis d'amplifier toutes les souches *X. c. pv. campestris*. Les résultats des tests obtenus, montrent que ce couple d'amorces n'est pas spécifique des souches de *X. c. pv. campestris*. Il amplifie également certains pathovars des autres espèces de *Xanthomonas* : *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. cassavae*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. oryzae*, *X. pisi* et *X. vesicatoria*.

Tableau 1.6: Spécificité des amorces utilisées dans notre étude

Numéro (CFBP)	Genre	Espèce	Pathovar	gal A	rpoD	gyrB	Zup	
							2309/2310	2311/ 2312
147 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
1119	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
1121	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
1124	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
1710	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>		+	+	+	+
1711	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>		+	+	+	+
1712	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
1713	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
1869	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
4952	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>		+	+	+	+
4953	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>		+	+	+	+
4954	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
4955	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
4956	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
5127	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>		+	+	+	+
5128	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
5129	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
5130	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>		+	+	+	+
5241	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
5683	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>		+	+	+	+
5814	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
5815	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
5816	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
5817	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>		+	+	+	+
5818	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
5820	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
6650	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>campestris</i>	+	+	+	+	+
6863	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>aberrans</i>	+	+	+	+	+
6865 <sup>T</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>aberrans</i>	+	+	+	+	+
3838	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>armoraciae</i>	+	+	+	+	+
5824	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>armoraciae</i>	+	+	+	-	-
5825	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>barbarae</i>	+	+	+	-	-
5826	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>barbarae</i>	+	+	+	-	-
1371	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>incanae</i>		+	+	-	-
1438	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>incanae</i>		+	+	-	-
1606	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>incanae</i>	+	-	+	-	-
2527	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>incanae</i>		+	+	+	-
5686	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>incanae</i>	+	+	+	+	+
5827	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>raphani</i>	+	+	+	-	-
5828	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>raphani</i>		+	+	-	-
5829	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i>	pv. <i>raphani</i>	+	+	+	-	-
5852	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i> <sup>a</sup>	pv. <i>betae</i>	-	+	-	+	+
3135	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i> <sup>a</sup>	pv. <i>bilvae</i>	+	-	-	-	+
3136	<i>Xanthomonas</i>	<i>campestris</i> <sup>a</sup>	pv. <i>bilvae</i>	+	-	-	-	+
2523	<i>Xanthomonas</i>	<i>albilineans</i>			-	-	-	-
1846	<i>Xanthomonas</i>	<i>arboricola</i>	pv. <i>corylina</i>	-	+	-	-	-
2528	<i>Xanthomonas</i>	<i>arboricola</i>	pv. <i>juglandis</i>	-	+	-	-	-
3123	<i>Xanthomonas</i>	<i>arboricola</i>	pv. <i>populi</i>		-	-	-	-
2535	<i>Xanthomonas</i>	<i>arboricola</i>	pv. <i>pruni</i>		-	-	-	-
3836	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>alfalfae</i>		+	-	-	-
6107	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>allii</i>		-	-	-	-
3528	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>aurantifolii</i>		-	-	-	-
4924	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>axonopodis</i>		+	+	-	-

## Chapitre 1. Détection des *X. campestris* dans les semences par RT-PCR

Numéro (CFBP)	Genre	Espèce	Pathovar	gal A	rpoD	gyrB	Zup	
							2309/2310	2311/ 2312
2524	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>begoniae</i>		+	-	-	-
2866	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>citri</i>		-	-	-	-
3369	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>citri</i>		+	-	-	-
3371	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>citrumelo</i>		+	-	-	-
1559	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>glycines</i>	-	+	-	-	-
2526	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>glycines</i>	-	+	-	-	-
2603	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>manihotis</i>	-	-	-	-	-
2530	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>malocearum</i>		+	-	-	-
Xap62 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		+	-	-	-
JW162-11 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		+	-	-	-
JW355-5 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		+	-	-	-
JW214-3 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		+	-	-	-
JW162-2 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		+	-	-	-
JW162-1 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		+	-	-	-
JW353-1 <sup>b</sup>	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		+	-	-	-
412	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>			-	-	-
1815	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>	-	+	-	-	-
1505	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		+	-	-	-
1845	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>	-	+	-	-	-
2604 /2534	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>	-	-	-	-	-
6155	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		+	-	-	-
6167	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>phaseoli</i>		+	-	-	-
1604	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>vesicatoria</i>	-	+	-	-	-
2484	<i>Xanthomonas</i>	<i>axonopodis</i>	pv. <i>vesicatoria</i>		+	-	-	-
3629	<i>Xanthomonas</i>	<i>bromi</i>		-	+	-	-	-
4690	<i>Xanthomonas</i>	<i>codiae</i>			-	+	-	-
4642	<i>Xanthomonas</i>	<i>cassavae</i>			+	-	-	-
2542	<i>Xanthomonas</i>	<i>Cucurbitae</i>		-	-	-	-	-
4210	<i>Xanthomonas</i>	<i>cynarae</i>		-	-	-	-	-
2157	<i>Xanthomonas</i>	<i>fragariae</i>			+	-	-	-
2533	<i>Xanthomonas</i>	<i>hortorum</i>	pv. <i>pelargonii</i>			-	-	-
4997	<i>Xanthomonas</i>	<i>hortorum</i>	pv. <i>carotae</i>		+	-	-	-
410	<i>Xanthomonas</i>	<i>hortorum</i>	pv. <i>taraxaci</i>		-	-	-	-
1156	<i>Xanthomonas</i>	<i>hyacinthi</i>		-	-	-	-	-
4644	<i>Xanthomonas</i>	<i>melonis</i>			-	-	-	-
2286	<i>Xanthomonas</i>	<i>oryzae</i>	pv. <i>oryzicola</i> .	-	+	-	-	-
1817	<i>Xanthomonas</i>	<i>populi</i>		-	-	-	-	-
4643	<i>Xanthomonas</i>	<i>pisi</i>		-	+	-	-	-
2053	<i>Xanthomonas</i>	<i>translucens</i>	pv. <i>graminis</i>	-	-	-	-	-
2054	<i>Xanthomonas</i>	<i>translucens</i>	pv. <i>translucens</i>		-	-	-	-
1545	<i>Xanthomonas</i>	<i>vesicatoria</i>				-	-	-
2537	<i>Xanthomonas</i>	<i>vesicatoria</i>		-	-	-	-	-
2625	<i>Xanthomonas</i>	<i>vesicatoria</i>		-	+	-	-	-

a Cette souche n'est pas classée selon Vauterin *et al.*(1995) mais à celle de Dowson

b Cette souche n'est pas déposée à la CFBP

T : souche type



Test positif



Test négatif



Souche non testée

Les résultats d'amplification réalisée par PCR avec le couple d'amorces EmigrB5/EmigrB8, montrent que, dans les conditions optimum d'amplification, ce couple d'amorce permet d'amplifier toutes les souches du *X. campestris*. Il reconnaît en plus la souche CFBP 4124 (*X. axonopodis* pv. *axonopodis*) et la souche CFBP 4690 (*X. codiae*).

Les couples d'amorces Zup 2309/Zup 2310 et Zup 2312/Zup 2311 ont un spectre de détection qui ne respecte pas totalement la phylogénie et la taxonomie des *Xanthomonas* : Ces couples d'amorces permettent l'amplification de toutes les souches de *X. c.* pv. *campestris* et de *X. c.* pv. *abrerans* mais pas celles de *X. c.* pv. *barbarae*. Ils ne reconnaissent qu'une des deux souches de *X. c.* pv. *armoraciae*. Ils reconnaissent qu'une ou deux souches des cinq souches de *X. c.* pv. *incanae* et aucune souche de *X. c.* pv. *raphani*. Ils reconnaissent également quelques souches qui n'appartiennent pas à l'espèce *X. campestris* au sens de Vauterin et al. (1995). Le couple d'amorces Zup2309/2310 reconnaît la souche CFBP 5852 de *X. c.* pv. *betae* et le couple Zup2311/Zup 2312 reconnaît cette souche (CFBP 5852) et les deux souches de *X. c.* pv. *bilvae* (CFPB 3135 et CFBP 3136).

### 1.3.2 Optimisation de la Reverse Transcriptase PCR sur le gène *rrs* (16S RNA)

L'objectif de cet essai n'était pas de vérifier si le gène *rrs* était un marqueur de viabilité des cellules. Une étude a été réalisée dans ce sens au laboratoire et a montré que l'ARN 16S n'est pas rapidement dégradée après la mort de la bactérie (Fargier, 2003). Nous avons choisi d'optimiser pour un premier temps nos protocoles expérimentaux en utilisant l'ARNr du fait de sa stabilité par rapport à l'ARNm. Les étapes à considérer pour la mise au point de la technique RT-PCR sont : la préparation des échantillons d'acides nucléiques totaux, la purification des ARN extraits et leur rétrotranscription sous forme d'ADNc.

#### 1.3.2.1 Extraction des ARN totaux

Les ARN cibles ont été extraits à partir d'un culot de cellules bactériennes d'environ  $10^8$  cfu/ml. Le kit d'extraction utilisé est le SV Total Isolation System Promega. L'efficacité de ce kit est assurée par une membrane qui permet le

piégeage des acides nucléiques et un traitement à la DNase permettant une première purification des ARN. L'extrait obtenu a subi une série de dilution de  $10^0$  à  $10^{-8}$  puis conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Afin de vérifier l'intégrité des ARN extraits, une amplification par PCR a été réalisée avec le couple d'amorces EmiRib5 /EmiRib6. Les résultats d'amplification montrent que, l'ADNg génomique n'a pas été totalement éliminé (Figure 1.3 B).

La purification des ARN est une étape essentielle pour la mise en évidence de l'activité métabolique des bactéries. L'extrait d'ARN doit être totalement débarrassé de toute trace d'ADN. Pour cela un autre traitement à la DNase est indispensable après chaque extraction

### **1.3.2.2 Ajustement du traitement à la DNase**

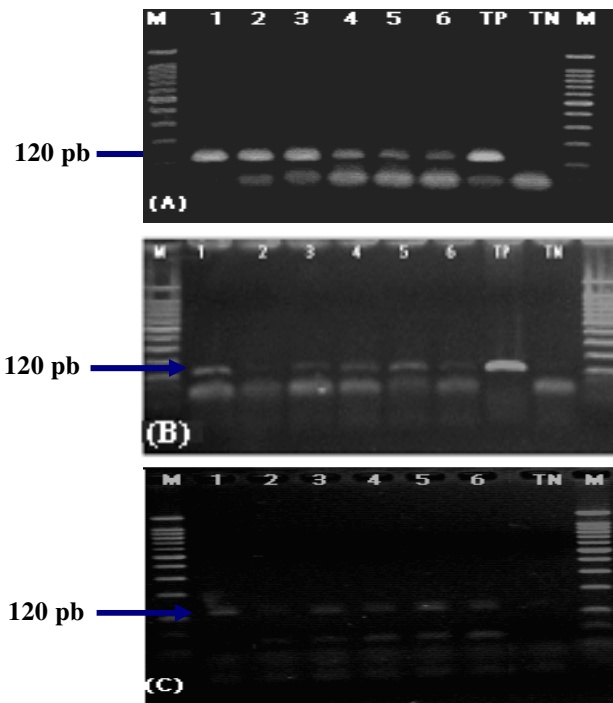
Le traitement à la DNase a été optimisé en testant plusieurs temps d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 1h et pendant 1h 30 min avec l'enzyme RQ1 Rnase-Free DNase. L'amplification réalisée par PCR sur les ARN traités après extraction par le kit Promega a montré qu'un traitement de 1h 30 min avec 0,5 unités par  $\mu\text{l}$  d'ARN offre la meilleure efficacité, mais ne permet pas l'élimination totale de l'ADNg. L'amplification par PCR effectuée sur les extraits ayant subis un deuxième traitement à la DNase permet la visualisation de quelques traces d'ADNg (Figure 1.3 C). L'efficacité de ce traitement a été mesurée en effectuant, en parallèle à la réaction M-MLV RT-PCR une réaction avec les mêmes constantes sauf la reverse transcriptase qui est omise dans le milieu réactionnel c'est à dire RT-PCR sans M-MLV. La présence d'un amplifiât dans ces réactions est dû à la présence d'ADN résiduel.

### **1.3.2.3 Comparaison de la RT-PCR en une seule étape et la RT-PCR en deux étapes.**

L'objet de cette étude est de comparer la technique RT-PCR en une seule étape à celle de la technique RT-PCR en deux étapes en terme de sensibilité. L'analyse a été menée sur une série de dilution de l'ARN purifié.

- RT-PCR en une seule étape dont la réalisation du processus (rétrotranscription et amplification de l'ADNc) se fait dans un seul et même tube.
- RT-PCR en deux étapes consiste à synthétiser un brin d'ADNc suivi d'une PCR. L'amorçage de la retrotranscription peut se faire à l'aide d'une amorce spécifique qui s'allonge lors de la formation d'une copie moule de l'ARN matrice

ou bien à l'aide d'un mélange d'oligonucléotides non spécifiques qui vont se fixer de façon aléatoire à la séquence cible d'ARN.



**Figure 1.3** : Efficacité du traitement à la DNase sur les acides nucléiques extraits selon le Kit Promega. L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à 2%.

TP : Témoin positif : ADNg non traité à la DNase

TN : Témoin négatif : eau

Les puits 1 à 6 correspondent aux concentrations  $10^8$  à  $10^3$  cfu/ml.

(A) : Résultats d'amplification par PCR réalisée sur l'ADN génomique brute

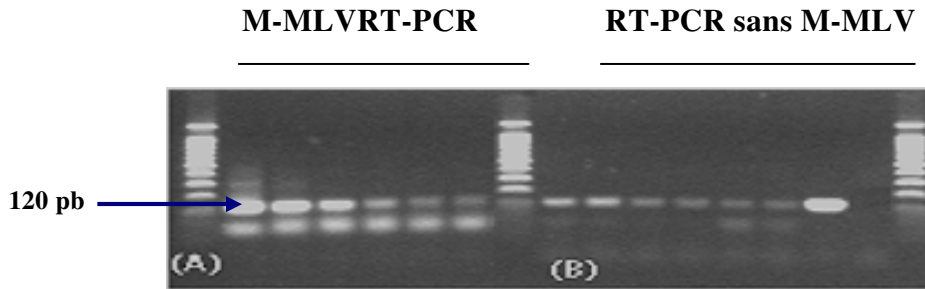
(B) : Résultats d'amplification par PCR réalisée sur les extraits obtenus par le Kit Promega avec un premier traitement à la DNase

(C) : Résultats d'amplification par PCR des extraits d'ARN après un deuxième traitement à la DNase.

#### 1.3.2.4 Amplification des ARN par RT-PCR en une seule étape

La RT-PCR directe a été optimisée en utilisant un couple d'amorces EmiRib5 /EmiRib6 spécifique du gène *rrs* qui permet d'obtenir une molécule d'ADN complémentaire contenant la séquence cible. Les résultats d'amplification obtenus ont permis de visualiser la présence d'amplifiât à la taille attendue (120 pb) jusqu'à une dilution de  $10^{-3}$ . Afin de vérifier la fiabilité des résultats obtenus, une RT-PCR sans M-MLV (témoin de non contamination) a été réalisée sur les mêmes échantillons ayant servi de matrices pour la M-MLVRT-PCR.

Les résultats d'amplification de la Figure 1.4, montrent que dans ce cas la



**figure 1.4** : Détection de *X. campestris* par RT-PCR en une seule étape réalisée avec le couple d'amorces EmiRib5/EmiRib6 du gène *rrs*

L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à 2%.

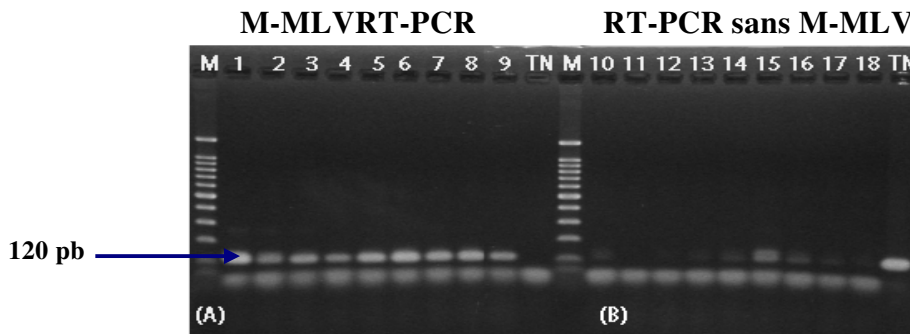
M : Marqueur de poids moléculaire à 100 p.b. (Promega)

TP : Témoin positif ADNg CFBP 1121 non traité à la DNase

TN : Témoin négatif eau PCR

(A) : Résultats d'amplification par M-MLVRT-PCR. Le puit 1 correspond à l'échantillon non dilué ( $10^8$  cfu/ml), les puits 2 à 6 correspondent aux dilutions ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ ).

(B) : Résultats d'amplification par RT-PCR sans M-MLV. Le puit 7 correspond à l'échantillon non dilué ( $10^8$  cfu/ml), les puits 8 à 12 correspondent aux dilutions ( $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ )



**Figure 1.5** : Détection *X. campestris* par RT-PCR en deux étapes réalisée avec le couple d'amorces EmiRib5/EmiRib6 du gène *rrs*

L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à 2%.

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

TP : Témoin positif ADNg CFBP 1121 non traité à la DNase

TN : Témoin négatif eau PCR

(A) : Résultats de la RT-PCR avec l'enzyme M-MLV. Le puit 1 correspond à l'échantillon non dilué ( $10^8$  cfu/ml), les puits 2 à 9 correspondent aux dilutions ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ).

(B) : Résultats de la RT-PCR sans l'enzyme M-MLV. Le puit 10 correspond à l'échantillon non dilué ( $10^8$  cfu/ml), les puits 11 à 18 correspondent aux dilutions ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ).



digestion enzymatique est presque efficace. En effet, la réaction permet de visualiser de très faibles signaux liés à une légère contamination par l'ADNg.

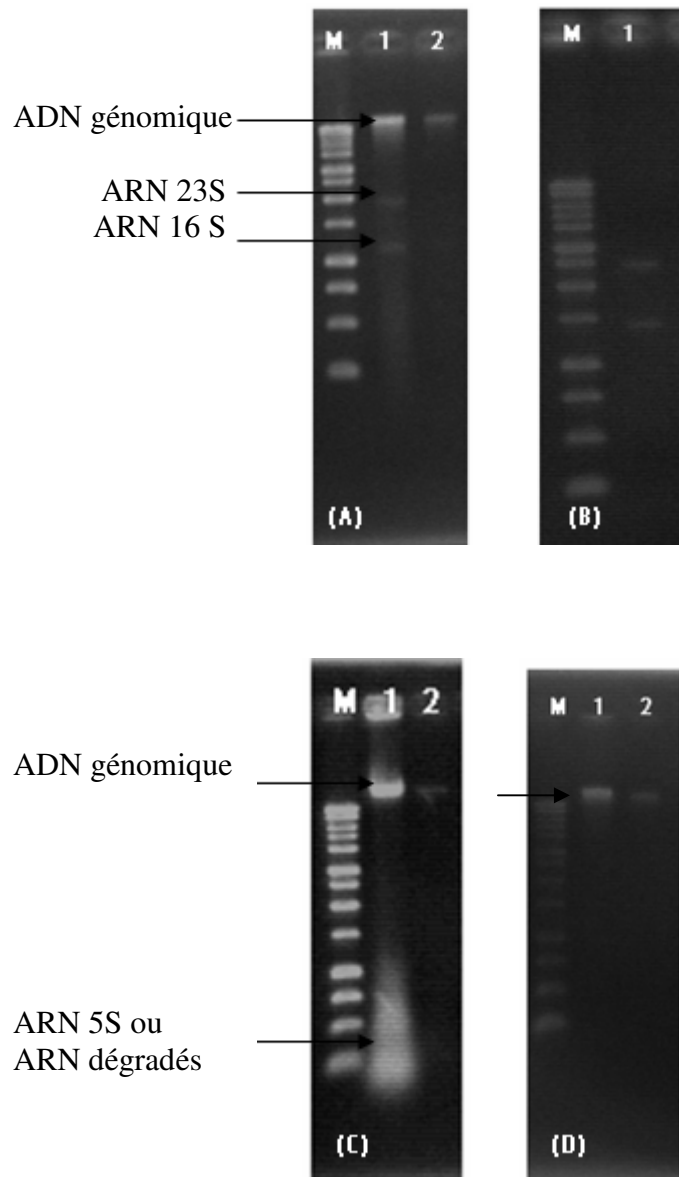
### 1.3.2.5 Amplification des ARN par RT-PCR en deux étapes

L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir des mêmes échantillons d'ARN utilisés au cours de la RT-PCR en une seule étape. La retrotranscription a été réalisée à l'aide d'un mélange d'oligonucléotides non spécifiques à 11 pb chacun. Après la rétrotranscription, l'ADNc synthétisé est utilisé comme cible pour la PCR. Les résultats des produits amplifiés ont mis en évidence la présence d'amplifiats jusqu'à une dilution de  $10^{-8}$ . Les résultats d'amplification réalisée par une RT-PCR sans M-MLV ou témoin de non-contamination sur les mêmes échantillons ont permis de visualiser la présence de faible trace d'ADNg dans certain puits du gel. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 1.5. Si l'on compare les deux protocoles en terme de sensibilité. Il paraît que la RT-PCR en deux étapes offre un gain de sensibilité significatif. En effet la RT-PCR en deux étapes permet de révéler la présence de cible dans une suspension bactérienne diluée à  $10^{-8}$ , alors que la RT-PCR en une seule étape ne permet pas de détecter la cible au-delà d'une dilution de  $10^{-3}$ .

### 1.3.3 Optimisation des protocoles d'extraction des acides nucléiques

Le succès d'une technique d'identification des ARN dépend de l'intégrité et de la pureté des ARN. Pour cela six protocoles d'extraction ont été comparés pour valider celui qui offre le meilleur rendement en ARN. Les ARN ont été extraits à partir de cellules bactériennes de concentrations variables. L'intégrité des ARN extraits a été testée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Figure 1.6). Le traitement à la DNase proposé par le Kit promega permet une première purification des ARN totaux. La photo du gel prise sous UV montre la présence de deux bandes correspondant respectivement à l'ARN 23S et 16S et l'absence de bande visible correspondant à l'ADN contaminant.

