

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة  
**École Nationale Supérieure Agronomique**  
**(ENSA) EL Harrach-Alger**



**Thèse de DOCTORAT**

**Présentée par KHENFOUS -DJEBARI Bahria**

**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN SCIENCES**  
**AGRONOMIQUES**  
**Spécialité Phytopathologie**

**Détection et identification phénotypique et génétique de**  
***Xanthomonas* associé aux céréales en Algérie**

Devant le jury

<b>Mme Houda Boureghda</b>	<b>Professeur</b>	<b>(ENSA ) El Harrach</b>	<b>Présidente</b>
<b>M. Bragard Claude</b>	<b>Professeur</b>	<b>(Université Catholique Louvain ) Belgique</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>M. Bouznad Zouaoui</b>	<b>Professeur</b>	<b>(ENSA) El Harrach</b>	<b>Co- Directeur de thèse</b>
<b>Mme Bouanane-Darenfed Amel</b>	<b>Professeur</b>	<b>Université Houari Boumediene (USTHB) Alger</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mme Krimi Zoulikha</b>	<b>Professeur</b>	<b>(Université Saad Dahlab) Blida</b>	<b>Examinatrice</b>

**Année universitaire 2021**

## REMERCIEMENTS

الحمد لله اولاً

La réalisation de ce travail a été possible grâce à l'aide de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude au Professeur Claude Bragard, Président de « Earth and Life Institute », mon Directeur de thèse qui m'a initié à la biologie moléculaire dès mon premier passage dans son laboratoire, je le remercie pour m'avoir consacré son temps précieux et pour m'avoir intégré dans son équipe joviale et laborieuse, lors de mes passages dans son laboratoire, je le remercie pour sa patience tout au long de ce parcours, pour ses précieuses contributions et conseils, je le remercie aussi vivement pour avoir mis à ma disposition toutes ses connaissances et pour avoir aidé à parfaire la rédaction de ce document, je le remercie aussi pour m'avoir mise en contact avec l'équipe accueillante du laboratoire de l'IRD Montpellier et le Dr Koebnik expert dans le domaine.

Je remercie vivement et jamais assez, Professeur Zouaoui Bouznad mon co-Directeur de thèse, mon enseignant de la phytopathologie pour son soutien à chaque étape, sa disponibilité, ses conseils judicieux et aussi son aide pour l'aboutissement de ce document et pour avoir dénoué par son savoir faire les situations les plus délicates ainsi que pour toutes les facilitations administratives.

Mes remerciements vont également Au professeur Houda Bouregghda pour tous ses encouragements et pour avoir bien voulu présider mon jury

Je remercie Professeur Amel Bouanane-Darenfed de l'université Houari Boumediene (USTHB) et Professeur Zoulikha Krimi de l'Université Saad Dahlab de Blida pour avoir accepté de faire partie de mon jury et prendre le temps d'examiner ce travail.

Je remercie toutes les personnes m'ayant aidé et encouragé jusqu'au bout, dont la liste est longue je cite particulièrement Dr. M. Kerkoud pour sa contribution dans ce travail et pour les innombrables coups de pouce jusqu'au bout, je remercie parmi toutes les personnes omniprésentes ma sœur, Pr F. Laraba-Djebari, pour son boost constant, son aide précieuse et son soutien moral permanent, ma reconnaissance et mes vifs remerciements s'adressent aussi à tous mes enseignants du département de Botanique, Mr A. Kedad, Mme S. Yahiaoui, Mme M. Aitouada, Mr A. Guezlane, Mme M. Louanchi, Mme S. Benhouhou , Mme F. Boughrarou, Mr H Trakia, mes amies et collègues Samia Laala, Nassima Lassouane, Hayet Meamiche, Badia Farsi et Lynda Allala. Ma reconnaissance va également à . L.ila N. Salhi et Hamida Benslimane pour leur coup de main en bio-informatique et tous les « very usefull links ». Un grand merci aussi à mon accotoir technique aimable et actif, Fatima, Fadila, Meriem, Nisrine, Arbia, Sabrina, Soumia, Mohamed, Fouzi et aussi à M. Tahirine pour le précieux coup de main final.

Je remercie Pr Khelifi L. pour ses encouragements et toutes les facilitations durant tout le parcours ainsi que Pr Mefti M. pour son grand soutien et Dr Boukraa S. pour son aide précieuse.

Je remercie les responsables de la station de l'ITGC pour avoir mis à notre disposition la station lors des prospections et pour les lots de semence ainsi que les responsables des fermes pilotes pour nous avoir facilité le travail de l'échantillonnage, particulièrement Mr Merdoukh Y.A.

Je remercie toutes les équipes des différents laboratoires dans lesquels j'étais très aimablement accueillie (UCL/ Louvain-La-Neuve, USTHB et CNCC) et particulièrement, Pr H. Maraite et l'agréable Christine Bousmane ainsi que tout le personnel et doctorants de l'UCL/ Louvain-La-Neuve. Je remercie Pr T. Benhassine pour son aide et son amitié sincère également Amira et Pr Semai du laboratoire de génétique de l'USTHB, Dr. M. Fischer-Le Saux de l'INRA d'Angers pour les innombrables conseils et ses précieuses recommandations, Kahina, Houria et Lyes du Centre National de Contrôle et Certification des semences et plants (CNCC), merci pour avoir tous, chacun avec un bout, aidé à l'aboutissement de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Dr. R. Koebnik pour m'avoir bien accueillie dans son laboratoire (IRD/ Montpellier), pour son aide précieuse consacrée à la valorisation des résultats de ce travail, pour son temps précieux, sa rigueur, son perfectionnisme et pour la formation rapide mais très efficace dont j'ai bénéficié lors de mon stage.

Je tiens à remercier et à exprimer toute ma gratitude spécialement à tous mes collègues et amis (es), dont je n'ai pas cité ici le nom, mais qui se reconnaîtront pour m'avoir aidé à me relever à chaque fois et dieu seul sait qu'ils sont nombreux et tous spéciaux, je leur exprime ici ma toute gratitude pour leur soutien moral et intellectuel tout au long de ce parcours dont aussi tous mes étudiants pour leur respect leur confiance.

At last but not least, à tous les membres de ma famille, j'adresse ma profonde gratitude, pour avoir toujours été à mes côtés.

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*À la mémoire de mes parents tous deux agriculteurs passionnés du grain*

*À tous les membres de ma famille*

*À mes sœurs et frères, nièces et neveux*

*À Moulâi et mes trois petits boutons floraux, Camélia, Abderraouf et Khadidja*

*À tous mes amis et collègues*



## Avant-propos

Cette thèse est une version écrite d'une série de travaux de recherches menés en plein champs, au laboratoire moyennant, l'outil informatique. Ce travail est mené dans le but de faire une mise au point sur l'expression d'une série de symptômes observés en plein champs. Ces observations révèlent en effet, un impact néfaste et menaçant de bactéries phytopathogènes redoutables telles que les *Xanthomonas* sur une culture stratégique qu'est le blé.

Les différentes étapes de ce travail ont été réalisées dans plusieurs laboratoires dont le laboratoire de phytobactériologie de l'ENSA, El Harrach, le laboratoire de « Applied Microbiology-Phytopathology, Earth & Life Institute », à UCL Louvain, Louvain-la-Neuve en Belgique, le laboratoire de Biologie Cellulaire et de Biologie Moléculaire, USTHB, Bab Ezzouar, Alger et le laboratoire de biologie moléculaire du centre de certification et de contrôle de la semence (CNCC) d'El Harrach.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication et de deux présentations internationales en posters et d'une communication nationale.

Cette thèse souligne l'impact des maladies émergentes sur les cultures stratégiques en initiant un projet de mise au point sur la présence d'une nouvelle espèce de *Xanthomonas* sur le blé et en révélant un pouvoir adaptatif non encore signalé de l'espèce *Xanthomonas campestris* aux monocotylédones.

Cette thématique est présentée sur ce document en s'appuyant sur une revue bibliographique traitant les différents aspects relevés. Une démarche classique de rédaction est adoptée pour éclaircir les différentes étapes du travail en précisant les différents volets abordés aboutissant à des résultats assujettis à de nombreuses perspectives.

## LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1: Production, disponibilité et utilisation du blé et des céréales dans le monde.....	6
Tableau 2: Le zonage bioclimatiques en Algérie .....	12
Tableau 3: Pathovars de <i>Xanthomonas translucens</i> et leurs hôtes .....	38
Tableau 4: Les principales plantes hôtes de l'espèce <i>translucens</i> et les hôtes secondaires .....	40
Tableau 5: Caractères phénotypiques de <i>Xanthomonas translucens</i> .....	49
Tableau 6: Diversité des caractères biochimiques .....	65
Tableau 7: Les gènes séquencés .....	69
Tableau 8: Description des isolats .....	70
Tableau 9: Les séquences d'ADN utilisées dans l'étude phylogénétique .....	75

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: PRODUCTION ET UTILISATION MONDIALE DES STOCKS DES ANNÉES (2010 - 2020)DANS LE MONDE.....	6
<b>FIGURE 2: PRODUCTION DE CEREALES EN ALGÉRIE</b> ( <a href="http://MADRP.GOV.DZ/AGRICULTURE/STATISTIQUES-AGRIQUES">HTTP://MADRP.GOV.DZ/AGRICULTURE/STATISTIQUES-AGRIQUES</a> , FAOSTAT 2020).....	7
FIGURE 3: PRODUCTION DE BLÉ EN ALGÉRIE (FAOSTAT 2020) .....	8
FIGURE 4: ÉVOLUTION DES TAUX D'IMPORTATIONS DE BLE EN ALGERIE (SOURCE FAOSTAT).....	8
FIGURE 5: STADES PHENOLOGIQUES DU BLE (SOURCE : ÉCHELLE BBCH <a href="https://www.syngenta.fr">HTTPS://WWW.SYNGENTA.FR</a> ).....	10
FIGURE 6: CARTE DES ZONES BIOCLIMATIQUES EN ALGERIE. SOURCE : ANAT 2004 .....	12
FIGURE 7:ÉTUDE COMPARATIVE LES XANTHOMONADACEAE VASCULAIRES ET PARENCHYMATEUSES BASEE SUR LA PRESENCE ET L'ABSENCE DU CBSA .....	21
FIGURE 8: CYCLE BIOLOGIQUE DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS (YE ET AL., 2020) ..	35
FIGURE 9: SYMPTOME DE LA STRIE FOLIAIRE BACTERIENNE SUR FEUILLES, GLUMES ET ARETES (SOURCE : KAUR ET AL., 2002).....	42
FIGURE 10: L'EVOLUTION DE LA PATHOGENIE VASCULAIRE ET NON VASCULAIRE CHEZ LES XANTHOMONAS ASSOCIEES AUX PLANTES. ( SOURCE : GLUCK-THALER ET AL., 2020). .....	43
FIGURE 11: DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DE XANTHOMONAS TRANSLUCENS PV. TRANSLUCENS DANS LE MONDE ( <a href="https://www.cabi.org/isc/datasheet/56978#TODISTRIBUTIONMAPS">HTTPS://WWW.CABI.ORG/ISC/DATASHEET/56978#TODISTRIBUTIONMAPS</a> ). .....	45
FIGURE 12: SYMPTOMES NOTES EN PLEIN CHAMP A ET B: NECROSES FOLIAIRES, C: NECROSE EN STRIES ACCOMPAGNEE DE CHLOROSE D, E, F : SYMPTOMES DE « BLACK CHAFF » SUR EPIS. ....	57
FIGURE 13:CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET CULTURAUX DES ISOLATS SUR MILIEU NA. ....	63
FIGURE 14: CARACTERES MORPHOLOGIQUES ET CULTURAUX DES ISOLATS (A :SUR MILIEU NA, B :SUR MILIEU GYCA EN BOITE ET C :MILIEU GYCA EN TUBE EN TUBE).....	64
FIGURE 15: AMPLIFICATION DE LA BANDE SPECIFIQUE 139 PB CARACTERISTIQUE DE X. TRANSLUCENS AMPLIFIEE AVEC LES AMORCES T1 ET T2. ....	74
FIGURE 16: ARBRES PHYLOGENETIQUE DES GENES A) GYRB ET B) RPOD CONSTRUITS PAR L'ALGORITHME ( <a href="http://www.phylogeny.fr">HTTP://WWW.PHYLOGENY.FR</a> ) (DEREEPER ET AL., 2008). ....	78
FIGURE 17: ARBRE PHYLOGENETIQUE DU GENE GYRB DES ISOLATS LIES AUX CLADE 1 ET 2 CONSTRUIT PAR L'ALGORITHME ( <a href="http://www.phylogeny.fr">HTTP://WWW.PHYLOGENY.FR</a> ) (DEREEPER ET AL., 2008). ....	79
FIGURE 18: ARBRE PHYLOGENETIQUE DU GENE GYRB DES ISOLATS LIES AUX CLADE 1 ET 2 CONSTRUIT AVEC SUR MEGA 7, AVEC "FIT-SUBSTITUTION MODEL" (GTR+G+I). ....	80
FIGURE 19: ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES SEQUENCES DES GENES GENERE AVEC MR BAYSE, L'ARBRE CONSENSUS, TRACE SUR GENIOUS A) GENE GYRB, B)GENE RPOD,C) CONCATENATION DES GENES RPOD ET GYRB.....	81

<b>FIGURE 20: ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES SEQUENCES DU GENE ATPD DES GENES SUR MEGA7,AVEC “FIT-SUBSTITUTION MODEL” (GTR+G+I).....</b>	<b>82</b>
<b>FIGURE 21: ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES SEQUENCES DU GENE DNAK SUR MEGA7,AVEC “FIT-SUBSTITUTION MODEL” (GTR+G+I) .....</b>	<b>82</b>
<b>FIGURE 22: REPOSE POSITIVE AU TEST DIFFERENTIEL DE PATHOGENICITE REACTION D’HYPERSENSIBILITE POSITIVE.....</b>	<b>88</b>
<b>FIGURE 23: SYMPTOMES REPRODUITS PAR INOCULATION ARTIFICIELLE PAR PIQURE (A : NECROSE DU POINT D’INOCULATION B, C, D : PROGRESSION DE LA NECROSE TOUT AU LONG DE LA GAINE, E ET F: PROGRESSION DES ZONES SATUREE TOUT AU LONG DU LIMBE NECROSE, G : NOIRCISSEMENT DES TISSUS .....</b>	<b>90</b>
<b>FIGURE 24: SYMPTOMES REPRODUITS PAR INOCULATION ARTIFICIELLE PAR INFILTRATION (A : ZONE SATUREE APRES 3 JOURS D’INCUBATION, B :ZONE SATUREE ACCOMPAGNEE DE NECROSE C ET D PROGRESSION DES NECROSES ET DEPERISSEMENT DES FEUILLES). .....</b>	<b>91</b>
<b>FIGURE 25: SYMPTOMES OBTENUS PAR INOCULATIONS DES SOUCHES SUR LES PLANTULES ET PLANTS ADULTES DE CHOU (BRASSICA OLERACEA). A ET B: SYMPTOMES SUR JEUNES PLANTULES.C :SYMPTOMES SUR PLANTS ADULTES.....</b>	<b>92</b>
<b>FIGURE 26: RE-ISOLEMENT A PARTIR DE LA FEUILLE DE CHOU INOCULEE PAR IMMERSION AVEC LA SOUCHE X7. A : FEUILLE DE CHOU PRESENTANT DES SYMPTOMES 8J APRES INOCULATION B : CULTURE PURE OBTENUE APRES REISOLEMENT SUR NA (48H D’INCUBATION A 30°C).....</b>	<b>93</b>
<b>FIGURE 27: REPRODUCTION DES SYMPTOMES SUR FEUILLE DE CHOU 8J APRES INOCULATION PAR IMMERSION PAR LA SOUCHE X14.....</b>	<b>93</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN:** Acide Désoxyribo Nucléique.
- ADNr :** Acide Désoxyribo Nucléique ribosomique
- BET :** Bromure d'éthidium
- BLAST :** Basic Local Aligement Search tool
- BLS:** bacterial leaf streak .
- CFU:** Colony Forming Unit .
- CIMMYT :** Centro International de Mejaramiento de Maize Y Trigo.
- dNTP :** desoxynucleoside triphosphate
- ENSA :** Ecole Nationale Superieure Agronomique
- EPS:** Exopolysaccharide.
- FAO:** Food and Agriculture Organization.
- GYCA:** Glucose Yeast Chalk Agar.
- H2S:** Sulfure d'hydrogène.
- IF:** Immuno fluorescence .
- LPGA :** Extrait de Levure Peptone Glucose Agar .
- MADR:** Ministre de l'Agriculture, du Développement rural.
- NA :** Nutrient Agar.
- OEPP:** Organisation Européenne de la Protection des Plantes.
- PCR:** Polymerase Chain Reaction.
- PSA:** Agar Peptone Saccharose.
- SAU :** surface agricole utile.
- TTSS = T3S:** Type Three Secretion System
- UE:** Union européenne.
- USA:** United States American.
- WBC:** Wilbrink Boric Acid- Cephalixin Medium.
- X. t. pv. t:** *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*.
- X.c. :** *Xanthomonas campestris*.
- X.t. :** *Xanthomonas translucens*.
- Xcc :** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
- XTS:** *Xanthomonas translucens* Selective agar.
- ML :** Maximum Likelihood
- MLSA :** Multilocus sequence analysis
- MLST :** Multilocus sequence typing

**CbsA** : The cellobiohydrolase

**CRISPR** : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

**pv**: Pathovar

Introduction	1
I- SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
Chapitre 1 : Généralités sur les <i>Poaceae</i>	5
1.2. Evolution de la production des céréales et du blé dans le monde	5
1.4. Importations et exportations des céréales et du blé en Algérie	8
1.5. Généralités sur le blé et son importance en Algérie	8
1.5.1. Origine du blé cultivé	8
1.5.2. Aspect botanique du blé	9
1.5.3. Stades de végétation du blé	9
1.5.4. Systèmes de cultures et rotations	10
1.5.5. Les utilisations du blé	11
1.5.6. La situation du blé en Algérie	11
1.5.7. Les maladies bactériennes des céréales et du blé évolution et émergence	12
Chapitre 2. Le genre <i>Xanthomonas</i>	14
2.1. Généralités sur le genre <i>Xanthomonas</i> (Dowson, 1939)	14
2.1.1. Évolution taxonomique et outils de typage des bactéries phytopathogènes	14
2.1.1.1 Évolution taxonomique et outils de typage du genre <i>Xanthomonas</i>	15
2.1.1.1.1 Les techniques classiques soutenues par les profils biochimiques et métaboliques	15
2.1.1.1.2 Les techniques sérologiques	15
2.1.1.1.3 Étude du profil des acides gras et l'hybridation DNA-DNA	15
2.1.1.1.4. Outils moléculaires de typage.	16
2.1.1.1.5. L'analyse de l'ARN 16 S ribosomal.	16
2.1.1.1.6. L'analyse des multilocus (MLST, MLSA).	17
2.1.1.1.7. Autres outils de typage moléculaire.	17
2.1.1.1.8. La technique du « Multi Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis » (MLVA).	17

2.1.1.1.9. Le spoligotypage basé sur le CRISPR.	18
2.1.1.1.10. Séquençage génomique.	18
2.1.2. Phylogénie de <i>Xanthomonas</i>	18
2.1.3. Écologie et épidémiologie du genre <i>Xanthomonas</i> en interaction avec les facteurs environnementaux	19
2.1.4. Symptômes engendrés par <i>Xanthomonas</i>	20
2.1.5. Facteurs de pathogénie	22
2.1.5.1 Les enzymes	23
2.1.5.2. Les polysaccharides et la gomme de xanthane	23
2.1.5.3. Le pigment xanthomonadine	24
2.1.5.4. Les toxines	24
2.1.5.5. Les adhesines	25
2.1.5.6. Système de sécrétion type 3(SST3) et un effecteur Hrp	25
2.1.5.7. Détection du quorum sensing (QS) et régulation de la virulence	26
2.1.6. Principales cultures hôtes du genre <i>Xanthomonas</i>	27
a- Espèces hôtes parmi les Poaceae	27
b- Quelques espèces hôtes parmi les maraichères	28
c- Quelques espèces arboricoles hôtes	29
Chapitre 3. L'espèce <i>Xanthomonas translucens</i> (Johnson et Reddy, 1917) ; Vauterin, Hoste, Kersters et Swings, 1995)	30
3.1. Maladies et symptômes causés par <i>Xanthomonas translucens</i>	30
3.2. L'agent causal : l'espèce <i>Xanthomonas translucens</i> (Johnson et Reddy, 1917); Vauterin, Hoste, Kersters et Swings, 1995)	30
3.3. Evolution de la nomenclature de <i>Xanthomonas translucens</i> et relation hôte-pathogène	31
3.3.1. Classification évolutionniste et relation entre les espèces <i>Xanthomonas translucens</i> et <i>X. campestris</i>	31
3.3.1.1 Quelques notions sur l'espèce <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel, 1895) Dowson, 1939 emend. Vauterin et al., 1995	31