Le protocole d'extraction des ARN proposé par le Kit Quiagen basé sur une colonne contenant une membrane (RNeasy silica-membrane), ne permet pas



**Figure 1.6** : Intégrité des ARN extraits selon différents protocoles d'extraction testés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

M : Marqueur de poids moléculaire

A : Représente les acides nucléiques extraits par le Kit Quiagen

B : Représente les acides nucléiques extraits par le Kit Promega

C : Représente les acides nucléiques extraits par le protocole décrit par Llop *et al.* (1999)

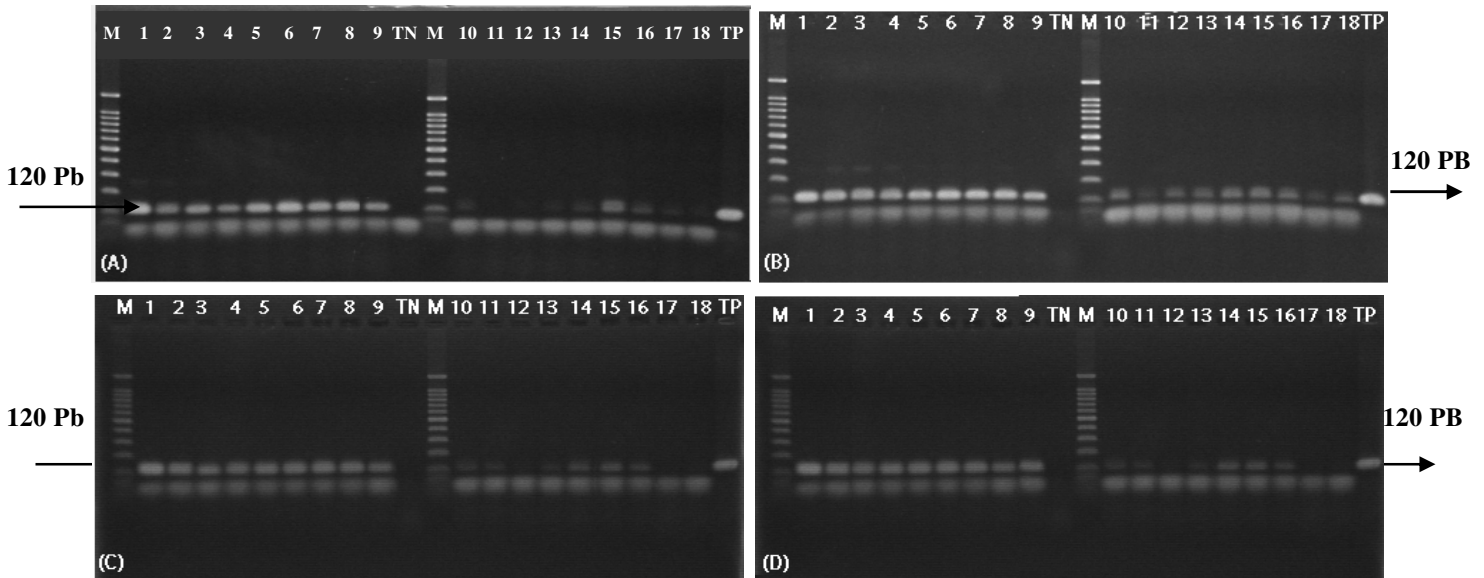
D : Représente les acides nucléiques extraits par le Kit Sigma

Les puits 1 et 2 représentent respectivement les concentrations ( $10^8$  et  $10^7$  cfu/ml)

l'élimination de tout l'ADN contaminant. Une bande de forte intensité est visible sur le haut du gel correspondant à l'ADNg. Deux bandes correspondant respectivement à l'ARN 23S et 16S sont également visibles sur le gel. Après traitement à la DNase l'ADN n'est plus visible. Cependant, on remarque que les ARN apparaissent sous forme de faibles signaux. Cela est probablement dû à une dégradation partielle de l'ARN après traitement à la DNase.

Une bande correspondant à l'ADNg est présente sur le haut du gel qui a été extrait par le kit Sigma. Après traitement à la DNase cette bande n'est plus visible. En revanche, les deux bandes ARNr mises en évidence par les autres kits d'extraction, ne sont plus visibles dans l'extrait obtenu par ce dernier. L'extraction des acides nucléiques réalisée par le kit MO BIO ainsi que celle réalisée selon le protocole décrit par Sung *et al.*, (2003), n'ont pas permis de visualiser des bandes correspondantes aux ARN extraits. Ceci peut être dû à une dégradation des ARN durant les différentes étapes de l'extraction. Le protocole d'extraction décrit par Llop *et al.* (1999) est basé sur la précipitation des acides nucléiques par l'isopropanol. De légères modifications lui en ont été apportées. Le temps de lyse de la membrane bactérienne après l'ajout du tampon Edwards a été modifié à 30 min au lieu d'une heure pour éviter la dégradation des ARN. Pour une meilleure précipitation des acides nucléiques, le temps d'incubation à l'isopropanol a été prolongé à 2 heures au lieu d'une heure. L'analyse sur gel d'agarose des acides nucléiques extraits, permet de visualiser une bande en haut du gel qui correspond à l'ADNg ainsi qu'un signal de forte intensité en bas du gel qui pourrait correspondre à des petites ARN ou à des produits de dégradation. Après traitement à la DNase ces bandes ne sont plus visibles.

Afin de valider les protocoles d'extraction ci-dessus décrits, une RT-PCR en deux étapes a été effectuée sur les ARN extraits traités à la DNase. Les résultats obtenus avec le couple d'amorces EmiRib5/EmiRib6 sont représentés sur la Figure 1.7. La comparaison des profils électrophorétiques correspondant aux différents protocoles d'extraction, montre la présence d'amplicons à une dilution de  $10^{-8}$  quelque soit le protocole d'extraction. Par ailleurs, une RT-PCR sans M-MLV a été réalisée. Les résultats d'amplification obtenus permettent la visualisation de quelques traces d'ADNg contaminant chez certains échantillons.



**Figure 1.7 :** Détection par RT-PCR en deux étapes sur les extraits d'acides nucléiques traités à la DNase.

Les amplifications ont été réalisées avec le couple d'amorces EmiRib5/EmiRib6.

L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à 2%.

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

TP : (Témoin positif) ADN<sub>g</sub> CFBP 1121 non traité à la DNase.

TN : Témoin négatif eau PCR

Le puit 1 correspond à l'échantillon non dilué ( $10^8$ cfu/ml), les puits 2 à 9 correspondent aux extraits à différentes dilutions ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ) amplifiés par M-MLVRT-PCR.

Le puit 10 correspond à l'échantillon non dilué ( $10^8$ cfu/ml), les puits 11 à 18 correspondent aux dilutions ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ) amplifiés par RT-PCR sans M-MLV (RT-PCR négatif)

(A) : Amplification des ARN extraits selon le kit Proméga

(B) : Amplification des ARN extraits selon le kit Quiagen

(C) : Amplification des ARN extraits selon le kit «Ultra clean™ 15 MO BIO»

(D) : Amplification des ARN extraits selon le protocole à l'isopropanol. (Llop *et al.*, 1999)

### 1.3.4 Optimisation de la RT-PCR sur les ARNm.

L'objectif de cet essai est d'optimiser la réaction de la RT-PCR sur les ARNm obtenus selon les différents protocoles d'extraction préalablement décrits.

Dans un premier temps, la technique a été réalisée sur le gène *rpoD*. C'est le meilleur candidat pour la détection des cellules vivantes. Il s'exprime de façon constitutive.

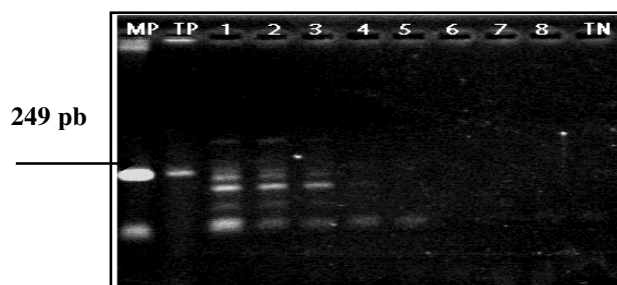
La RT-PCR réalisée sur le gène *rpoD* a été optimisée en suivant les mêmes étapes que pour le gène *rrs*. C'est à dire :

- Une extraction des acides nucléiques totaux.
- Purification des ARN extraits à l'aide d'un traitement à la DNase.
- Une comparaison de la RT-PCR en une seule étape et la RT-PCR en deux étapes
- Validation d'un protocole d'extraction avec le gène *rpoD*

L'extraction des acides nucléiques a été réalisée sur une culture bactérienne (souche CFBP 1121) à différente charge :  $10^8$ cfu/ml,  $10^7$ cfu/ml,  $10^6$ cfu/ml et  $10^4$ cfu/ml. Le protocole d'extraction utilisé en premier lieu est celui proposé par le Kit Promega. C'est un kit d'extraction des ARN et il permet une première purification des ARN. Les extraits obtenus sont traités à la DNase pour éliminer toutes traces éventuelles de l'ADNg contaminants. Les ADNc synthétisés ont été aliquotés, et conservés à  $-20^\circ\text{C}$  pour une utilisation future.

Les résultats d'amplification obtenus par PCR pour l'ADNc synthétisés à partir des ARN extraits par le kit Promega, ont mis en évidence la présence d'un amplifiât à une charge bactérienne de  $10^8$  cfu/ml à la taille attendue c'est-à-dire 249 pb. En revanche la RT-PCR sans M-MLV n'a engendré aucun signal démontrant ainsi une absence de contamination par l'ADNg (Figure 1.9 A). Par contre les résultats obtenus par RT-PCR directe ou en une seule étape réalisée avec le couple d'amorces Emirpo19/Emirpo21 du gène *rpoD*, a permis la visualisation de plusieurs bandes qui interfèrent et qui ne correspondent pas à la taille de l'amplifiât attendu. Ceci est probablement lié à l'optimisation des paramètres de la phase pré-PCR. (Figure 1.8). Pour cette raison, nous réaliserons le reste de notre étude en utilisant la RT-PCR à deux étapes. Pour valider les autres protocoles d'extraction sur le gène *rpoD*, une RT-PCR à deux étapes a été réalisée sur les extraits obtenus par les différents protocoles d'extractions.

M-MLVRT-PCR RT-PCR sans M-MLVRT



**Figure 1.8** : Détection par RT-PCR en 1 seule étape réalisée avec le couple d'amorces du gène *rpoD* Emirpo19/Emirpo21

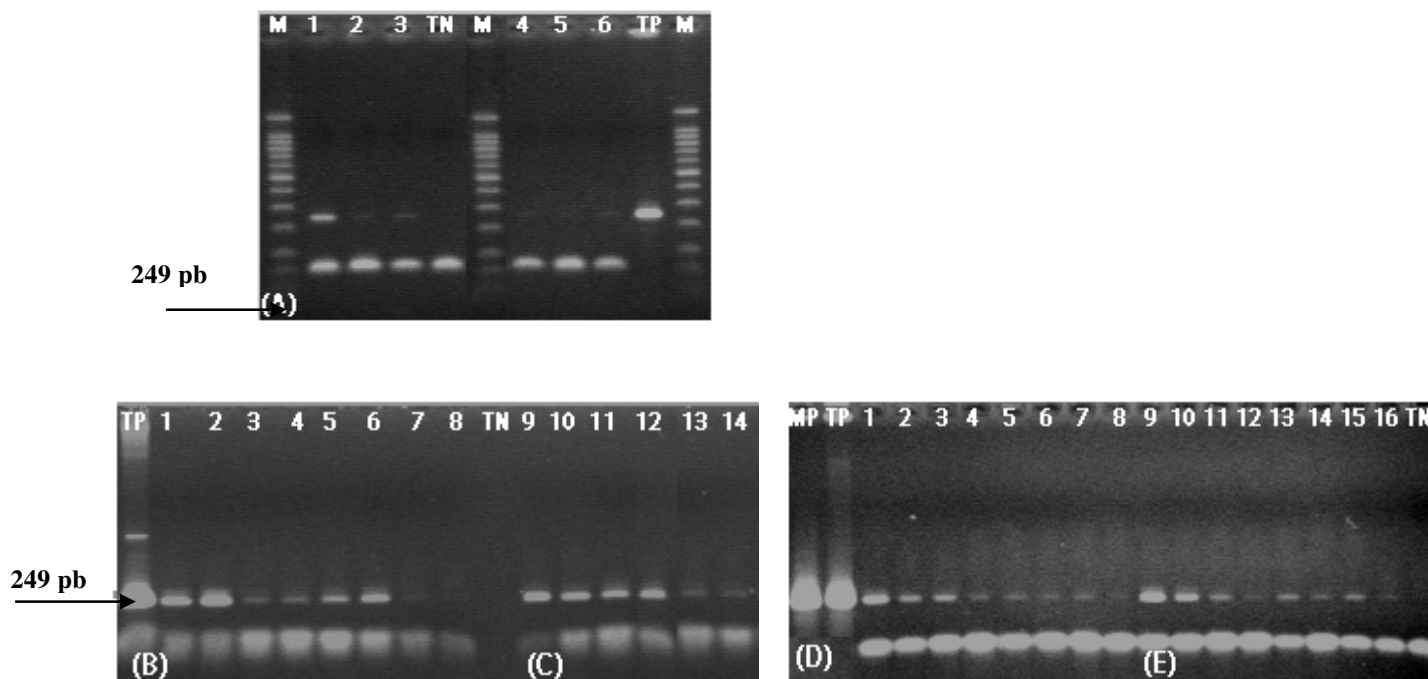
L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à 2%. Amplification des ARN extraits selon le protocole décrit par Llop *et al.*, 1999.

MP: Marqueur positif à 160 p.b.

TP : Témoin positif ADN<sub>g</sub> CFBP 1121 non traité à la DNase.

TN : Témoin négatif eau PCR

Les puits 1, 2, 3 et 4 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par M-MLVRT-PCR. Les puits 5, 6, 7, et 8 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par RT-PCR sans M-MLV (RT-PCR négatif).



**Figure 1.9** : Détection par RT-PCR en deux étapes réalisée avec le couple d'amorces Emirpo19/Emirpo21 du gène *rpoD*.

L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à 2%.

M : marqueur de poids moléculaire à 100p.b.(Proméga)

MP: marqueur positif à 249 p.b.

TP : Témoin positif ADN<sub>g</sub> CFBP 1121 non traité à la DNase

TN : Témoin négatif eau PCR

**(A)** : Amplification des ARN extraits selon le kit Proméga.

Les puits 1, 2 et 3 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par M-MLVRT-PCR. Les puits 4,5 et 6 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par RT-PCR sans M-MLV (RT-PCR négatif)

**(B)** : Amplification des ARN extraits selon le kit Sigma. Les puits 1, 2, 3 et 4 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par M-MLVRT-PCR. Les puits 5, 6, 7, et 8 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par RT-PCR sans M-MLV (RT-PCR négatif)

**(C)** : Amplification des ARN extraits selon le kit «Ultra clean™ 15 MO BIO». Les puits 9, 10,11 correspondent aux concentrations  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par M-MLVRT-PCR. Les puits 12,13 et 14 correspondent aux concentrations  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par RT-PCR sans M-MLV (RT-PCR négatif).

**(D) et (E)** : Amplification des ARN extraits selon le kit Quiagen et le protocole décrit par Llop et al.(1999). Les puits 1, 2, 3 et 4 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par M-MLVRT-PCR. Les puits 5, 6, 7, et 8 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par RT-PCR sans M-MLV (RT-PCR négatif). Les puits 9,10, 11 et 12 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par M-MLVRT-PCR. Les puits 13, 14, 15, et 16 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par RT-PCR sans M-MLV (RT-PCR négatif).

préalablement cités. Les extraits ont été traités à la DNase. Les ADNc synthétisés ont été aliquotés et conservés à -20°C pour être testés par PCR.

Les résultats d'amplification illustrés sur la Figure 1.9 montrent, la présence d'un signal à la taille attendue jusqu'à une concentration de  $10^4$  cfu/ml avec les quatre types de protocole d'extraction. D'autre part aucune amplification n'a pu être détectée avec le protocole proposé par Sung *et al.*, (2003), (résultats non présenté).

Par ailleurs, une RT-PCR sans M-MLV (témoin de non-contamination) a été réalisée sur les mêmes échantillons ayant été testés en M-MLVRT-PCR. Les résultats d'amplification obtenus sur les échantillons extraits selon le kit Sigma et le kit MO BIO permettent la visualisation de signaux démontrant, la présence de contamination des ARN par d'ADNg contaminants même après la digestion enzymatique. Ceci est peut être dû à une forte concentration d'ADN dans les échantillons testés ou bien aux kits d'extraction qui ne sont pas adéquats pour l'extraction des ARN.

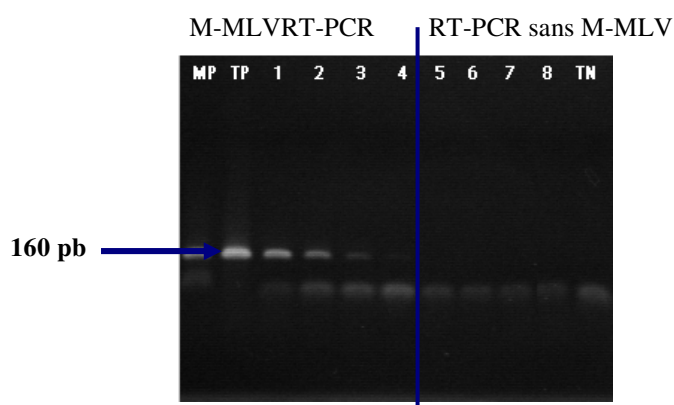
Les résultats obtenus sur les échantillons extraits selon le kit Quiagen et le protocole décrit par Llop *et al.* (1999), montrent que ces deux derniers offrent une meilleure intégrité des ARN. En effet le profil électrophorétique obtenu montre une légère contamination par l'ADNg. Toutefois, le protocole d'extraction décrit par Llop *et al.* (1999), a permis d'extraire des ARN de meilleure qualité et une légère contamination en ADN génomique après traitement à la DNase et diminue ainsi le risque de conclure à des résultats de faux positif. C'est un protocole simple à réaliser et le moins laborieux pour une extraction massale d'échantillons. Ce protocole a été alors retenu pour la suite de notre étude

### **1.3.5 Vérification de l'expression des gènes cibles avec les amorces sélectionnées**

Les autres gènes candidats (*gyrB*, *galA* et *XCC2585*) ont été testés avec l'ADNc synthétisé à l'aide des ARN extrait selon le protocole décrit par Llop *et al.* (1999). Les résultats du test RT-PCR obtenus pour le gène *gyrB* avec le couple d'amorces EmigyrB5/EmigyrB8 ont permis de mettre en évidence la présence d'un signal jusqu'à une charge bactérienne de  $10^4$  cfu/ml. Le traitement à la DNase



s'est révélé efficace puisque aucune trace d'ADNg n'a été détecté après RT-PCR sans M-MLV (Figure 1.10). Ce gène a bien été transcrit, il serait donc intéressant de le proposer comme un marqueur de la viabilité des bactéries phytopathogènes. Toutefois les résultats obtenus par RT-PCR n'ont pas permis de révéler la présence d'ARNm issue de la transcription du gène *galA*. Il en est de même pour le gène *XCC2585*, aucun produit amplifié n'a pu être obtenu avec les deux couples d'amorces (Zup2309/Zup2310 et Zup2311/2312). Ceci est dû au fait que ces gènes ne s'expriment pas de façon constitutive ou dans les conditions de culture de la bactérie.



**Figure 1.10** : Détection par RT-PCR en deux étapes réalisée avec le couple d'amorces Emigyr5/Emigyr8 du gène *gyrB*.

L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à 2%.

Amplification des ARN extraits selon le protocole décrit par Llop *et al.*, 1999.

MP: marqueur positif à 160 p.b.

TP : Témoin positif ADNg CFBP 5241 non traité à la DNase.

TN : Témoin négatif eau PCR

Amplification des ARN extraits selon le protocole à l'isopropanol. Les puits 1, 2, 3 et 4 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par M-MLVRT-PCR.

Les puits 5, 6, 7, et 8 correspondent aux concentrations  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^4$  cfu/ml amplifiés par RT-PCR sans M-MLV (RT-PCR négatif).

### 1.3.6 Stabilité des ARNm :

Un des problèmes liés à l'utilisation de la RT-PCR réside dans la préparation et la purification des ARNm lesquels sont particulièrement fragiles et ont une durée de vie très courte. L'objectif de cet essai était d'évaluer les conditions les plus favorables pour obtenir un bon rendement et la meilleure intégrité des ARNm. Pour cela, une extraction a été réalisée sur une culture bactérienne d'environ  $10^8$  cellules/ml en utilisant le kit d'extraction (Promega). Les extraits obtenus ont été aliquotés. Le premier aliquot a été stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant une semaine. Les ARN extraits du deuxième aliquot ont suivi toutes les étapes du processus (traitement à la DNase et synthèse de l'ADNc) le même jour. Les résultats d'amplification par PCR réalisée sur l'ADNc pour le gène *rpoD* ont mis en évidence la présence d'un amplifiât correspondant à la taille attendue (249 pb) dans le deuxième aliquot. Par contre aucun amplifiât n'a été obtenu pour les extraits d'ARN du premier aliquot.

## 1.4 Discussion

La nouvelle approche de diagnostic phytosanitaire est la détection des bactéries vivantes dans les semences. L'ARN messager qui est un intermédiaire de la synthèse des protéines, est donc le meilleur indicateur de viabilité, car il n'est présent que dans les cellules vivantes et rapidement dégradé par les ribonucléases du milieu. La technique de détection des ARNm la plus envisageable est la RT-PCR. Elle est basée sur une amplification d'ADNc synthétisé à partir d'un ARNm cible grâce à la transcriptase inverse.

La conception correcte des amorces, l'optimisation des paramètres du cycle PCR et la préparation des ARNm purifiés conduit au développement d'un protocole fiable de détection des bactéries vivantes dans un lot de semences.

Il est très important de prendre en compte le seuil de sensibilité d'un couple d'amorces ainsi que leur spécificité à l'égard d'une population souches bactériennes. La conception correcte des amorces, l'optimisation des paramètres

du cycle PCR et la préparation des ARNm purifiés conduit au développement d'un protocole fiable de détection des bactéries vivantes dans un lot de semences.

Il est très important de prendre en compte le seuil de sensibilité d'un couple d'amorces ainsi que leur spécificité à l'égard d'une population souches bactériennes. Le couple d'amorces Xc5a/Xc5b complémentaire de la séquence *galA* est spécifique des *Xanthomonas campestris* définis par Vauterin et al. en 1995. Nous l'avons choisi comme référence pour juger la spécificité des autres couples d'amorces. Sa limite de détection vis-à-vis d'une série de dilution de suspension bactérienne est de  $10^4$  cfu/ml.

Le couple d'amorces Emirpo19/Emirpo21 définie sur le gène *rpoD* a permis de révéler la présence de cible à une concentration de 10 cfu/ml. Néanmoins ce couple d'amorces s'est révélé non spécifique du pathovars *campestris*. Il reconnaît aussi des souches appartenant à d'autres espèces de *Xanthomonas*. Ce couple d'amorces aurait dû être spécifique puisqu'il a été dessiné dans une zone polymorphe. L'alignement des séquences de 96 souches a révélé la présence d'une thymine spécifiquement dans les souches de *X. campestris* (Fargier com. Personnel). Un mismatch formé par le nucléotide thymine s'est révélé insuffisant pour pouvoir distinguer les *X. campestris* sensu stricto (selon la classification de Vauterin *et al.*, 1995).

Le seuil de détection du couple d'amorces EmigrB5/EmigrB8 défini sur le gène *gyrB* a été estimé à  $10^5$  cfu/ml. Il détecte la totalité des pathovars de l'espèce *X. campestris*. Il reconnaît aussi les souches : *X. axonopodis* pv. *axonopodis* et *X. codiae*. Ce résultat est peut être dû à une contamination de ces deux dernières souches par des souches appartenant à l'espèce *X. campestris*.

Le seuil de détection des deux couples d'amorces Zup 2309/Zup 2310 et Zup 2312/Zup 2311 a été estimé à  $10^2$  cfu/ml. D'après Rijlaardsdam *et al.* (2004), ils seraient spécifiques du pathovar *campestris*. Nos résultats ont montré qu'ils reconnaissent aussi, d'autres souches de *X. campestris* pathogènes des crucifères mais pas de façon extensive. Il pourrait donc exister deux populations génétiques capables d'attaquer les crucifères. La détection des souches du pathovars *betae* et *bilvae* est surprenante. Ces deux pathovars ne sont pas isolés des crucifères.

Cependant leur détection avec les amorces *galA* indique une parenté entre ces pathovars et l'espèce *X. campestris* définie par Vauterin *et al.* (1995).

L'un des problèmes liés à l'utilisation de la RT-PCR réside dans la préparation des ARN. Ceci est particulièrement vrai pour les ARNm qui sont fragiles et rapidement dégradés par les ribonucléases. C'est pourquoi il est important de choisir un protocole d'extraction qui permet l'obtention d'un bon rendement en ARNm sans contamination par l'ADNg. Les résidus d'ADNg dans le milieu peuvent être amplifiés par RT-PCR et engendrer des faux positifs.

Pour optimiser nos protocoles pour le reste de nos manipulations une RT-PCR a été réalisée en utilisant un couple d'amorces EmiRib5 /EmiRib6 définie sur le gène *rrs*, du fait de sa stabilité par rapport à l'ARNm. L'extraction des ARN a été réalisée par le kit le SV Total Isolation Systeme Promega. C'est un kit d'extraction des ARN et inclus dans son protocole un traitement à la DNase. Cependant ce Kit n'a pas permis l'obtention des ARN totaux purifiés. Pour cette raison, une digestion enzymatique doit être systématiquement appliquée après chaque extraction afin d'éliminer toutes traces de l'ADN contaminant. Le traitement à la DNase a été ajusté à 0,5 unités d'enzyme par  $\mu\text{l}$  d'ARN et incubé pendant 1h 30 à 37°C. L'efficacité de ce traitement a été vérifiée en comparant les résultats obtenus par amplification des acides nucléiques avant et après traitement à la DNase. En parallèle, la pureté des ARN obtenus après traitement à la DNase a été vérifiée encore une fois en RT-PCR sans l'enzyme M-MLV qui est un témoin de non contamination. La RT-PCR a été réalisée selon deux protocoles: l'un, en deux étapes et l'autre en une seule étape. La RT-PCR en une seule étape permet un gain de temps et une diminution du risque de contamination puisque la réaction est réalisée en une seule étape et dans un seul tube. Toutefois si l'on compare les deux protocoles en terme de sensibilité, la RT-PCR en deux étapes offre un gain de sensibilité et de spécificité significatif. Elle permet en effet de révéler la présence de signal jusqu'à une dilution de  $10^{-8}$ . Par contre la RT-PCR en une seule étape ne permet pas de détecter la cible au-delà d'une dilution de  $10^{-3}$ . Ces deux protocoles ont été optimisés par la suite sur l'ARNm. Dans ce cas, le choix du gène cible comme un marqueur de viabilité doit être judicieux. Le gène *rpoD* est le meilleur candidat, il

code pour le facteur sigma ( $\sigma$ ) 70, il est indispensable dans l'organisme et s'exprime d'une manière constitutive.

(yanlin shi, [http://www.biology.Isu.edu/webfac/dpollack/4800/Profects2 /Yanlin](http://www.biology.Isu.edu/webfac/dpollack/4800/Profects2/Yanlin))

La RT-PCR en une seule étape n'a pas permis la détection de cibles à la taille attendue. Nous n'avons pas pu déterminer si ce résultat est lié au couple d'amorces Emirpo19/Emirpo21 qui s'est révélé non spécifique à l'espèce *X. campestris* ou bien à un mauvais ajustement des paramètres de la Pré - PCR.

En revanche les résultats obtenus par RT-PCR en deux étapes ont mis en évidence la présence d'un amplifiât à la taille attendue et sans contamination par l'ADNg.

Toutefois le niveau de sensibilité de cette réaction n'est que de  $10^8$  cellules/ml. Ceci est probablement lié à une perte en ARNm suite au deuxième traitement à la DNase. Or ce résultat ne répond pas au but poursuivi pour notre étude. En effet le niveau de sensibilité est un critère très important pour la validation d'une technique de détection. C'est pourquoi le choix d'un autre protocole d'extraction semblait être indispensable, car il est important d'obtenir des extraits avec un bon rendement en ARNm.

Six protocoles d'extraction ont été testés. Les extraits obtenus ont été amplifiés par RT-PCR en deux étapes après traitement à la DNase. Les résultats obtenus pour le gène *rrs* montrent la présence de signal jusqu'à une dilution de  $10^8$  quel que soit le protocole d'extraction avec une légère contamination par l'ADNg. Parmi, les cinq protocoles testés pour le gène *rpoD*, le protocole d'extraction décrit par Llop *et al.*(1999) a permis d'obtenir le meilleur rendement en ARNm avec un seuil de sensibilité de  $10^4$  cellules bactériennes/ml avec une légère contamination par l'ADNg.

De part sa simplicité et sa rapidité, ce protocole pourra être approprié pour traiter un grand nombre d'échantillons. En effet, l'aspect économique relatif au coût des analyses doit être pris en compte pour le choix d'un protocole.

Il serait tout de même intéressant de tester d'autres enzymes (DNase) qui permet une meilleure purification des ARN que celle offerte par l'enzyme RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Afin d'éliminer toute trace l'ADNg et d'éviter le risque d'obtenir de faux positifs. La vérification de l'expression des autres gènes candidats a été testée avec le ADNc synthétisé à partir des ARN extraits

selon le protocole décrit par Llop *et al.*(1999). Les ARNm issus de transcription du gène *gyrB* ont été détectés par RT-PCR. Le gène *gyrB* code pour la subunité B de l'ADN gyrase. Il joue un rôle important au niveau du chromosome et permet de protéger l'ADN des risques de dénaturation par la température

[http://www.igmors.upsud.fr/duguet/webEAN/francais/pages\\_personnelles/michel/MD\\_reverse\\_gyrase.html](http://www.igmors.upsud.fr/duguet/webEAN/francais/pages_personnelles/michel/MD_reverse_gyrase.html). Ce gène peut donc être considéré comme un bon marqueur de viabilité pour la détection des bactéries vivantes.

Le gène *galA* pourrait être un constituant du pouvoir pathogène de la bactérie. Il code pour l'arabino-galactane endo-1,4- $\beta$ -galactosidase enzyme qui catalyse la dégradation de l'arabinogalactane qui est un composant majeur des polysaccharides au niveau de la paroi du végétale (Singleton *et al.*, 2001). Cependant, la transcription du gène *galA* n'a pas été détectée dans nos conditions expérimentales. L'expression de ce gène peut être liée à des conditions spécifiques (présence l'arabinogalactane dans le milieu) ou bien en réponse à un stimulus particulier. Il en est de même pour le gène *XCC2585*, aucune amplification n'a été repérée par RT-PCR réalisée avec les deux couples d'amorces. Nous ne pouvons pas déterminer si cela est lié à l'absence de cible car ce gène n'est pas transcrit ou si c'est lié aux conditions expérimentales. Une optimisation de la RT-PCR sur des semences contaminées peut nous rapprocher des conditions réelles et répondre éventuellement à cette question.

L'une des contraintes rencontrées durant la réalisation de ce travail, réside dans la préparation des ARNm. Lesquels se trouvent en petites quantités et facilement dégradables par les ribonucléases du milieu. Pour cela nous avons tenté de tester la stabilité des ARNm au cours du temps. Une amplification par RT-PCR a permis de révéler la présence de cibles pour les extraits d'ARN ayant suivi toutes les étapes du processus (traitement à la DNase et synthèse de l'ADNc) le même jour. En revanche aucune amplification n'a été détectée sur les ARN stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant une semaine. Au terme de ces résultats nous pouvons conclure qu'il est important de réaliser successivement toutes les étapes du processus (extraction des ARN, traitement à la DNase et synthèse de l'ADNc), afin d'éviter la dégradation des ARNm dans le temps.

## *Chapitre 2. Détection des *X. campestris* dans les semences par BIO-PCR*

---

## **Chapitre 2**

# **Validation d'une procédure de détection de *Xanthomonas campestris* dans les semences de Brassicacées basée sur la PCR (BIO-PCR)**

### **2.1 Introduction**

La BIO-PCR est une technique qui combine la croissance du pathogène sur un milieu semi sélectif, suivi d'une amplification spécifique par PCR de l'ADN des bactéries ciblées (Schaad *et al.*, 1995). Elle a l'avantage d'éliminer les inhibiteurs de la PCR, de réduire la chance d'obtenir de faux positifs en raison de la présence éventuelle de cellules mortes ou d'ADN libre, d'augmenter significativement la sensibilité grâce à un pré enrichissement des cellules cibles et d'informer sur la viabilité des cellules.

Le milieu de culture utilisé est le **YPACvc**. C'est un milieu classique additionné de deux antibiotiques : **la céphalexine** et **la vancomycine**, utilisés par ailleurs dans la composition d'autres milieux sélectifs. Ils offrent une sélectivité satisfaisante contre la microflore saprophyte des lots de semences de Brassicacées en favorisant la croissance de *Xanthomonas campestris*.

Ce présent travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre la SNES (Station Nationale d'Essais de Semences) et l'INRA d'Angers et la validation d'un protocole été effectuée en utilisant des lots communs de semences variées.



## 2.2 Matériels et méthodes

### 2.2.1 Souches bactériennes :

Les souches bactériennes utilisées durant cette étude, appartiennent à la collection Française de phytopathologie (CFPB). Il s'agit de la souche CFPB 1121 (*X. c. pv. campestris*), de la souche CFPB 5827 (*X. c. pv. raphani*) et de la souche CFPB 5828 (*X. c. pv. raphani*).

Les bactéries sont remises en suspension dans du milieu LP (extrait de levure 7g/L, peptone 7g/L). À partir de ce bouillon de culture, 100 µl sont prélevés et étalés sur milieu LPGA (extrait de levure 7g/L, peptone 7g/L, glucose 7g/L et agar 15g/L). Les bactéries sont ensuite incubées à 28°C pendant 48 h. Elles sont conservées à + 4°C et à - 20°C dans de l'eau stérile durant toute la durée de cette étude.

### 2.2.2 Lots de semences :

Douze lots de semences de Brassicacées infectés et sains ont été utilisés durant cette étude (tableau 2.1). Ces semences ont été fournies par la SNES, leur état sanitaire avait préalablement été vérifié par méthodes microbiologiques (Roberts and Koenraadt, 2002).

### 2.2.3 : Milieux de cultures

Trois milieux semi sélectifs ont été préalablement testés par le laboratoire (Fargier *et al.*, 2007) afin de sélectionner celui qui offre une meilleure sélectivité vis-à-vis de la microflore bactérienne des crucifères et qui respecte les CMI (concentration minimum inhibitrice). Il s'agit du milieu mCS20ABN (Chang *et al.*, 1991), du milieu mFSC (Schaad, 1989) et du milieu Y.P.A.C.cv. Les milieux mCS20ABN et mFSC sont avérés fortement sélectifs vis-à-vis de certaines souches appartenant à l'espèce *Xanthomonas campestris* et une croissance lente des autres souches de *Xanthomonas campestris* pouvant aller jusqu'à 5 jours. Le milieu Y.P.A.C.cv. est un milieu classique additionné de deux antibiotiques céfalexine et de vancomycine, utilisés dans la composition d'autres milieux sélectifs de *X. campestris*.

### 2.2.4 Extraction des bactéries :

#### Macération des semences traitées et non traitées :

Les échantillons ont été subdivisés en 3 sous échantillons composés de 10 000 graines chacun (Robert *et al.* (1993) et Robert, 1999), puis placés dans un récipient stérile approprié (Erlenmeyer de 250 ml) avec 100 ml d'une solution saline stérile (0,85% NaCl) et de Tween 20 (0,02% v/v). Le tout est placé sous une agitation de 150 -200 rpm à température ambiante pendant 2 heures à 2h et demi.

#### Macération des semences désinfectées :

Les sous-échantillons de graines désinfectées sont macérés dans 250 ml de PBS -Tween (NaCl 8g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,75g/L et Tween – 20 200 µl/L) sous une agitation de 100 rpm pendant 3h à température ambiante. Au bout de ce temps, les échantillons sont broyés à l'aide d'un broyeur à couteaux. Le broyat est ensuite versé dans un sac de broyage muni d'un filtre (BIOREBA Stomacher). Dix ml de jus sont prélevés dans un tube approprié, puis centrifugé à 5000 g pendant 5min. Le surnageant est éliminé, alors que le culot est remis en suspension avec 1ml d'eau saline. Cette suspension est utilisée pour la BIO- PCR.

Par ailleurs, un lot de semence contaminé artificiellement à l'aide d'une suspension bactérienne de *X. c. pv campestris* CFBP 1121 (10<sup>5</sup> cfu/ml) et broyé dans les mêmes conditions que les autres lots de semences désinfectés. Ce lot témoin est utilisé pour vérifier l'absence des inhibiteurs de la PCR suite au broyage des semences de chou ainsi qu'un lot de semence sain utilisé comme témoin négatif.

### 2.2.5 Enrichissement des bactéries sur milieu sélectif :

Cent microlitre du macérât obtenu de chaque sous-échantillon ont été étalés sur boîte de LPACvc (Extrait de levure 7g/L, Bactropeptone 7g/L, Agar Agar 15g/L, Cycloheximide 100 mg/L, Vancomycine 0,5 mg/L et Céphaléxine 25 mg/L) à l'aide d'un étaleur stérile à raison de 2 répétitions par sous échantillon. Une suspension d'une souche de référence de *X. c. pv campestris* CFBP 1121 (10<sup>5</sup> cfu/ml) a été également étalée pour servir de témoin positif de la réaction.

Les boîtes ont été placées dans un incubateur pendant 40 à 45 h à 28 °C.

Au bout de ce temps la surface de la gélose est lavée avec 3 ml d'eau saline stérile (0,85% de NaCl). La suspension bactérienne ainsi obtenue est homogénéisée à l'aide d'une pipette de 1000 µl et 1ml est alors prélevé dans un microtube de 1,5 ml pour la suite de l'analyse.

### **2.2.6 Extraction de l'ADN selon le protocole basé sur la lyse par NaOH**

La suspension bactérienne récoltée est centrifugée 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 la 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.

### **2.2.7 Amplification de l'ADN par Polymerase chain reaction (PCR) :**

Deux réactions en PCR multiplex ont été réalisées : La première réaction consiste à détecter la présence de *Xanthomonas campestris* dans les lots de semences analysés, la seconde réaction consiste à identifier le pathovar *raphani*. Les couples d'amorces utilisés durant la première réaction ont été préalablement décrits dans la littérature (Eden *et al.*, 1991 and Berg *et al.*, 2005). Les amplifications sont réalisées par PCR en multiplex dans un mélange réactionnel de 20 µl. Il comprend 1X Green GoTaq Flexi Buffer (promega), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,5 µM de chaque amorce spécifique **DLH120** (5'CCGTAGCACTTAGTGCAATG3') et **DLH125**(5'GCATTTCCATCGGTCACGATTG3'), 0,05µM de chaque amorce universelle: **1052-F** (5'GCATGGTTGTCGTCAGCTCGT3') et **Bac-R** (5'TACGGCTACCTTGTTACGACT3'), 0,05U de la GoTaq Flexi Buffer DNA polymérase et 3µl d'ADN cible.

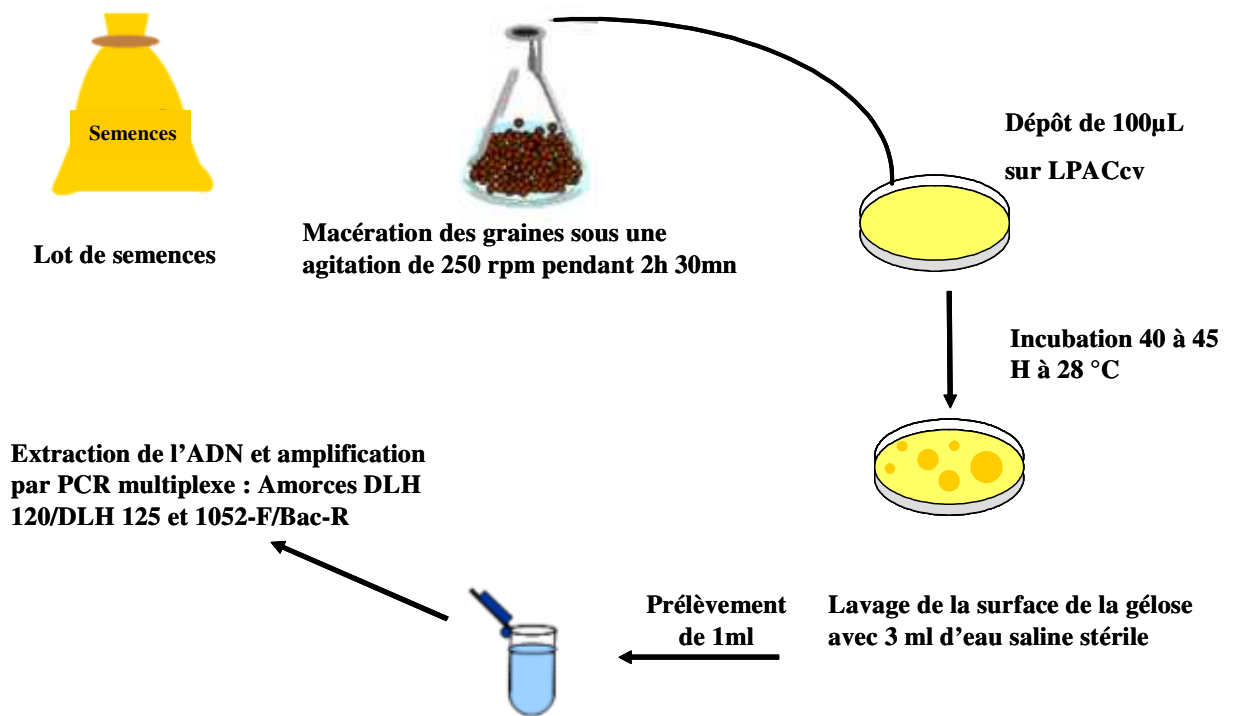


Figure 2.1 : Représentation schématique de la BIO-PCR

## *Chapitre 2. Détection des X. campestris dans les semences par BIO-PCR*

---

La deuxième réaction a été réalisée dans un volume final de 20 µl comprenant 1X Green GoTaq Flexi Buffer (promega), 0,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,6 µM de chaque amorce **DLH120/DLH125** et 0,2 µM du couple d'amorces **Zup9/Zup10**(5' AAATCAGGGGGATGCGGTGG3')/(5'TCCGGCCAGGGTTCGATAC AGTG3'), 0,05U de la GoTaq Flexi Buffer DNA polymérase et 3µl d'ADN cible. Le programme d'amplification est le suivant : Il consiste en une dénaturation de 3 min. à 95°C suivi de 35 cycles de 40 sec. à 95°C, 40 sec. à 63°C (touchdown à 58°C au cours des 6 premiers cycles) et 40 sec. à 72°C.

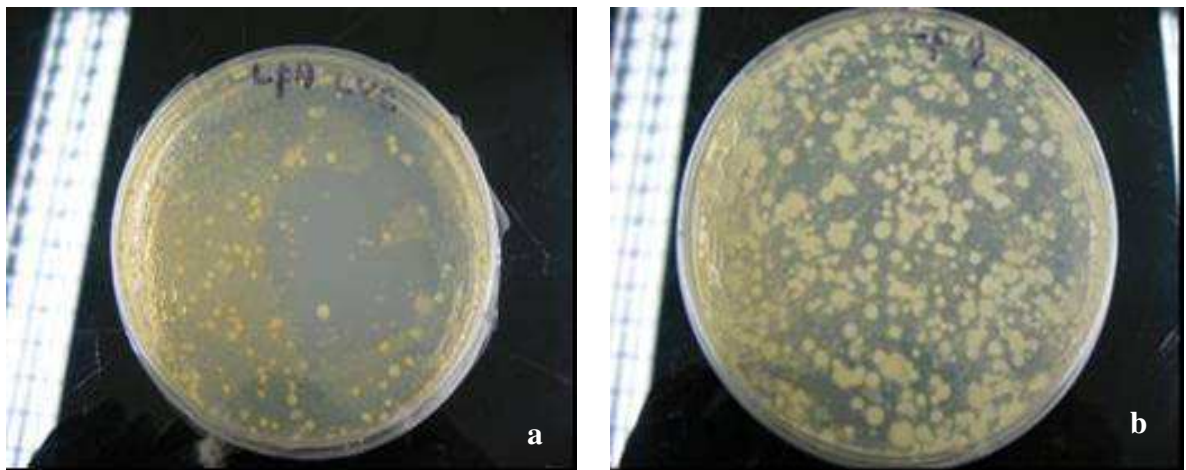
### **Analyse des produits amplifiés**

Au terme de la PCR, les produits d'amplification obtenus sont analysés sur gel d'agarose à 2% dans du tampon TBE 0,5 X. Huit µl de chaque produit d'amplification mélangé à 2µl de tampon de charge (15 % Ficoll 400, 0,03% de bleu de Bromophénol, 0,03% Xylene cyanol FF, 0,4% orange G, 10mM Tris-HCl pH 7,5) ont été chargés dans des puits de gel correspondants avec 8 µl d'un marqueur de poids moléculaire (100 paires de base, Promega). L'ensemble est soumis à une électrophorèse sous un voltage constant (100 V) pendant 30 min. 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

## 2.3 Résultats :

### 2.3.1 Sélectivité du milieu YPACcv pour la microflore des semences de crucifères:

Le macérât de semence extrait à partir des lots testés (tableau 2.1) a été ensemencé sur milieu Y.P.A.C.c.v. Ce milieu offre une sélectivité satisfaisante et limite la multiplication de la microflore bactérienne des graines de semences de chou et permet une croissance des *X. campestris* au bout de 40 h (Figure 2.2).