3.3.1.2 Classification de l'espèce <i>X. campestris</i> , Notion de pathovar et de race	31
3.3.1.3. .Maladies causées par l'espèce <i>X. campestris</i> et gamme d'hôtes associée	32
3.3.1.4. . Les symptômes causés par <i>X. campestris</i> sur les <i>Brassicaceae</i>	32
-Symptômes vasculaires	32
3.3.1.5. Écologie et cycle biologique de <i>X. campestris</i>	34
3.3.1.6. Les gènes reliés à la pathogénie de <i>X. campestris</i>	36
3.3.2. Statut actuel de la taxonomie de <i>X. translucens</i>	36
3.4. La gamme d'hôtes de l'espèce <i>X. translucens</i>	38
3.5. Symptômes reliés à l'espèce <i>X. translucens</i>	41
3.5.1. Relation entre les symptômes vasculaires et parenchymateux chez <i>Xanthomonas translucens</i>	42
3.6. Epidemiologie de l'espèce <i>X. translucens</i>	43
3.6.1. Développement de la maladie et conditions environnementales	43
3.6.2. Conservation du pathogène	44
3.6.3. Distribution géographique	45
3.7. Impact économique de la maladie	46
3.8. Techniques de Diagnostic et détection de <i>Xanthomonas translucens</i>	47
3.8.1. Techniques de détection par isolement sur milieux nutritifs et caractères morphologiques et culturels	47
3.8.2. Caractères physiologique et biochimiques	48
3.8.3. Techniques sérologiques et analyse des protéines et des profils d'acides gras	50
3.8.4. Caractérisation moléculaire et diversité	51
3.8.5. Evaluation du pouvoir pathogène	52
3.8.5.1. Techniques d'inoculation	52
3.8.5.2. Échelles d'évaluation des symptômes.	53
3.9. Moyens de contrôle et de prévention contre l'agent pathogène	53
II- EXPERIMENTATION :	56
PARTIE 1 : CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES ISOLATS	56

1.1 MATERIEL ET METHODE	56
1.1.1 Prospections de champs céréaliers	56
1.1.2 Analyse des échantillons malades et des lots de semences	58
1.1.2.1 Isolement	58
1.1.2.1.1 Traitements des échantillons atteints	58
1.1.2.1.2 Analyse des résidus et des échantillons de la rhizosphère	58
1.1.2.1.3. Analyses des lots de semences.	58
- Macération	58
- DILUTION ET ENSEMENCEMENT DES MACERAT DE SEMENCES	59
1.1.3. Caractérisation préliminaire des isolats	59
1.1.4. Caractérisation physiologique et biochimique des isolats	59
1.2. RESULTATS	60
1.2.1. Observations des symptômes aux champs et prélèvement des échantillons	60
1.2.2 Symptomatologie et isollements des bactéries	61
1.2.3 Caractères morphologiques et culturaux et diversités des profils biochimiques et physiologiques des isolats	63
PARTIE 2: TYPAGE MOLECULAIRE PAR PCR ET SEQUENÇAGE	67
2.1 MATERIELS ET METHODES	67
2.1.1 Extraction de l'ADN	67
2.1.2 Caractérisation par amplification spécifique	67
2.1.3. Caractérisation avec le séquençage des gènes de ménage	68
2.1.4. Analyse phylogénétique	71
2.1.4.1. Analyse des séquences des gènes MLSA	71
2.1.4.2. Alignement et construction des arbres phylogénétiques	71
2.2. RESULTATS	73
2.2.1. Attribution des isolats à l'espèce <i>X. translucens</i>	73
2.2.2 Reclassification des isolats sur la base des alignements et des analyses phylogénétiques.	74

PARTIE 3 : ETUDE DU POUVOIR PATHOGENE DES SOUCHES	83
3.1. MATERIELS ET METHODES	84
3.1.1. Préparation du matériel végétal	84
3.1.1.1. Plants de blé pour la première étude	84
3.1.1.2. Plant de blé orge et avoine pour la deuxième étude	84
3.1.1.3. Plant de <i>Brassicaceae</i>	85
3.1.2. Préparation de l'inoculum.	85
3.1.3. Méthodes d'inoculation	85
3.1.4. Dispositif expérimental	86
3.1.5. Les notations	87
3.1.6. Ré-isolement et re-identification	87
3.2. RESULTATS	87
3.2.1. Diversité et spécificité des symptômes	88
3.2.2. Confirmation de l'atypie des symptômes sur blé par la réaction spécifique des <i>Brassicaceae</i>	92
DISCUSSION	93
CONCLUSION GENERALE	98
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99
Annexes	126

# **INTRODUCTION GENERALE**



## Introduction

Les céréales à paille sont des monocotylédones appartenant à l'ordre des *Poales* et à la famille des *Poaceae* ou Parfois aussi dénommées *Gramineae*. Cette famille rassemble une série d'espèce principalement herbacées, parmi lesquels la présence d'une tige ou chaume cylindrique avec entrenœuds creux et des feuilles alternes à nervation parallèle, dont la gaine enveloppe la tige . Parmi les espèces céréalières, le blé dont le grain appelé caryopse et produit par autofécondation est riche en protéines et hydrates de carbone constitue la nourriture de base de nombreux peuples. Le blé est une espèce monocotylédone appartenant au genre *Triticum* de la famille des *Poacées*. Les deux espèces céréalières les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*). De nombreuses autres espèces de *Triticum* se différencient par leur degré de ploïdie et par le nombre de chromosomes (Naville, 2005). Le blé constitue aussi la première ressource en alimentation humaine au monde, la surface qui lui est consacrée sur la planète dépasse celles de toutes les autres cultures.

La filière céréalière constitue l'une des principales filières de la production agricole en Algérie, La production des céréales, la jachère comprise, occupe environ 80% de la superficie agricole utile (SAU) du pays. La superficie emblavée annuellement en céréales se situe entre 3 à 3 ,5 millions d'hectares. Les superficies annuellement récoltées représentent 63% des emblavures. La filière céréalière apparaît donc comme une spéculation dominante et est présente dans tous les étages bioclimatiques, y compris dans les zones sahariennes. Cependant, en relation avec le marché mondial, les produits céréaliers représentent plus de 40% de la valeur des importations des produits alimentaires (Djermoun 2009).

La culture de blé pratiquée en Algérie utilise aussi bien des génotypes locaux traditionnels que des génotypes plus récemment introduits. Le blé en Algérie, comme pour toutes les régions céréalières dans le monde est confronté à des facteurs limitants d'ordre biotiques responsables de dégâts assez importants. Ces pressions supplémentaires mettent à rudes épreuves la résistance de ces génotypes déjà affaiblis par les conditions climatiques pas toujours clémentes. Les variétés locales sont connues d'une part pour leur potentiel de production assez limité, et d'autre part pour leur adaptation aux conditions locales induites par des pressions sélectives intenses, exercées en majeure partie par les facteurs du milieu ou alors liées à l'introduction de génotypes connus pour leur haut potentiel de production. Ces derniers par contre disparaissent souvent à cause de leur vulnérabilité à la sécheresse et leur incapacité d'adaptation aux contraintes de ce nouvel environnement.

Les nombreuses introductions des nouveaux génotypes au cours des années ont toutefois fini par exclure jusqu'à la disparition de plusieurs génotypes rustiques locaux, provoquant ainsi une uniformisation qui atteint au plus haut degré la diversité des blés durs dans l'ensemble du pays. De nombreuses études ont été effectuées sur les différents facteurs et principalement les facteurs biotiques parmi lesquels les ravageurs, les maladies virales, fongiques et notamment les maladies bactériennes du blé. Les céréales sont en effet sujettes à plusieurs maladies bactériennes, transmises via plusieurs voies. Parmi les plus importants réservoirs d'inoculum bactérien, la semence joue un rôle primordial. Celle-ci est considérée comme la source primaire de nombreux pathogènes, ceux-ci peuvent s'installer sur et dans la graine et peuvent se transmettre facilement à la plante et aussi à la rhizosphère lors de la germination. Par ailleurs, la conservation des pathogènes au niveau du sol et des résidus de récoltes est largement rapportée (Malavolta., et al., 2000, )

Les maladies les plus connues pour leur impact économique sur les céréales en général et sur le blé en particulier sont celles associées au genre *Xanthomonas* communément limitées aux différents pathovars de l'espèce *X. translucens*

Ce travail est par conséquent consacré à la recherche de la maladie de la strie bactérienne causée par *Xanthomonas translucens* intervenant sur les céréales par ses différents pathovars (*cerealis*, *translucens*, *undulosa*...). L'incidence de ces bactéries sur le rendement est assez importante. L'impact de cette maladie est d'autant plus important, lorsque les conditions favorables à son développement se trouvent réunies. Aussi, la conservation de cette bactérie au niveau de la semence, de la rhizosphère, des débris végétaux et sur les graminées spontanées constitue un réservoir non négligeable pour la régénération de l'inoculum.

Le genre *Xanthomonas* est responsable de plusieurs maladies phytopathogènes, les espèces qui lui sont attachées présentent des gammes d'hôtes diversifiées et en continuel changement affectant plusieurs familles botaniques parfois assez éloignées. Ce phénomène d'adaptation pourrait entraver toutes les lois de la spécificité hôte pathogène.

La nomenclature et la classification très controversée des membres de ce groupe sont régulièrement actualisées. Ces continuels remaniements sont souvent liés à l'évolution des nouvelles techniques de caractérisation.

Ce travail est consacré d'une part à l'étude de la maladie de la strie bactérienne du blé en plein champ. Pour cela plusieurs parcelles de blé ont été prospectées dans les régions de l'Algérois, incluant les wilayas d'Alger, de Tipaza, de Bouira, de Boumerdes et de la wilaya de Tiaret

située à l'Ouest du pays. Les champs de blé prospectés comptent des stations expérimentales, des fermes-pilotes et des champs de particuliers. L'étude s'est aussi étalée à l'analyse de plants présentant des symptômes typiques de la maladie collectés au niveau de parcelles sous pivots dans la région de Ménée (El Goléa) située dans le Sud du pays.

D'autre part, cette étude s'est penchée également sur la vérification de la présence et la conservation de l'agent pathogène au niveau du sol et également dans les résidus de récolte de quelques zones prospectées ayant présenté des symptômes similaires aux attaques bactériennes. En effet, l'inoculum provenant des plants atteints, une fois enfoui dans le sol avec les chaumes lors des opérations culturales, peut se maintenir et constituer une source potentielle de contamination pour la nouvelle culture.

La source primaire de l'inoculum étant la semence, une partie de ce travail est aussi consacrée à la vérification de l'état sanitaire de quelques lots de semences produites et multipliées en Algérie, vis-à-vis de l'agent de la strie bactérienne.

Les isollements à partir des différents échantillons par les techniques recommandées dans chacun des cas dans la littérature nous ont permis de constituer une collection d'isolats à caractériser phénotypiquement et génotypiquement.

La caractérisation phénotypique consiste en une mise au point sur les caractères morphologiques culturaux, biochimiques et physiologiques ainsi que la détermination du pouvoir pathogène des isolats. La caractérisation génotypique entreprise est basée sur une étude moléculaire corroborée par l'amplification d'une région conservée au niveau de l'ITS 16S-23S, en utilisant des amorces spécifiques recommandées par Maes et Garbeva (1996). La confirmation des résultats obtenus a été soutenue par un séquençage de gènes faisant partie du schéma de l'analyse (MLSA) des multilocus (*gyrb*, *rpoD*, *dnak* et *atpD*) avec les amorces recommandées par Mhedbi-Hajri et al. (2013). Cet outil d'analyse a été développé et recommandé par plusieurs auteurs dont Fischer-Le Saux et al (2008), Khojasteh et al (2019). Les séquences déposées dans la base de données Gene Bank ont fait l'objet d'une étude phylogénétique et la construction des arbres phylogénétiques respectifs de chaque gène. Cette étape est précédée par une étude comparative par des alignements avec les séquences disponibles dans les bases de données. L'analyse phylogénétique est réalisée en prenant appui sur deux approches, la méthode du bootstrap non paramétrique, utilisée pour estimer le degré de confiance accordé aux nœuds d'un arbre phylogénétique obtenu par maximum de vraisemblance (Felsenstein, 1985), utilisée pour évaluer le soutien de relations phylogénétiques spécifiques (Cummings et al., 20003) et la procédure bayésienne en termes de probabilités

postérieures. Une concaténation des gènes et la construction des arbres consensus sont réalisés dans le but d'assurer une affiliation cladistique robuste pour les isolats.

En développant une approche innovante et unique, initialement focalisée sur les agents responsables de la strie bactérienne du blé et des céréales en Algérie, cette étude ouvre la voie à une approche de la diversité génétique des *Xanthomonas* en association avec les graminées et ouvre la voie à une réflexion sur l'émergence de nouvelles espèces non encore décrites dans le monde et en Algérie.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre 1 : Généralités sur les *Poaceae*

La famille des *Poaceae* regroupant les céréales et les graminées, compte environ 12 000 espèces groupées en 780 genres présentant une grande importance économique, de par leur utilisation dans l'alimentation humaine et animale et aussi leur introduction dans plusieurs industries. Les graminées sont aussi cultivées comme pelouses. Parmi ces espèces, le blé, le maïs, l'orge, le triticale, le millet et le riz sont des monocotylédones ayant toutes émergé dans le triangle fertile, du Moyen-Orient et du Proche Orient. (Clerget, 2011.)

De nombreuses espèces de graminées sont considérées comme adventices affectant les cultures (*Cynodon dactylon*, *Echinochloa colona*, *Eleusine indica*, *Sorghum halepense*, *Imperata cylindrica*...).

Parmi les céréales le blé (*Triticum sp*), cette espèce est souvent prise comme référent pour définir les caractères botaniques de sa famille constituée elle-même de douze sous-familles.

1.1. Les différentes espèces céréalières cultivées dans le monde

Selon Clerget, (2011), il existe trois grands groupes de céréales domestiquées et cultivées, le premier groupe formé par le blé, l'orge, le seigle et l'avoine, ayant pour origines, le Moyen-Orient et le Proche Orient. Le deuxième grand groupe est formé par le maïs dont l'origine est l'Amérique centrale. Un troisième grand groupe est constitué principalement par le riz originaire des régions chaudes et humides de l'Asie du Sud-Est. Il existe cependant d'autres espèces de céréales aussi dans le monde non moins importantes notamment en Afrique dont, le seigle, le millet, l'alpiste des Canaries...etc.

#### 1.2. Evolution de la production des céréales et du blé dans le monde

Le maïs, le blé et le riz sont les trois principales céréales cultivées dans le monde. Les principaux exportateurs de céréales sont l'Argentine, l'Australie, le Canada, les États-Unis et l'Union européenne ; les principaux exportateurs de riz sont les États-Unis, l'Inde, le Pakistan, la Thaïlande et le Vietnam. Les dernières indications concernant l'offre de céréales et la production mondiale de céréales s'établissent à 2,586 milliards de tonnes (Burny, 2007, Bulletin FAO 2018), les dernières statistiques concernant la production mondiale (figure 1) sont reproduites dans le tableau 1 récapitulant les niveaux de production de la campagne (2014-2015) à la campagne (2018-2019).

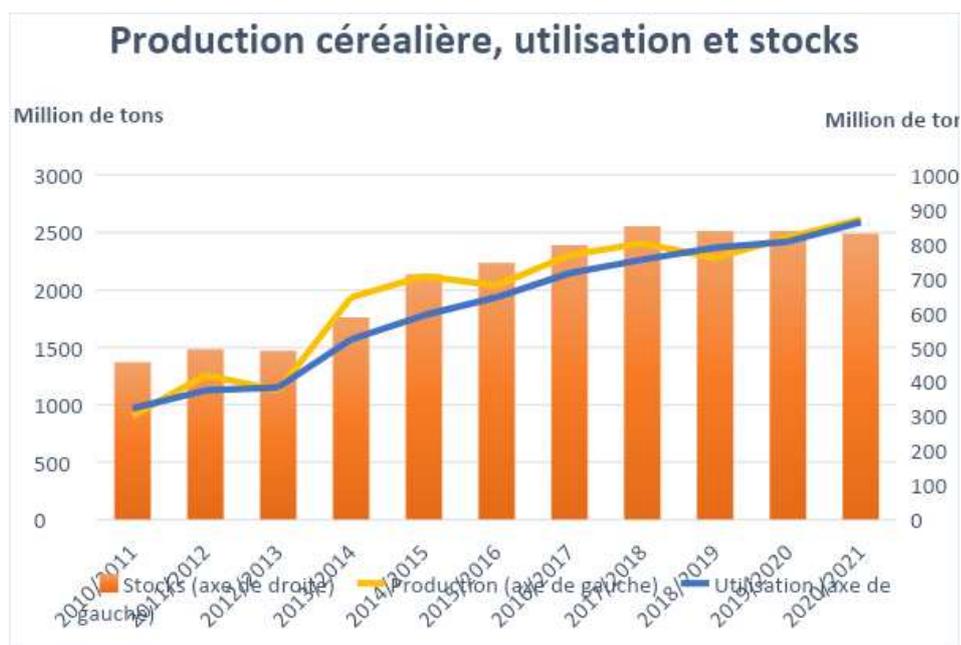


Figure 1: Production et utilisation mondiale des stocks des années (2010 - 2020) dans le monde

 Source : <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>

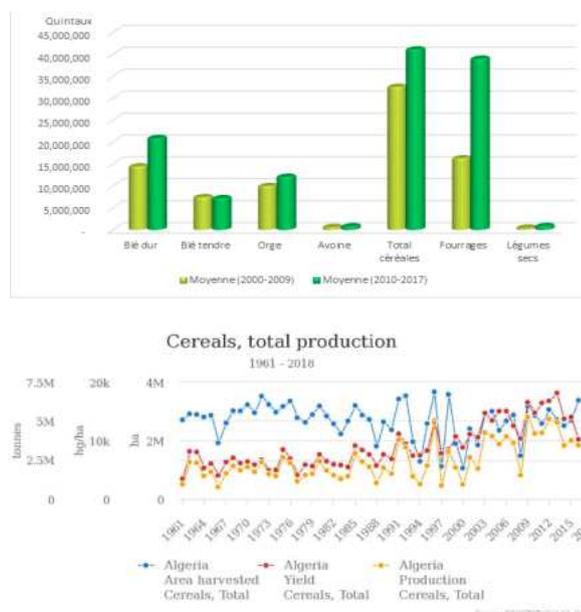
Tableau 1: Production, disponibilité et utilisation du blé et des céréales dans le monde

		2016/17	2017/18	2018/19	2019/20 estimation	2020/21 prévision Précédent (03 sept.2020)	Dernière (08 oct. 2020)
M a r c h é m o n d i a l d e s c é r é a l e s M a r		(.....millions de tonnes .....)					
	Production 1/	2660.7	2693.1	2645.9	2706.7	2764.9	2762.4
	Disponibilités 2/	3455.3	3532.2	3525.7	3574.4	3645.8	3635.3
	Utilisation	2613.8	2645.3	2675.3	2689.2	2746.4	2743.7
	Commerce3/	406.6	422.8	410.5	437.0	441.4	447.6
	Stocks de clôture	839.2	879.8	867.8	872.9	895.5	889.6
		(.....pour cent .....)					
	Rapport stocks mondiaux-utilisation	31.7	32.9	32.3	31.8	31.8	31.6
	Rapport stocks des principaux exportateurs/ utilisation total 5/	17.8	18.3	18.9	18.4	19.1	19.1
		(.....millions de tonnes .....)					
Production 1/	763.5	761.6	732.4	761.6	760.1	764.9	

c h é m o n d i a l d e s b l és	Disponibilités 2/	1006.2	1026.6	1019.4	1032.7	1036.6	1039.7
	Utilisation	736.9	738.1	751.4	750.8	756.1	756.6
	Commerce3/	176.9	177.4	168.3	184.2	181.5	184.5
	Stocks de clôture	265.0	287.0	271.0	274.7	282.2	284.8
		(.....pour cent .....) )					
	Rapport stocks mondiaux/utilisation	35.9	38.2	36.1	36.3	36.6	36.9
	Rapport stocks des principaux Exportateurs/utilisation totale 5/	19.8	21.0	18.1	15.3	15.2	15.5

Source : <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/1.3>. Production des céréales en Algérie

La production des céréales en Algérie a toujours connu une forte irrégularité, du fait qu'elle soit dépendante et souvent conditionnée par les aléas climatiques (figure 2). Cette dépendance conduit souvent à des alertes de sécheresse durant les périodes les plus sensibles des céréales. La céréaliculture occupe une superficie avoisinant les trois millions d'hectares (Smadhi et Zella 2009) (Figure 2). Pour la campagne 2016-2017, celle-ci est rapportée de 3 509 000 ha contre 3 380 300 ha emblavée lors de la campagne 2015-2016 avec 1 602 340 ha de blé dur et 515 600 ha de Blé tendre et 1 303 260 ha d'orge (ONFAA 2017), la superficie irriguée consacrée à la céréaliculture est estimée à 250.000 hectares (MADR, 2017). De grands écarts de production de céréales et particulièrement de blé (Figure3) ont toujours été enregistrés, car souvent pratiquée en extensif et en régime pluvial.