**Figure 2.2** : Photo représentant la sélectivité du milieu Y.P.A.C.cv (a) vis à vis de la microflore bactérienne d'un lot de semence de chou comparé au milieu Y.P.A.(b). 100 µl d'un même macérât ont été étalés sur les deux milieux qui ont été incubés dans les mêmes conditions.

### 2.3.2 Efficacité de la Bio PCR en multiplex :

#### Détection de *X. campestris* par PCR multiplex (Tableau 2.1) :

Douze lots de semences de choux infectés et sains subdivisés en trois sous échantillons de 10 000 graines chacun ont été analysés en PCR après enrichissement des bactéries cibles sur milieux de culture YPACvc pendant 40 à 45 h à 28°C et extraction de l'ADN cibles. Les résultats des produits amplifiés ont mis en évidence la présence d'amplifiât à la taille attendue c'est à dire 619 paires de bases pour les lots de semences infectés par *Xanthomonas campestris* Figure 2.3. Par ailleurs, Le profil électrophorétique des produits PCR amplifiés obtenus permet de visualiser une bande à une taille de 441 de p.b. Figure 2.3. Le couple d'amorces (1052-F/Bac-R) nommé amorces universelles (Eden *et al.*, 1991) a été utilisé 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 dans le macérât de semences. L'absence de cette bande sur le profil électrophorétique signifie que le résultat obtenu n'est pas interprétable (Berg *et al.*, 2005).

#### Détection de *X. c. pv. raphani* par PCR multiplex :

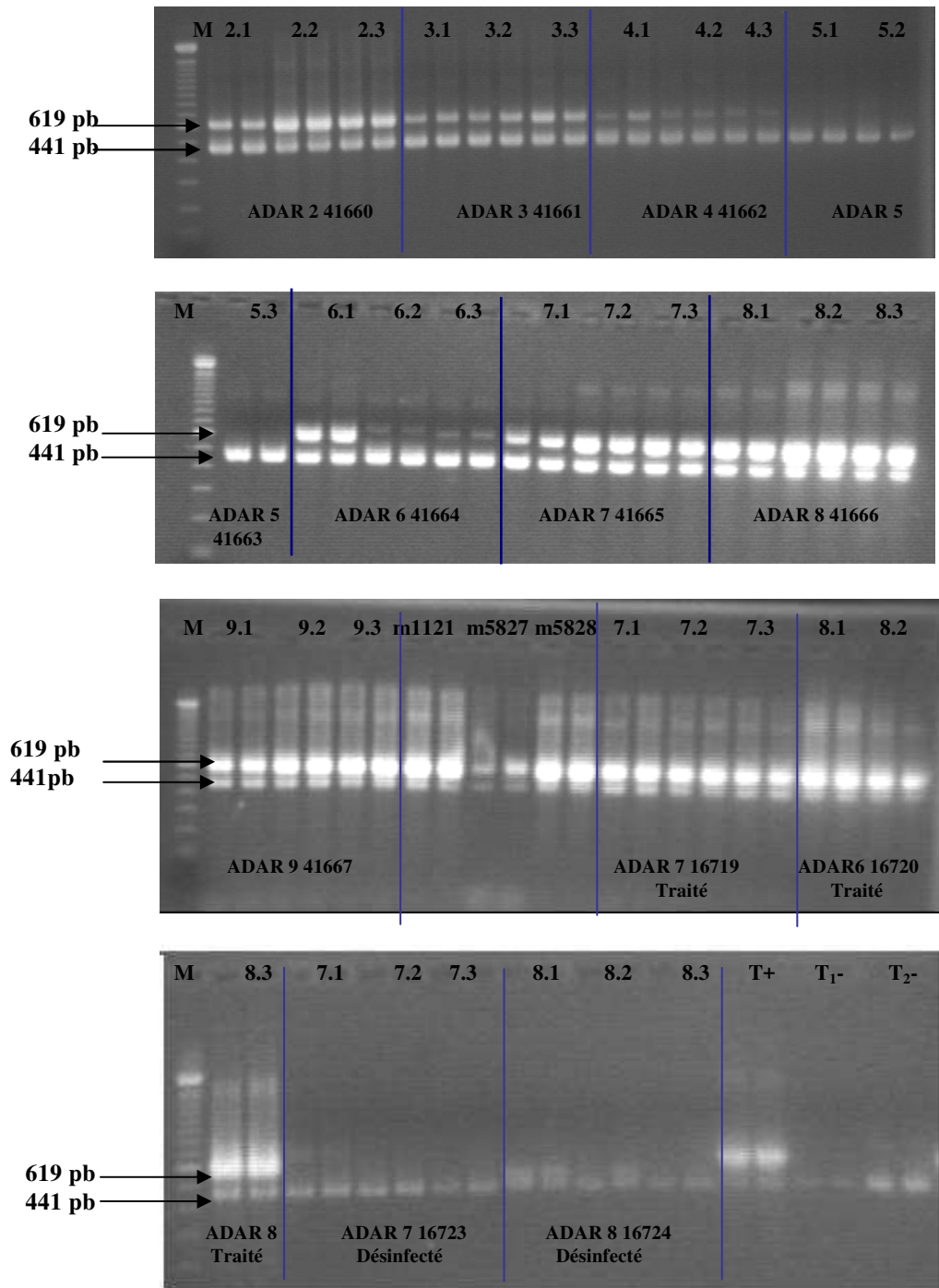
Les lots de semences ainsi analysés et avérés positifs vis-à-vis du *Xanthomonas campestris* ont été testés par PCR multiplex pour l'identification du pathovar en utilisant deux couples d'amorces spécifiques. Le couple d'amorces DLH120/DLH125 complémentaire du gène *hrpF* a été préalablement vérifié sur une collection de bactéries phytopathogènes (Berg *et al.*, 2005). Il reconnaît toutes les souches de *X. campestris* définie par Vauterin *et al.* en 1995. Le couple d'amorces. Zup2309/Zup2310 (Rijlaardsdam *et al.*, 2004) définis sur le gène *XCC2585*. Ce couple d'amorces permet l'amplification de toutes les souches de *X. c. pv. campestris*, une ou deux souches des cinq souches de *X. c. pv. incanae* et ne reconnaît aucune souche de *X. c. pv. raphani*. La visualisation sur gel d'agarose de deux bandes de 619 pb et 370 pb indique la présence de *X.c. pv campestris* dans les semences de choux. La visualisation d'une seule bande à 619 pb correspond à la présence de *Xanthomonas campestris pv raphani* (Figure 2.4)

**Tableau 2.1** : Résultats des tests obtenus par BIO-PCR sur les lots de semences

<b>Semence</b>	<b>N° du lot</b>	<b>Résultats BIO-PCR</b>	<b>Méthode de référence</b>
ADAR 2	41660	+	+
ADAR 3	41661	+	+
ADAR 4	41662	+	+
ADAR 5	41663	-	-
ADAR 6	41664	+	+
ADAR 7	41665	+	+
ADAR 8	41666	+	+
ADAR 9	41667	+	+
ADAR 7 <b>traitée</b>	16719	+	+
ADAR 8 <b>traitée</b>	16720	+	+
ADAR7 <b>désinfectée</b>	16723	-	-
ADAR 8 <b>désinfectée</b>	16724	-	-

Les résultats obtenus par la méthode de référence (Roberts and Koenzaadt, 2002) ont été communiqués après la manipulation.





**Figure 2.3** : Détection du *X.campestris* par PCR multiplex (amorces spécifiques/amorces universelles)

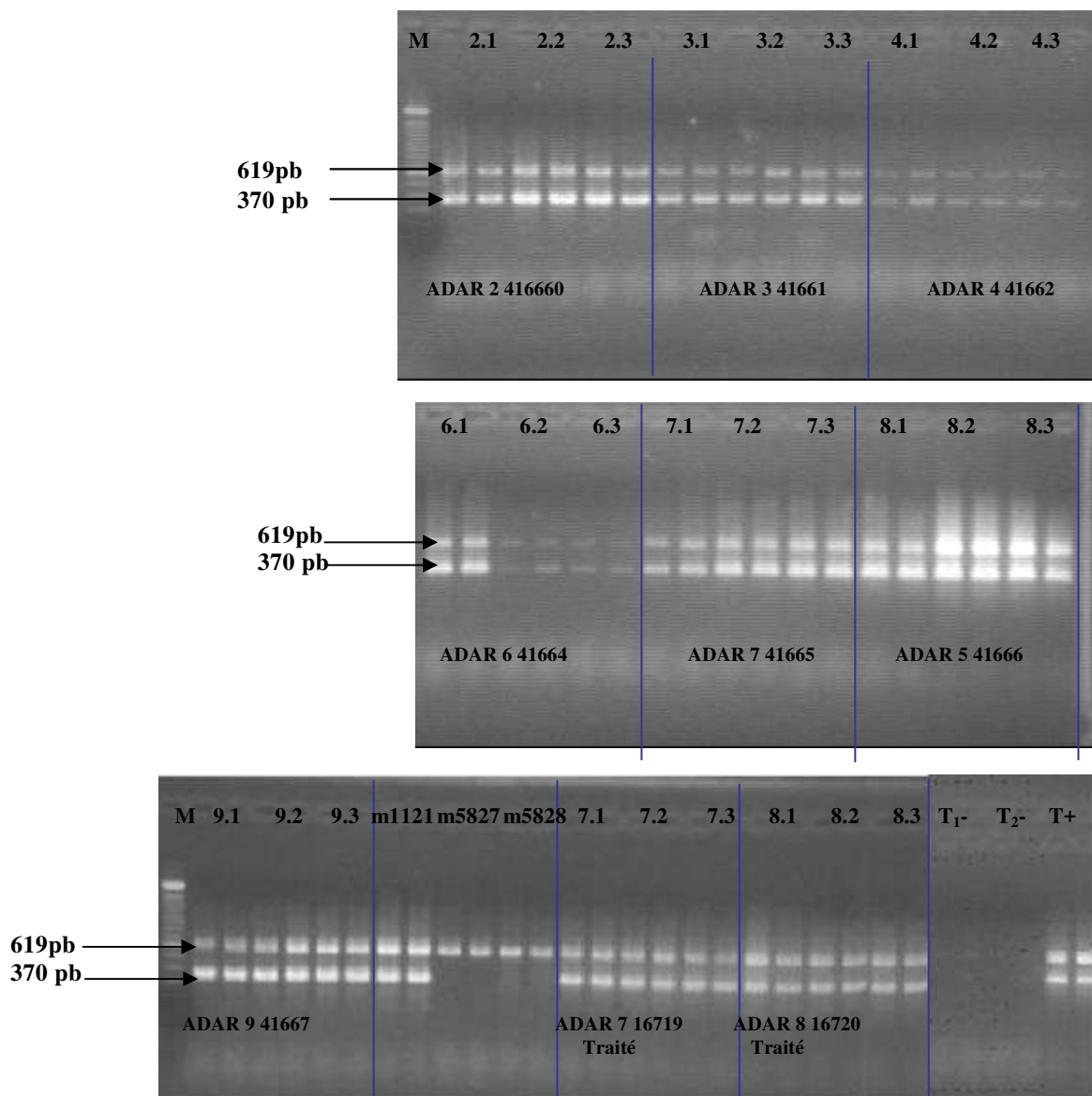
Une bande universelle à 441 pb. et une bande spécifique 619 pb.

M : Marqueur de poids moléculaire à 100 p.b.

T+ (échantillon extrait par broyage à partir de semences inoculées artificiellement par une souche de *X. c. pv. campestris* 1121).

T<sub>1</sub>- Témoin négatif : échantillon extrait à partir de semences de chou saines.

T<sub>2</sub>-Témoin négatif eau



**Figure 2.4 :** Détection de *X. c. pv. raphani* par PCR Multilex (amorces DLH à 619 pb. Pb, amorces zup 370 pb)

m1121 (macérât contaminé par une souche de *X. c. pv campestris*).

m 5827 et m5828 (Macérât contaminé par une souche de *X. c. pv raphani*).

T<sub>+</sub> : Echantillon extrait par broyage à partir de semences inoculées artificiellement par une souche de *X. c. pv campestris*

T<sub>1</sub>- Témoïn négatif : échantillon extrait à partir de semences de chou saines.

T<sub>2</sub>-Témoïn négatif eau

## 2.4 : Discussion :

L'une des exigences de la législation internationale vis-à-vis du contrôle sanitaire des lots de semences est de renseigner sur la viabilité des bactéries dans les semences. De plus suite à la mise en place des techniques de désinfection, il devient nécessaire que les méthodes de détection utilisées soient capables de certifier l'absence de germes vivants dans l'échantillon analysé. Les méthodes de détection officielles adoptées par l'ISTA (*International Seed testing Association*) font appel aux propriétés microbiologiques. Celles-ci restent coûteuses et contraignantes et imposent un délais de réponse de plusieurs semaines (Chitara *et al.*, 2002., Tsygancova *et al.*, 2004., Berg *et al.*, 2005, 2006).

La technique de détection des bactéries vivantes dans les semences que nous envisageons de valider est une technique moléculaire qui combine la croissance du pathogène sur un milieu sélectif suivi d'une amplification spécifique par PCR de l'ADN cible (BIO-PCR) (Schaad *et al.*, 1995). Le milieu de culture utilisé est Le YPACcv. Le milieu de culture YPA est un milieu classique additionné à deux antibiotiques céphalexine et vancomocine couramment utilisés dans d'autres milieux de culture sélectifs de *X. campestris*, mSF et NSCAA respectivement (Schaad, 1989 et Randhawa et Schaad, 1984). Il offre en effet un enrichissement satisfaisant des *X.campestris* avec un temps d'incubation de 40 h et ralentit la croissance de la microflore saprophyte des lots de semences de Brassicacées. Ce milieu de culture semble être le mieux adapté pour un contrôle de routine. Il est simple à préparer et le moins coûteux.

Le couple d'amorces **DLH 120/DLH125** définis sur la séquence génomique du gène *hrpF* qui code pour le système de sécrétion type III (Berg *et al.*, 2005) assure une bonne spécificité vis-à-vis des *Xanthomonas campestris* et offre un bon rendement en produit PCR. Le couple d'amorces universelles **1052 F/BacR** (Eden *et al.*, 1991) a été introduit dans la réaction PCR multiplex pour servir de témoin afin d'éviter les faux négatifs engendrés par la présence éventuelle d'inhibiteurs de la réaction dans le macérât de semences. L'absence de cette bande

dans le profil électrophorétique de la PCR multiplex ne permet pas d'interpréter la réaction.

Le couple d'amorces Zup 9/Zup10 définis sur le gène *XCC2585* (Rijlaardsdam *et al.*, 2004) semble être un bon indicateur du pathovar *raphani*, il reconnaît toutes les souches de *X. c. pv campestris*, deux souches des cinq souches de *X. c. pv. incanae* et ne reconnaît aucune souche de *X. c. pv. raphani*. La visualisation sur le gel d'agarose de deux bandes correspondant à un poids moléculaire de 610 pb et 370 pb implique la présence de *X.c.pv. campestris* et ou *X. c. pv. incanae* et ou *X. c. pv . raphani*. La visualisation d'un seul signal à 619 pb signifie la présence de *X. c. pv . raphani*

Au terme des résultats obtenus lors de cette étude nous pourrions conclure que la technique de BIO PCR est un outil rapide et sensible pour la détection en routine des bactéries vivantes de *X. campestris* dans les lots de semences naturellement contaminés. Un Protocole a été également élaboré expliquant toutes les étapes à suivre pour la réalisation de cette technique.

**(Annexe1).**

## Chapitre 3

# Mise au point d'une Nouvelle technique de détection des bactéries Vivantes dans les semences : La SEED-PCR en temps réel

### 3.1 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, elle est 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. *armoracae*, *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, Fargier *et al.*, 2007) avec une large collection de souches des différents pathovars de *X. campestris* sur une gamme d'hôtes différentielles de la famille des Brassicacées a montré que l'espèce *X. campestris* est en fait restreint à 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

### *Chapitre 3. Détection des X. campestris dans les semences par SEED-PCR*

---

laboratoires officielles pour la détection de ce pathogène sont essentiellement basées sur des tests microbiologiques c'est à dire, isolement sur milieu semi-sélectif des bactéries suspectes suivis d'un test de pouvoir pathogène (Roberts and Koenraad, 2006) adoptée par ISTA (International Seed Testing Initiative). 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 and 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- PCR basée sur un enrichissement en bactéries par une germination des semences sur papier buvard placé dans un phytotron, 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-PCR a été testée sur des lots de semences artificiellement contaminés par *X.c. pv. campestris* à raison d'une graine sur 10 000 graines.

## 3.2 Matériels et méthodes

### 3.2.1 Souches bactériennes

Deux souches de *X. c. pv. campestris* conservées à la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France, ont été utilisées au cours de cette étude. Il s'agit en l'occurrence, 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). Elles peuvent être conservées à - 20°C dans de l'eau stérile.

### 3.2.2 Lots de semences :

Six lots de semences de *Brassicacées* infectés et sains ont été utilisés durant cette étude (tableau 3.4). Ces semences ont été fournies par la SNES, leur état sanitaire avait préalablement été vérifié par méthodes microbiologiques et par BIO-PCR.

### 3.2.3 Contamination artificielle d'un lot 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 ( $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^5$  cfu/ml). 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 un vide égal à - 0,098 Bars pendant 1 min. Les graines ont ensuite été séchées sur du papier filtre pendant 2h puis stockées à température ambiante dans des boîtes de Pétri stériles.

### **3.2.4 Germination des semences contaminées**

Des échantillons de 100 semences chacun issus des graines contaminées préparés comme le paragraphe précédent, ainsi qu'un lot de semences non contaminé utilisé comme témoin négatif ont été mis en germination. La germination a été réalisée dans des germoirs : des boîtes transparentes en polystyrène cristal contenant du papier buvard plissé (Schleicher et schull) humidifié avec 40 ml d'eau stérile. Les graines ont été semées à raison de 2 graines par pli. Les germoirs ont été incubés à 25°C à raison de 8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité par jour, (International Seed Testing Association, 2006). L'observation des symptômes a été réalisée au bout du 7<sup>ème</sup> et du 14<sup>ème</sup> Jours.

### **3.2.5 Etude de la sensibilité de la SEED-PCR en temps réel**

#### **Macération des semences germées :**

Des lots de 100 graines chacun contaminées artificiellement avec une suspension bactérienne (souche type CFBP 1121) de concentration variable allant de 10 à 10<sup>8</sup> cfu/ml sont mis à germer pendant 3, 4, 5, 6 et 7 jours à 25°C à raison de 8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité par jours. Les plantules issues des graines contaminées ont été placées dans un sac en plastique avec filtre de dimension approprié (**BIOREBA**) avec une solution saline stérile (0,85% NaCl) additionnée de Tween 20 (0,02% v/v) à raison de 3ml /g d'échantillon. Le tout est placé sous une agitation à 150-200 rpm pendant 2h à température ambiante. Un millilitre du macérât obtenu a été prélevé dans un microtube de 1,5 ml pour la suite de l'analyse.

#### **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. Il s'agit du protocole décrit par Llop *et al.* (1999) et du protocole basé sur la soude. Le protocole basé sur la soude consiste à prélever 1 ml de macérât dans un microtube de 1,5 ml puis 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 la 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. Les couples d'amorces utilisés durant cette étude ont été préalablement décrits dans la littérature (Eden *et al.*, 1991 and 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 GoTaq Flexi Buffer (promega), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,5 µM de chaque amorce spécifique **DLH 120** (5'CCGTAGCACTTAGTGCAATG3') et **DLH125** (5'GCATTTCCATCGGTCACGAT TG 3'), 0,05 µM de chaque amorce universelle :

**1052-F** (5'GCATGGTTGTCGTCAGCTCGT 3')

et **Bac -R** (5'TACGGCTACCTTGTTACGACT 3'), 0,05U de la GoTaq Flexi Buffer DNA polymérase et 3µl d'ADN cible. Le programme d'amplification est le suivant : Il consiste en une dénaturation de 3 min. à 95°C suivi de 35 cycles de 40 sec. à 95°C, 40 sec. à 63°C (touchdown à 58°C au cours des 6 premiers cycles) et 40 sec. à 72°C. Les produits d'amplification obtenus sont analysés sur 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') et 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, puis 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 iCycler iQ Real Time (BIORAD).

#### **3.2.6 Mise au point d'une méthode de germination adaptée pour 10 000 Graines :**

Trois sous échantillons de semences de chou (ADAR 3) contaminés naturellement composés de 10 000 graines chacun ont été mis à germer selon trois méthodes.

**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 à 25°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 de l'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 par 24h (**méthode 2**) ou à l'obscurité dans un incubateur à 27°C (**méthode 3**).

Un ml de lavât a été prélevé et dilué au 1/10, 1/100 et au 1/1000 dans de l'eau distillée stérile. La charge bactérienne des lots de semences a été testée est estimée par comptage de colonies sur milieu LPGa à raison de 3 répétitions par dilution.

Après trois jours d'incubation, les plantules issues de la germination selon les trois méthodes ont été placées dans un sac en plastique avec filtre de dimension approprié (BIOREBA) avec une solution saline stérile additionnée de 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 obtenue a été prélevé dans un microtube de 1,5 ml pour extraire l'ADN et procéder à une amplification par PCR en temps réel.

### **3.2.7 Comparaison entre la méthode de détection en BIO-PCR et en SEED-PCR en temps réel dans des semences naturellement contaminées**

Une analyse comparative par BIO-PCR et SEED-PCR en temps réel a été menée sur des lots de semences de choux naturellement contaminés par *X.c. pv campestris* et des lots sains. Chaque lot a été subdivisé en trois sous lots de 10 000 graines et soumis au test BIO-PCR et SEED- PCR en temps réel selon les protocoles d'extraction des ADN et d'amplification précédemment décrits.