**Figure 2: Production de céréales en Algérie**  
(<http://madrp.gov.dz/agriculture/statistiques-agricoles> , FAOSTAT 2020)

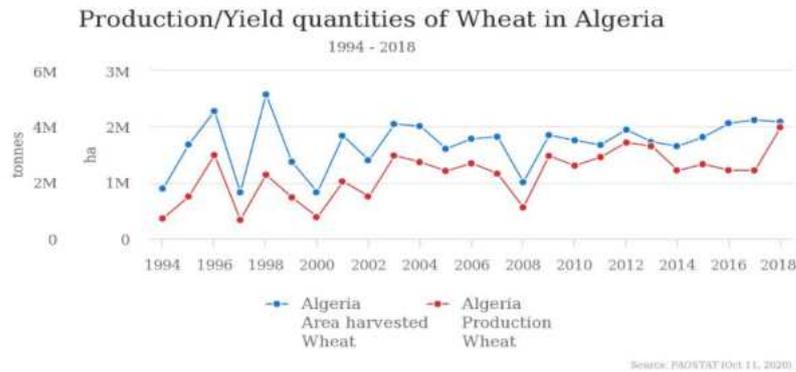


Figure 3: Production de blé en Algérie (FAOSTAT 2020)

#### 1.4. Importations et exportations des céréales et du blé en Algérie

Les importations des céréales en l'année 2019 ont représenté 34,15% du taux globale des importations, Le taux montre une baisse de 12,06%(<https://www.commerce.gov.dz/statistiques/cereales>) par rapport aux années précédentes. Le taux d'importation en matière de blé en Algérie est en augmentation(Figure 4), ceci étant lié à l'augmentation de la demande et aux différentes contraintes dont les maladies, entravant l'évolution de la production.

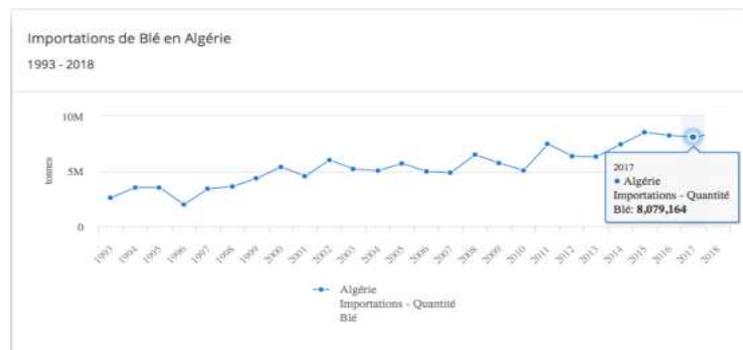


Figure 4: Évolution des taux d'importations de blé en Algérie (source FAOSTAT)

#### 1.5. Généralités sur le blé et son importance en Algérie

##### 1.5.1. Origine du blé cultivé

L'histoire de l'origine du blé cultivé a été rapportée par plusieurs auteurs, dont Aaronsohn, (1909), Clerget, (2011). Les blés domestiqués sont des espèces polyploïdes issues d'un croisement naturel et spontané d'espèces ancestrales sauvages diploïdes. (*Aegilops*, *Engrain*, *Sitopsis*,...) Diploïdes avec  $2n = 14$  chromosomes. Le blé dur ou amidonnier (*Triticum durum* L.) est une espèce tétraploïde ( $4n = 28$ ) issue du croisement naturel et spontané entre l'engrain et le *Sitopsis*. Les blés tendres ou froments *Triticumaestivum* Lamk espèces hexaploïdes ( $6n = 42$ ) riches en amidon est une nouvelle hybridation spontanée plus récente entre l'amidonnier et l'*Aegilops*.

### 1.5.2. Aspect botanique du blé

Le blé est une plante annuelle, semée en automne (blé d'hiver) ou au printemps (blé de printemps) et fructifie en été. Le blé est une espèce végétale bien différenciée et composée des deux parties aérienne et racinaire. La tige appelée aussi chaume est creuse et est cloisonnée par des nœuds d'où prennent naissance délicatement les feuilles. Celles-ci sont régulièrement agencées en deux rangées opposées autour de la tige, les feuilles de blé sont sans pétiole et engainantes avec des nervures parallèles, tel est le cas pour toutes les espèces monocotylédones présentant à la base une languette qui correspond à une membrane protectrice appelée ligule. Plusieurs tiges sont issues d'un seul grain de blé au stade tallage (Feillet, 2000, Clerget, 2011). L'épi est composé d'une série d'épillets formés par des glumes composées elles-mêmes de trois à cinq fleurs délicatement enveloppées dans des glumelles protectrices brandissant une longue arête chez les blés barbus, les fleurs verdâtres de blé dépourvues de corolles sont uniformément rangées en épis situés à l'extrémité des chaumes est sont composées de glumelles en guise de sépales, de trois étamines et d'un carpelle qui abrite soigneusement l'ovule, d'un ovaire renflé à la base surmonté de deux stigmates plumeux. Le blé est une l'espèce autogame, la fleur est autofécondée par son propre pollen. Après fécondation, l'ovaire discrètement se transforme en un fruit, le "grain" ou caryopse formé d'un seul cotylédon de forme ovale de couleur variant du roux au blanc. La graine constituée un organe de réserve d'amidon et de gluten. Ce caryopse comprend une radicule et une gemmule qui s'allongent et percent pour donner les racines et la tige.

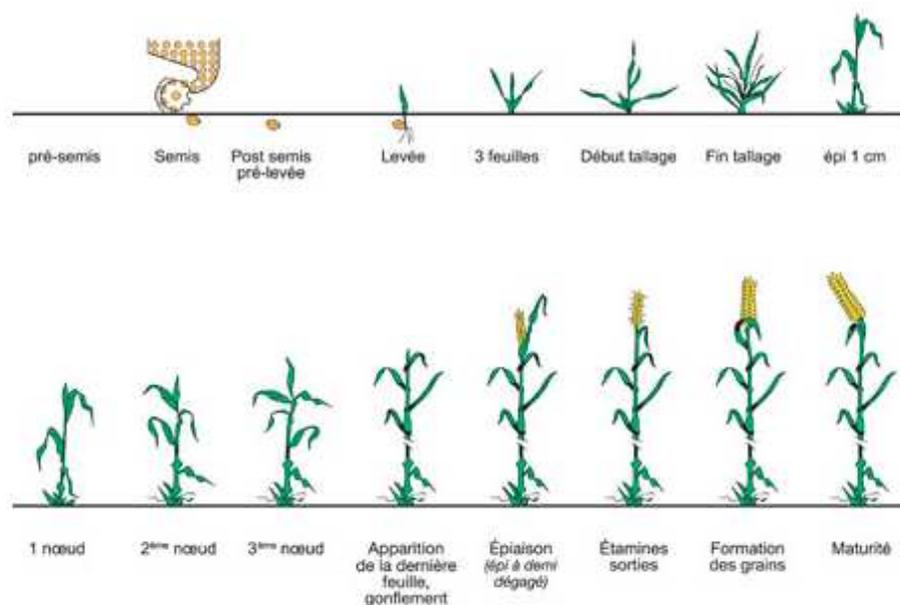
La description des racines de blé a été développée par Meunissier (1922). Les racines du blé se présentent sous deux types, les racines de l'embryon et les racines adventives.

### 1.5.3. Stades de végétation du blé

Les stades de végétations du blé (Figure 5) sont au nombre de treize si nous associant le stade de sénescence Stade 1 et 2 : germination, levée, Stade 3 : développement des feuilles Stade 4: le tallage Stade principal 5 et 6: élongation de la tige principale Stade principal 5 et 6: élongation de la tige principale Stade 7: gonflement de l'épi ou de la panicule, montaison Stade 8: sortie de l'inflorescence ou épiaison Stade 9: et 10 : floraison, anthèse Stade 11: développement des graines Stade 11: développement des graines Stade 12: maturation des graines Stade 13: sénescence, Les principaux stades de développement du blé (monocotylédones) selon Meier, U. (2001) sont :

0. Germination / levée / développement des bourgeons

1. Développement des feuilles (tige principale)
2. Formation des pousses secondaires / tallage
3. Élongation de la tige / formation de la rosette / développement des pousses (tige principale)
4. Développement des parties végétatives de récolte ou des organes de multiplication végétative / développement des organes de reproduction sexuée, gonflement de l'épi ou de la panicule (tige principale)
5. Apparition de l'inflorescence (tige principale) / épiaison
6. Floraison (tige principale)
7. Développement des fruits
8. Maturation des fruits ou graines
9. Senescence et mort ou début de la période de dormance



**Figure 5: Stades phénologiques du blé (Source : Échelle BBCH <https://www.syngenta.fr>)**

#### 1.5.4. Systèmes de cultures et rotations

La rotation est la succession dans le temps de cultures sur une même parcelle afin d'augmenter la fertilité du sol et de limiter certains facteurs dont l'incidence des maladies et ravageurs et aussi pour contrer l'érosion en ayant toujours une culture en place. Plusieurs rotations sont menées de par le monde dont celles combinant Blé d'hiver-Maïs-jachère, Colza-Blé-Orge, Blé de printemps-Blé d'hiver-Maïs-Tournesol Maïs-Soja Blé d'hiver-Maïs-Pois, pour les

productions végétales européennes le système céréales à paille, maïs grain et colza est devenu le plus dominant (Mignolet, 2007). Actuellement et par soucis économique et environnemental, un système « Pois-Colza-Blé » est proposé afin de promouvoir les protéagineux dans les rotations (Schneider 2010).

#### **1.5.5. Les utilisations du blé**

Outre les utilisations classiques du blé, de nouvelles utilisations à l'échelle industrielle apparaissent depuis quelques années telles que la fabrication de bioplastiques à base de gluten ou d'amidon, les sacs en plastique, les plastiques agricoles, les emballages. Ces bioplastiques ont l'avantage d'être biodégradables et renouvelables. L'amidon est aussi utilisé dans des épaississants alimentaires et est utilisé en tant que dragéifiant, dans l'industrie pharmaceutique, dans la fabrication de papier, de carton, mais aussi de détergents. L'amidon est aussi utilisé dans le processus de fabrication du bioéthanol et comme biocarburants de première génération issue de produits alimentaires (blé et maïs) (Clement Debiton 2010).

#### **1.5.6. La situation du blé en Algérie**

L'évolution des superficies, de production et des rendements de blé en Algérie de la dernière décennie (2004-2014) est représentée par le tableau II (FAOSTAT, 2014) qui indique des fluctuations irrégulières en fonction des années.

Le blé est cultivé à travers quatre zones en Algérie (Figure 6) dépendant des conditions climatiques et spécialement de la pluviométrie, les différentes zones agroclimatiques sont démarquées par le taux de précipitation différent d'une zone à une autre (tableau 2)

- La zone humide et subhumide qui comprend des régions littorales et sublittorales (Tipaza, Skikda, Guelma, El Taref, Béjaïa, Tizi Ouzou, Annaba), dont la pluviométrie est supérieure à 600mm

- La zone semi-aride avec une distribution irrégulière (Constantine, Bouira, Médéa, Tlemcen, Mila, Souk Ahras, Chlef, Ain Témouchent, Relizane, Sidi Bel-Abbès, Ain Defla) avec une pluviométrie de 350 à 500 mm.

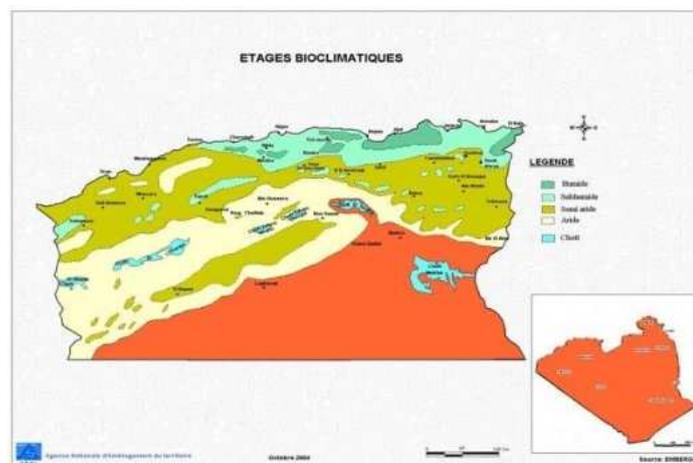
- La zone subaride (Tissemsilt, Tiaret, Sétif, Saida, Oum EL-Bouaghi, Bordj Bou Arréridj) avec une faible pluviométrie (200-350 mm).

La région du Sud qui se caractérise par des périmètres irrigués et des cultures oasiennes (Chehat, 2006 ; Boulal et al., 2007). Selon Zaghouane et *al.*, (2011)

**Tableau 2: Le zonage bioclimatiques en Algérie**

Etages bioclimatiques	Pluviométrie annuelle(mm)	Superficie (ha)	%de la superficie totale
Humide	>900	773 433	0.32
Sub humide	600-900	3 401 128	1.42
Semi aride	300_600	9 814 985	4.12
Aride	100-300	11 232 270	4.71
Saharien	<100	212 766 944	89.43

Source :Derouiche, 2007

**Figure 6: Carte des zones bioclimatiques en Algérie. Source : ANAT 2004**

### 1.5.7. Les maladies bactériennes des céréales et du blé évolution et émergence

Le principal facteur déterminant de l'émergence des nouvelles maladies sur les céréales et toutes les espèces cultivées est surtout lié aux migrations des bactéries phytopathogènes. Cette émergence implique des perturbations à la fois dans les niches écologiques des hôtes et aussi des pathogènes (Bartoli et Roux 2017). L'épidémiologie moléculaire est une approche qui permet de mieux comprendre ce phénomène de déplacement des agents phytopathogènes sur de longues distances et leur introduction dans de nouvelles régions. Plusieurs études de typage, dont les différentes techniques (microsatellite, MLSA, MLVA...) assises sur des analyses phylogénétiques, suggèrent en effet de nouvelles introductions bactériennes et l'émergence en hausse de plusieurs nouveaux pathosystèmes (Leduc et al 2015, ).

Cette évolution est actuellement bien rehaussée par la performance des techniques de séquençage génomique qui sont immédiatement suivies par le développement d'outils d'annotation automatisés. Celles-ci permettent l'identification des allèles de résistance chez les

plantes par une simple prédiction des déterminants génétiques des agents pathogènes (Bartoli et Roux 2017). D'autre part l'approche wgmlst s'appuyant sur des bases de données permet à son tour une analyse gène par gène des bactéries phytopathogènes et aide à attribuer une désignation d'allèle à chaque gène (Maiden et al., 2013; Jeong et *al.*, 2016; Bartoli et Roux 2017).

Cette émergence déterminée par des études moléculaires et des analyses phylogénétiques peut être expliquée par des remodelages génétiques régis par les phénomènes de transduction, de transformation ou de conjugaison accumulant les altérations génomiques les plus apparentes ajoutées à celles-ci les différentes erreurs inévitables et cumulées lors des réplifications de l'ADN (Klemm et Dougan. 2016).

## Chapitre 2. Le genre *Xanthomonas*

### 2.1. Généralités sur le genre *Xanthomonas* (Dowson, 1939)

Les cellules des bactéries de ce genre sont en forme de bâtonnet de 0.4 à 1.0  $\mu\text{m}$  sur 0.7 à 2.0  $\mu\text{m}$  de long, Gram négatives, les colonies formées par ces bactéries sont jaunes, convexes et mucoïdes. Le genre *Xanthomonas* appartient au Domaine des *Bacteria*, Phylum des *Proteobacteria*, Classe des *Gammaproteobacteria*, Ordre des *Xanthomonadales* et à la Famille des *Xanthomonadaceae*.

Cette bactérie est responsable de maladies sur une large gamme d'hôtes regroupant plus de 300 espèces végétales, parmi lesquelles environ 124 espèces de monocotylédones et 268 espèces de dicotylédones infectant ainsi, plusieurs familles dont les *Solanaceae*, les familles des *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Araceae*, *Araliaceae*, *Poaceae*,...etc. (Hayward et al., 1993). Les espèces et pathovars de ce genre se caractérisent par une spécificité stricte des tissus de l'hôte et par une gamme d'hôtes relativement étroite pour chaque pathovar (Vauterin et al., 1995). En effet, les travaux effectués sur différents génomes de ce genre suggèrent un modèle dans lequel des ensembles complexes d'adaptations tiennent compte de la spécificité au niveau génomique de l'hôte (Bogdanove et al., 2011).

#### 2.1.1. Évolution taxonomique et outils de typage des bactéries phytopathogènes

Le principal facteur déterminant de l'émergence des nouvelles maladies est surtout lié aux migrations des bactéries phytopathogènes. Cette émergence implique des perturbations à la fois dans les niches écologiques des hôtes et aussi des pathogènes (Bartoli et Roux 2017). Cette émergence peut être expliquée également par des remodelages génétiques régis par les phénomènes de transduction, de transformation ou de conjugaison accumulant ainsi, les altérations génomiques les plus apparentes et les différentes «erreurs» inévitables et cumulées lors des réplifications de l'ADN (Klemm et Dougan, 2016).

L'épidémiologie moléculaire est une approche qui permet de mieux comprendre ce phénomène de déplacement des agents phytopathogènes sur de longues distances et leur introduction dans de nouvelles régions. Plusieurs études de typage, en constante évolution, ont été rapportées.

En effet, Swings et Civetta. En 2012, ont décrit la technique d'hybridation qui présente l'avantage de mesurer l'homologie génomique totale et constitue une méthode taxonomique fiable pour la détermination de l'espèce notamment pour le genre *Xanthomonas*. Nous notons par ailleurs que la classification procaryote s'est toujours appuyée sur des comparaisons de similarité génomique depuis la fin des années 1960, lorsque l'hybridation ADN-ADN (DDH) a

été introduite pour vérifier ou améliorer les groupes d'organismes par des similarités génomiques approximatives (Ciufu et *al.*, 2019), d'autres techniques se sont ensuite succédé (microsatellite, MLSA ,MLVA...). Ces techniques sont assises sur des études moléculaires et des analyses phylogénétiques suggérant toujours de nouvelles introductions bactériennes et l'émergence en hausse de plusieurs nouveaux pathosystèmes (Leduc et *al* 2015, ).

Cette évolution est actuellement bien rehaussée par la performance des techniques de séquençage génomique qui sont immédiatement suivies par le développement d'outils d'annotation automatisés. Celles-ci permettent l'identification des allèles de résistance chez les plantes par une simple prédiction des déterminants génétiques des agents pathogènes (Bartoli et Roux 2017).

D'autre part l'approche wgmlst s'appuyant sur des bases de données permet à son tour une analyse gène par gène des bactéries phytopathogènes (Maiden et *al.*, 2013; Jeong, 2016; Bartoli et Roux 2017).

#### **2.1.1.1 Évolution taxonomique et outils de typage du genre *Xanthomonas***

La classification du genre *Xanthomonas* a été maintes fois relatée et par plusieurs auteurs (Stead, 1989, Vauterin et *al.*, 1990, Young et *al.*, 1991; Rademaker et *al.*, 2005, Schaad et *al.*, 2006, Parkinson et *al.*, 2007, Young et *al.*, 2008; Young et *al.*, 2009, Parkinson et *al.*, 2009, Young et *al.*, 2010) moyennant plusieurs techniques adoptées dans l'ordre de leur évolution.

##### **2.1.1.1.1 Les techniques classiques soutenues par les profils biochimiques et métaboliques**

##### **2.1.1.1.2 Les techniques sérologiques**

Plusieurs auteurs (Bradbury, 1986 ; Schaad et al, 1981 ; Schaad et al 2001) se sont en effet basés sur les caractères immunologiques et ses déterminants antigéniques de cette bactérie pour son identification en utilisant principalement les techniques ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay) (Soda et Cleverdon 1959 ; Civerolo et al.,1982, Gottwald et al., 1991, Swings et Civetta 2012) et la technique IF (immunofluorescence) (Bragard et Verhoyen, 1993). L'identification des bactéries et par voie de conséquence la classification bactérienne en général et du genre *Xanthomonas* en particulier a évolué au même rythme de l'évolution des techniques de diagnostic en microbiologie,

##### **2.1.1.1.3 Étude du profil des acides gras et l'hybridation DNA-DNA**

la classification des procaryotes est toujours appuyée sur des comparaisons de similarité génomique depuis la fin des années 1960, lorsque l'hybridation ADN-ADN (DDH) a été introduite pour vérifier ou améliorer les groupes d'organismes par des similarités génomiques approximatives (Ciufu *et al.*, 2019).

Depuis la mise au point de la capacité des bactéries à induire la maladie en 1901 par Erwin F Smith jusqu'à la proposition des regroupements dont l'un formera le genre *Xanthomonas* (Dawson, 1939), l'étude taxonomique du genre a fait l'objet de plusieurs rapports par plusieurs auteurs dont Fargier (2008) Hamza (2010) et ayant mis le point sur la taxonomie moléculaire et évolutive du genre *Xanthomonas*.

#### **2.1.1.1.4. Outils moléculaires de typage.**

Les techniques d'identification et les différents outils de typage moléculaire « Molecular typing tools » tel que la (Rep-PCR) repetitive-sequence-based et la technique (rapds) Random Amplification of Polymorphic DNAs ou AFLP (Bragard *et al.*, 1997 ; Pooler *et al.*, 1996 et Rademaker *et al.*, 2000), la technique (snps) single-nucleotide polymorphisms (Pieretti *et al.*, 2015), la technique (VNTR) variable numbers of tandem repeats (Zhao *et al.*, 2012) et la technique (ERIC-PCR) Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (Asgarani *et al.*, 2015). Toutes ces techniques se sont multipliées et ont été optimisées pour l'étude des espèces de ce genre, mais selon (Nakato *et al.*, 2019) n'ont pas toujours été en mesure de résoudre les questions liées aux modèles d'évolution de ces bactéries.