### 3.2.8 Etude du seuil de sensibilité de la SEED- PCR

Des semences de chou ont été contaminées artificiellement par une suspension bactérienne de *X. c. pv. campestris* à  $8 \times 10^8$  cfu/ml ( $1,6 \times 10^5$  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 : 100 à 1 : 10 000 à raison de trois répétitions par lot. Les lots ainsi formés ont été semés selon la première méthode de germination décrite dans les paragraphes précédents. Après trois jours, les plantules formées ont été prélevées dans un sac (stomacher Bioreba) avec 1 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. puis analysé en PCR en temps réel après extraction de l'ADN.

## 3.3 Résultats

### 3.3.1 Mise au point d'un système de contamination artificiel des semences de chou

Le but de cet essai était de mettre au point un système de contamination artificielle des semences par trempage dans une suspension bactérienne de *X. c. pv. campestris* (CFBP 1121 et CFBP 5241) à une concentration de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  et  $10^5$  cfu/ml. Cet essai pourrait nous rapprocher des conditions réelles de contamination ainsi que des charges bactériennes, la graine pourrait transmettre la maladie 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 charge bactérienne du macérât récolté a été estimée par un comptage de colonies sur milieu LPGa à raison de trois répétitions par dilution. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci dessous.

Concentration en cfu/ml de la suspension bactérienne utilisée pour l'infection	0	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$
Niveau d'infection des graines (cfu/graine) estimé par dénombrement après infection	$\leq 0,4^*$	1 et $1,6 \times 10^3$	$\leq 0,4$	$\leq 0,4$	$\leq 0,4$

**Tableau 3.1 :** Niveau d'infection estimé sur les graines après inoculation

\* limite inférieure de détection des bactéries par échantillon

### Chapitre 3. Détection des *X. campestris* dans les semences par SEED-PCR

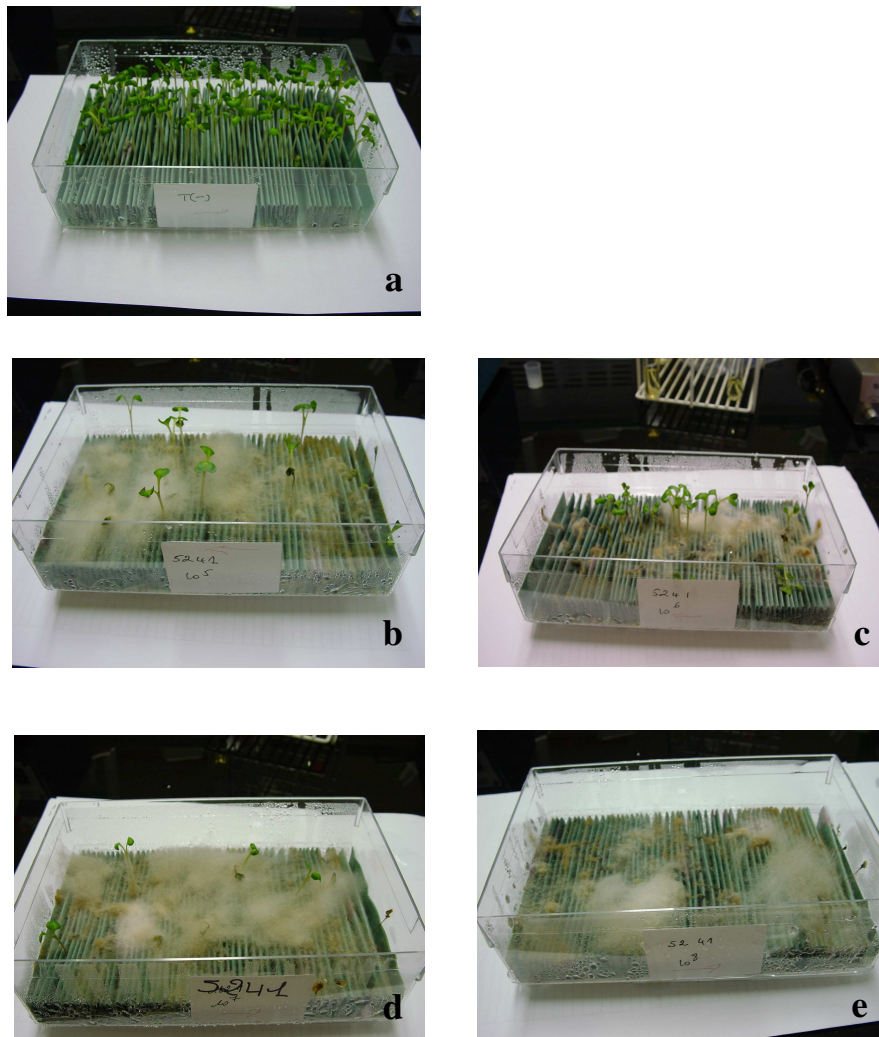
Les graines contaminées par une suspension bactérienne de  $1 \times 10^8$  cfu/ml étaient porteuses d'une population bactérienne d'environ  $1 \times 10^3$  cfu/graine (souche CFBP 1121) et  $1,6 \times 10^3$  cfu /graine (souche CFBP 5241). Aucune colonie n'a été isolée à partir des graines contaminées par les suspensions de concentrations plus faibles ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  cfu/ml) par l'analyse microbiologique effectuée 24 h après inoculation. Nous pouvons donc en conclure que soit chaque graine n'a absorbé que 0,01  $\mu$ l d'inoculum, soit chaque graine a absorbé un volume supérieure et seulement une partie des cellules bactériennes a survécu à l'inoculation.

Les semences de chou contaminées 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. Le taux de plantules malades 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  $10^5$  cfu/ml. Au bout du quatorzième jour, les plantules de tous les lots contaminés étaient malades. Le témoin négatif ne présentait aucun symptôme de la maladie (tableau 3.2, Figure 3.1).

Concentration en cfu/ml de la suspension bactérienne utilisée pour l'infection des semences	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$
Pourcentage de plantules malade après le 7 <sup>eme</sup> jour (1 <sup>ère</sup> notation)	40	40	40	20
Pourcentage de plantules malade après le 14 <sup>eme</sup> jour (2 <sup>ème</sup> notation)	100	100	100	100

**Tableau 3.2 :** Pourcentage des plantules issues de graines contaminées exprimant des symptômes après germination

Ceci indique que les tests microbiologiques effectués avant le semis ont sous-estimé le niveau de contamination des semences. Elles ne concordent pas avec les résultats observés sur les plantules contaminées qui révèlent un développement de maladie mais une absence de détection, 24 heures après inoculation période où les graines ne sont pas encore germées. L'inoculation des semences par la technique utilisée est donc très efficace. Cette technique pourra être utilisée pour avoir des plantules contaminées en vue d'essais de colonisation de plantes via l'infection des semences.



**Figure : 3.1** Photos de symptômes sur plantules de chou contaminées par la souche (CFBP 5241) 14 jours après semis

- (a) : Plantules saines ou témoin négatif
- (b) : Contamination avec une suspension bactérienne de  $10^5$ .
- (c) : Contamination avec une suspension bactérienne de  $10^6$ .
- (d) : Contamination avec une suspension bactérienne de  $10^7$ .
- (e) : Contamination avec une suspension bactérienne de  $10^8$ .

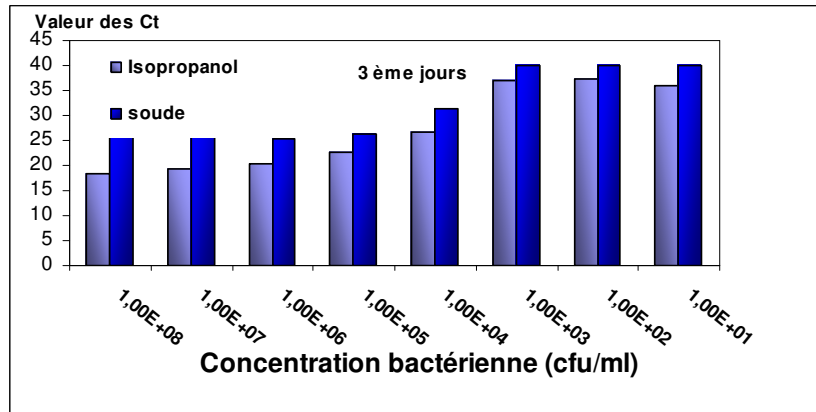
### 3.3.2 Etude de l'efficacité de détection par SEED-PCR en temps réel lorsque les tests sont réalisés sur les semences contaminées par des suspensions bactériennes à différentes charges.

Des graines de chou ont été contaminées par une série de dilution d'une suspension bactérienne de *X. c. pv campestris* (souche CFBP 1121) titrant de  $1 \times 10^8$  cfu/ml à  $1 \times 10$  cfu/ml. Les graines ont été mises à germer à 25 °C 8/16 h pendant différentes périodes (3, 4, 5, 6 et 7 jours). Après germination, les plantules obtenues ont été prélevées puis macérées dans une solution saline et tween 20 à raison de 1g de matière végétale fraîche pour 3ml de solution. L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de 1ml de macérât selon deux protocoles : Llop *et al.*, 1999 et le protocole basé sur la lyse des cellules à la soude précédemment décrit. L'ADN extrait selon les deux protocoles a été amplifié par PCR en temps réel. Le meilleur rendement a été obtenu par extraction selon le protocole décrit par : Llop *et al.* (1999) (Figure 3.2). La PCR en temps réel a pu révéler la présence de bactéries au bout du 3<sup>ème</sup> jour de germination. Une suspension bactérienne calibrée (Témoin) a été également testée par PCR en temps réel Figure 3.3.

### 3.3.3. Dynamique de croissance des bactéries au cours de la germination estimée par PCR en temps réel

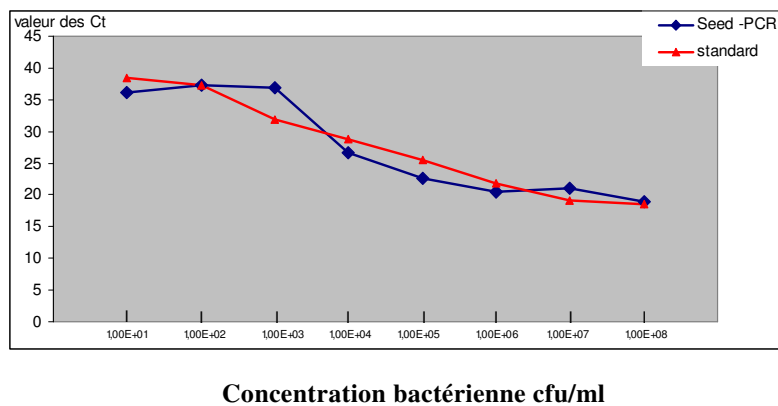
La dynamique de croissance de *X. c. pv campestris* CFBP 1121 a été mesurée sur huit lots de semences contaminés par des suspensions bactériennes allant de 1cfu/ml à  $1 \times 10^8$ /ml (Figure 3.4). Des valeurs de Ct égales à environ 18 sont observées sur les lots inoculés avec les fortes concentrations de bactéries traduisant une contamination forte des plantules. Trois jours après la mise en culture, le niveau de Ct observé est inversement proportionnel à la concentration des suspensions bactériennes utilisées pour l'inoculation des graines. Pour tous les lots inoculés avec des concentrations inférieures à  $1 \times 10^7$  cfu/ml, les valeurs des Ct décroissent alors que la charge bactérienne augmente au cours du temps traduisant une croissance de la population bactérienne dans les plantules. On remarque cependant que pour les graines inoculées par une suspension bactérienne de  $10^1$  cfu/ml et  $10^2$  cfu/ml au bout du 6<sup>ème</sup> jour de germination la charge bactérienne décroît cela est peut être dû à une hétérogénéité de l'infection des échantillons analysés due à la faible concentration de l'inoculum.

### Chapitre 3. Détection des *X. campestris* dans les semences par SEED-PCR



**Figure 3.2 :** Influence du protocole d'extraction de l'ADN pour la détection du *X.c. pv campestris*

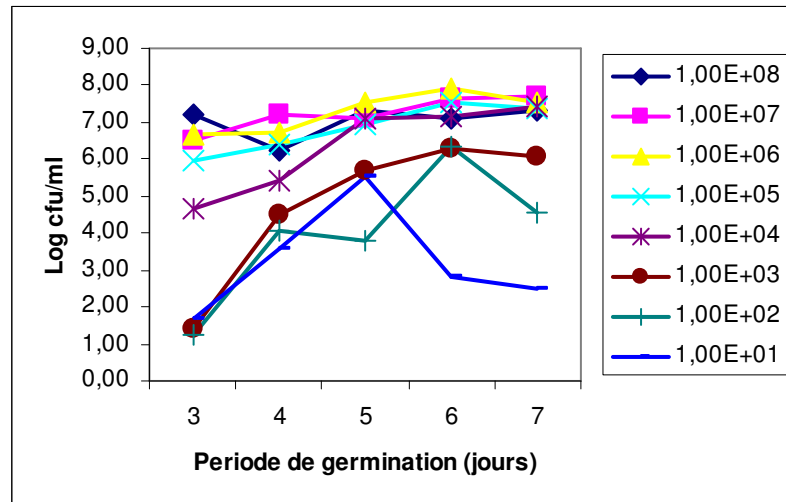
L'influence du protocole d'extraction de l'ADN pour la détection du *X.c. pv campestris* a été mesurée par PCR en temps réel sur une gamme de lots de semences contaminés artificiellement par des suspensions bactériennes à concentration décroissante après trois jours de germination. La concentration d'ADN est estimée par la valeur de Ct observé. Les Ct observés sur les échantillons traités à l'isopropanol sont toujours inférieurs à ceux observés sur les mêmes échantillons traités à la soude.



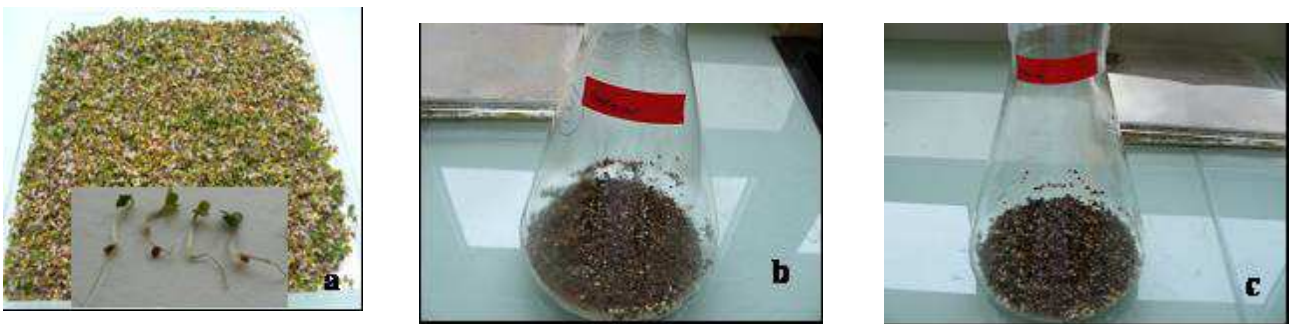
**Figure 3.3 :** Efficacité de la détection de *X.c. pv. campestris* par Seed -PCR en temps réel après trois jours de germination

Les valeurs des Ct ont été obtenues après amplification par PCR en temps réel, d'une suspension bactérienne calibrée témoin (Standard) et une suspension bactérienne obtenue après enrichissement bactérien par germination : SEED -PCR..

Les valeurs en abscisse correspondent à la concentration bactérienne de la suspension Témoin (standard), utilisée pour la contamination initiale des graines 3 jours avant enrichissement. La différence entre les valeurs des Ct témoin et les valeurs des Ct SEED tr- PCR traduit la multiplication des bactéries pendant la germination.



**Figure 3.4 :** Dynamique de croissance des bactéries au cours de la germination estimée par PCR en temps réel



**Figure 3.5 :** Comparaison entre trois méthodes de germination pour 10 000 graines

**a :** Germination des graines dans une boîte en polyéthylène munie d'un papier buvard et incubé dans un phytotron

**b :** Germination des graines dans un Erlene et incubé dans un phytotron

**c :** Germination des graines dans un Erlene et incubé dans un incubateur



### 3.3.4 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 une population bactérienne estimée à  $1,4 \times 10^4$  cfu/graine. 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 ainsi qu'une augmentation de la population bactérienne initiale.

La première méthode s'inspire de la méthode germination de référence de ISTA (International Seed Testing Association). Elle consiste à faire germer 10 000 graines dans une boîte en polyéthylène munie d'un papier buvard maintenue humide. 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 3.5 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 3.5 **b,c**).

Une PCR en temps réel a été effectuée sur l'ADN bactérien extrait à partir des graines germées selon les trois méthodes testées. Les résultats ainsi obtenus sont présentés sur le tableau 3.3. Les valeurs des Ct obtenus par SEED-PCR à partir plantules issues selon la première méthode de germination, traduit une multiplication par un facteur 100 de la population bactérienne. Elle est passée de  $1,4 \times 10^4$  à  $1,15 \times 10^6$  cfu/ml. Les bactéries se multiplient aussi dans les semences en erlen mais d'un facteur 3 seulement. Nous avons donc choisi de retenir la première méthode de germination pour le reste de notre étude.

.

Concentration de départ cfu/ml	Germination					
	Méthode 1		Méthode 2		Méthode 3	
1,4 X 10 <sup>4</sup>	23,84 <sup>a</sup>	1,15x10 <sup>6b</sup>	28,11 <sup>a</sup>	3,42x10 <sup>4 b</sup>	27,96 <sup>a</sup>	3,26x10 <sup>4 b</sup>

**Tableau 3.3 :** Comparaison entre trois méthodes de germination pour 10 000 graines

<sup>a</sup> Valeur des Ct

<sup>b</sup> Concentration bactérienne cfu/ml détuite

Les concentrations bactériennes cfu/ml ont été évaluées grâce à la courbe de régression

$y = - 2,727x + 40$  obtenue avec une suspension bactérienne témoin souche CFBP 1121 de concentration connue allant de  $1 \times 10^8$  à 10 cfu/ml

### **3.3.5 Comparaison entre la méthode de détection en YPGACvc / BIO-PCR et la SEED-PCR 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*. Des lots de semences ont été testés par YPGACvc / BIO-PCR (Fargier *et al.*, 2007) et par SEED-PCR enrichissement naturelle des bactéries par germination pendant 3 jours dans un phytotron suivit d'une extraction d'ADN et une amplification par PCR. L'ensemble des résultats obtenus (tableau 3.4) montre l'efficacité de la SEED-PCR comparée à la BIO-PCR. Les valeurs des Ct obtenus par SEED-PCR dénotent la sensibilité de celle ci, elle permet en effet de révéler la présence de bactéries dans certains échantillons révélés négatifs par la BIO-PCR conventionnelle, cas du 3eme sous échantillon du lot **E-41-661** (ADAR 3).

### 3.3 Résultats

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

**Tableau 3.4 :** Comparaison entre deux méthodes d'enrichissement bactérien la BIO-PCR et la SEED- PCR

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

<sup>b</sup> 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<sup>8</sup> à 10 cfu/ml.

<sup>c</sup> Non testé

### 3.3.6 Seuil de sensibilité de la SEED-PCR en temps réel

La sensibilité de la SEED-PCR a été évaluée sur des semences naturellement et artificiellement contaminées. Des lots de semences constitués chacun de 100, 1000, 10 000 graines ont été contaminés artificiellement par une semence de charge bactérienne  $10^5$  cfu/graine.

L'analyse par SEED-PCR temps réel a permis de détecter la contamination dans tous les lots y compris ceux avec un taux de contamination égale à une graine contaminée par 10 000 graines saines (tableau 3.5).

Le lot E16-725 qui aurait été désinfecté au cours du processus en usine, s'est révélé contaminé, mettant en cause l'efficacité du traitement. La détection de bactéries dans les lots ne peut pas être attribuée à la présence d'ADN des cellules mortes dans les semences car la détection était positive même par BIO-PCR qui est une technique au cours de laquelle la culture sur milieu gélosé hydrolyse les ADN libres.

N° Echantillon	Taux d'infection	PCR en temps réel	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		-	-

**Tableau 3.5:** Etude du seuil de sensibilité de la seed - PCR

### Etude statistique

L'exploitation des résultats obtenus par Test de Duncan à permis de classer les moyennes des Ct par groupe homogène et de distinguer deux groupes homogènes : le groupe **a** regroupant les taux 1 :10 000 et 1 : 1000 et le groupe **b** le taux 1 :100

Lot de semences	Moyenne des Ct	Groupe homogène
1/10 000	23,93	<b>a</b>
1/1000	22,37	<b>a</b>
1/100	20,66	<b>b</b>

**Tableau 3.6** Comparaison de la moyenne des Ct par groupe homogène

### 3.4 Discussion :

La méthode conventionnelle adoptée par 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 (Robert and Koenraadt, 2006). 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 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. Une méthode de germination adaptée pour 10 000 graines a été mise au point. Elle est fondée sur la méthode de référence (ISTA, 2006).

### *Chapitre 3. Détection des X. campestris dans les semences par SEED-PCR*

---

Récemment Berg *et al.* (2006) ont mis au point un couple d'amorces combiné avec une sonde Taq-man définies dans le gène *hrpF* (hypersensitive response and pathogénécité) qui code pour le système de sécrétion de type III. Un enrichissement en bactéries par germination des semences couplé à une Taq-man PCR en temps réel avec le couple d'amorces précité, constitue un protocole fiable et rapide pour détecter jusqu'à 2 équivalents cfu/graine de *X.campestris*.

Le temps de germination proposé est de 3 jours, temps nécessaire pour permettre une germination homogène de toutes les semences semées et une multiplication des *X. campestris* leur permettant d'atteindre un nombre facilement détectable par PCR. De plus, l'ADN des cellules mortes a le temps d'être hydrolyser par les ribonucléases libérées lors de la germination des semences et multiplication des bactéries.

L'efficacité de la SEED- PCR en temps réel a été comparée à la YPACvc BIO-PCR en temps réel et la YPACvc BIO-PCR conventionnel sur des lots de semences contaminées naturellement, désinfectées et saines. Les résultats obtenus tableau 3.4 montre que ces deux techniques sont d'efficacité équivalente, et permettent toutes deux de détecter jusqu'à 10 cfu/ml. La SEED-PCR a l'avantage d'être peu onéreuse, et ne nécessite aucune préparation de milieu.