#### **2.1.1.1.5. L'analyse de l'ARN 16 S ribosomal.**

Cette technique était aussi longtemps utilisée dans les études phylogénétiques bactériennes (Stead, 1989, Vauterin *et al.*, 1990, Rademaker *et al.*, 2005, Schaad *et al.*, 2006, Parkinson *et al.*, 2007, Young *et al.*, 2009, Parkinson *et al.*, 2009, Young *et al.*, 2010 ; Sharma et Patil, 2011), en raison de sa présence dans presque toutes les bactéries et de son taux de mutation lent suggérant que les changements de séquence aléatoire sont une mesure plus précise du temps d'évolution des bactéries. Cette caractéristique fait de la séquence 16S de l'ARN un marqueur moléculaire spécifique du genre et permettant une classification rapide tel que démontré (Maes, 1993). Toutefois, cette technique qui permet l'identification du genre dans plus de 90% des cas (Janda *et al.*, 2007), a été relativement abandonnée pour plusieurs raisons : d'une part à cause de la faible résolution des espèces étroitement liées et d'autre part en raison de la présence de copies multiples des opérons d'ADN dans le génome (Patel, 2001, Stepkowski *et al.*, 2003). En effet, La présence de copies à différents seuils d'hétérogénéité peut être la cause d'une

surestimation des espèces bactériennes et fausser les analyses phylogénétiques cladistiques (Marchandin *et al.* 2003 ; Roudière *et al.*, 2007).

#### **2.1.1.1.6. L'analyse des multilocus (MLST, MLSA).**

En effet le séquençage du 16S a été secondé par l'analyse des multilocus (MLST, MLSA), cette méthode consiste à analyser plusieurs gènes « house keeping » conservés chez la plupart des bactéries notamment chez le genre *Xanthomonas*. Cette méthode présente en effet une capacité discriminatoire importante chez les procaryotes en général et le genre *Xanthomonas* en particulier (Gevers *et al.*, 2005, Granada *et al.*, 2015) et a beaucoup servi les analyses phylogénétiques (Young *et al.*, 2008 ; Martens *et al.*, 2008; Menna *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2009; Rajendhran *et al.*, 2011) et des bases de données internationales sont actuellement disponibles en ligne <http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.plet> <http://www.xanthomonas.org/tools.html>. Récemment, plusieurs publications ont proposé une approche dédiée aux *X. Translucens* (Khojasteh *et al.*, 2019).

#### **2.1.1.1.7. Autres outils de typage moléculaire.**

L'étude taxonomique du genre a fait l'objet de plusieurs rapports par plusieurs auteurs dont Fargier (2008) Hamza (2010) et ayant mis le point sur la taxonomie moléculaire et évolutive du genre *Xanthomonas*. Les techniques d'identification et les différents outils de typage moléculaire « Molecular typing tools » tel que la (Rep-PCR) repetitive-sequence-based et la technique (rapds) Random Amplification of Polymorphic dnas (Pooler *et al.*, 1996 et Rademaker *et al.*, 2000), la technique (snps) « Single-Nucleotide Polymorphisms » (Pieretti *et al.*, 2015), la technique (VNTR) variable numbers of tandem repeats (Zhao *et al.*, 2012) et la technique (ERIC-PCR) Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (Asgarani *et al.*, 2015) toutes ces techniques se sont multipliées et ont été optimisées pour l'étude des espèces de ce genre, mais selon (Nakato *et al.*, 2019) n'ont pas toujours été en mesure de résoudre les modèles d'évolution de ces bactéries.

#### **2.1.1.1.8. La technique du « Multi Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis » (MLVA).**

Cette technique permet de pallier les problèmes liés à l'étude évolutive des espèces momorphiques du genre *Xanthomonas* présentant des séquences d'espèces très proches révélant un degré de diversité relativement faible (Pruvost *et al.*, 2014; Nakato *et al.*, 2019)

#### 2.1.1.1.9. Le spoligotypage basé sur le CRISPR.

La technique de typage par les CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat). Ce sont des familles de séquences répétées dans l'ADN, de courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées qui ont été utilisées pour typer des souches bactériennes, une technique appelée spoligotypage (Spacer Oligonucleotide typing), est une technique de génotypage permettant d'identifier des séquences DR (Direct Repeat) au sein de la région CRISPR. Cette technique permettra d'améliorer la précision de l'identification génétique des souches de *Xanthomonas* dans les analyses d'épidémiologie moléculaire, en particulier lorsqu'il est utilisé en concomitance avec une autre méthode de génotypage (Jeong et al., 2019, Martins et al., 2019).

#### 2.1.1.1.10. Séquençage génomique.

Actuellement et avec le développement des différentes techniques de séquençage et la modération de leurs couts, plusieurs génomes particulièrement de souche type « strain type » sont disponibles. Environ 141 000 génomes procaryotes sont actuellement (mars 2018) publics dans la base de données de l'Assemblée au National Center for Biotechnology Information (NCBI) et ce nombre augmente de manière exponentielle (Brover et al., 2019) et le nombre de génomes pour les espèces de *Xanthomonas* est également en continuelle augmentation <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/xanthomonas>. Cependant, il a été noté que de nombreux génomes sont mal identifiés à genbank et un plan a été élaboré par la base de données NCBI pour trouver et corriger les génomes mal identifiés à l'aide de statistiques sur les comparaisons génomiques et d'un échafaudage de génomes identifiés de façon fiable de souches type « strain type » (Federhen et al., 2016) Ce plan se base sur un procédé qui utilise la méthode ANI (Identité nucléotidique moyenne) pour améliorer la précision de l'identification taxonomique des génomes procaryotes séquencés, Cette méthode est utilisée pour évaluer quotidiennement les nouvelles soumissions à genbank (Figueras et al., 2014; Ciufu et al., 2019). La disponibilité de séquences génomiques et l'accès aux bases de données combiné à l'optimisation des programmes d'analyse et d'annotation ont permis de mettre au point de nouvelles techniques

#### 2.1.2. Phylogénie de *Xanthomonas*

Les analyses phylogénétiques ont montré que les *Xanthomonas* peuvent être classées en deux clades, le clade I qui compte les espèces *X. translucens*, *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. theicola*, et *X. sacchari* et le clade II qui compte la majorité des autres espèces de *Xanthomonas* (Young et al., 2008 ; Gardiner et al., 2014 ; Pesce et al., 2018; Sapkota et al., 2020).

### 2.1.3. Écologie et épidémiologie du genre *Xanthomonas* en interaction avec les facteurs environnementaux

Cette bactérie est très influencée par les facteurs climatiques, selon Stromberg *et al.* (1999), les conditions environnementales peuvent avoir un effet considérable sur la densité de la population de *Xanthomonas* et également sur la sensibilité des plantes à l'infection. La bactérie est capable de supporter une large gamme de température. *In vitro*, les températures de croissance sont de 30°C à 35°C, au-delà de 40°C les températures deviennent létales (Dye et Leliott, 1974 et Stall *et al.* 1993), le seuil de 22°C constitue une température optimale pour la bactérie (Forster *et al.*, 1986) par ailleurs, *in vivo* les températures exigées pour la croissance des bactéries sont différentes et sont en relation avec l'indice de progression de la maladie (Stall *et al.* 1993). En effet, Duveiller *et al.* (1997) rapportent que concernant l'espèce *Xanthomonas translucens*, les symptômes apparaissaient, seulement, lorsque la température permettait une croissance bactérienne atteignant les 10<sup>8</sup> CFU/feuille et inversement, les températures basses retardaient la multiplication du pathogène provoquant ainsi une contrainte à la progression de la maladie. D'autre part les basses températures favorisent la glaçogénèse, certaines bactéries ayant une activité glaçogène (Ice Nucleating Activity ou INA+) sont capables de catalyser la formation de la glace à des températures qui varient entre 0 et -10°C. Les souches de *Xanthomonas translucens* expriment cette activité à des températures qui se situent entre -2 et -8 °C (Kim *et al.*, 1987). Ce phénomène une fois que les conditions redeviennent favorables pour la multiplication du pathogène peut considérablement favoriser l'apparition des symptômes de la maladie sur la plante (Duveiller *et al.*, 1997). La glycogénèse n'est cependant pas considérée comme une condition nécessaire de l'induction d'une épidémie (Duveiller *et al.*, 1991).

L'humidité favorisée surtout par la pluie et les différents moyens d'irrigation peut en effet, catalyser l'apparition de certains symptômes comme la strie bactérienne « Bacterial leaf streak ». Ces symptômes se développent souvent pendant la saison des pluies ou dans les champs irrigués par aspersion où le taux d'humidité est assez important notamment dans les environnements les plus chauds, caractérisés par des nuits fraîches (Forster *et al.*, 1986 ; Duveiller *et al.*, 1994). Le développement de la maladie est favorisé par des conditions chaudes et humides indispensables pour la reproduction et la dissémination des bactéries. L'humidité facilite le détachement du pathogène de la graine et contribue à la colonisation des feuilles et l'invasion des tissus foliaires. L'eau libre aussi permet au pathogène de s'étendre dans les champs et se disperser sur les feuilles permettant aussi l'augmentation du nombre de lésions

(Duveiller et al.,1997). Le plus souvent, les bactéries sont transférées aux nouveaux tissus végétaux par les éclaboussures de pluie et les éclaboussures d'eau d'irrigation.

Les espèces de *Xanthomonas* se disséminent facilement dans le matériel végétal infecté comme les graines ou les boutures, et par des moyens mécaniques comme les outils de taille contaminés. Le pathogène pénètre dans la plante par les stomates et/ou via d'autres ouvertures naturelles ou encore à travers les blessures.

Les espèces de *Xanthomonas* hivernent dans les débris végétaux atteints et certaines espèces peuvent également se maintenir à l'état épiphyte la surface des plantes sans générer de symptômes (Poplawsky et Chun,1998; Stromberg et Leonard 2000).

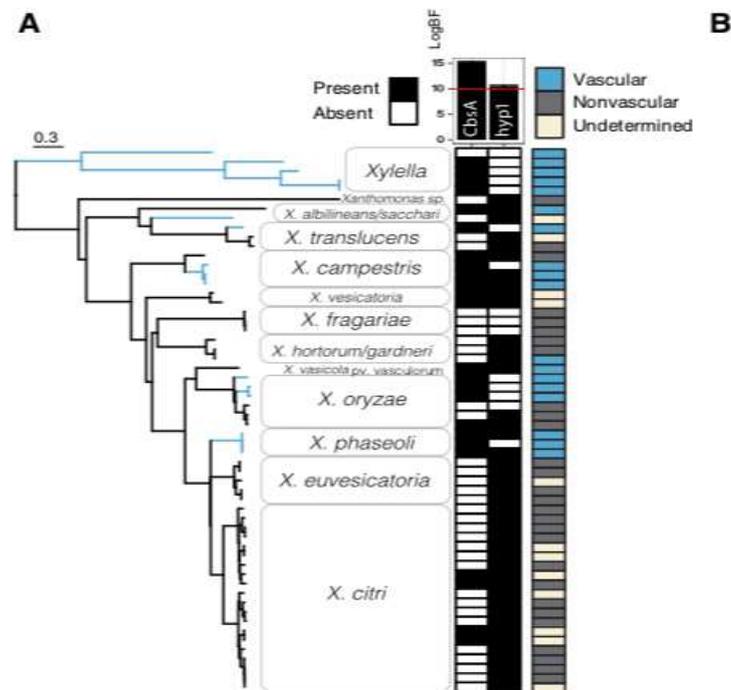
#### 2.1.4. Symptômes engendrés par *Xanthomonas*

Les espèces du genre *Xanthomonas* sont responsables de symptômes variés sur différentes familles végétales, ces espèces peuvent être responsables de symptômes vasculaires et/ou parenchymateux. Au niveau des plantes le système vasculaire et le parenchyme représentent des niches distinctes, l'adaptation à l'une ou l'autre environnement, pourrait être liée au gain à une délétion de gène au cours de l'évolution principalement le gène *CbsA* codant pour des enzymes responsables de la dégradation de la paroi végétale (Tahi et al., 2018, Gluck-Thaler, et al.,2020). Une étude comparative basée sur la présence et l'absence du *CbsA* chez les *Xanthomonadaceae* vasculaires et parenchymateuses ( figure 7) , incluant l'espèce *Xylella fastidiosa* et *Xanthomonas translucens* a révélé l'importance de ce gène dans l'évolution de la pathogénie vasculaire dont la mutation peut générer le développement du symptôme parenchymateux des lésions saturées eau. Gluck-Thaler., et al.,2020)

Tous les organes aériens du végétal (tiges, rameaux, feuilles, fleurs, bourgeons, fruits et graines) des espèces hôtes peuvent être colonisés par *Xanthomonas* et peuvent tous exprimer des symptômes divers allant des lésions saturées en eau sur les feuilles au dépérissement et aux chancres aboutissant à des flétrissements, des pourritures et dans certains cas à des noircissements des nervures, des noircissements des tissus, des stries foliaires, des nécroses des tissus pour certaines espèces à l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules végétales, tel le cas de la formation de grosses pustules ou chancres sur les feuilles, les tiges et les fruits causées par l'infection par *X. Citri* (Gürlebeck et al. 2006 Lawson et al., 1989; Swarup et al., 1991; Brunings et Gabriel, 2003).

Les symptômes causés par les espèces de ce genre sont variables en fonction de l'hôte et se présentent le plus souvent en des lésions saturées en eau, un noircissement des nervures ou des

lésions nécrotiques, les nécroses en coalesçant peuvent causer la mort des feuilles, dans certains cas les nécroses se situent sur les parties marginales des feuilles ou en spots entourés par un halo chlorotique, ces bactéries sont également responsables de chancres et de dépérissements.



**Figure 7: Étude comparative des *Xanthomonadaceae* vasculaires et parenchymateuses basée sur la présence et l'absence du *CbsA***

Sur les parties aériennes du végétal, les symptômes de taches foliaires apparaissent sur le feuillage de l'hôte au bout de trois à sept jours de l'infection. Ces pathogènes peuvent affecter différentes parties des plantes, y compris les feuilles, les tiges et les fruits, pouvant également devenir systémique chez certains hôtes. Ces espèces présentent une spécificité tissulaire marquée en colonisant soit le xylème, soit le mésophiles et les espaces intercellulaires des tissus non vasculaires (Bogdanove et al., 2011).

En effet, l'espèce *Xanthomonas translucens* est responsable de deux symptômes, la strie bactérienne et de la glume noire, sur feuilles, le symptôme se présente sous forme de lésions allongées, brun clair, de plusieurs centimètres de long, coalesçant, pour couvrir de plus grandes zones, sur les glumes, la bactérie provoque le symptôme de bandes noires, longitudinales, plus ou moins parallèles, les symptômes de couleur noir pourpre s'étendent au pédoncule situé entre l'inflorescence et la feuille étendard (Duveiller et al., 2002), le pathogène bactérien pénètre probablement dans les tissus végétaux par les stomates et colonise principalement les tissus mésophylliens, (Sapkota et al., 2020). Toutefois les *graminis* et *translucens*, peuvent coloniser

le xylème, *X. t. pv. graminis* envahit la plante à travers les tissus blessés et colonise protoxylème, d'où elle migre vers le tissu vasculaire, entraînant des symptômes tels que le flétrissement des feuilles et la nécrose de la plante entière (Masuch et al., 1989 et Wichmann et al., 2013) le pathovar *translucens* peut également développer des symptômes à longue distance, comparé au pathovar *undulosa* qui reste limité au point d'inoculation (Gluck-Thaler et al., 2020).

En effet, les agents pathogènes non vasculaires restent souvent confinés aux sites d'infection et développent des symptômes localisés alors que, les agents pathogènes vasculaires sont véhiculés par le système vasculaire sur de longues distances et peuvent provoquer des infections systémiques létales (Gluck-Thaler et al., 2020). Les symptômes parenchymateux et vasculaire sont reliés à l'intervention de l'hydrolase *CbsA* qui agissant tel un commutateur phénotypique de pathogenèse vasculaire et non vasculaire chez les *Xanthomonadaceae* peut augmenter la virulence et entraîner un développement des symptômes vasculaires au détriment des non vasculaires et réciproquement (Jha et al., 2007 et Thaler et al., 2020). Le pathovar *translucens* possède en effet une copie intacte de *cbsA*.

### 2.1.5. Facteurs de pathogénie

Le pouvoir pathogène chez les *Xanthomonas* est régi par un grand nombre de déterminants agissant sur la virulence et/ou l'agressivité. Plusieurs espèces et pathovars de *Xanthomonas* ont fait l'objet de travaux pour identifier leurs modes d'action sur les plantes (Bogdanove et al., 2011).

La spécificité vis-à-vis du spectre d'hôte et/ou de symptomatologie peut être générée par à une variation d'un seul gène ou par une simple variation de séquence au sein d'un seul gène, aussi à une variation de l'équilibre entre les actions de plusieurs gènes. De ce fait, la caractérisation génétique des pathovars et la mise en relation des pathovars avec une histoire phylogénétique en sont d'autant plus difficiles. Selon plusieurs auteurs, les espèces de *Xanthomonas* utilisent un arsenal de facteurs de virulence pour envahir l'hôte, les enzymes dégradant la paroi cellulaire des plantes, les toxines, les polysaccharides extracellulaires, les adhésines et les substances membranaires actives (Klaus et al., 1994; Büttner et Bonas, 2010). Chez la plupart des *Xanthomonas*, le système de sécrétion de type III (T3S) et les effecteurs sécrétés (T3E) sont essentiels à la pathogénicité bactérienne par l'inhibition de l'immunité des plantes ou l'induction des gènes de sensibilité des plantes (S), comme indiqué pour les effecteurs de type TAL (Transcription Activation-Like) effectors. Les toxines peuvent aussi être des déterminants majeurs de la virulence chez certaines espèces de *Xanthomonas*, tandis que les espèces non

pathogènes de *Xanthomonas* vivent avec les plantes sans aucun système T3S ni T3Es (Klaus et al., 1994 Büttner et Bonas, 2010).

L'infection et de la multiplication bactérienne dans le tissu hôte dépendent souvent des facteurs de virulence sécrétés, notamment les adhésines, les polysaccharides, le LPS et les enzymes de dégradation.

#### **2.1.5.1 Les enzymes**

Selon Daniels et Leach (1993), certains pathovars de *X. Campestris* produisent des enzymes à activité extracellulaires telles que la protéase, l'amylase, la pectinase, la glucanase, la lipase et déduit que du fait que ces enzymes ont la capacité de dégrader les composants des tissus végétaux, celles-ci sont considérées comme facteurs de pathogénicité. Concernant la protéase, l'auteur rapporte que des travaux génétiques montrent que des mutants déficients en protéase inoculés sur des feuilles adultes sont beaucoup moins virulents que le type sauvage, pour l'enzyme glucanase, il a été déduit qu'il est possible que ces enzymes agissent en synergie du fait que la perte par mutation des gènes structuraux de l'activité de chaque enzyme individuellement n'a qu'un effet très faible sur la virulence.

#### **2.1.5.2. Les polysaccharides et la gomme de xanthane**

Les exopolysaccharides (EPS) dont le xanthane sont copieusement produits par différents les espèces de et pathovars de *Xanthomonas* notamment l'espèce *X. Campestris* la production de cet exopolysaccharide se manifeste par la formation de colonies mucoïdes sur les milieux solides et par une forte viscosité des milieux de cultures liquides. La gomme est largement utilisée dans plusieurs industries dont le textile, l'industrie pétrolière, alimentaire... comme un viscosificateur, le xanthane présente des propriétés pseudoplastiques uniques (De Vuyst et Vermeire, 1994 ; García-Ochoa et al., 2000 ; He, et Zhang, 2008). Plusieurs études (Kamoun et Kado, 1990; Ferauge et Maraite, 1992) ont montré le rôle du xanthane dans la pathogenèse.

Klaus et al (1994) montrent que les interactions entre le xanthane et les polymères des plantes peuvent créer une sorte de masses colloïdales initiant la réaction de sensibilité. Le même auteur rapporte que des travaux récents ont montré l'existence de régions dans le génome contenant des gènes codant pour la production de xanthane et pour la production d'un certain nombre d'enzymes responsables dans la pathogenèse chez *X. campestris*, ces gènes sont désignés sous le nom de gènes *rpf* (régulation of pathogenèse factors) et contrôlent différentes enzymes incluant la cellulase, l'amylase, la polygalacturonate lyase et la protéase. L'eps peut également contribuer à la formation de biofilms par les bactéries au niveau des plantes. Selon Adrian et

*al.*, 2009, le Xanthane induit la sensibilité à *Xcc* des espèces *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana benthamiana* en supprimant les défenses de la plante telles que les dépôts de callose et l'exopolysaccharide est activé uniquement lors des étapes avancées de l'infection, les résultats suggèrent que *Xcc* et produit de grandes quantités d'eps uniquement lors des phases avancées de la maladie. La production élevée de l'eps dans les stades avancés de la maladie au niveau des tissus qui subissent une nécrose peut protéger les bactéries contre diverses contraintes, telles que la dessiccation et la destruction lors des réactions de défense des plantes.

Kauls et *al* (1994) notent que l'alginate et le levane qui sont des composants des exopolysaccharides (EPS), produits par *Xanthomonas* pv. *Translucens* grâce à son équipement enzymatique jouent un rôle important dans la pathogénicité. Ceux-ci suggèrent également que les EPS et le xanthane favorisent la multiplication des bactéries par plusieurs mécanismes. Ils permettent l'attraction de l'eau et des ions au niveau des espaces intercellulaires de façon à ce que les bactéries ne se dessèchent pas et peuvent facilement prendre les nutriments, permettent d'éviter le contact de bactéries avec les parois des cellules végétales et par conséquent éviter de déclencher le système de résistance chez la plante. Ils permettent d'éviter l'agglutination des bactéries par les agglutinines de la plante et de protéger les bactéries contre les phytoalexines et les molécules de stress tels que les radicaux d'oxygène.