La sensibilité de la SEED-PCR a été évaluée sur des lots de semences artificiellement comtaminés à des différents taux 1 : 100, 1 : 1000 et 1 : 10 000.

La détection des amplicons de la SEED-PCR permet de révéler jusqu'à une graine contaminée parmi 10 000 graines saines. Ces résultats sont répétitifs pour l'ensemble des trois répétitions.

## Conclusion générale

L'objectif de cette étude était de proposer de nouveaux outils moléculaires fiables et rapides pour la détection des bactéries vivantes dans les semences de choux.

La première partie de ce travail consistait à rechercher les marqueurs moléculaires de la viabilité de *X. c. pv campestris* afin de mettre au point une technique de détection des ARNm par RT-PCR (Transcription inverse couplée à une amplification par PCR).

La RT-PCR a été optimisée et a permis de détecter les transcrits de deux gènes cibles : Le gène *rpoD* et gène *gyrB*. Par contre nous n'avons pas obtenu de transcrit pour les gènes *galA* et *XCC2585*, soit parce qu'ils ne sont pas exprimés, soit parce qu'ils sont induits dans les conditions qui n'étaient pas présentes au cours de la culture des bactéries. Cependant l'élaboration de cette technique s'est révélée particulièrement complexe. L'extraction des ARNm qui sont instables et rapidement dégradables par les RNase du milieu est une étape critique de la technique. Le protocole d'extraction décrit par LIop (1999) offre le meilleur rendement en ARN mais ne permet pas d'éliminer définitivement l'ADN génomique même après un traitement à l'ADase. Ce qui peut être à l'origine de faux positifs.

Au terme de ce travail préliminaire, si l'on compare les résultats obtenus par PCR et par RT-PCR en terme de sensibilité, la PCR relativement simple et rapide dans sa mise en œuvre peut offrir une sensibilité de l'ordre de 10 cfu/ml. Alors que la RT-PCR ne détecte pas de cible au delà de 10<sup>4</sup>cfu/ml. Ce qui s'avère insuffisant dans le cadre d'une procédure de contrôle et de certification.

La deuxième technique est basée sur un enrichissement bactérien couplé à une amplification de l'ADN cible par PCR permettant la détection des *X. campestris* vivants dans les semences de choux. La BIO-PCR est un enrichissement des *X. campestris* contenus dans le macérât des graines pendant 40 à 45 h sur le milieu

semi sélectif YPACvc . Cette technique a été validée sur des lots de semences variés, naturellement contaminés et a prouvé son efficacité pour détecter la présence de *X. campestris*.

La troisième technique que nous avons mis au point est basée sur un enrichissement utilisant le processus naturel de colonisation de *X. campestris* lors de la germination des plantules issus de semences contaminées, suivis d'une PCR en temps réel (SEED- PCR). Nous avons démontré qu'un temps de germination de 3 jours est suffisant pour détecter jusqu'à 1 graine contaminée parmi 10 000 graines saines. Cette durée est nécessaire pour permettre une germination homogène de toutes les semences semées et une multiplication des *X. campestris*. Cette technique a prouvé son efficacité pour détecter des lots de semences naturellement infectées.

Les résultats de mise au point de la SEED- PCR laisse apparaître une efficacité comparable à celle de la BIO-PCR. La SEED- PCR a l'avantage d'être peu onéreuse et ne nécessite aucune préparation de milieu. Elle est la mieux adaptée dans le cadre d'une procédure de contrôle de routine des lots de semences à certifier.



## **Références bibliographiques**

|



## Références bibliographiques

- ANONYME, 1998:** OEPP Organisation Européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes. Directives sur la bonne pratique phytosanitaire (légumes du genre brassica) PP 2/7 (1) Français
- ANONYME, 2007.** Donnée statistique, Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.
- AL-SHEHBAZ I. A., 1984.** The tribes of Cruciferae (Brassicaceae) in the southeastern United States. *J. Arnold Arbor.* 65: 343–373.
- AL-SHEHBAZ, I. A., BEILSTEIN MA & KELLOGG EA, 2006.** Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution* 259, 89-120.
- ALVAREZ, A.M., BENEDICT A.A., MIZUMOTO C.Y., HUNTER J.E. & GABRIEL DW. , 1994.** Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. *Phytopathology* 84, 1449-1457
- ANDREWES, A.G., JENKINS C.L., STARR M.P., SHEPHERD J. & HOPE H. , 1976.** Structure of xanthomonadin I, a novel dibrominated aryl-polyene pigment produced by the bacterium *Xanthomonas juglandis*. *Tetrahedron Letters* 45, 4023-4024.
- BAGASTRA, O. & HANSEN J., 1997.** In situ PCR techniques. John Wiley & Sons, INC publication, 141 : 7-9
- BAILEY, C.D., KOCH M.A., Mayer M., Mummenhoff K., O'Kane Jr. SL, Warwick SI, Windham M.D., & Al-Shehbaz I.A., 2006.** Toward a Global Phylogeny of the Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution* 23, 2142-2160.
- BARBER, C. E., TANG, J.L., FENG, J.-X., PAN, M.-Q., WILSON, T.J. G., SLATER, H., DOW, J. M., WILLIAMS, P., & DANIELS, M. J., 1997.** A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol* 24:555-566.
- BECKER, A., KATZEN F., PUHLER A. & IELPI L., 1998.** Xanthan gum biosynthesis and application a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50, 145-152.
- BERG, T., TESORIERO L. & HAILSTONES D.L., 2005.** PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in Brassica seed. *Plant Pathology* 54, 416-427.
- BERG, T., TESORIERO L. & HAILSTONES D.L., 2006.** A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Letters in Applied Microbiology* 42, 624-630.
- BERGEY'S MANUEL OF SYSTEMATIC BACTÉRIOLOGY.** Volume 2: The proteobacter (part B), 2<sup>nd</sup> Ed, 2005). ISBN : 13 : 9780387241449,

## *Références bibliographiques*

**BERGEY, D.H., HARRISON F.C., BREED R.S., HAMMER BW. & HUNTOON FM, 1923.** Bergey's manual of determinative bacteriology, 1st Edition, Baltimore: Williams and Wilkins, Co. 442 pages.

**BLAKEMAN J.P., 1991.** Foliar bacterial pathogens: Epiphytic growth and interactions on leaves. *Journal of applied bacteriology* 70, no. Suppl

**BRADBURY J. F., 1986.** Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute. Kew, Surrey, UK. 198-260.

**BRADBURY J. F., 1986.** Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute. Kew, Surrey, UK. 198-260.

**BUHOT N., 2003.** Rôle des élicitines et des protéines de transfert de lipides dans l'induction de la résistance des plantes à leurs agents pathogènes. Thèse de doctorat Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université de Bourgogne. Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé

**BURKHOLDER W.H., 1930.** The genus *Phytopomonas*. *Phytopathology* 20, 1-23

**BURKHOLDER ,W.H., 1941.** The black rot of *Barbarea vulgaris*. *Phytopathology* 31, 347-348.

**BURRILL T.J., 1882.** The bacteria : An account of their nature and effects, together with a systematic description of the species. Illinois Industrial University, 11<sup>th</sup> Report: 93-157

**CAVELL, AC, LYDIATE DC, PARKIN IAP, DEAN C. & TRICK M., 1998.** Collinearity between a 30-centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome. *Genome* 41, 62-69.

**Catalogue des souches ,2006 .** Collection Française de bactéries phytopathogènes. 7eme édition. [www.intranet.angers.inra.fr/cfbp](http://www.intranet.angers.inra.fr/cfbp)

**CHALANDRE M.C., 2000.** Eléments de Botanique : Cours de première année de Pharmacie. UFR de Pharmacie et Ingénierie de la Santé - ANGERS [[http://www.123bio.net/cours/bv/bv\\_4.html#cappa](http://www.123bio.net/cours/bv/bv_4.html#cappa)].

**CHANG, C.J., DONALDSON R., CROWLEY M. & PINNOW D. A., 1991.** New semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology* 81, 449-453.

**CHAPUT J. I. M., 2000.** Les ravageurs des crucifères cultivées. ISSN 1198-7138

**CHUN W.W.C., 2002.** Xanthomonadins, Unique Yellow Pigments of the Genus *Xanthomonas*. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-A-2000-0824-01

## Références bibliographiques

**COLLIN, F. & SERPEILLE A., 2000.** Inventaire des maladies en production de semence de chou. Proceedings of AFPP Sixième conférence internationale sur les maladies des Plantes. Tours, France, 403-410.

**COOK, A.A., LARSON RH & WALKER J.C., 1952.** Relation of the black rot pathogene to cabbage seed. *Phytopathology* 42, 316-320.

**CROSA, J. M. D., BRENNER, D. J. & FALKOW, S., 1973.** Use of a single strand-specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *J Bacteriol* 115, 904-911.

**DA SILVA, A.C., FERRO J.A., REINACH F.C., FARAH C.S., FURLAN LR, QUAGGIO R.B., MONTERO-VITORELLO C.B., VAN SLUYS M.A., ALMEIDA NF, ALVES L.M.C., DO AMARAL A.M., BERTOLINIMC, CAMARGO L.E.A., CAMAROTTE G., CANNAVAN F., CARDOZO J., CHAMBERGO F., CIAPINA L.P., CICALI R.B.M., COUTINHO L.L., CURTINO-SANTOS J.R., EL-DORRY H, FARIA J.B., FERREIRA A.J.S., FERREIRA R.C.C., FERRO M.I.T., FORMIGHIERI E.F., FRANCO M.C., GREGGIO C.C., GRUBER A., KATSUYAMA A.M., KISHI L.T., LEITE R.P., LEMOS E.G.M., LEMOS M.V.F., LOCALI E.C., MACHADO M.A., MADEIRA AMBN, MARTINEZ-ROSSI N.M., MARTINS E.C., MEIDANIS J., MENK C.F.M., MIYAKI C.Y., MOON D.H., MOREIRA L.M., NOTO M.T.M., OKURA V.K., OLIVEIRA M.C., OLIVEIRA V.R., PEREIRA H.A., ROSSI A., SENA J.A.D., SILVA. C., DE SOUZA R.F., SPINOLA L.A.F., TAKITA M.A., TAMURA R.E., TEIXEIRA E.C., TEZZA R.I.D., TRINDADE D.O.S. SANTOS M., TRUFFI D., TSAI S.M., WHITE F.F., SETUBAL J.C. & KITAJIMA JP, 2002.** Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417, 459-463.

**DANIELS, M.J., BARBER C.E., TURNER P.C., SAWCZYK M.K., BYRDE B.W. & FIELDING AH, 1984.** Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *The EMBO Journal* 3, 3323-3328.

**DAWSON, W.J., 1939.** On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. *Zentralblatt für Bakteriologie u.s.w. Abt.2100*, 177-193.

**DE VOS, P, DE LEY J., 1983.** Intra- and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 33, 487-509.

**DUPONT F. & GUIGNARD J.L., 2007.** Les Brassicacées (Brassicales). *Botanique: Système moléculaire*. P. 178 à 179 ISBN 2294047923, 9782294047923.

## Références bibliographiques

- DYE, D.W., BRADBURY J.F., GOTO M., HAYWARD A., LELLIOTT R.A. & SCHROTH MN, 1980.** International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology* 59, 153-168.
- DYE, D W. & LELLIOT RA 1974.** Genus II. *Xanthomonas*. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, edited by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons. Baltimore: Williams and Wilkins, Co.
- DZHALILOV, F S. & TIWARI R. D., 1995.** Soil and cabbage plant debris as infection sources of black rot. *Archives f'ur Phytopathologische und Pflanzenschutz* 29, 383-386.
- EDEN, P.A., SCHMIDT T.M., BLACKEMORE R.P. & PACE N.R., 1991.** Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using Polymerase Chain Reaction Amplified 16S rRNA specific DNA. *International Journal of systematic Bacteriology* 41, 324-325.
- FABER F.C. VON, 1907.** Uber eine bakterienkrankheit der Levkoyen. *Arb.K. boil. Anst. f. Land. u. Forstw.* 5, 489-492.
- FARGIER, E., 2003.** Recherche de marqueurs de viabilité chez *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en vue de sa détection dans les semences de chou. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'étude approfondie.
- FARGIER, E. & MANCEAU C, 2007.** Pathogenicity assays restrict the *Xanthomonas campestris* species (Vauterin *et al.*, 1995) into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology*, 56:805- 818.  
1<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/systematique/nomenclature.html>
- FARGIER, E., BRIAND B., BRIN C., GUILLAUMES J. & MANCEAU C., 2007.** Detection of living cells of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on crucifers in seed by BIO-PCR.
- FARGIER, E., FISCHER LE SAUX M. & MANCEAU C, 2007.** Recombination and point mutation contribute to the high genetic diversity of *Xanthomonas campestris* (Vauterin *et al.*, 1995) and to the complex structure of pathovars. Mai 2007. *Applied and Environmental Microbiology* (soumis).
- FISLAGE, R., BERCEAU M., HUMBOLDT Y., WEND M. & OBERENDER H., 1997.** Primer design for prokaryotic differential display. *oxford University press* 25 : 1830-1835.
- Food & Agricultural Research Council (FARC) , 2005. Fiche technique PP 6 / 05

## *Références bibliographiques*

**FRANKEN, A.A.J.M., VAN ZEIJL C., VAN BILSEN J.G.P.M., NEUVEL A., DEVOGEL R., VAN WINGERDEN Y., BIRNBAUM Y.E., VAN HATEREN J., VAN DER ZOUWEN P.S., 1991.** Evaluation of a plating assay for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Seed Science and Technology* 19, 215-26

**GRIMM, R. & VOGELSANGER J., 1990 .** Black rot disease on cabbage, irrigation and spreading. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Budapest, Hungary, June 11-16, 1989. *Ukad´emiai Kiad´o*, Budapest, 225- 229.

**GUO, H., DICKSON M.H. & HUNTER J.E., 1991.** Brassica napus sources of resistance to black rot in crucifers and inheritance of resistance. *Hort Science* 26, 1545-1547.

**HALL, C.J.J VAN, 1900.** Twee bakterienziekten. *Tijdschr. over Plantenziekten* 6, 169-177.

**HANAGE, W.P., FRASER C. & SPRATT B.G., 2006.** Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 1917-1927.

**HAYWARD A.C., 1974.** Latent infection by bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 12, 87-97.

**HAUBEN, L., VAUTERIN L., SWINGS J. & MOORE E.R., 1997.** Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 47, 328-335.

**HEDGE I. C., 1976.** A systematic and geographical survey of the Old World Cruciferae. In: MacLeod A. J., Jones B. M. G. (eds.) *The biology and chemistry of the Cruciferae*. Academic Press, London New York San Francisco, pp. 1-45.

**HEID, C.A., STEVENS J., LIVAK K. J. & WILLIAMS P. M., 1996.** Real-time Quantitative PCR. *Genome Res.*, 6 : 986-994.

**HELMUT, B. WIDNER F., SIGLER W.V. & JOSEF Z., 2003.** mRNA Extraction and Reverse Transcriptase-PCR protocol for Detection of nifH Gene Expression by *Azobactere vinelandi* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 : 1928-1935

**HENSON J. M., 1993.** The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Ann. Rev. phytopathology.*, 31 : 81-109.

**HANAGE, W.P., FRASER C. & SPRATT B.G., 2006.** Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 1917-1927

### *Références bibliographiques*

**HUANG, T.C. & LEE H.L., 1988.** Hot acidified zinc sulfate as seed soaking agent for the control of crucifer black rot. *Plant Protection Bulletin* (Taiwan) 30, 245-258.

**HUGOUVIEUX, V., BARBER C.E. & DANIELS M.J., 1998.** Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into Hydathodes of *Arabidopsis thaliana* Leaves: A System for Studying Early Infection Events in Bacterial Pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 537-543.

**HUMAYDAN, H.S., HARMAN G.E., NEDROW B.L. & DINITTO LV, 1980.** Eradication of *Xanthomonas campestris*, the causal agent of black rot from Brassica seeds with antibiotics and sodium hypochlorite. *Phytopathology* 70, 127-131.

**HUNTER, J.E., ABAWI G.S. & BECKER R.F., 1975.** Observation on the source and spread of *Xanthomonas campestris* in an epidemic of black rot in New York. *Plant Disease Reporter* 59, 384-387.

**ISHI-Vegetable, 2000.** *Xanthomonas campestris* on Brassicaceae. Seed Health Testing Methods Reference Manual. 16-20.

**INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA), 2007,** Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp.7-019.

**ITO, S, USHIJIMA Y., FUJII Y., TANAKA S., KAMEY A. IWAKI M., YASHIWARU S. & KISHI F., 1998.** Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *Journal of Phytopathology* 146, 369-84.

**JANSE J.D., 2006.** The study of bacterie that cause diseases in plants. *Phytobacteriology principales and practice*. P 34. ISBN – 13 : 978-1-84593-025-7.

**JOSEPHSON, K.L., GERBA C.P. & PEPPER I.L., 1993.** Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 59,3513- 3515.

**KAMOUN, S., KAMDAR H.V., TOLA E. & KADO C.I., 1992.** Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive responses: role of the *hrpX* locus. *Molecular plant-microbe interactions* 5, 22-33.

**KENDRICK, J.B. & BAKER K.F., 1942.** Bacterial blight of garden stocks and its control by hot-water seed treatment. *Bulletin of the California Agricultural Experiment Station* 665, 1-23.

**KIM, J.G, CHOI S, OH J., MOON J.S. & HWANG I., 2006.** Comparative analysis of three indigenous plasmids from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *Plasmid*.56, 79-87.

**KLEIN, P.G. & JUNEJA V.K., 1997.** Sensitive detection of viable *Listeria monocystogenes* by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4441- 4448.



### *Références bibliographiques*

**KNÖSEL D., 1961.** Eine an Kohl blattfleckerzeugende Varietas von *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten (Pflanzenpathologie) und Pflanzenschutz 68, 1-6.

**KOCKS, C.G. & ZADOKS J.C., 1996.** Cabbage refuses piles as source of inoculum for black rot epidemics. *Plant Disease* 80, 789-792.

**KOCH, M., AL-SHEHBAZ I. A. & MUMMENHOFF K., 2003a.** Molecular systematics, evolution, and population biology in the mustard family (Brassicaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 90: 151-171.

**KORKMAZ,<sup>1</sup> S. , ONDER S. <sup>1</sup>, TOMITAKA<sup>2</sup> Y. & OHSIMA<sup>2</sup> K., 2006.** First report of Turnip mosaic virus on Brassicaceae crops in Turkey Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Canakkale Onsekiz Mart, 17020 Canakkale, Turkey

**KUAN, T.L., MINSAVAGE G.V. & SCHAAD NW, 1986.** Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected Brassica campestris. *Plant Disease* 70, 409-413.

**LAN ,T.H. & PATERSON A.H., 2000.** Comparative Mapping of Quantitative Trait Loci Sculpting the Curd of Brassica oleracea. *Genetics* 155, 1927-1954.

**LANEUVILLE S. I. , 2004.** Étude de l'interaction associative entre la  $\beta$  - lactoglobuline et le xanthane natif ou le xanthane traité aux hautes pressions hydrodynamiques. Thèse de Doctorat (Ph.D.) Sciences et Technologie des Aliments .faculté des Sciences de L'Agriculture et de L'Alimentation Université Laval QUÉBEC

**LAPAGE, S.P., SNEATH PH.A., Lessel E.F., Skerman VB.D., Seeliger H.P.R. & Clark W.A., (1976 Revision), 1975.** International Code of Nomenclature of Bacteria. *American Society for Microbiology*, Washington, DC: 180 pp.

**LARZULE D., 1993.** La PCR, un procédé de répliation in vitro. Edition Médicinales Internationales, 26 : 27, 387p.

**LEPOIVRE P., 2003.** Détection et identification des agents phytopathogènes. *Phytopathologie*. P. 229, 346. ISBN : 2-804164115-2.

**LECHEVALIER, H. & LECHEVALIER MP, 1988.** Chemotaxonomic use of lipids an overview. In: *Microbial Lipids*, Vol. 1, Ratledge, C. and Wilkinson, S.G., Eds., Academic Press, San Diego, CA. 869-902.

**LEE ,B.M., PARK Y.J., PARK D.S., KANG H.W., KIM J.G., SONG E.S., PARK I.C., YOON U.H, HAHN J.H., KOO B.S., LEE G.B., KIM H., PARK H.S., YOON K.O., KIM J.H., JUNG C.H. & KOH N.H., 2005.** The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research* 33, 577-586.

### Références bibliographiques

- LIOP, P., CARUSO P., CUBERO J., MORENTE C. & LOPEZ M.M., 1999.** A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* 37, 23-31.
- MADR, 2009.** Ministère de l'agriculture et du Développement Rural.
- MAIDEN, M.C., BYGRAVES J.A., FEIL E., MORELLI G., RUSSELL J.E., URWIN R., ZHANG Q., ZHOU J., ZURTH K., CAUGANT D.A., FEATHERS I.M., ACHTMAN M. & SPRATT B.G., 1998.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 3140-3145.
- MASMOUDI, K., DUBY C., SUHAS M., GUI J. Q., TAYLOR J. D & MAURY Y., 1994.** Quality control of peas seed for pea seed-borne Mosaic Virus. *Seed Science and Technology*, 22 :407-414.
- MASSOMO, S.M.S., MORTENSEN C.N., MABAGALA R.B., NEWMAN M.A. & HOCKENHULL J., 2004.** Biological Control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *Journal of Phytopathology* 152, 98-105.
- MASSOMO, S.M.S., NIELSEN H., MABAGALA R.B., MANSFELD-GIESE K., HOCKENHULL J. & MORTENSEN C.N., 2003.** Identification and characterisation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains from Tanzania by pathogenicity tests, Biolog, rep-PCR and fatty acid methyl ester analysis. *European Journal of Plant Pathology* 109, 775-89.
- MASTERS, C.I., SHALLCROSS J.A. & MACKEY B.M., 1994.** Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *Journal of applied bacteriology* 77, 73-79.
- MAURIN, G., PATERMELLE M. C. & CLUZEAU S. , 1999.** Guide Pratique de défense des cultures  
P. 33-36 ISBN : 2-85794-182-X 5ème édition
- McCULLOCH, L., 1929.** A bacterial leaf spot of horse-radish caused by *Bacterium campestre* var. *armoraciae* n. var. *Journal of Agricultural Research* 38, 269-287.
- MESSIAEN, C.M., BLANCARD D., ROUXEL F. & LAFON R., 1991.** Les maladies des plantes maraîchères. INRA, Paris, FRANCE 552 pp.
- NOLASCO, G., DE BLAS C., TORNE V. & PONE F., 1993.** Method combining immunocapture and PCR amplification in microtitration plate for the detection of plant virus and subviral pathogens. *J. of virological meth.*, 45 : 201-208.
- NOLASCO, G., SEQUEIRA Z., SOARES C., MANSINHO A., BAILEY A. M. & NIBLETT C.L., 2002.** Asymmetric PCR ELISA: increased sensitivity and reduced cost for the detection of plant viruses. *J. of plant pathol.*, 108: 293-298.

### *Références bibliographiques*

**O'NEILL, C.M. & BANCROFT I., 2000.** Comparative physical mapping of segments of the genome of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* that are homoeologous to sequenced regions of chromosomes 4 and 5 of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 23, 233-243.

**OCHIAI, H., INOUE Y., TAKEYA M., SASAKI A. & KAKU H., 2005.** Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. *JARQ Japan Agricultural Research Quarterly* 39, 275-287.

### **Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.**

**PAMMEL, L.H., 1895.** Bacteriosis of rutabaga (*Bacillus campestris* n. sp.). *Bulletin of the Iowa State College Agriculture Experiment Station* 27, 130-134.

**PARADIES, F., 1999.** Caractérisation biologique et moléculaire de trois isolats du virus de la mosaïque du concombre (CMV) provenant de la vigne et d'orangers. Thèse de Master CIHEM de Bari, p10 à 12, 58p

**PARK, Y.J., LEE B.M., HO-HAHN J., LEE G.B. & PARK D.S., 2004.** Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species-specific primers based on *hrpF* gene sequences. *Microbiological Research* 159, 419-423.

**PARKER, J. E., BARBER C.E., FAN M.J. & DANIELS M.J., 1993.** Interaction of *Xanthomonas campestris* with *Arabidopsis thaliana*: characterization of a gene from *X.c.* pv. *raphani* that confers avirulence to most *A. thaliana* accessions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6, 216-224.

**PATEL, M.K., ABHYANKAR S.G., & KULKARNI Y.S., 1949.** Black rot of cabbage. *Indian Phytopathology* 2, 58-61.

**PATERSON, A.H., BOWERS J.E., ESTILL J.C., OSBORN T.C., PIRES J.C., AMASINO R., QUIROS C.F. & FARNHAM M., 2006.** Evolutionary history of the angiosperms and its relevance to Brassica. In proceeding of the joint meeting of the XIV Crucifer Genetics Workshop and the IV ISHS International Symposium on Brassicas. edited by Y.P. Lim in *Acta Horticulturae* 706, 49-54.

**POPLAWSKY, A. R. & CHUN, W. 1997.** *pigB* determines a diffusible factor needed for EPS and xanthomonadin production in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Bacteriol.* 179:439-444.

**POPLAWSKY, A.R. & CHUN W., 1998.** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* requires a functional *pigB* for epiphytic survival and host infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 466-475.

### *Références bibliographiques*

**POPLAWSKY, A.R. & CHUN W., 2002.** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* extracellular polysaccharide is required for natural host infection as well as virulence. *Phytopathology* 92, S66.

**POPLAWSKY, A.R., URBAN S.C. & CHUN W., 2000.** Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5123-5127.

**POPLAWSKY, A. R., WALTERS, D. M., ROUVIERE, P. E., AND CHUN, W. 2005.** A Gene for a Dioxygenase-like Protein Determines the Production of the DF Signal in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Molecular plant pathology* 6, 653-657.

**QIAN, W., JIAY., REN S.X., HE Y.Q., FENG J.X., LU L.F, SUN Q., YING G., TANG D.J., TANG H., WU W., HAO P., WANG L., JIANG B.L., ZENG S., GU W.Y., LU G., RONG L.,TIAN Y., YAO Z., FU G., CHEN B., FANG R., QIANG B., CHEN Z., ZHAO G.P., TANG J.L.,HE C., 2005.** Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Research* 15, 757-767.

**RADEMAKER ,J.L.W., LOUWS F.J., SCHULTZ M.H., ROSSBACH U., VAUTERIN L., SWINGS J. & DE BRUIJN. F.J., 2005.** A Comprehensive Species to Strain Taxonomic Framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 95, 1098-1111.

**RANDHAWA, P.S. & Schaad NW, 1984.** Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology* 74, 268-272.

**RAT, B. & CHAUVEAU J. F., 1985.** La nervation des crucifères. *Phytoma*, 41-42.

**RIJLAARSDAM, A., WOUTD B., SIMONS G., KOENRAAD T., OOSTERHOF J., ASMA M., BUDDIGER P., ROORDA P., GRIMAULT V. & DE KOENING J. 2004.** Development of specific primer for the molecular detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. EPPO Conference on Quality of Diagnosis and New Diagnostic Methods for Plant Pests. Noordwijkerhout, NL, 2004-04-19/22. <sup>22</sup>On-lineposter [http://archives.eppo.org/MEETINGS/2004\\_meetings/diag\\_posters/poster\\_deKoning2.pdf](http://archives.eppo.org/MEETINGS/2004_meetings/diag_posters/poster_deKoning2.pdf)

**ROBERTS S.J., 1999.** Thresholds, standards, tests, transmission and risks. In : Proceedings of 3<sup>rd</sup> ISTA Seed Health Symposium, Ames, Iowa, USA, 16-19 August 1999. pp. 20-24. ISTA, Zurich, Switzerland.

**ROBERSON, E.B. & FIRESTONE M.K., 1992.** Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil Pseudomonas sp. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1284-1291.

**ROBERTS, S.J. & KOENRAADT H, 2002.** Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage (Brassica). International Seed Health Initiative - Vegetable DRAFT.

### Références bibliographiques

**ROBERTS, S.J. & KOENRAADT H., 2006.** 7-019: Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. Version 3.0, 05 July 2006. International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter Seed Health Testing Methods. International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland (<http://www.seedtest.org/en/content—1-1132-241.html>)

**ROBERTS, S.J., PHELPS K., TAYLOR J.D. & RIDOUT M.S., 1993.** Design and interpretation of seed health assays. In: Sheppard, J.W., (Ed.) Proceedings of the First ISTA Plant Disease Committee Symposium on Seed Health Testing, Ottawa, Canada. pp. 115-125. Agriculture Canada, Ottawa, Canada

**RUISSEN, M.A. & GIELINK A.J., 1994.** The development of black rot in cabbage as a result of differences in guttation between cultivars, and the relation of guttation to infectiousness. Colloque - INRA in *Proceedings of the 8th International conference on Plant Pathogenic Bacteria* 66, 767-774.

**SADDLER, G.S., BRADBURY J.F., 2005.** Family I. *Xanthomonadaceae* fam. nov. In:GM Garrity, DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley editors in *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology second edition, vol. 2* (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), Springer, New York, 2005, 63-90.

**SALZBERG, S.L., SOMMER D.D., SCHATZ M.C., PHILLIPPY A.M., RABINOWICZ P.D., TSUGE S., FURUTANI A., OCHIAI H., DELCHER A.L., KELLEY D., MADUPU R., PUIU D., RADUNE D., SHUMWAY M., TRAPNELL C., APARNA G., JHA G., PANDEY A., PATIL P.B., ISHIHARA H., MEYER D.F., SZUREK BORIS, VERDIER VALÉRIE, KOEBNIK RALF, DOW J.M., RYAN R.P., HIRATA H., TSUYUMU S., WON LEE S., RONALD P.C., SONTI R.V. & VAN SLUYS M.A., 2008.** Leach J.E., White F.F., Bogdanove A.J. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BioMed Central Genomics*, 9 (204), p. 1-16.

**SAMISH, Z., ETINGER-TULCZYNSKA R. & BICK M., 1963.** The flora within the tissue of fruit and vegetables. *Journal of Food Science* 28, 259-266.

**SARKAR SF, GUTTMAN DS, 2004.** Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1999-2012.

**SAUER J.D., 1993.** Historical geography of crop plants - a select roster. CRC Press, Boca Raton, Florida.

**SAVASTANO L., 1886.** Les maladies de l'olivier : hyperplasies et tumeurs. Paris, Comptes Rendues de l'Academie des Sciences 103, 1278-1281.

**SCHAAD N.W, 1989.** Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifers. In: Saettler AW, Schaad NW, Roth DA, editors. Detection of plant pathogenic bacteria in seed and other planting material. St. Paul, MN: *The American Phytopathological Society Press*; 68-75

### *Références bibliographiques*

**SHAAD N. W.**, 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3<sup>rd</sup> Edition. ISBN : 0-89054-263-5.

**SCHAAD, N.W. & ALVAREZ A**, 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Cause of black rot of crucifers. In: Swing JG and Civerolo EL (eds) *Xanthomonas*, Chapman and Hall, London, United Kingdom, 51-56.

**SCHAAD, N.W., CHEONG S.S., TAMAKI S., HATZILOUKAS E. & PANOPOULOS N.J.**, 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85, 243-8

**SCHAAD, N.W. & DIANESE J.C.**, 1981. Cruciferous weeds as source of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology* 71, 1215-1220.

**SCHAAD, N.W., GABRIELSON R.L. & MULANAX M.W.**, 1980. Hot Acidified Cupric Acetate Soaks for Eradication of *Xanthomonas campestris* from Crucifer Seeds. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 803-807.

**SCHAAD, N.W. & KENDRICK R. A.**, 1975. A qualitative method of detecting *Xanthomonas campestris* in crucifer seed. *Phytopathology* 65 1034 1036

**SCHAAD, N.W., Sitterly W.R. & Humaydan H.**, 1980. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. *Plant Disease* 64, 91-92.

**SCHAAD, N.W., Vidaver A.K., Lacy G.H., Rudolph K. & Jones J.B.**, 2000. Evaluation of proposed amended names of several pseudomonads and xanthomonads and recommendations. *Phytopathology* 90, 208-213.

**SCHAAD, N.W. & WHITE W.C.**, 1974. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. *Phytopathology* 64, 1518-1520.

**SHAHRAEEN, N., FARZADFAR S.H. & LESEMANN D.E.**, 2003. Incidence of viruses infecting winter oil seed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) in Iran. *Journal of Phytopathology* 151, 614-616.

**SCHULTZ, T. & GABRIELSON R.L.**, 1986. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Western Washington crucifer seed fields: occurrence et survival. *Phytopathology*; 76,1306-1309.

**SHAW, J.J., SETTLES L.G. & KADO C.I.**, 1988. Transposon Tn4431 mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of a nonpathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1, 39-45.

**SHERIDAN, G.E.C., MASTERS C.I., SHALLCROSS J.A. & MACKEY BM**, 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1313-1318.

*Références bibliographiques*

**SINGLETON, P. & SAINSBURY D., 2001.** Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd Edition. P.49, 561. ISBN : 0-471-94150-6.

**SUNG, K., KHAN S. A., NAWAZ M. S. & KHAN A. A., 2003.** A simple and efficient Triton X-100 boiling and chloroform extraction method of RNA isolation from Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol.Let.* 229 : 97-101.

**SWING, J. G. & CIVEROLO E. L., 1993.** *Xanthomonas*, Chapman and Hall, Londres p. 157 à 175. ISBN: 0 412 434202.

**SWINGS, J., VAUTERIN L. & KERSTERS K., 1993.** The Bacterium *Xanthomonas*. In *Xanthomonads*, Edited by Swing JG, Civerolo EL. In *Xanthomonads*. London, UK.Chapman and Hall publication, 121-156.

**SOENGAS, P., HAND P., VICENTE J.G., POLE J.M. & PINK D.AC, 2007.** Identification of quantitative trait loci for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica rapa*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 114, 637-645.

**STEVENS P.F., 2001.** Angiosperm Phylogeny Website. Version 7, May 2006 3  
Suerbaum S, Achtman M, 1999. Evolution of *Helicobacter pylori*: the role of recombination. *Trends in Microbiology* 7, 182-184.

**SWING, J. G. & CIVEROLO E. L., 1993.** *Xanthomonas*, Chapman and Hall, Londres p. 157 à 175. ISBN: 0 412 434202

**SWINGS, J., VAUTERIN L. & KERSTERS K, 1993.** The *Bacterium Xanthomonas*. In *Xanthomonads*, Edited by Swing JG, Civerolo EL. In *Xanthomonads*. London, UK.Chapman and Hall publication, 121-156.

**THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000.** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.  
<sup>3</sup><http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

**THIEME, F., KOEBNIK R., BEKEL T., BERGER C., BOCH J., BUTTNER D., CALDANA C., GAIGALAT L., GOESMANN A., KAY S., KIRCHNER O., LANZ C., LINKE B., MCHARDY A.C., MEYER F., MITTENHUBER G., NIES D.H., NIESBACH-KLOSGEN U., PATSCHKOWSKI T., RUCKERT C., RUPP O., SCHNEIKER S., SCHUSTER S.C., VORHOLTER F.J., WEBER E., PUHLER A., BONAS U., BARTELS D. & KAISER O, 2005.** Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of Bacteriology* 187,7254-66.

**TSYGANKOVA, S.V., IGNATOV A.N., BOULYGINA E.S., KUZNETSOV B.B. & KOROTKOV E.V., 2004.** Genetic relationships among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* revealed by novel rep-PCR primers. *European Journal of Plant Pathology* 110, 845-853

*Références bibliographiques*

**TURNER, P. C., MCLENNAN A. G., BATES A. D. & WHITES M. R. H., 2000.** Amplification en chaîne par polymérase. L'Essentiel en Biologie Moléculaire P.155,174,. ISBN : 2-911808-10-X.

**VALVERDE, A., HUBERT T., STOLOV A., DAGAR A., KOPELOWITZ J. & BURDMAN S., 2007.** Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. *Plant Pathology* 56, 17-25.

**VAN DEN MOOTER, M. & SWINGS J., 1990.** Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 348-369.

**VAN DOORN, J., OJANEN-REUHS T., HOLLINGER T. C., REUHS B. L., SCHOTS A., BOONEKAMP P. M., & OUDEGA B., 1999.** Development and Application of Pathovar-Specific Monoclonal Antibodies That Recognize the Lipopolysaccharide Antigen and the Type IV Fimbriae of *Xanthomonas hyacinthi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 : 4171-4180

**VAUTERIN, L., HOSTE B., KERSTERS K. & SWINGS J, 1995.** Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 472-489.

**VAUTERIN, L., SWINGS J., KERSTERS K., GILLIS M., MEW T.W., SCHROTH M.N., PALLERONI N.J., HILDEBRAND D. C., STEAD D.E., CIVEROLO E.L., HAYWARD A.C., MARAITE H., STALL R.E., VIDAVER A.K. & BRADBURY J.F., 1990.** Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 312-316.

**VICENTE, J.G., CONWAY J., ROBERTS S.J. & TAYLOR J.D., 2001.** Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race and related pathovars. *Phytopathology* 91, 492-499.

**VICENTE, J.G., EVERETT B., ROBERTS S.J., 2006.** Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. *Phytopathology* 96, 735-745.

**VICENTE, J.G., TAYLOR J.D., SHARPE A.G., PARKIN I.A.P., LYDIATE D.J. & KING GJ, 2002.** Inheritance of Race-Specific Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in Brassica Genomes. *Phytopathology* 92, 1134-1141.

**VORHÖLTER, F.J., SCHNEIKER S., GOESMANN A., KRAUSE L., BEKEL T., KAISER O., LINKE B., PATSCHKOWSKI T., RÜCKERT C., SCHMID J., SIDHU V.K., SIEBER V., TAUCH A., WATT S.A., WEISSHAAR B., BECKER A., NIEHAUS K. & PÜHLER A., 2008.** The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthane biosynthesis. *Journal of Biotechnology* 134, 33-45.

**WAKKER J.H., 1883.** Vorläufige Mitteilungen über Hyacinthenkrankheiten. *Botanisches Centralblatt* 14, 315-317.



### *Références bibliographiques*

**WALKER, G., 2005.** Profil de la culture du chou et du brocoli au Canada. *Agriculture et Agroalimentaire Canada* 1-47. <sup>4</sup>

**WALKER J.C., 1952.** Disease of crucifers. In Diseases of vegetable crops. McGrawHill, New York 128-131.

4[<http://www.agrireseau.qc.ca/legumeschamp /documents/brocc-cabb f.pdf>]

**WATSON, L. & DALLWITZ M.J., 1992.** Onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 29th July 2006. <http://delta-intkey.com>.

**WELLER ,S.A., ELPHINSTONE J.G., SMITH N.C., BOONHAM N., STEAD D.E., 2000.** Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2853-8.

**WHITE H.E., 1930.** Bacterial spot of radish and turnip. *Phytopathology* 20, 653-662.

**WHITE, H.E. & Gardner M.W., 1929.** Bacterial spot of radish and turnip. *Phytopathology* 19, 97.

**WILKINSON J.F., 1958.** The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriological Reviews* 22, 46-73.

**WILLEMS, A., GILLIS M., KERSTERS K., VAN DEN BROECKE L., DE LEY J., 1987.** TRANSFER of *Xanthomonas ampelina* panagopoulos 1969 to a new genus, *Xylophilus* gen. nov.as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 422-430.

**WILLIAMS P.H., 1980.** Black Rot: A continuing threat to world crucifers. *Plant disease* 64, 736-742.

**WUKASCH R.T., 1990.** Maladies fongiques des crucifères cultivées. Fiches Techniques du Ministère de l'Agricultures, de l'Alimentation et des Affaires Rurales [<http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/90-255.htm>].

**WUKASCH R.T., 1990.** Maladies bactériennes des crucifères cultivées. Fiches Techniques du Ministère de l'Agricultures, de l'Alimentation et des Affaires Rurales <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/90-255.htm>].

**WULFF, E.G., MGUNI C.M., MORTENSEN C.N., KESWANI C.L. & HOCKENHULL J., 2002.** Biological Control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of PlantPathology* 108, 317-325.

**XIONG, Z., LIU C. & GENG B., 2006.** Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 273-280.

### *Références bibliographiques*

**YANG, P., VAUTERIN L., VANCANNEYT M., SWINGS J. & KERSTERS K, 1993** Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*.

**YOUNG, J.M., 1969.** An alternative weed host for *Xanthomonas campestris*. *Plant Disease* 53, 820-821.

**YOUNG, J.M., DYE D.W., BRADBURY J.F., PANAGOPOULOS C.G. & ROBBS CF, 1978.** A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N.Z. Journal of Agricultural Research* 21, 153-177.

## *Sitographie*

### **Photos des Brassicacées :**

[www.visoflora.com](http://www.visoflora.com)

### **Classification des bactéries**

<http://www.microbes-edu.org/etudiant/intro.html>

<http://www.biology.lsu.edu/webfac/dpollack/4800/Projects2/Yanlin/General.html>

<http://www.igmors.upsud.fr/duguet/webEAN/francais/pages>

[\\_personnelles/michel/MD\\_reverse\\_gyrase.html](http://www.igmors.upsud.fr/duguet/webEAN/francais/pages_personnelles/michel/MD_reverse_gyrase.html)

[www.inra.fr](http://www.inra.fr)

### **Nervation noire Comment la prévenir**

<http://xipm.ucdavis.edu/PMG/r108100211.html>

<http://www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/hyg-fact/3000/3125.html>

[http://www.eppo.org/MEETINGS/2004\\_meetings/diag\\_posters/poster\\_deKoning2.pdf](http://www.eppo.org/MEETINGS/2004_meetings/diag_posters/poster_deKoning2.pdf)

### **Photos de symptômes**

[www.apsnet.org/.../Images/blackrot.htm](http://www.apsnet.org/.../Images/blackrot.htm)

<http://www.inra.fr/Internet/Produits/HYP3/images/6037613.jpg>

### **Amplification exponentielle d'un gène par PCR**

<http://allserv.rug.ac.be/%7Eavierstr/principles/pcr.html>

### **Activité de l'ADN polymérase dans PCR avec une sonde TaqMan**

[www.probes.com/handbook/figures/0710.html](http://www.probes.com/handbook/figures/0710.html)

**Wildflowers & Weeds, 2006.** Resource for plant identification and Uses.

[www.Wildflowers-and-Weeds.com](http://www.Wildflowers-and-Weeds.com)

# **Annexes**



## **Annexe 1 : Procédure de la BIO-PCR**

### **SEMENCES DE CRUCIFERES: DETECTION DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et *Xanthomonas campestris* pv *raphani* PAR BIO - PCR**

---

#### **Précautions de sécurité**

La bactérie ne présentant aucun caractère de pouvoir pathogène pour l'homme, les précautions à prendre lors de sa manipulation pourront se limiter au respect des consignes générales de protection dont l'application doit permettre d'éviter la dissémination d'agents pathogènes.

Ainsi, comme pour toute autre manipulation de phytopathogènes, on veillera à inactiver les bactéries présentes dans les végétaux, extraits végétaux, supports de culture, effluents liquides, par une méthode appropriée.

En outre, dans le cas de semences traitées et désinfectées, des dispositions devront être prises pour la protection de l'opérateur.

La manipulation des acides nucléiques nécessite un travail minutieux. Elle est réalisée en portant des gants, en utilisant une vaisselle stérile et un matériel dépourvu d'ARN et d'ADN. Les supports de manipulation doivent être nettoyés avec de l'Ethanol 70% avant chaque manipulation.

#### **0. Introduction**

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* est la bactérie responsable de la maladie de la nervation noire des crucifères (black-rot), transmise notamment par la semence qui constitue une source importante d'inoculum. Cette bactérie attaque tous les *Cruciferaeae* cultivés et de nombreux adventices ; elle est mondialement distribuée.

#### **1. Objet**

La technique utilisée permet l'isolement des bactéries suspectes sur milieux semi sélectifs après extraction par macération des semences dans une solution saline ou une solution phosphate et son identification finale par PCR.

#### **2. Domaine d'application**

Cette méthode qualitative s'applique à la détection du *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, pour les semences de crucifères. Elle est à proposer pour toutes les analyses réglementaires.

**3. Définitions** **YPACcv** : milieu de culture Yeast (levure) extrait, peptone, Agar, Cycloheximide, céfaléxine et vancomycine.

#### **4. Principe**

La bio-PCR est une technique qui combine la croissance du pathogène sur un milieu semi sélectif, suivi d'une amplification spécifique par PCR de l'ADN des bactéries ciblées. Elle a l'avantage d'éliminer les inhibiteurs de la PCR, de réduire la chance d'obtenir de faux positifs en raison de la présence éventuelle de cellules mortes ou d'ADN libre et d'augmenter significativement la sensibilité grâce à un pré enrichissement des cellules cibles.

Le milieu de culture utilisé est le **YPACvc**. C'est un milieu classique additionné à deux antibiotiques : la **céphalexine** et la **vancomycine**, utilisés par ailleurs dans la composition d'autres milieux sélectifs. Ils offrent une sélectivité satisfaisante contre la microflore saprophyte des lots de semences de Brassicacées en favorisant la croissance des *Xanthomonas campestris*.