#### **2.1.5.3. Le pigment xanthomonadine**

Le pigment xanthomonadine caroténoïde orange, non soluble dans l'eau est spécifique aux espèces du genre *Xanthomonas* (Sands et Fourrest, 1989; Daniels et Leach 1993; Schaad et *al*, 2001). Les gènes responsables de la biosynthèse du pigment jaune de xanthomonadine sont probablement aussi importants dans l'interaction plante-bactérie, et bien qu'au laboratoire les mutants de *X. c.* pv. *campestris* non pigmentés conservent leur pathogénicité, les mutants de *X. c.* *juglandis* sont rapportés sensibles à la lumière ; 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 plusieurs pathovars.

#### **2.1.5.4. Les toxines**

Les toxines peuvent aussi être des déterminants majeurs de la virulence chez certains xanthomonas, tandis que les espèces non pathogènes de *Xanthomonas* vivent avec les plantes sans aucun système T3S ni T3Es. (Büttner et Bonas, 2010).

Pieretti et *al.*, ont passé en revue les dernières découvertes sur *Xanthomonas albilineans*, une espèce atypique de *Xanthomonas* pathogène de la canne à sucre qui a subi une érosion radicale du génome (y compris l'absence de systèmes de sécrétion hrp T3S et type VI), mais qui a acquis la capacité de produire l'albicidine, une phytotoxine responsable des symptômes de la maladie.

#### 2.1.5.5. Les adhesines

L'attachement au tissu hôte est l'une des premières étapes clés du processus d'infection bactérienne. La fixation des bactéries sur les surfaces se fait par l'intermédiaire de structures de surface qui sont ancrées dans la membrane externe de la bactérie et qui couvrent un large groupe de structures fimbriales et non fimbriales, communément appelées adhesines y compris les structures polysaccharidiques (lipopolysaccharides, exopolysaccharides) et protéiques (chaperon/usher pili, pili de type IV, autotransporteurs, adhesines sécrétées par deux partenaires et autres adhesines de membrane externe), leur implication dans la formation de biofilms et leur mode de régulation par la détection du quorum.

Les composants de surface sont essentiels pour la pathogénicité bactérienne. Les adhesines, fimbriales et afimbriales, servent de médiateurs pour le contact physique direct entre les bactéries et les surfaces de l'hôte. Les adhesines fimbriales sont composées de plusieurs sous-unités de protéines, l'adhesine proprement dite étant très souvent située à l'extrémité du pilus. En revanche, les adhesines afimbriales se présentent généralement sous forme de monomères. Bien que la majorité des fimbriae aient été identifiées dans les bactéries Gram-négatives, le nombre de pili dans les Gram-positifs augmente régulièrement. La plupart des fimbriae des bactéries Gram-négatives sont ancrées dans la membrane externe, les sous-unités fimbriales sont reliées de manière non covalente et ces fimbriae se lient aux résidus d'hydrates de carbone. Les pili de Gram-positifs sont liés de manière covalente au peptidoglycane et entre eux et, en général, ils interagissent avec les protéines de l'hôte. Le seul type fimbrial présent dans certaines bactéries Gram-positives et Gram-négatives est le pili de type IV. Dans les deux groupes bactériens, elles proviennent de la membrane cytoplasmique. D'autres organites de surface importants pour la pathogénicité bactérienne sont les flagelles. Ils sont non seulement responsables de la motilité, mais peuvent également fonctionner comme des adhesines et des invasines qui peuvent dépendre de la glycosylation de la sous-unité de la protéine flagelline. En outre, une protéine sécrétée (etpa) qui se lie à la pointe du flagelle peut servir de médiateur pour l'adhésion Oelschlaeger et *al.*, (2010).

#### 2.1.5.6. Système de sécrétion type 3(SST3) et un effecteur Hrp

Plusieurs espèces et pathovars de *Xanthomonas* ont fait l'objet de travaux pour identifier leurs modes d'action sur les plantes et l'intervention des SST3 (Weber et Koebnik, 2006 ; Bogdanove et al., 2011, ). Les effecteurs de type III (T3E) sont de nature protéique, injectés dans le cytoplasme et l'apoplaste de la cellule végétale de la plante-hôte. Cette protéine en supprimant les défenses de la plante joue un rôle essentiel au pouvoir pathogène. Les effecteurs de type III (T3E) sont introduits dans les cellules végétales par le système de sécrétion de type III codé par le cluster des gènes hrp (T3S) Pesce et al., 2017. Ce dernier étant constitué par un panel de 10 gènes chez *Xanthomonas* (avrbs2, xopfl, xopk, xopl, xopl, xopn, xopp, xopp, xopq, xopr, xopx, et xopz1) ([http : //www.xanthomonas.org](http://www.xanthomonas.org)). Le terme effecteur de type III provient justement du fait que ces molécules transitent par le SST3. L'espèce *X. translucens*, comme la plupart des espèces de *Xanthomonas*, utilise un système de sécrétion de type III (T3SS) pour transférer des effecteurs T3SS (T3E) directement à l'intérieur des cellules végétales. Cette confirmation est basée sur l'analyse des 48 séquences du génome de *X. translucens* comptant sept pathovars de *X. translucens* (Wichmann et al., 2013 ; Gardiner et al., 2014 ; Pesce et al., 2015a,b ; Hersemann et al., 2016, 2017 ; Jaenicke et al., 2016 ; Peng et al., 2016,) avec la séquence du génome de *X. hyacinthi* (Naushad et al., 2015), l'étude a en effet révélé que toutes ces espèces et pathovars contiennent un *Hrp* T3SS dont l'organisation génétique est différente de celle du clade-2 (pesce et al., 2017 ; Sapkota et al., 2020).

#### 2.1.5.7. Détection du quorum sensing (QS) et régulation de la virulence

Chez *Xanthomonas campestris*, parmi les paramètres étroitement liés à la maladie la détection du quorum « quorum sensing » QS. Il s'agit d'un système conservé chez l'agent pathogène, considéré comme un mécanisme de régulation génétique à l'échelle communautaire. Ce système confère aux bactéries la capacité à communiquer par des signaux moléculaires. Le QS régule l'expression de certains gènes en fonction de la densité d'une population bactérienne responsables de nombreuses fonctions biologiques importantes, dont la virulence, la dispersion du biofilm et la compétence écologique (He and Zhang, 2008). Le QS peut être simplement compris comme la communication bactérienne via le facteur de signal diffusible (DSF) qui est structurellement caractérisé par l'acide cis-11-méthyl-2-dodécénoïque, largement conservé dans de nombreuses bactéries pathogènes à Gram négatif telles que *Xcc* (Ye et al., 2020). Le QS régule les facteurs de virulence, notamment les enzymes pectinolytiques et cellulolytiques extracellulaires, les pectinases, les lyases, les xylanases et les cellulases, qui contribuent à la dégradation des parois cellulaires des plantes [10-13]. La perturbation du SQ peut empêcher la production de facteurs de virulence *Xcc*,

### 2.1.6. Principales cultures hôtes du genre *Xanthomonas*

Les espèces du genre *Xanthomonas* sont responsables de maladies sur une large gamme d'hôtes regroupant plus de 300 espèces végétales. Ces espèces végétales hôtes incluent plusieurs familles représentées par 70 genres, dont 124 espèces monocotylédones et 268 espèces dicotylédones (Hayward, 1993; Denancé et al., 2018). De nombreuses cultures importantes sur le plan économique servent d'hôtes à différentes *Xanthomonas* dont les familles végétales de *Poaceae*, *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Malvaceae*, *Euphorbiaceae*, *Araceae*, *Araliaceae*...etc. (Jacques et al., 2016, Schandryet al., 2018, Nakato, et al 2018). Les espèces et pathovars de ce genre se caractérisent par une spécificité stricte des tissus de l'hôte et une gamme d'hôtes étroites de chaque espèce et des pathovars (Vauterin et al 1995). Les travaux effectués sur différents génomes de ce genre suggèrent un modèle dans lequel des ensembles complexes d'adaptations tiennent compte de la spécificité au niveau génomique de l'hôte (Bogdanove et al., 2011).

#### a- Espèces hôtes parmi les *Poaceae*

Le genre *Xanthomonas* est présent sur les céréales avec l'espèce *X. translucens*, responsable de la maladie de la strie foliaire bactérienne «Bacterial leaf streak» et du noircissement de l'épi «Black Chaff». L'espèce *X. Translucens* est rapportée sur plusieurs *Poaceae* hôtes dont céréales à paille cultivées et aussi sur des graminées spontanées (blé, orge, triticale, avoine, seigle, ray gras, sorgho, millet, *Phalaris*, *Lolium multiflorum*, *Phleum pratense*, *Bromus spp...*) faisant intervenir avec une spécificité relativement variable plusieurs pathovars dont *X. t. pv. cerealis*, *X. t. pv. hordei*, *X. t. pv. secalis*, *X. t. pv. translucens*, *X. t. pv. undulosa*, *X. t. pv. arrhenatheri*, *X. t. pv. graminis*, *X. t. pv. phlei*, *X. t. pv. phleipratensis*, et *X.t. pv. poae* (Hagborg, 1942 ; Moffett et mccarthy, 1973; Bragard et al., 1997; Cunfer et Scolari, 1982).

En plus des céréales à paille et des graminées, cette espèce est également responsable de beaucoup de dégâts sur d'autres *Poaceae* dont le riz *Oryza sativa* Linn et le maïs *Zea mays*. En effet l'espèce *X. Oryzae* peut induire des dégâts importants sur le riz avec les pathovars *X. oryzae pv. oryzicola* (Xoc) agent de la strie foliaire bactérienne «Bacterial leaf streak» (BLS) et *X. oryzae pv. oryzae* (Xoo) responsable du dépérissement bactérien «Bacterial blight» (BB) (Thri Murty et Devadath, 1984; Zhao et al, 2004, Chukwu et al., 2019; ). L'espèce *Xanthomonas vasicola* pv. *Vasculorum* (Xvv) est rapportée responsable du «Bacteria Leaf Streak» du maïs (*Zea mays*) Plazas, et al. (2018).

L'espèce *Xanthomonas albilineans* est un agent pathogène systémique responsable de l'une des principales maladies de la canne à sucre (hybrides interspécifiques de *Saccharum spp.*) faisant

partie également de la famille des *Poaceae* (Pieretti et al., 2009). Cette bactérie limitée au xylème provoque l'échaudure des feuilles. Cette espèce est considérée un taxon intermédiaire évolutif entre plusieurs espèces de *Xanthomonas* et l'espèce *Xylella fastidiosa* (Champoiseau et al., 2006). De plus selon Sapkota et al (2020). L'espèce *X. translucens* qui infecte principalement les espèces végétales des *Poaceae* avec le groupe *translucens* sur les espèces de cultures céréalières et le groupe *graminis* sur les espèces de graminées fourragères est capable aussi d'infecter les asperges (*Asparagus virgatus*) et les pistachiers d'ornement. En effet La maladie du dépérissement bactérien a été observée pour la première fois sur des pistachiers (*Pistacia vera*) en Australie en 1992 (Facelli et al., 2002, Facelli et al., 2005 ; Marefat, 2006, Marefat et al., 2006,). Ducray et al., en 2009, se basant sur les données de pathogénicité , Ducray et al., (2009), confirme que l'agent pathogène du pistachier est un nouveau pathovar de *X. translucens* et propose la nomination *Xanthomonas translucens* pv. *pistaciae* pv. nov.

L'asperge (*Asparagus virgatus*) faisant partie de la famille des *Liliaceae*, assez éloignée des *Poaceae*, est aussi signalée comme plante hôte de l'espèce *X. translucens*, la bactérie est isolée à partir de lésions sombres et saturée en eau sur les tiges (Norman et al., 1997, Rademaker et al., 2006, Adhikari. Et al., 2012). Plusieurs espèces d'asperges (*A. virgatus*, *A. setaceus*, *A. macowanii*, *A. densiflorus*'Sprengeri', *A. densiflorus*'Myers', et *A. officinalis*) ont montré des symptômes par inoculation artificielle (Norman et al., 2007)

### **b- Quelques espèces hôtes parmi les maraichères**

Sur les *Brassicaceae*, le genre *Xanthomonas* avec l'espèce *X. Campestris* et ses différents pathovars atteignent plusieurs espèces végétales de cette famille.

La famille des *Brassicaceae* compte environ 3200 espèces de plantes dicotylédones réparties en 350 genres utilisés dans l'alimentation humaine et animale. Certaines de ces espèces poussent à l'état sauvage d'autres sont cultivées et sont aussi utilisées pour la production d'huile (à usage alimentaire et industriel), cette famille compte aussi des espèces d'ornement. L'espèce *Xanthomonas campestris* est responsable de la maladie de la nervation noire et/ou des taches nécrotiques sur feuilles des *Brassicaceae*, Plusieurs pathovars de cette espèce sont responsables de dépérissements des *Brassicaceae* dont *X.c.pv. armoraciae* (mcculloch) Dye, *X.c. pv. barbareae* (Burkholder) Dye, *X.c.pv. incanae* (Kendrick et Baker) Dye et *raphani* (White) Dye (Vauterin) et le pathovar *X. c. pv.aberrans* (Knösel) Dye, responsable de la maladie du dépérissement des giroflées (Fargier, 2007).

D'autres pathovars de l'espèce *X. campestris* sont aussi responsables de maladies sur plusieurs autres espèces végétales hormis les *Brassicaceae*, dont la carotte *Daucus carota* subsp. *Sativus*

avec le pathovar *Xanthomonas campestris* pv. *Carotae* (Meng et al., 2004), actuellement *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* responsable de la brûlure bactérienne de la Carotte. Sur les *Cucurbitacea*, cet agent est responsable avec le pathovar *X. c. cucurbitae* actuellement élevé au rang de l'espèce *Xanthomonas cucurbitae* de la maladie du « Bacterial leaf spot ». Sur le haricot, le pathovar *X.c.* pv. *phaseoli* (Smith) Dye actuellement *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Vauterin et al. est responsable de la maladie du « Common bacterial blight » ou « Fuscous blight ». La brûlure bactérienne commune est une maladie bactérienne dévastatrice du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) causée aussi bien par *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* que par *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. (Ruh et al 2017).

Sur les *Solanaceae* dont la tomate et le poivron la maladie de la gale bactérienne est induite par plusieurs taxons dont *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri*, *X. euvesicatoria*, et *campestris* pv. *raphani* (Hamza, 2010).

### c- Quelques espèces arboricoles hôtes

Plusieurs espèces végétales fruitières sont également sensibles aux espèces de *Xanthomonas* dont *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* provoque le flétrissement des plantes appartenant aux *Musaceae*, principalement le bananier (*Musa acuminata*), le plantain (*M. acuminata* × *balbisiana*) et l'ensete (*Ensete ventricosum*) (Nakato, et al 2018). La plupart des espèces de *Prunus*, y compris l'abricot, la pêche, la nectarine, la prune et l'amande, et occasionnellement la cerise, sont infectées par *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap). Les symptômes causés par ce pathogène se trouvent sur les feuilles, les fruits, les rameaux et les branches ou les troncs. En cas d'infection grave, une défoliation et une chute des fruits peuvent se produire (Garita-Cambronero et al., 2018). Certaines espèces hôtes parmi les agrumes sont variées dans leur sensibilité au chancre des agrumes, le pamplemousse, le citron vert, l'orange, le kumquat et le calamondin de la famille des *Rutaceae* étant parmi les moins sensibles (Ference et al., 2018).

### Chapitre 3. L'espèce *Xanthomonas translucens* (Johnson et Reddy, 1917) ; Vauterin, Hoste, Kersters et Swing, 1995)

#### 3.1. Maladies et symptômes causés par *Xanthomonas translucens*

Les deux maladies, la strie bactérienne des céréales et la maladie de la glume noire «Black chaff», sont décrites, selon que le symptôme se présente sur les feuilles ou atteint l'épi. Ces deux maladies sont associées à l'espèce *Xanthomonas translucens* (Johnson et Reddy, 1917) ; Vauterin, Hoste, Kersters et Swing, 1995.

#### 3.2. L'agent causal : l'espèce *Xanthomonas translucens* (Johnson et Reddy, 1917); Vauterin, Hoste, Kersters et Swings, 1995)

La bactérie peut atteindre plusieurs céréales en produisant les mêmes symptômes sur différentes graminées cultivées et spontanées. Beaucoup de controverses ont été soulevées quant à la nomenclature de ce pathogène et la classification de tous les pathovars de cette espèce (Bradbury, 1986 ; Moffett et Croft, 1986; Wiese, 1987; Paul et Smith, 1989; Duveiller et al, 1997a). De leurs côtés Paul et Smith (1989) et Sletten (2001) prennent un large concept et associent le pathovar *translucens* avec la maladie connue sous le nom de «la strie translucide» des feuilles des céréales et graminées spontanées. De même, Lelliot (1988) et Sletten (2001) reconsidèrent la spécialisation de l'hôte par la forme spéciale de «*X. Translucens*» et rassemblent les différents pathovars en un seul. Selon les mêmes auteurs, ce pathovar. *Translucens* pourrait être considéré comme un organisme de la liste A2 pour la région EPPO.

De nombreux auteurs Reddy et al (1924); Wallin (1946); Boosalis (1952); Barry et al (1982) ; Bradbury (1986); Paul et Smith (1989); Stead (1989); Duveiller (1989); Anonyme (1991); Alexandrova et al (1995); Bragard et al (1995); Alizadeh et al., (1995) ; Maes et al (1996); Bragard et al. (1997); Young et al, (1996); Dye et. Leliott, 1974; Duveiller et al (1997) ; Duveiller et al, (1997) démontrent qu'en effet, cette bactérie peut affecter plusieurs céréales dont le blé, l'orge, le triticale, le seigle, l'avoine, le ray-grass et d'autres graminées spontanées telles que *Bromus inermis*, *Aegilops sp*, *Sclerochloa dura*, *Hetheranthelium sp.*, *Bromus inermis* Leys, *Phleum pratense* L, *Agropyron repens* et *Phalaris canariensis*. Des populations épiphytes de cette espèce ont également été retrouvées à proximité de champs de blé de printemps sur *Poa pratensis*, *Festuca arundinacea*, *F. Rubra*, *Hordeum leporinum*, et *Medicago sativa* (Duveiller et al (1997). Selon, Wallin (1946) *X. Translucens* peut hiverner sur des hôtes pérennes tels que (*Bromus inermis* Leyss) et (*Phleum pratens* L). Ces plantes sont considérées comme des réservoirs de l'inoculum et favorisant ainsi la dissémination du pathogène sur les céréales voisines. Le même auteur, émet aussi, la proposition de races physiologiques de

*Xanthomonas translucens* pv. *Cerealis*, et note que les races 1-6, ont été identifiées sur la base de la réaction différentielle des variétés d'avoine, des variétés de *Bromus inermis* et de *Bromus spp.* En outre, les races parasitent le blé, l'orge, le seigle et *Agropyron repens*. Il est suggéré que le nom, *Xanthomonas streak*, soit utilisé pour toutes les maladies des céréales et des graminées causées par *X. translucens* pv. *cerealis*.

### **3.3. Evolution de la nomenclature de *Xanthomonas translucens* et relation hôte-pathovar**

#### **3.3.1. Classification évolutionniste et relation entre les espèces *Xanthomonas translucens* et *X. campestris***

L'espèce *Xanthomonas translucens* était durant plusieurs années nommée *Xanthomonas campestris* pv. *Translucens* (Jones, Johnson et Reddy, 1917) Dye 1978 (Dye et al, 1980 ; Valerie et al., 1981; Bradbury, 1984 ; Leyns et al, 1984 ; Van Den Mooter et al., 1987; Azad et Schaad, 1988 ; Young et al., 1991 ; Swings, 1993 ; Duveiller et Maraite 1993), est actuellement élevée au rang de l'espèce et est nommée *Xanthomonas translucens*.

##### **3.3.1.1 Quelques notions sur l'espèce *Xanthomonas campestris* (Pammel, 1895) Dowson, 1939 emend. Vauterin et al., 1995**

##### **3.3.1.2 Classification de l'espèce *X. campestris*, Notion de pathovar et de race**

La première classification de l'espèce *Xanthomonas campestris* (Pammel, 1895) Dowson, 1939 emend. Vauterin et al., 1995 est basée sur la technique d'hybridation par Vauterin et al., (1995). L'espèce *Xanthomonas campestris*, appartient au règne *Bacteria*, phylum *Proteobacteria* à la classe *Gamma Proteobacteria* à l'ordre *Xanthomonadales* à la famille *Xanthomonadaceae* et au genre *Xanthomonas*. Dans ce taxon étaient groupés de nombreux pathovars affectant de nombreuses espèces végétales. La plupart de ces pathovars sont actuellement élevés au rang de l'espèce. Cette espèce compte aujourd'hui encore plusieurs autres pathovars dont six sont connus pathogènes des *Brassicaceae* (Fargier and Manceau 2007a): *X. c. pv. aberrans* (Knösel, 1961), Dye et al, 1980, *X. c. pv. armoraciae* (mcculloch, 1929) Dye et al (1980), *X. c. pv. barbareae* (Burkholder, 1941), Dye et al (1980), *X. c. pv. campestris*, *X. c. pv. incanae* (Kendrick et Baker, 1942), Dye et al (1980), et *X. c. pv. raphani* (White, 1930), Dye et al. L'espèce *Xanthomonas campestris* est aussi subdivisée en races sur la base des réponses différentielles induites par le pathogène suite à des inoculations sur des espèces de *Brassicaceae* et autres espèces hôtes. Nous notons que, la notion de race est définie par plusieurs auteurs dont

Dawson (2009) et Jackson, (2009) comme étant, le groupe de la même espèce ou sub-espèce qui peut être différencié par rapport à d'autres groupes par sa gamme d'hôtes au niveau cultivar d'une même espèce végétale. Six races ont été décrites par (Kamoun et *al.*, 1992; Vicente et *al.*, 2001), trois races sur le pathovar *X. c. pv. raphani* par (Vicente et *al.*, 2006). Trois autres races ont été décrites par (Fargier et Manceau, 2007).