#### **5. Produits**

Leurs composition, préparation et condition d'emploi sont données en annexe.

Les produits spécifiques pour la réalisation de cette méthode sont les suivants :

**5.1** Milieux de culture pour l'isolement : **YPACvc**

**5.2** Solution saline stérile pour les dilutions et la macération.

**5.3** Solution phosphate PBS –tween 20 pour la macération des semences désinfectées

**5.4** Solution NaOH 0,5 N

**5.5** Solution Tris-HCl (20mM) pH = 8

**5.6** Mélange réactionnel de la PCR

**5.7** Tris Borate EDTA (TBE) Buffer 5x

**5.8** Gel d'agarose à 2%

**5.9** Tampon de charge

**5.10** Solution de bromure d'éthidium

**5.11. Amorces :**

❖ **Amorces universelles** : (Eden *et al.*, 1991)

1052 –F : 5'GCATGGTTGTCGTCAGCTCGT 3'

Bac –R : 5'TACGGCTACCTTGTTACGACT 3'

❖ **Amorces spécifiques** : (Berg *et al.*, 2005) :

DLH 120 : 5'CCG TAGCACTTAGTGCAATG 3'

DLH 125 : 5'GCATTTCCATCGGTCACGATTG 3'

❖ **Amorces spécifiques** : (Rijlaardsdam *et al.*, 2004)

Zup 2309 : 5'AAATCAGGGGGATGCGGTGG3'

Zup2310 : 5'TCCGGCCAGGGTCGATACAGTG3'

## **6. Appareillage :**

Matériel courant de laboratoire de bactériologie et biologie moléculaire et notamment

**6.1** Balance de précision (0,001g).

**6.2** pH mètre.

**6.3** Pipettes automatiques.

**6.4** Etuve ou incubateur bactériologique réglé(e) à  $28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

**6.5** Autoclave.

**6.6** Chambre réfrigérée à  $5^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ .

**6.7** Système de production d'eau déminéralisée.

**6.8** Agitateur à plateau universel.

**6.9** Broyeur à couteau pour le voyage des graines.

**6.10** Centrifugeuse.

**6.11** Congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**6.12** Micropipettes.

**6.13** Thermocycleur.

**6.14** Cuve d'électrophorèse

**6.15** Transluminateur à UV

**6.16** Consommables (embouts, pipettes pasteur, étaleurs)

**6.17** Boîte de YPACvc : Boîte de Petri de 9 cm de diamètre (deux boîtes par sous échantillon).

## **7. Echantillon**

### **7.1 Echantillon pour laboratoire**

L'échantillon soumis à l'analyse sera d'au moins 30000 graines.

### **7.2 Préparation de l'échantillon pour analyse**

A partir de l'échantillon pour laboratoire et après homogénéisation, prélever au hasard 3 sous échantillons d'environ 10 000 graines Roberts *et al.* (1993) et Roberts (1999).

## **8. Mode opératoire**

### **8.1 Témoins d'analyse**

- Souche témoin positif (utilisée lors de l'isolement et du test de pouvoir pathogène) : souche de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* préalablement vérifiée sur milieux et en test de pouvoir pathogène sur plantules de choux (*Brassica oleracea*) provenant d'une collection de référence (exemple CFBP 1121).
- La manipulation de ces souches doit s'effectuer de manière séparée dans l'espace et dans le temps de façon à éviter tout risque de contamination croisée.

## **8.2 Déroulement du test**

### **8.2.1 Extraction des bactéries :**

#### **8.2.1.1 Macération des semences traitées et non traitées**

- Mettre chaque sous échantillon de graines dans un récipient stérile approprié (par exemple Erlenmeyer de 250 ml avec 100 ml de solution saline stérile additionnée de Tween 20 (0,02% v/v).
- Placer le tout sur un agitateur à 150-200 rpm (ou agitation équivalente) à température ambiante pendant 2 heures à 2 heures et demi.

#### **8.2.1. 2 Macération des semences désinfectées :**

- Mettre chaque sous échantillon de graines à macérer dans 250 ml de PBS- tween 20 (0,02 % v/v) pendant 3 h à température ambiante et sous agitation à 100 rpm.
- Broyer chaque sous échantillon à l'aide d'un broyeur à couteaux.
- Verser le broyat dans un sac stomacher à filtre puis prélever 10 ml dans un tube approprié.
- Centrifuger pendant 5 min à 5000 g.
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 1 ml d'eau saline.  
C'est cette suspension qui est utilisée pour la bio PCR.
- **Un contrôle est également ajouté.**

Un macérât broyé contaminé artificiellement à l'aide d'une suspension de *Xanthomonas campestris* pour vérifier l'absence d'inhibition suite au broyage des semences.

#### **8.2.2. Enrichissement sur milieu sélectif**

- Agiter les flacons pour homogénéiser le macérât.
- Prélever 100 µl de macérât obtenu de chaque sous échantillon et l'étaler sur deux boîtes de YPACvc à l'aide d'un étaleur stérile.
- Etaler également une suspension de la souche de référence *X.c. pv. campestris* ( $10^5$  cfu/ml).
- Incuber les boîtes à 28 °C pendant 40 à 45 h.
- Laver la surface de la gélose avec 3 ml d'eau saline stérile.
- Homogénéiser la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette de 1000 µl.
- Prélever 1ml de la suspension de lavage et déposer le dans un microtube de 1,5 ml.



### 8.2.3 Extraction de l'ADN par lyse à NaOH

- Centrifuger la suspension bactérienne prélevée après lavage à 8000 rpm pendant 5min.
- Eliminer le surnageant et ressuspendre le culot avec 500 µl de NaOH à 0,5 N.
- Incuber le tout à 65 °C pendant 10 min avec une agitation de 100 rpm.
- Transférer 5 µl de la solution dans un microtube de 1,5 ml contenant 495 µl de Tris HCl (20mM) à pH 8 puis conservée à – 20 °C avant de réaliser la PCR .

### 8.2.4 Amplification d'ADN par PCR multiplex :

#### 8.2.4.1 Première réaction : Amplification d'ADN pour la détection de

##### *X. campestris* :

- Préparer le mélange réactionnel pour la PCR 1 dans un volume final de 20 µl (annexe 2).  
La PCR est réalisée dans des tubes appropriés à raison de 17µl du mélange réactionnel et 3 µl de l'ADN cible.

#### 8.2.4.2 Deuxième réaction : Amplification d'ADN pour l'identification du pathovar *raphani*

- Préparer le mélange réactionnel pour la PCR 2 dans un volume final de 20 µl(annexe 2).  
Les PCR sont réalisées dans des tubes appropriés à raison de 17µl du mélange réactionnel et 3 µl de l'ADN cible.  
3 min à 95°C  
Le programme d'amplification est réalisé à l'aide d'un thermocycleur avec une dénaturation de 3 min à 95°C suivi de 35 cycles de 40 sec. à 95°C, 40 sec. à 63°C (touchdown à 58°C au cours des 6 premiers cycles) et 40 sec. à 72°C.

### 8.3 Analyse des produits amplifiés :

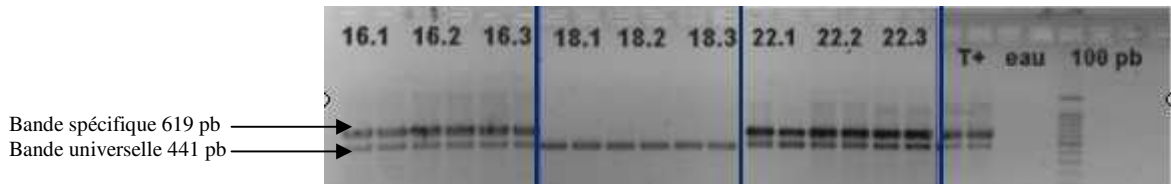
Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose à 2% dans du tampon TBE 0,5 X.

- Charger 8 µl de chaque produit amplifié mélangé avec 2 µl de tampon de charge dans des puits de gel correspondants.
- Ajouter à chaque extrémité 8 µl un marqueur de poids moléculaire (100 paires de bases).
- L'ensemble est soumis à une électrophorèse sous un voltage constant (100 V).
  - La migration des produits amplifiés est visualisée à l'aide d'un transilluminateur à UV, après coloration au bromure d'éthidium.

### 8.4 Interprétation des résultats :

L'analyse des produits d'amplification permet de visualiser :

#### 8.4.1 Première réaction



**Figure 1 :** Exemple d'amplification par PCR d'extrait de macérât de semences contaminées ou non par *X. campestris* (premix PCR 1)

- 1 bande (441 pb) : Absence de détection de *X. campestris*.
- 2 bandes (441 pb + 619 pb) : Détection de *X. campestris*
- 0 bande : Résultat ininterprétable

#### 8.4.1 Deuxième réaction :



**Figure 2 :** Exemple d'amplification par PCR d'extrait de macérât de semences contaminées ou non par *X. campestris* (premix PCR 2)

- 1 bande (619 pb) : Détection de *X. c. pv raphani* dans l'échantillon exclusivement.
- 2 bandes (370 pb + 619 pb) : Détection de *X. c. pv raphani* et/ou *X. c. pv campestris* et *X. c. pv incanae*.
- 0 bande Absence de et *Xanthomonas campestris*.

### 9. Expression des résultats

Cette méthode étant qualitative, le résultat sera donné de la façon suivante :

- Lorsque le résultat de l'analyse après PCR 1 est négatif :  
“ *Xanthomonas campestris* **non détecté** par Bio-PCR dans l'échantillon analysé ”.
- Lorsque le résultat de l'analyse après PCR 1 est positif :  
“ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* **détecté** par BIO-PCR dans l'échantillon analysé ”.
- Lorsque le résultat de l'analyse après PCR 2 révèle qu'une bande à 619 pb :  
“ *Xanthomonas campestris* pv *raphani* **détecté** par BIO-PCR dans l'échantillon analysé ”.
- Lorsque le résultat de l'analyse après PCR 2 révèle deux bandes à (619 pb et 370 pb) :  
“ Détection de *X. campestris* : soit *X. c. pv. campestris* soit *X. c. pv. incanae* soit un mélange de *X. c. pv raphani* avec *X. c. pv campestris* et/ou *X. c. pv incanae*”.

## 10. Références

- Berg T., Tesoriero L. & Hailstones D.L., 2005. PCR- based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in Brassica seed. *Plant pathology* 54, 416-427.
- Eden P.A., Schmidt T.M., Blackemore R.P. & Pace N.R., 1991. Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using Polymerase Chain Reaction Amplified 16S rRNA specific DNA. *International Journal of systematic Bacteriology* 41, 324-325.
- Fargier E., Briand B., Brin C., Guillaumes J. & Manceau C., 2007. Detection of living cells of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on crucifers in seed by BIO-PCR.
- ISHI-Vegetable, 2000. *Xanthomonas campestris* on Brassicaceae. Seed Health Testing Methods Reference Manual. 16-20.
- International Seed Testing association (ISTA), 2007, Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp.7-019.
- Rijlaardsdam A., Woudt B., Simons G., Koenraad H., Oosterhaf J., Asma M., Buddiger P., Roorda P., Grimault V.& De Koning J., 2004. Development of specific primer for the molecular detection of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *EOPP Conference on Quality of Diagnosis and New Diagnostic Methods for plant Pests*. Noordwijkerhout, NL, 2004-04-09/22.<sup>2</sup>
- Roberts S.J., Phelps K., Taylor J.D. & Ridout M.S., 1993. Design and interpretation of seed health assays. In: Sheppard, J.W., (Ed.) *Proceedings of the First ISTA Plant Disease Committee Symposium on Seed Health Testing*, Ottawa, Canada. pp. 115-125. Agriculture Canada, Ottawa, Canada.
- Roberts S.J.1999. Thresholds, standards, tests, transmission and risks. In : *Proceedings of 3<sup>rd</sup> ISTA Seed Health Symposium*, Ames, Iowa, USA, 16-19 August 1999. pp. 20-24. ISTA, Zurich, Switzerland.
- Shaad N. W., 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3<sup>rd</sup> Edition. ISBN : 0-89054-263-5.

**ANNEXE 1 :**  
**Tampons et milieu pour l'extraction et la culture des bactéries**

**Milieu LPACvc :**

<b>Produits</b>	<b>Concentration finale dans 1 litre de milieu</b>	<b>1 litre</b>
Extrait de levure	7	7g
Bactropeptone	7	7g
Agar Agar	15	15g
Cycloheximide (1g/10 ml)	100 mg	1ml
Vancomycine (0,5mg/ml)	0,5 mg	1ml
Céphaléxine (10 mg/ml)	25 mg	2,5 ml

La cycloheximide peut être remplacée par la nystamine à raison de 20 mg/l

**Préparation du milieu LPACvc :**

- Peser tous les produits dans un récipient approprié
- Ajouter 900 ml d'eau distillée.
- Dissoudre et ajuster le ph à 7.2 avec NaOH (N)
- Ajuster le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.
- Préparer les solutions mères d'antibiotiques.
- Laisser refroidir le milieu à environ 50°C puis rajouter les solutions d'antibiotique.
- Agiter pour homogénéiser le milieu.
- Couler le milieu dans des boîtes de Petri à raison de 22 ml par boîte de 9 cm de diamètre.
- Sécher la surface des boîtes sous flux laminaire.

Les milieux en boîte de Petri doivent être utilisés dans un délai d'un mois après fabrication si le milieu contient des antibiotiques et trois mois si le milieu n'en contient pas.

**Préparation de la solution saline :**

<b>Produits</b>	<b>1 litre</b>
Chlorure de sodium NaCl	8,5 g
Eau distillée dé ionisée	1000 ml

Autoclaver 20 minutes à environ 120°C

- Rajouter 200 µl de tween 20 dans la solution saline pour l'extraction des bactéries dans les semences.

**Préparation du tampon Phosphate ( PBS ), pH 7,2**

<b>Produits</b>	<b>1 litre</b>
Chlorure de sodium NaCl	8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,75g
Eau distillée dé ionisée	1000 ml

**NB :** Si le réactif n'est pas sous forme anhydride le poids est ajusté

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O mettre 7,2 g au lieu de 5,75g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O mettre 14,50 g au lieu de 5,75g
- Autoclavage 15 minutes à environ 120°C.
- Rajouter 200 µl de tween -20 dans la solution pour l'extraction des bactéries dans les semences désinfectées.

**ANNEXE 2 :**  
**Produits et tampons pour la PCR et la révélation des amplifiats**

**Préparation du mélange réactionnel pour la PCR**

**Premix PCR 1 :**

<b>Produits</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Volume (µl) dans 20 µl</b>
Eau Sterile MilliQ		7
5 x Tampon	1x	4
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5 mM	1,2
dNTP (2.5 mM )	0,2 mM	1,6
Amorce Berg DLH 120 (20 µM)	0,5 µM	0,5
Amorce Berg DLH 125 (20 µM)	0, 5 µM	0,5
Amorce 1052-F (1µM)	0,05 µM	1
Bac -R (1µM)	0,05µM	1
Taq Polymerase (5U/µl)	0,05U	0,2
Suspension bactérienne		3

**Premix PCR 2**

<b>Produits</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Volume (µl) dans 20 µl</b>
Eau Sterile MilliQ		8,96
5 x Tampon	1x	4
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,8 mM	0,64
dNTP (2.5 mM )	0,2 mM	1,6
Amorce Berg DLH 120 (20 µM)	0,6 µM	0,6
Amorce Berg DLH 125 (20 µM)	0, 6µM	0,6
Amorce Zup 2309 (20 µM)	0,2 µM	0,2
Amorce Zup 2310 (20 µM)	0,2 µM	0,2
Taq Polymerase (5U/µl)	0,05U	0,2
Suspension bactérienne		3

**Preparation du tampon TBE 5x**

<b>Produits</b>	<b>1 litre</b>
Tris base	54g
Acide borique	27,5g
0,5M EDTA	20 ml

**Préparation de 2% de gel agarose pour l'électrophorèse**

<b>Produits</b>	<b>100 ml</b>
Agarose	2g
Tampon TBE 0,5x	100 ml

**Préparation du tampon de charge**

<b>Produits</b>	<b>100 ml</b>
Bleu de bromophénol	250 mg
Xyleme cyanol	250 mg
Ficoll type 400	15 g
Eau distillée stérile	100 ml

- Xyleme cyanol est facultatif
- Stocker à température ambiante

**Préparation du bromure d'éthidium**

<b>Produits</b>	<b>1 litre</b>
bromure d'éthidium (10 mg /ml)	200 µl
Eau distillée stérile	1000 ml

Le bromure d'éthidium est un produit potentiellement cancérigène. Il faut éviter tout contact avec la peau.

**Annexe 2 :****Tampons et solutions utilisés****Eau DEPC (Diéthylpyrocarbonate) ARN free**

Pour 1 litre

<b>Nom du produit</b>	<b>Quantité</b>
Diéthyl pyrocarbonate	1ml
Eau ultra pure	1 litre

**Tampon d'Edwards**

Pour 200 ml PH 7,5.

<b>Nom du produit</b>	<b>Quantité</b>
200 mM Tris-HCl	54g
250mM NaCl	27,5g
25mM EDTA.	4,65 g
SDS 0,5 %.	1g
2% de pvp	4g

**TBE Solution mère 5X**

Pour 1 litre

<b>Nom du produit</b>	<b>Quantité</b>
Tris base	54g
Acide borique	27,5g
0,5M EDTA	20 ml

**TE 1X**

Pour 1litre

<b>Nom du produit</b>	<b>Quantité</b>
1M Tris (pH 8,0)	10 ml
0,5M Na <sub>2</sub> EDTA	20 ml

**Acétate de Sodium 3M (PH, 5,2)**

Pour 1 litre

<b>Nom du produit</b>	<b>Quantité</b>
Acétate de Sodium-3H <sub>2</sub> O(NaOAc-3H <sub>2</sub> O, P.M.=136,08)	408,24g
Eau DEPC	800 ml



## 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 soient 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 comme objectif de proposer un nouvel outil moléculaire de détection fiable et rapide de *Xanthomonas campestris* vivant dans les semences de chou.

Trois méthodes moléculaires ont été étudiées et testées afin d'évaluer leur potentiel de détection de *Xanthomonas campestris* dans les semences.

La première technique qui a été développée durant cette étude est la RT-PCR. Elle utilise l'ARN comme matrice et permet d'amplifier l'ADNc à partir de l'ARNm cible grâce à une transcription inverse. Des amorces ont été sélectionnés dans quatre gènes *rpoD*, *gyrB*, *galA* et *XCC2585*, leur seuil de sensibilité et leur potentiel de spécificité ont été testés et comparés.

Cette technique a permis de détecter les transcrits de deux gènes parmi les quatre gènes candidats testés. Il s'agit du gène *rpoD* et *gyrB*. Le gène *galA* et *XCC2585* ne s'exprime pas de manière constitutive.

La deuxième partie de notre travail était de valider la méthode BIO-PCR sur des lots de semences naturellement infectées par *X. campestris*. Cette technique a permis de détecter jusqu'à 10cfu/ml de macérât de semence.

La troisième technique que nous avons mise au point pour la détection de *X. campestris* vivants dans les lots de semences est la SEED-PCR. 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. C'est une technique peu onéreuse et permet de détecter jusqu'à 1 graine contaminée parmi 10 000 graines saines, même quand la graine est contaminée à un faible niveau.

**Mot clés :** *Xanthomonas campestris*, bactérie vivante, semence, détection, RT-PCR Gène cible ARNm, BIO-PCR, SEED PCR,

## 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*.

The first technique which was developed during this study is the RT-PCR. It uses RNA as a template and allows to amplify the cDNA from the mRNA target through a reverse transcription step. Primers were selected in four genes *rpoD*, *gyrB*, *galA* and *XCC2585*, their level of sensitivity and potential specificity were tested and compared. This technique allowed to detect *rpoD*, *gyrB* genes transcribed among the tested genes.

The second part of our study was to validate the BIO-PCR method in seeds lots naturally infected by *X. campestris*. This technique can detect until 10cfu/ml seed extract.

The third technique that we have developed for the detection of living *X. campestris* in seed lots is the SEED-PCR. 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.

**Keywords :** *Xanthomonas campestris*, living bacteria, seed, detection, RT-PCR Gène mRNA, BIO-PCR, SEED PCR

*Xanthomonas campestris* يسبب عدة أمراض عند النباتات لعائلة *Brassicacées* واحد من هذه الأعراض هي التعفوق السوداء . يعتبر هذا المرض الأكثر انتشاراً حول العالم و الأكثر تدميراً . رغم أن هذه البكتيريا تنتقل عبر عدة وسائل و لكن تبقى البذور المصدر الرئيسي لانتقاله ضمان الجودة و الصحة هي الوسيلة الوحيدة و الأكثر فعالية ضد الأمراض الجرثومية حالياً الوسائل المعمول بها رسمياً في مخابر مراقبة البذور هي التقنيات المكر وبيولوجية ولكن هذه التقنيات تعتبر مكلفة و تستهلك وقت طويل لكي تستعمل بصورة روتينية تفاعل PCR. هي تقنية تعتمد على استعمال جزء الحمض النووي (DNA) لكن هذه التقنية لا تدرك قدرة البكتيريا الحية في العينة. الهدف من هذا العمل هو اقتراح تقنية جزئية جديدة تكون سريعة و موثقة للكشف على *X. campestris* في البذور. ثلاثة تقنيات تمت دراستها واختبار قدرتها على كشف *X. campestris* في البذور. أول تقنية التي تم تطويرها خلال هذه الدراسة RT-PCR هذه التقنية تستعمل RNA لتضاعف cANA من خلال RNA من فضل استعمال انزيم النسخ العكسي RT عدة بداءيات اختيارها على أربعة جينات *rpodD, gyrB, galA et x cc2585* لمعرفة مستوى دقتهم و حساسيته إن هذا الأسلوب سمح للكف على نسخ 2 جينات من الأربعة الجينات المرشحة أم *gal A et x cc2585* لم يتم الكشف عليها. الجزء الثاني من هذا العمل يتمثل في المصادقة على تقنية BIO-PCR للكشف على *X. campestris* في البذور المصابة طبيعياً. أم التقنية الثالثة التي تمت دراستها SEE-PCR تركز هذه التقنية على تكاثر البكتيريا من خلال أنتاش الحبوب المصابة ثم إجراء عملية taq-man PCR بعد استخلاص DNA إن هذه تقنية غير مكلفة و حساسة في نفس الوقت و تسمح للكشف على بذرة واحدة مصابة ضمن 10.000 آلاف بذرة غير مصابة.