### 3.3.1.3. .Maladies causées par l'espèce *X.campestris* et gamme d'hôtes associée

L'espèce *X. Campestris* est responsable de trois maladies actuellement bien connues : La pourriture noire causée par *X. c. pv. campestris* sur les plantes de la famille des *Brassicaceae*, la tâche des feuilles causée par *X. c. pv raphani* sur des espèces des *Brassicaceae* et certaines espèces de *Solanaceae*; la brûlure bactérienne causée par *X. c. pv. incanae* sur des *Brassicaceae* ornementales (*Matthiola* spp. Et *C. Cheiri*). La gamme d'hôte de cette espèce n'étant pas limitée aux cultures légumières, ornementales et aux adventices de *Brassicaceae* la plante modèle *Arabidopsis thaliana* fait aussi partie de la gamme d'hôtes de *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Vicene et Holub, 2013). Bien que des inoculations artificielles de la bactérie sur des plantes appartenant aux familles de *Solanaceae*, *Malvaceae*, *Cucurbitaceae*, *Umbeliferae*, *Leguminoceae*, *Graminaceae* (*Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Avena sativa*) n'ont montré aucun signe d'infection (Bhat et *al.* 2010). Le pathovar *campestris* s'est montré capable d'infecter d'autres espèces appartenant à d'autres familles botaniques, en effet récemment, l'espèce *campestris* a été décrite sur une espèce appartenant à la famille des *Amaranthaceae* (*Beta vulgaris* L. Var. *Cicla*) communément appelée la bette ou la blette présentant des symptômes typiques de la III-3-maladie de la nervation noire et des nécroses en v à l'extrémité des feuilles (Corzo et *al.*, 2019).

### 3.3.1.4. . Les symptômes causés par *X. campestris* sur les *Brassicaceae*

#### -Symptômes vasculaires

Trois bactérioses vasculaires dues à *X. Campestris* sont recensées sur les espèces de la famille des *Brassicaceae*. Il s'agit de la nervation noire due à *X. Campestris* pv. *Campestris*, la nervation noire de la barbarée due à *X. Campestris* pv. *Barbareae* et le dépérissement des giroflées due à *X. Campestris* pv. *incanae*. Bradbury, (1986) rapporte que Pammel (1895) a décrit le premier les symptômes sur le rutabaga (*B. Napus* var. *napobrassica*) de la famille des *Brassicaceae*. Il s'agit de lésions jaunes sur les marges des feuilles accompagnées de nervures noires. À partir de ces lésions, il isole des bactéries mobiles produisant des colonies de couleur

jaune, qu'il a nommée, *Bacillus campestris* actuellement connues sous le nom *X. c. pv. campestris*. La gamme d'hôtes du pathogène s'étend ultérieurement, à toute la famille des *Brassicaceae*. En 1941, une maladie similaire est rapportée sur les *Brassicaceae* sauvages ou adventices, notamment la barbarée vulgaire (*Barbarea vulgaris*) (Burkholder, 1941). L'auteur montre que le pathogène est très proche de *X. c. pv. campestris* au niveau de la morphologie, mais ne provoquerait que des symptômes sur son hôte d'isolement et très peu, voire aucun, sur chou-fleur (Bradbury, 1986). Ce pathogène, actuellement connu sous le nom *X. c. pv. barbareae*. 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, bien que ressemblant morphologiquement à *X. c. pv. campestris* le pathogène des giroflées en diffère dans son pouvoir pathogène (Kendrick and Baker, 1942). Ce pathogène provoque un flétrissement des feuilles ainsi que des nécroses sur la tige (Kendrick and Baker, 1942). Bradbury (1986) précise que la gamme d'hôtes de *X. c. pv. incanae* est restreinte aux giroflées aussi bien *Matthiola sp.* que *Cheiranthus sp.*

-

S

#### **-Symptômes parenchymateux**

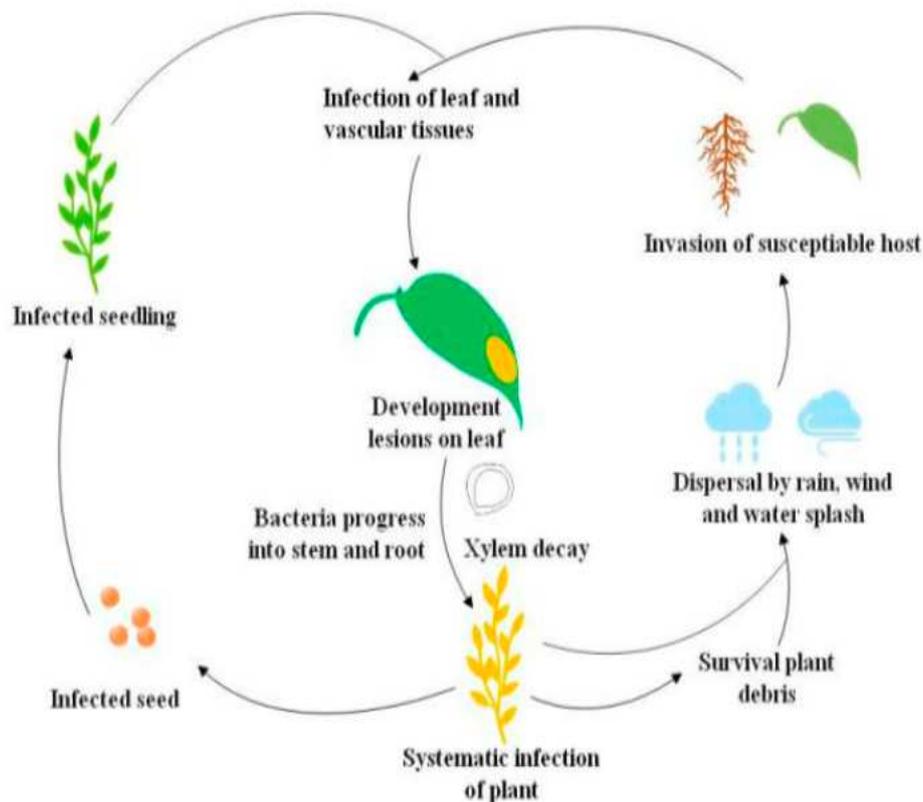
Au moins trois bactérioses entraînant des symptômes sur le parenchyme de *Brassicaceae* sont décrites dans la littérature. Il s'agit de la maladie des taches foliaires du chou-fleur due à *X. Campestris pv. aberrans* (Bradbury, 1986), de la maladie des taches foliaires du raifort due à *X. Campestris pv. armoraciae* (mcculloch, 1929 ; White and Gardner, 1929).). Selon le même auteur, la bactérie semble avoir de nombreuses caractéristiques en commun avec *X.c. pv. campestris* hormis sa réaction particulière avec l'hôte. Ce pathogène, actuellement connu sous le nom de *X. campestris 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 vert foncé sur la face inférieure des feuilles. A un stade plus avancé, les taches deviennent visibles sur la surface supérieure des feuilles. Sur chou et chou-fleur, ce pathogène *X. c. pv. armoraciae* est nettement moins agressif, quelques symptômes typiques sont également observés sur giroflées (*Matthiola incana*) et sur haricots (*Phaseolus spp.*). Il est de même pour la maladie des taches foliaires du radis due aux attaques de *X. campestris pv. raphani* sur radis et navets (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 tomates, tabacs et poivrons. 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 (White, 1930). Bradbury (1986) rapporte l'existence d'un variant de *X. c. pv. campestris* nommé *X. c. pv. aberrans*. Knösel (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 nécrose noire; il nomme cette bactériose la maladie des taches foliaires du chou-fleur.

D'autre part, *X. c. pv. campestris* infecte par les hydathodes (Cook et al. 1952) puis se propage et se multiplie au niveau des vaisseaux. La plante accumule des fibrilles dans les vaisseaux pour empêcher le pathogène de se propager par obstruction de ceux-ci (Bretschneider et al. 1989 ; Wallis et al. 1973). Cela provoque une carence en eau, un flétrissement et une nécrose des tissus foliaires autour des nervures infectées, l'évolution des étapes est traduite par le symptôme typique de la pourriture noire. La pluie ou l'irrigation par aspersion peuvent en effet, concentrer les microbes au niveau des hydathodes., de plus , l'anatomie des hydathodes représente une issue potentielle exploitée par les agents pathogènes pour accéder aux tissus internes des plantes, y compris le système vasculaire (Jauneau et al., 2020).

#### 3.3.1.5. Écologie et cycle biologique de *X. campestris*

L'inoculum Xcc se propage à partir de la graine infectée à l'épicotyle des graines saines, les cotylédons ou feuilles cotylédonaires présentent des bords noircis, puis se ratatinent et tombent. Le système vasculaire véhicule les bactéries vers les jeunes tiges et feuilles, la maladie apparaît sous la forme de lésions chlorotiques à nécrotiques en forme de V sur les bords des feuilles. Dans des conditions humides, les bactéries contenues dans les gouttelettes de guttation se disséminent aux plantes voisines par les différents vecteurs dont, le vent, la pluie, les éclaboussures d'eau et les outils de travail. Les ouvertures naturelles telles que les hydathodes et les stomates, les racines et les blessures foliaires causées par les insectes constituent les principaux agents d'entrée de la bactérie. Le Xcc peut survivre dans les débris végétaux du sol jusqu'à deux ans, mais pas plus de six semaines dans un sol libre [1]. La transmission à longue distance de l'Xcc peut également se faire par des insectes vecteurs volants. Des isolats similaires au pathovar *campestris* ont été décrits dans des associations asymptomatiques avec des tissus végétaux ou en épiphytes (Maes et al., 1985).



**Figure 8: Cycle biologique de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Ye et al., 2020)**

L'inoculum *Xcc* se propage (figure 8) à partir de la graine infectée à l'épicotyle des graines saines, les cotylédons ou feuilles cotylédonaires présentent des bords noircis, puis se ratatinent et tombent. Le système vasculaire véhicule les bactéries vers les jeunes tiges et feuilles, la maladie apparaît sous la forme de lésions chlorotiques à nécrotiques en forme de V sur les bords des feuilles. Dans des conditions humides, les bactéries contenues dans les gouttelettes de guttation se disséminent aux plantes voisines par les différents vecteurs dont, le vent, la pluie, les éclaboussures d'eau et les outils de travail (Van Derie et Gabrielson, 1988 ; Van Loon, 2000 ; Ye et al., 2020). Les ouvertures naturelles telles que les hydathodes et les stomates, les racines et les blessures foliaires causées par les insectes constituent les principaux agents d'entrée de la bactérie. Le *Xcc* peut survivre dans les débris végétaux du sol jusqu'à deux ans, mais pas plus de six semaines dans un sol libre. La transmission à longue distance de l'*Xcc* peut également se faire par des insectes vecteurs volants (An et al., 2020).

### 3.3.1.6. Les gènes reliés à la pathogénie de *X. campestris*

L'espèce *X. Campestris* fournit un bon modèle pour les études de base des interactions plantes pathogènes d'autant plus que cette bactérie est également pathogène sur le modèle végétal largement utilisé *Arabidopsis thaliana* (Daniels et al., 1991; Meyer et al., 2005).

Trois différents systèmes de sécrétion ont été identifiés et largement étudiés chez *X. campestris campestris*. Des études ont montré que, les groupes de gènes *xps* et *xcs* codent pour un système de sécrétion de type II. Les gènes *xps* sont directement liés à la pathogénicité (Daniels et al., 1991; Meyer et al., 2005). Cependant, le rôle du système de sécrétion de type IV dans la pathogénicité est encore incertain. Le groupe de gènes *hrp* code pour un système de sécrétion de type III et est également associé à la pathogénicité. Un inventaire des gènes effecteurs candidats a été dressé à partir de l'homologie avec des effecteurs connus. Une gamme d'autres gènes ont été associés à la virulence et à la pathogénicité, y compris les gènes *rpf*, gomme et *wxc* impliqués dans la régulation de la synthèse des enzymes de dégradation extracellulaire, gomme xanthane et lipopolysaccharides.

### 3.3.2. Statut actuel de la taxonomie de *X. translucens*

La bactérie faisant partie des pathovars de l'espèce *Xanthomonas campestris* (Valerie et al., 1981; Van Den Mooter et al., 1987; Azad et Schaad, 1988), est actuellement élevée au rang de l'espèce et est nommée *Xanthomonas translucens*. En se basant sur la virulence et la spécialisation hôtes-bactérie, plusieurs pathovars ont été attribués à cette espèce. L'utilisation du terme pathovar est étroitement liée à l'hôte. Néanmoins, les différents pathovars peuvent induire des symptômes similaires sur la même culture ajoutée à cela, l'utilisation de différents tests de pathogénicité avec la grande diversification de la gamme d'hôtes. Tous ces facteurs ont amené à une grande confusion jusqu'à l'heure actuelle dans la taxonomie du groupe *translucens* (Bragard et al., 1997; Duveiller et al., 1997; Sapkota et al., 2020).

Stead (1989) suggère la dénomination suivante : *X.c. Pv. Translucens* (incluant les pathovars *cerealis*, *hordei*, *secalis* et *undulosa*), *X.c. pv. graminis* (incluant les pathovars *phlei* et *poae*), *X.c. pv. arrhenatheri*, *X.c. pv. phleipratensis*, *X.c. pv. holcicola*, *X.c. .pv. oryzicola*, *X.c. pv. oryzae*, *X.c. pv. vasculosum*. Selon le même auteur, le système de nomenclature présente plusieurs spécificités hôte/pathovars à l'exemple de *X. c. pv. Translucens* / orge, *X.c .pv. secalis* / seigle, *X.c. pv. hordei* /orge, *X.c.pv. cerealis* /orge, blé, et *Bromus spp*, *X.c .undulosa* / blé, *X.c. orizicola* / riz.

Bragard et Maraite (1994) démontrent qu'il existe des différences nettes pour les souches de *X.t. pv. undulosa* en provenance d'origines géographiques différentes. En effet, lorsque les souches typiques provoquent des stries extensives sur blé et orge, d'autres souches induisent des symptômes limités. Se basant sur la technique RFLP Bragard et al (1995) montrent que les souches pathogènes sur orge, mais pas sur blé forment des groupes génétiquement différents. *X.t. pv.secalis* a été décrite, pathogène sur seigle Reddy et al, 1924 ; Duveiller et al, 1997). Pourtant les souches de ce pathovar infectent l'orge l'avoine et le blé.

Vauterin (1995) propose l'appellation de *X. translucens* sp. Nov. Nom. Rev qui inclut en plus des pathovars du groupe translucens, les pathovars : *arrhenatheri*, *graminis*, *phlei*, *phleipratensis*, et *poae*. Il reste cependant, le fait que du point de vue économique et phytopathologique, le danger représenté par les souches causant la strie noire, concerne plus les régions de culture du blé que les manifestations des autres pathovars (*arrhenatheri*, *poae* et *graminis*).

Les études sur la spécialisation hôte pathogène sont directement liées à la recherche la résistance à la maladie (Duveiller et al, 1997). Bragard et al (1997) estiment que l'utilisation du terme pathovar est relation directe avec l'hôte la plante. L'ambiguïté dans la taxonomie du groupe *translucens* est souvent liée à la spécificité des différents taxons et leurs spécialisations pathogéniques, les auteurs rapportent que les cinq pathovars du groupe *translucens* ne peuvent être différenciés par l'hybridation de l'ADN, ni par les techniques sérologiques, ni par le profil des acides gras, bien que des différences dans la gamme d'hôtes et dans l'agressivité ont été clairement démontrées.

L'espèce *Xanthomonas translucens* est proposée par Schaad et al., (2000) et Vauterin et al., (2000) en lui attribuant les pathovars, *translucens*, *cerealis*, *hordei*, *secalis*, *undulosa*, *arrhenatheri*, *phlei*, *phleipratensis*, *poae*, et *secalis*. et que le pathovar bromi pourrait être classé dans une espèce à part (*X. bromi*).

La classification est en continuel remaniement. Certains travaux basés sur le séquençage de gènes constitutifs utilisant la méthode d'analyse des gènes de ménage « multilocus sequence analyse » (Young et al.2008), ont contribué à la reconstitution de groupes d'espèces de *Xanthomonas translucens*.

La contribution de plusieurs auteurs (Gonsalves et Rosato, 2002, Parkinson and al.,2007. Fischer-Le Saux, 2008. Ah-You et al., 2009, Parkinson and al., 2009 ; Azali, 2010), s'appuyant sur des méthodes moléculaires, des méthodes de génotypage et des méthodes d'analyses phylogénétiques commençant par des hybridations DNA-DNA, l'analyse des ITS

(ITS1,ITS2,et ITS3) 16S-623S rdna, arnr16s, REP-PCR, AFLP, SNP, l'utilisation des puces à ADN, MLST, MLSA allant au séquençage génomique, ont contribué à la classification et la détermination de la position phylogénétique de l'espèce *X. translucens* et de ses pathovars.

L'étude de Yakoubou et Côté (2010) a permis la reconstruction de la famille  $\gamma$ -*Proteobacteria*, se basant sur un marqueur de 224 nucléotides (une combinaison de 157 nucléotides du gène 16S rRNA et de 67 nucléotides de l'its 16S-23S). Cette analyse a abouti à la formation au sein des *Xanthomonadaceae* de quatre grands groupes: les groupes I et II qui incluent les genres : *Stenotrophomonas* et *Xylella*, respectivement. Le groupe III renferme les cinq espèces de *Xanthomonas* : *X. theicola*, *X.sacchari*, *X. albilineans*, *X. translucens* and *X. hyacinthi*. Ce groupe se confond avec le groupe de *Xanthomonas hyacinthi* , le groupe IV regroupe 18 autres espèces de *Xanthomonas*.

Les données récentes basées sur les séquençages génomiques (Wichmann et al., 2013; Jaenicke et al., 2016; Peng et al., 2016; Charkhabi et al.,2017) ont permis de mieux comprendre la phylogénie et l'identification des bactéries ainsi que leur pathogénicité et virulence (Sapkota et al., 2020).

### 3.4. La gamme d'hôtes de l'espèce *X. translucens*

*Xanthomonas translucens* pv. *Translucens* a été identifié la première fois sur l'orge (Jones et al.,1917), et plus tard sur blé (Smith et al.,1919), seigle (Reddy et al.,1924),sur graminées (Wallin,1946) et finalement sur triticales (Zillinsky et Borlaug1971).

Selon Alizadeh et al (1997), la strie bactérienne est provoquée par cinq pathovars de *Xanthomonas translucens*, ces pathovars ont été distingués par leurs pathogénicité vis-à-vis des différents 'hôtes (tableaux 3et 4).

**Tableau 3:Pathovars de *Xanthomonas translucens* et leurs hôtes**

Pathovar	Plantes hôtes
<i>X. t. pv.arrhenatheri</i> (Egli and Schmidt, 1982) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings	<i>Arrhenaterum elatius</i>
1995 ( <i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>arrhenatheri</i> Egli et Schmidt, 1982).	

<i>X. t. pv.cerealis</i> (Hagborg, 1942)Vauterin, Hoste, Kersters and Swings 1995 ( <i>X. C.pv.cerealis</i> (Hagborg 1942), Dye (1978).	<i>Agropyron spp.</i> , <i>Bromus spp.</i> , <i>avena spp.</i> , <i>Hordeum spp.</i> , <i>Secate cereale</i> , <i>Triticum spp.</i>
<i>X. t. pv. Graminis</i> (Egli, Goto and Schmidt, 1975) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings(1995) ( <i>X. C.pv.graminis</i> (Egli, Goto and Schmidt, 1975), Dye (1978).	<i>Dactylis glomerata</i> , <i>Festuca spp.</i> , <i>Lolium multiflorum</i> , <i>L. Perenne</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Alopecurus pratensis</i>
<i>X. t. Pv. Phlei</i> ( <i>Egli andschmidt, 1982</i> ) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings (1995)( <i>X. C.pv.phlei</i> Egli and Schmidt (1982).	<i>Phleum pratense</i> ( <i>timothée</i> )
<i>X. t. Pv. Phleipratensis</i> (Wallin and Reddy 1945) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings (1995) ( <i>X. C.pv.phleipratensis</i> (Wallin and Reddy 1945), Dye (1978).	<i>Phleum pratense</i>
<i>X. t. Pv. (Egli andschmidt, 1982)</i> Vauterin, Hoste, Kersters and Swings (1995)( <i>X. C.pv.poa</i> Egli et Schmidt (1982).	<i>Poa trivialis</i> ( <i>pâturin</i> )
<i>X. t. Pv. Secalis</i> (Reddy, Godkin and Johnson, 1924) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings (1995) ( <i>X. C.pv.secalis</i> (Reddy, Godkin and Johnson, 1924), Dye (1978).	<i>Secale cereale</i> ; <i>Hordeum et Triticurn spp.</i> <i>Peuvent être inoculées artificiellement</i>
<i>X. t. Pv. Translucens</i> (Jones, Johnson and Reddy, 1917) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings (1995) ( <i>X. C. Pv.hordei</i> (Hagborg 1942), Dye 1978) <i>X. C. Pv.translucens</i> (Jones, Johnson et Reddy 1917), Dye1978).	<i>Hordeum spp.et autres céréales</i> ( <i>famille des Graminaceae</i> ).
<b><i>X. t. Pv. Undulosa</i> (Smith, Jones and Reddy, 1919) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings (1995) (<i>X. C.pv. Undulosa</i> (Smith, Jones et Reddy, 1919) Dye (1978).</b>	<b><i>Triticumspp.</i>, <i>Secale cereale</i>, <i>Hordeum spp.</i> <i>Par inoculation.</i></b>

Source: Staley et al., 2004 et Janse, 2005

Tableau 4: Les principales plantes hôtes de l'espèce translucens et les hôtes secondaires

Nom scientifique	Hôte principale	Hôte secondaire	Hôte spontané
<i>Xanthomonas translucens translucens</i>	Hordeum vulgare (Orge), cereale (seigle), Triticum aestivum (blé tendre)	Secale (seigle), Triticum aestivum (Epeautre ou blé des Gaulois)	<i>Avena sativa</i> (Avoine), <i>Triticum spelta</i> (Epeautre ou blé des Gaulois), <i>Bromus inermis</i> (Brome)
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	Hordeum vulgare (orge) cereale (seigle), triticae, triticum aestivum (blé tendre)	Avena sativa (Avoine), Triticum spelta (Epeautre ou blé des Gaulois)	<i>Bromus inermis</i> (brome), <i>Phleum pratense</i> (Fléole des prés), <i>Elymus repens</i> (le chiendent officinal ou chiendent commun),  <i>Phalaris canariensis</i> (Alpiste des Canaries), <i>Poa pratensis</i> (Le pâturin des prés)  <i>Festuca arundinaceae</i> (la fétuque élevée, fétuque roseau ou fétuque faux-roseau)  <i>Festuca rubra</i> (la fétuque rouge ou fétuque traçante), <i>Hordeum murinum</i> subsp. <i>leporinum</i> (Link) Arcang. (Orge sauvage, Orge Queue-de-rat), <i>Medicago sativa</i> (La luzerne ou luzerne cultivée)

Source : <https://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2014/06/Bacterial-leaf-streak-CP-2011.pdf>

### 3.5. Symptômes reliés à l'espèce *X. translucens*

Toutes les parties aériennes de l'hôte sont atteintes (figure 9), mais les feuilles et les glumes le sont plus souvent que les autres (Zillinsky, 1983). Généralement, la strie bactérienne apparaît en fin de saison et les symptômes sont plus évidents après l'épiaison (Weise, 1987). Sur les glumes, la bactérie provoque des stries noires, longitudinales, plus ou moins parallèles, nombreuses sur les parties supérieures (Smith, 1917). Elle peut être identifiée par un aspect graisseux.

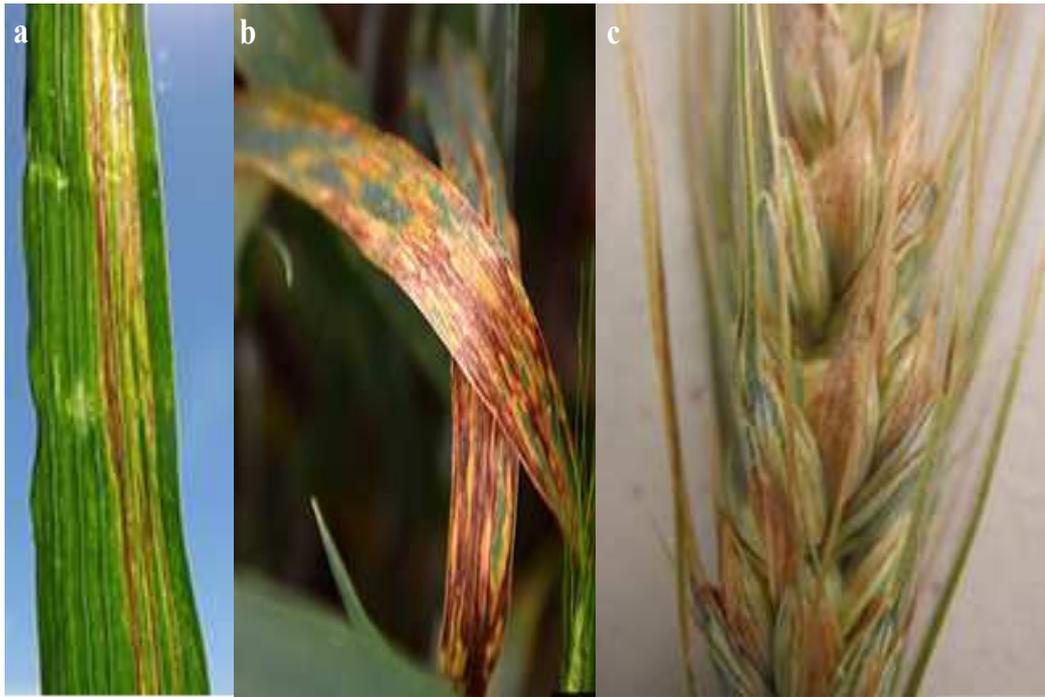
D'après Duveiller et *al.*(1997), l'attaque sur les feuilles et les tiges prend le nom de strie bactérienne. Les premiers symptômes sont de petites taches ou stries linéaires, brun pâle et huileuses, nécrotiques au centre avec des marges de couleur rouille chez le blé. Les lésions, au début, s'accroissent surtout dans le sens de la longueur des feuilles (figure 9a), entre les nervures, plus tard celles-ci s'élargissent et coalescent, produisant ainsi des bigarrures de formes irrégulières, brun gris. Par temps humide, des gouttelettes d'exsudat bactérien jaune suintent le long des lésions (figure 9, b). Cet exsudat en séchant se transforme en petites granules jaunâtres ou en croûtes minces et luisantes à la surface du limbe des feuilles (Milus et Charlkley, 1994; Zillinsky, 1983). Sur les épis, la glume noire peut être facilement reconnue par des stries foncées et huileuses sur les glumes et les glumelles inférieures.

Les premiers symptômes font leur apparition au niveau de la partie supérieure des glumes (figure 9 c). Dans les cas graves, la graine peut être noircie et ridée (Smith et *al.*, 1919; Zillinsky, 1983). La maladie s'étend à la gaine des feuilles adjacentes, provoquant l'apparition des pigments noirs et l'affaiblissement des tiges (Duveiller et *al.*, 1997).

Selon Anonyme(1996) et Weise (1987), l'apparition des symptômes prend 10 à 14 jours en fin de saison, bien après l'épiaison. Ces symptômes sont rarement observés sur feuilles avant l'épiaison, mais souvent observés entre l'épiaison et la floraison (Milus et Mirlohi, 1993). Selon Duveiller et *al.*(1997), la maladie est souvent observée tardivement dans la saison végétative.

Duveiller (1994) a rapporté que selon plusieurs auteurs, la maladie est fréquemment confondue avec la nécrose brune (Brown melanosis) et la tache septorienne des glumes, causée par *Septoria nodorum*, f. sp. *Leptosphaeria nodorum*). La strie bactérienne de l'avoine, causée par *Pseudomonas striafaciens* provoque des symptômes qui ressemblent beaucoup à ceux occasionnés par *X. Translucens* (Zillinsky, 1983).

Les symptômes de la maladie peuvent être aussi confondus avec des désordres physiologiques dont, la fausse glume noire, qui peut être due aux rayonnements ultraviolets en l'absence de la bactérie (Duveiller, 1991).

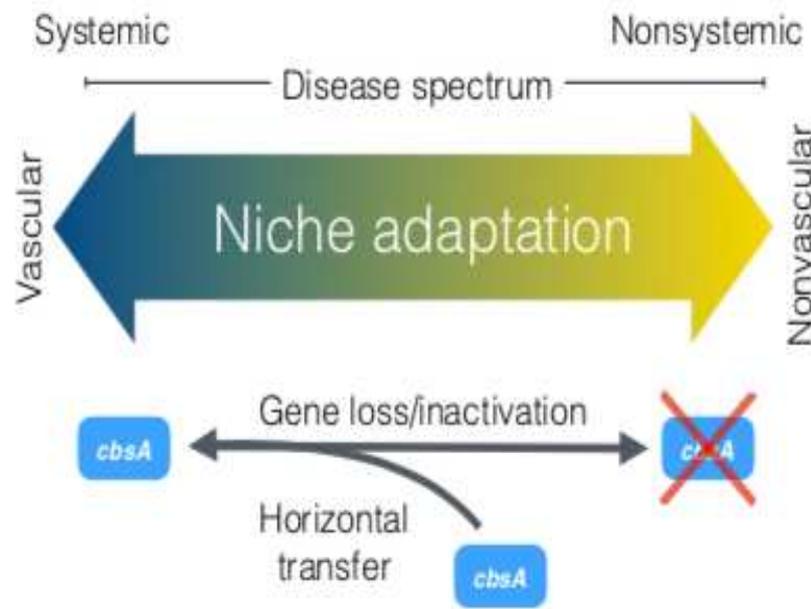


**Figure 9: Symptôme de la strie foliaire bactérienne sur feuilles, glumes et arêtes (Source : Kaur *et al.*, 2002).**

### **3.5.1. Relation entre les symptômes vasculaires et parenchymateux chez *Xanthomonas translucens***

Le au niveau des plantes le système vasculaire et le parenchyme représentent des niches distinctes (figure 10), le xylème composé de cellules mortes avec des parois très renforcées et organisées en cylindres conférant aux plantes leur intégrité et permettant le transport des fluides sur de longues distances, en contraste les tissus parenchymateux sont composés de cellules vivantes et d'espace intercellulaires . Le fluide du xylème est composé d'eau et d'éléments nutritifs et plusieurs pathogènes vasculaires réussissent bien à coloniser cet environnement, le xylème en transportant le fluide des racines vers les feuilles sert d'un pathway potentiel transportant rapidement et d'une façon systémique les pathogènes.

Se basant sur la tendance des bactéries de perdre et gagner des gènes regroupés en clusters , l'hypothèse est que la pathogénie vasculaire ou non vasculaire pourrait être due à la perte ou au gain d'un certain nombre de gènes.



**Figure 10: L'évolution de la pathogénie vasculaire et non vasculaire chez Les *Xanthomonas* associées aux plantes. ( Source : Gluck-Thaler et al., 2020).**

### 3.6. Épidémiologie de l'espèce *X. translucens*

#### 3.6.1. Développement de la maladie et conditions environnementales

La bactérie *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* peut se conserver dans les semences où elle peut vivre de 63 à 81 mois (Forster et Schaad, 1988). Cette bactérie peut infecter et infester la graine (Schaad, 1988; Smith et al., 1919; Wallin, 1946). Elle peut se conserver dans les débris végétaux du sol et même dans les populations microbiennes épiphytes (Smith et al, 1919, Boosalis, 1952; Schuster et Coyne, 1974; Leben, 1981 Wiese, 1987, Stromberg et al., 2003, ).

La bactérie se dissémine sur de longues distances par les semences qui constituent une importante source d'inoculum primaire. Localement elle est transmise par la pluie, la rosée et les contacts entre les plants, Ainsi, les pucerons piégés dans les exsudats peuvent le transmettre au blé et à l'orge et participent ainsi à la dissémination (Boosalis, 1952).

*Xanthomonas translucens* pv. *translucens* est un véritable pathogène du parenchyme. L'invasion intercellulaire se produit après la pénétration par les stomates (Duveiller et al., 1997).

Selon Stromberg et al. (1999), les conditions environnementales peuvent avoir un effet sur la densité de la population de *Xanthomonas translucens* et également sur la sensibilité des feuilles à l'infection.

La bactérie supporte en effet une large gamme de température de 15 à 30°C (Duveiller et *al.*, 1991). La température optimale de la bactérie étant d'environ 22°C (Forster et *al.*, 1986).

Duveiller et *al.* (1997) ont rapporté que les symptômes apparaissent, seulement, lorsque la température permettait une croissance bactérienne atteignant les 10<sup>8</sup> CFU/ feuille et températures basses retardaient la multiplication du pathogène et la progression de la maladie.

La strie bactérienne peut se produire pendant la saison des pluies ou dans les champs irrigués par aspersion où l'humidité est importante et dans des environnements plus chauds, caractérisés par des nuits fraîches (Forster et *al.*, 1986 ; Duveiller et *al.*, 1994).

L'humidité facilite en effet de détacher le pathogène de la graine et contribue à la colonisation des feuilles et l'invasion des tissus de la feuille l'eau libre aussi permet au pathogène de s'étendre dans les champs et se disperser sur les feuilles et permet l'augmentation du nombre de lésions (Duveiller et *al.*, 1997).

Certaines bactéries ayant une activité glaçogène (Ice Nucleating Activity ou INA+) sont capables de catalyser la formation de la glace à des températures qui varient entre 0 et -10°C. Les souches de *Xanthomonas translucens* expriment l'activité glaçogène à des températures qui se situent entre -2 et -8 °C (Kim et *al.*, 1987). Ceci peut induire des symptômes de la maladie sur la plante quand les conditions sont favorables pour la multiplication du pathogène (Duveiller et *al.*, 1997). La glaçogénèse n'est pas une condition nécessaire de l'induction d'une épidémie, car les symptômes ont tendance à apparaître après des périodes de gel. (Duveiller et *al.*, 1991).

La culture de blé sévèrement infectée par la pourriture racinaire peut être infectée par *Xanthomonas translucens* ce qui laisse suggérer que le champignon pourrait avoir un rôle dans l'épidémiologie de la strie bactérienne.

### 3.6.2. Conservation du pathogène

Les bactéries associées aux plantes sont diverses du point de vue leur pouvoir pathogène, leurs caractères génotypiques et phénotypiques, et leur phylogénie. Les espèces du genre *Xanthomonas* existent principalement en association pathogène ou épiphyte avec leurs hôtes et dans les graines (Gnanamanickam, 2006).

Boosalis (1952), rapporte que la bactérie *X. t. pv. translucens*. Survit pauvrement dans le sol, mais se conserve mieux quand les débris de récolte sont présents.

Les bactéries libres ne vivent pas plus de 14 jours dans le sol à air sec et pas au-delà de 57 jours lorsque les feuilles infectées des triticales sont mélangées à un sol humide (Cunfer, 1988).

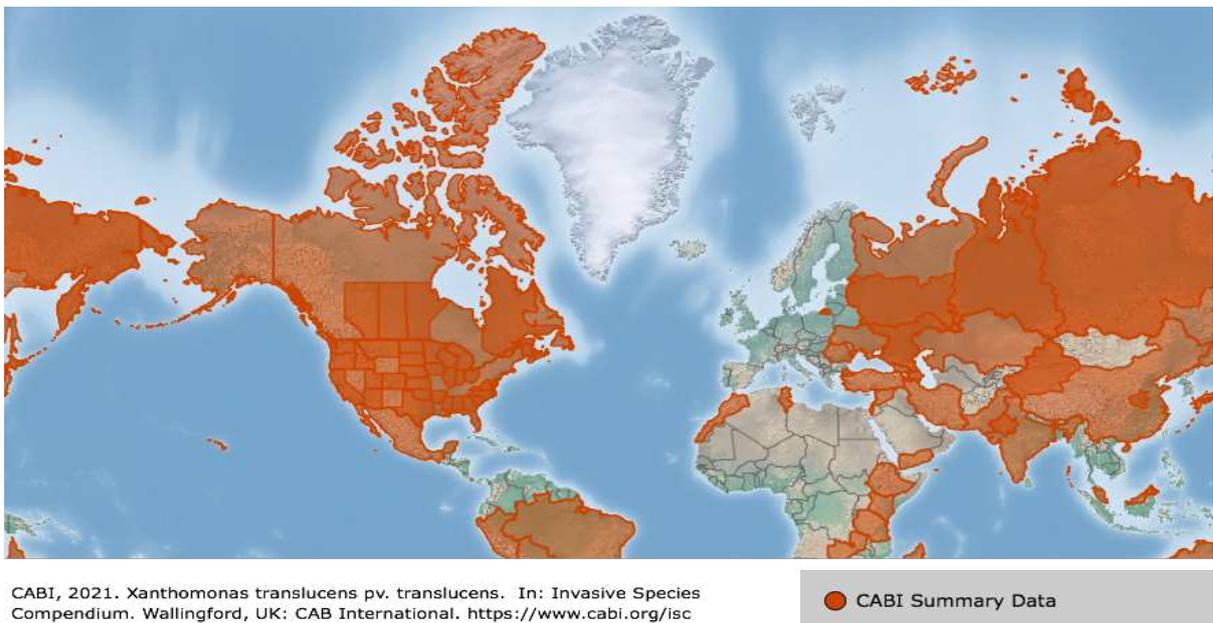
Par ailleurs, Gillings et Holmes (2005) ont rapporté que les espèces du genre *Xanthomonas* sont généralement de faibles compétiteurs dans le sol. et la conservation dans la graine peut être altérée avec le temps, en effet (Neergaard, 1977) rapporte que le taux des bactéries au niveau des semences a été réduit de 79% et de 93% après seulement six mois de conservation; et plus de 99,5% de bactéries n'ont pas été détectées après deux ans.

Wallin (1946a) et Marefat et al., (2006) a rapporté que *X.t. pv. translucens* Peut se conserver sur les espèces hôtes pérennes qui donnent au pathogène une opportunité de se disséminer vers les céréales voisines.

La paille peut également porter un inoculum viable de *X.t. pv. translucens* . De saison en saison qui cause une infection initiale dans le champ, mais lorsque la paille est couverte ou bien mélangée au sol le nombre de bactéries viables dans la paille est réduit (Boosalis, 1952).

### 3.6.3. Distribution géographique

La strie bactérienne présente une large distribution géographique, elle est répandue dans la plupart des régions céréalières du monde (Duveiller, 1989 et 1994, Alizadeh, 1996 ; Wonni et al., 2011; Adikhari et al., 2011) (figure 11). La maladie est fréquente dans les régions à climat tempéré (Duveiller, 1989; Duveiller et Maraite, 1993; Duveiller et al., 1997), dans les régions où le taux de pluviométrie est élevé et dans les zones où le système d'irrigation par aspersion est pratiqué.



**Figure 11: Distribution géographique de *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* dans le monde (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/56978#toDistributionMaps>).**

La présence de la maladie est en relation avec les grandes variations de température et les changements climatiques fréquents (Duveiller *et al.*, 1997). La strie bactérienne se produit aussi dans des régions tropicales et subtropicales de l'Asie, l'Afrique, L'Amérique du Sud, et l'Australie (Wonni *et al.*, 2011)

### **3.7. Impact économique de la maladie**

Cette maladie est souvent confondue avec les dégâts provoqués par les stress abiotiques (Duveiller *et al.*, 1997b). La strie bactérienne des céréales est une maladie dévastatrice et les pertes qu'elle occasionne sont considérables (Anonyme, 1991 ; Duveiller *et al.*, 1993a).

Cette bactérie est souvent associée à la semence (Anonyme, 1991). Cependant la tolérance 0 concernant les lois de quarantaine est considérée parfois comme non nécessaire pour ce pathogène (Schaad *et Forster*, 1989). La strie bactérienne est sujette aux législations phytosanitaires la bactérie fait partie de la liste A2 de l'EPPO (Alexandrova, 1995), du fait qu'elle constitue une menace pour la croissance des cultures et à la production (Maes *et Garbeva*, 1995),

La maladie peut attaquer sévèrement un champ complet de telle sorte que rien ne peut être moissonné (Burton, 1931), Selon Forster *et al.*, (1986).les pertes sont en général de l'ordre de 10% ou moins et les niveaux d'infections élevés peuvent entraîner des pertes de 10-30% du poids de la graine. Le blé dur comme le blé tendre peuvent être sévèrement touchés, de même que le triticale, mais moins fréquemment l'orge (Shane *et al.*, 1987).

Cette bactérie peut également provoquer la stérilité des épis de blé 5-10% (Forster *et Schaad*, 1988). D'après Duveiller (1989), au Mexique en 1987, les pertes avoisinent les 20% dans le rendement et de 13% dans le poids de 1000 grains pour un cultivar sensible de blé.

Au Mexique, des données indiquent que les pertes au-dessous de 5% peuvent être attendues quand le taux d'infection des feuilles est inférieur à 10%. Néanmoins, plus de 20% du rendement peuvent être perdus si la surface foliaire est infectée à 50% (Duveiller *et Maraite*, 1993a).

Les pertes occasionnées par cette bactérie sont couramment mineures. Néanmoins, un taux de 40% de pertes a été enregistré dans les champs irrigués par aspersion en Idaho (Duveiller *et al.*, 1997; Tubajika *et al.*, 1999).

### 3.8. Techniques de Diagnostic et détection de *Xanthomonas translucens*

Selon plusieurs auteurs le diagnostic est compliqué et le symptôme de cette maladie, peut être confondu avec le mélanisme du au gène (Sr2)de résistance à la rouille ou à au "pseudoblack chaff" (Duveiller, 1989).

Le diagnostic n'est pas très facile et la maladie du BLS causée par le groupe des pathovars de *Xanthomonas campestris* et du « Basal glume rot » causé par *P.s. pv. atrofaciens* peuvent être confondues ou bien carrément attribuées à d'autres agents étiologiques. En effet les symptômes atypiques des deux maladies peuvent être faussement attribués à *F. Culmorum*, *Leptosphaeria nodorum*, *P. s. pv. syringae* et à d'autres facteurs biotiques et abiotiques incluant les dégâts causés par le gèle favorisés par les populations épiphytes de *X.c. Pv. Translucens* qui exhibent une activité glaçogène (Kim et al, 1987 ; Azad et Schaad, 1988 in Alexandrova, 1995)

En particulier, le symptôme du BLS peut varier en fonction avec le degré de résistance du cultivar . Le symptôme peut être confondu avec celui dû à *Mycosphaerella graminicola*. (Milus et Mirlohi, 1994).

Afin de faciliter le diagnostic plusieurs techniques ont été proposées dont l'utilisation du microscope à fond noire qui montre si la lésion est induite par des bactéries diffusant à partir des tissus infectés, sous forme d'un nuage blanc (Duveiller et al, 1997).

Sands et Fourrest (1989) proposent un nouvel outil de diagnostic pour *X.c. pv. translucens* et montrent que le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranoside (ou le X-gal) dans le milieu Wilbrink's, permet de colorer les colonies recherchées en bleu verdâtre. La technique peut être également utilisée en plein champ en déposant un fragment de tissu végétal infecté dans une solution de X-gal dans un tube à essai avec incubation dans la poche pendant 2h la coloration bleue s'avère révélatrice de la présence du germe dans les tissus infectés.

#### 3.8.1. Techniques de détection par isolement sur milieux nutritifs et caractères morphologiques et cultureux

La semence étant considérée source primaire d'inoculum (Cunfer 1988 ; Forster et Schaad, 1988 et 1989 ; Duveiller, 1991). Plusieurs auteurs décrivent différentes techniques pour l'isolement du pathogène. En effet en 1985 puis en 1989, Schaad et Forster, Mehta (1990) et Duveiller (1991) proposent de procéder au lavage des semences pour l'isolement de la bactérie en adoptant différentes techniques, Sromberg et al (1999), suggèrent une technique d'isolement par le lavage des feuilles.

Différents milieux ont été proposés dont plusieurs auteurs ont étudié les avantages et les insuffisances. (Dowson,1957 ; Duveiller,1989 ; Duveiller,1991 ; Duveiller, 1994 ; Duveiller et Maraite, 1990 ; Bragard et al, 1993 ; Milus et Mirlohi, 1993 ; Maes et al ,1996et Duveiller et al, 1997). Cette espèce peut être cultivée sur des milieux usuels tels que (l'agar nutritif, YPGA, KB et sur milieu Wilbrink's (Dowson, 1957).

Des milieux semi-sélectifs tels que le milieu XTS Schaad et Forster (1985) et le milieu KM-1(Hee Kyu Kim et Sands, 1996) ont été utilisés.

Sands et Fourrest (1989) notent que *X. c. Pv translucens* apparaît sous forme de colonies jaunâtres au bout de 48-72h à 28°C sur milieu Wilbrinks (Dowson, 1957). Selon Duveiller (1989) l'identité des colonies représentatives sur milieu WBC pourrait être confirmée par la mise en culture de ces colonies sur milieu GYCA en tube incliné. La présence de masse mucoïde au fond du tube est caractéristique à *X. Translucens* et peut éviter le passage par le test de pathogénicité.

### 3.8.2. Caractères physiologiques et biochimiques

Une fois isolées les bactéries sont caractérisées phénotypiquement biaisant plusieurs critères dont leurs profil biochimique et physiologique. Les espèces appartenant au genre *Xanthomonas* sont Gram négatif, et présentent des paramètres biochimiques bien spécifiques. Une synthèse des caractères décrits par Miyama, 1980 ; Bradbury, 1984 Shaad et al, 1987b ; Duveiller, 1997 ;Shaad et al, 2001 est rapportée dans le tableau (Tableau 5). Elles sont oxydatives, catalase positive, et produisent des acides à partir de carbohydrate au bout d'une semaine (Schaad et al, 2001 ).

*Xanthomonas translucens* ne réduit pas les nitrites en nitrates, ne possédant pas de cytochrome oxidase, ni d'arginine dihydrolase, elle hydrolyse l'esculine et ne produit pas de 2-kétogluconate (Miyama, 1980 et Bradbury, 1984 in Duveiller et al, 1997), elle n'hydrolyse pas l'amidon et n'utilise pas le lactose (Schaad, 1987b) selon Schaad (2001) *Xanthomonas translucens* hydrolyse l'amidon possède une activité glaçogène, ne produit pas d'acide à partir de l'arabinose et n'utilise pas le glycerol et le melobiose, présente une digestion positive de la caséine, présente une croissance très colorée et très mucoïdes sur milieux GYCA et YDC. La plupart des caractères de ce germe sont similaires à ceux de la plupart des *Xanthomonadaceae* avec quelques exceptions, la bactérie peut croître à 35°C, tolérante à des concentrations de sel de %M, mais pas à 4% ne présente pas d'activité pectinolytique, Produit le pigment xanthomonadine, produit l'ammoniaque, produit l'acide 2-ketogluconique, 5-ketogluconiqueet 2,5 diketogluconique à partir de D-glucose, présente une utilisation oxydative du glucose dans

le milieu Hugh et Leifson,, dépourvue de l'enzyme Arginine d'hydrolase, des nitrates réductases, des cytochromes oxydases et de l'enzyme uréase, munie des enzymes levane sucrase , catalase, lipase du tween 80, beta-galactosidase, gélatinase, présente une croissance sur les sources de carbone, L-arabinose, D-xylose, d-glucose, D- galactose, D-manose, saccharose, trehalose, cellobiose, ne présentant pas de croissance sur les milieux contenant comme sources de carbone le meso-inositol, dulcitol, L-methionine, Na-L-glutamate, maltose, D-ribose, raffinose, amidon, D-manitol, Na-propionate, D-fructose, D6 glucose, D-manose, D-maltose, cellobiose et l'inuline Produit du H<sub>2</sub>S à partir de peptone ou de L-cysteine-HCL

Selon Duveiller *et al* (1997) les tests biochimiques et physiologiques ne possèdent pas la même valeur taxonomique, car plusieurs d'entre eux montrent des résultats variables pour une collection de souches du même pathogène.

Le profil physiologique de l'espèce *X. translucens* est similaire à la plupart des *Xanthomonadaceae* avec quelques exceptions, la bactérie peut croître à 35°C, tolérante à des concentrations de sel de 2%, mais pas à 4% ne présente pas d'activité pectinolytique, produit le pigment xanthomonadine, produit l'ammoniaque, produit l'acide 2-ketogluconique, 5-ketogluconique et 2,5 diketogluconique à partir de D-glucose, présente une utilisation oxydative du glucose dans le milieu Hugh et Leifson, dépourvue de l'enzyme Arginine d'hydrolase, des nitrates réductases, des cytochromes oxydases et de l'enzyme uréase, munie des enzymes levane sucrase , catalase, lipase du tween 80, beta-galactosidase, gélatinase, présente une croissance sur les sources de carbone, L-arabinose, D-xylose, d-glucose, D- galactose, D-manose, saccharose, trehalose, cellobiose, ne présentant pas de croissance sur les milieux contenant comme sources de carbone le meso-inositol, dulcitol, L-methionine, Na-L-glutamate, maltose, D-ribose, raffinose, amidon, D-manitol, Na, L-K-L- tartrate, Na-propionate, D-fructose, D6 glucose, D-manose, D-maltose, cellobiose et l'inuline Produit du H<sub>2</sub>S à partir de peptone ou de L-cysteine .hcl (Schaad *et al*, 1987b ; Schaad *et al*, 2001 ; Miyama, 1980 ; Bradbury, 1984 ; Duveiller, 1997).

**Tableau 5: Caractères phénotypiques de *Xanthomonas translucens***

TESTS	REPONSES
Croissance à 35°C	+
Tolérance au sel(NaCl)	
2%	+
4%	-
Pectinolyse	-
Catalase	+
Cytochrome oxidase	-
Production d'indole	-
Production de pigment xanthomonadine	+

Production d'amoniaque	+
Production d'acetoine	-
Production d'acide 2-ketogluconique, 5-ketogluconique et 2,5 diketogluconique à partir de D-glucose	-
Utilisation oxydative du glucose dans le milieu H&L	+
Réduction des nitrates	-
Réaction dans le lait écrémé	-
Production d'acide	
Réaction alcaline réduction de la crème	+
Coagulation	
Arginine d'hydrolase	-
Levane sucrose	+
Lipase de tween 80	+
Production d'H <sub>2</sub> S à partir de peptone ou de L-cystéine .HCl	+
Pigment fluorescent	-
Croissance anaérobic	-
Hydrolyse de l'esculine	+
Activité de l'uréase	-
Activité de la gélatinase	+
Utilisation de L-asparagine comme unique source de carbone et de nitrogène	-
Activité de la DN-ase	-
Croissance sur des sources de carbone L-arabinose, D-xylose, d-glucose, D- galactose, D-manose, saccharose, trehalose, cellobiose	+
Meso-inositol, dulcitol, L-méthionine, Na-L-glutamate, maltose, D-ribose, rafinose, amidon, D-manitol, Na,L-K-L- tartrate, Na-propionate	-
Production d'acide à partir de	
L-arabinose, D-xylose,	+
D-fructose, D6glucose, D-manose, D-maltose, cellobiose	
D-ribose, inuline	-
<b>CROISSANCE SUR MILIEUX :GYCA,GYEA,PSEUDOMONAS-F AGAR,</b>	+
<b>MILIEU SX</b>	-
<b>MILIEU SYNTHETIQUE EGLI ET AL(1975)+METHIONINE</b>	+

source :Shaad et al, 1987b ; Shaad et al, 2001 ; Miyama, 1980 ; Bradbury, 1984 ; Duveiller, 1997

### 3.8.3. Techniques sérologiques et analyse des protéines et des profils d'acides gras

Fang et al ,1958 ; Claflin et Ramundo, 1987 ; Sletten, 1989 et Fromel et Pazos, 1994, ont utilisé les tests sérologiques ELISA, Immunofluorescence (IF) et le "Dot-Immunobinding assay" (DIA). Pour identifier l'espèce *X. translucens* Bragard et al (1993), Les polysaccharides sont utilisés comme antigènes pour la production de l'anticorps monoclonal permettant de révéler les souches virulentes (Duveiller et Bragard, 1992 ; Bragard et verhoyen (1993); Bragard et al. 1995 ; Bragard et al. 1997).

Le taux d'inoculum détecté reste souvent relatif aux techniques DIA est simple et peu onéreuse cependant son seuil de détection se limite à 10<sup>5</sup>cfu/ml. (Duveiller et al (1997).l'if se montre plus rapide et plus sensible, avec un seuil de détection de 10<sup>3</sup>à10<sup>4</sup> cfu/ml (Duveiller et Bragard, 1992)

Aussi, les résultats des analyses des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide pour l'analyse de souches de *Xanthomonas* se sont montrés conformes avec ceux donnés par les tests

de pathogénicité en plus de la différenciation entre certains groupes de pathovar (Laemmli 1970; Kersters et De Ley,1975; Van Den Mooter et al.,1987 ; Alizadeh et Rahimian,1989; Kersters et al.,1989;Stead 1989; Vauterin et al.,1991) ; Bragard et al.,1997; Alizadeh et al.,1997),

#### 3.8.4. Caractérisation moléculaire et diversité

Les techniques moléculaires viennent pallier les insuffisances des méthodes de détection classiques. La REA (Restriction Endonuclease Analysis) et la RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) des plasmides et des DNA génomiques ont été utilisés pour différencier entre les pathovars (Alizadeh et al, 1997). Les bandes de DNA, sont visualisées et les fragments DNA sont ensuite analysés avec des sondes spécifiques aux plasmides contenant les gènes *hrp*. Les résultats montrent qu'il existe deux groupes : le premier rassemble les souches pathogènes à l'orge et pas aux autres espèces testées, le deuxième groupe inclue toutes les souches pathogènes au blé, seigle, brome, *Lolium multiflorum*, *Agropyron elongatus* et avoine.

Bragard et al (1993), Bragard et al (1995) ; Bragard et al (1997), ont essayé d'analyser un certain nombre de souches d'origines géographiques diverses par RFLP et hybridation d'adn après avoir testé leurs réactions sérologiques et leur pathogénicité, les résultats obtenus montrent que ces techniques permettent de regrouper les souches selon leur profil de la même manière qu'il avait été regroupé selon les résultats du pouvoir pathogène.

Bragard et al (1997) ont analysé des souches de *Xanthomonas translucens* par la technique AFLP (fingerprinting technique), les bandes obtenues contiennent 30 à 50 produits PCR de l'ordre de 80 à 550-pb.les résultats sont conformes à ceux du test de pathogénicité qui montre des symptômes typiques sur blé et orge .

Selon Bragard et al (1997) l'aflp pourrait être utilisée aussi bien pour la taxonomie que dans les études épidémiologiques.

La technique PCR utilisée pour la reconnaissance des *Xanthomonas* est selon Maes et al (1996) une technique rapide (5 heures) et sensible ( $2 \times 10^3$  cfu/g de semence). Cette technique a permis de détecter 5 autres pathovars de l'espèce *translucens* provoquant des symptômes sur les graminées fourragères et spontanées.

Du fait que les pathovars de *X. Campestris* ne peuvent se distinguer que par leurs gammes d'hôtes, la classification et la discrimination des *Xanthomonas* doivent être reflétées dans la structure des molécules de leur DNA ribosomal (rdna).l'application des technologies des acides nucléiques pour la détection et l'identification des micro-organismes peut être considérée

comme une évolution des anciennes méthodes conventionnelles (Maes et Garbeva, 1995). Dans leurs études Maes et Garbeva (1995) et Maes et al (1996) ont défini le complexe taxonomique de *X. c. translucens* et de *X. C. Graminis* qui lui est très relié. Se basant sur la connaissance de la combinaison des séquences des RDNA oligonucléotides spécifiques et semi-spécifiques. Cette technique permet également, d'analyser lots de semences contaminés. Les définitions par ces auteurs des amorces spécifiques est le résultat de la présence de séquences conservées de 90pb ayant permis la détermination de l'espèce de *translucens* par l'amplification de bandes spécifiques de 159pb, notamment sur des lots de semences infectés par un inoculum de  $210^3$  CFU/ml. Ce niveau de sensibilité correspond au plus bas taux d'inoculum ayant été reporté par Schaad et Forster (1985) suffisant pour l'initiation de la maladie dans le champ.

### **3.8.5. Evaluation du pouvoir pathogène**

Plusieurs auteurs, dont Fang et al. (1950), Shane et Baumer (1987), Gardan et Betin (1989), Paul et Birkenstaedt (1989), Sletten (1989), Colin et al. (1990), Bragard et Maraite (1992), Duveiller et al. (1993), Milus et al. (1994), Alizadeh et al. (1995), Milus et Mirlohi (1994), El Attari et al. (1996) ont étudié le pouvoir pathogène de l'espèce *translucens* sur des plants de céréales et ont décrit plusieurs techniques d'inoculation tout en évaluant le degré de performance de chacune de ces techniques.

#### **3.8.5.1. Techniques d'inoculation**

Duveiller et al. (1997) rapportent que l'inoculation du sol pathogène n'induit pas la maladie dans les plantules de blé (Hagborg, 1936). L'inoculation des semences en utilisant les grains blessés ou en couvrant les grains avec de la crème bactérienne ou des suspensions bactériennes avec est faisable, mais pénible et insatisfaisante pour le test de pathogénicité (Hagborg, 1936). Le même auteur rapporte également que selon Bamberg (1936), l'inoculation des feuilles des jeunes plantules (4 – 5 feuilles) ou bien dans la base des plantules plus âgées par pression de la suspension bactérienne à l'aide d'une seringue hypodermique est une méthode d'inoculation très efficace. Ceci a été confirmé au CIMMYT où les plantules sont habituellement incubées dans une chambre humide pendant 5 jours après inoculation (Duveiller, 1994b). Dans certains cas le symptôme de water-soaking est observé assez tôt 3-4 jours.

Plusieurs techniques d'inoculation relatives aux céréales sont citées; on peut citer : La technique d'inoculation par injection (Cunfer et scolari, 1982; Schaad et Forster, 1988; Noval, 1989; Alizadeh et Rahimian, 1995), l'inoculation par pression (Alizadeh et Rahimian, 1989; Hagborg,

1970; Bragard *et al.*, 1992); l'inoculation par pulvérisation (Noval, 1989), l'inoculation des feuilles détachées (COLIN *et al.*, 1990) et l'inoculation par piqûre et dépôt de crème bactérienne (Colin *et al.*, 1990; Bragard et Maraite, 1992; Ferauge et Maraite, 1992; Bragard *et al.*, 1995).

Colin *et al.* (1990) ont procédé à une inoculation des feuilles détachées insérées dans un milieu semi-solide. Les feuilles sont maintenues ainsi plus longtemps vertes. Les portions de feuilles sont ensuite infiltrées par une suspension bactérienne de  $10^6$  CFU/ml. Des symptômes de lésions saturés en eau « water-soaking » ainsi que les exsudats se sont manifestés au bout de 4 à 7 jours et les isolats saprophytes ne produisent aucun symptôme. La méthode paraît facile, rapide et standardisée pour le test de pathogénicité.

D'autres méthodes d'inoculation ont fait l'objet de recherche notamment celle de Cariglia *et al.*, (2003,2004) et la technique de Welde-Michael *et al.*, (2008) dans le cadre d'une expérimentation concernant la survie de *Xanthomonas vasicola* pv. *Musacearum* dans le sol.

### 3.8.5.2. Échelles d'évaluation des symptômes.

Milus et Mirlohi (1994) ont utilisé une échelle de notation de 0 à 6 degrés, cette échelle est basée sur le pourcentage de saturation en eau « water-soaking » pour évaluer la réaction de la maladie sur les plantules.

Duveiller (1992), a mesuré la longueur des lésions et a utilisé une échelle allant de 0 à 4 degrés pour évaluer le niveau de production d'exsudats

### 3.9. Moyens de contrôle et de prévention contre l'agent pathogène

Parmi les pratiques culturales intégrées parmi les méthodes prophylactiques, la rotation avec des cultures non-hôtes ainsi que l'enfouissement dans le sol de la paille hébergeant l'inoculum potentiellement viable dans le champ est recommandé (Boosalis, 1952; Schaad et Forster, 1985 et Stromberg 2002). Selon, Boosalis (1952), Le nombre de bactéries viables dans la paille est réduit lorsque la paille est incorporée dans le sol. La lutte chimique avec l'utilisation de divers produits dont, molécules organomercurielles, la maladie était en effet, contrôlée avec des traitements de chlorure mercurique jusqu'à ce que ces derniers soient bannis en 1978 (Tillman,1999). Les traitements cupriques, notamment pour la désinfection de la semence ont été rapportés par plusieurs auteurs (Sands *et al.*, 1981 ; Duveiller, 1989 ; Duveiller en 1994 ; Schaad *et al.*, 1981 ; Mehta, 1986b). ,

La transmission par la semence a été enregistrée par Jones *et al.*, qui a recommandé l'utilisation d'une semence dépourvue du pathogène afin de limiter la strie bactérienne. Le pathogène peut à la fois infecter ou infester la semence (Tubajika *et al.*, 1998).

Les traitements physiques, par air sec et par exposition de la semence pendant 7 jours à des températures de 72°C ont également été rapportés (Atanasoff et Jonhson, 1920 Fourest et al. en 1990, Agrios, 2005 et OEPP, 1996).

L'utilisation des cultivars résistants est également intégrée dans la stratégie de contrôle de ce pathogène (Tillman et al., 1996 ; El Attari et Barrault, 1997)

Des méthodes pour développer des outils de criblage robuste pour évaluer le germoplasme contre la strie foliaire bactérienne, et d'identifier les sources de résistance à cette maladie. (Adhikari, et al., 2011).

De nombreuses études effectuées avec les génomes bactériens ont permis de révéler des séquences conservées chez les *Xanthomonas* ayant des relations directes avec la pathogénie chez les bactéries. L'analyse de ces gènes pourrait ouvrir des voies pour la mise en place de stratégies de lutte. En effet l'étude du génome complet de l'espèce *X. t. pv. cerealis* a permis de montrer la relation des effecteurs de type activateur de transcription (TALE) qui activent par transcription une famille de gènes chez les plantes, avec le développement des symptômes de la strie bactérienne, sur blé, le rôle de ces effecteurs étant déjà décrit essentiel dans de nombreuses maladies des plantes causées par *Xanthomonas spp.* (Oliva et al., 2019 ; Shah et al., 2019). De plus la mise en évidence des gènes codant les endonucléases (protéines) ou CRISPR associated (Cas9) qui représente un système de l'immunité adaptative découverte chez les bactéries lui permettant d'acquérir une résistance à un ADN phagique ou plasmidique invasif.

Comme d'autres systèmes de défense et des répétitions palindromiques courtes et régulièrement espacées (CRISPR) retrouvées chez *Xanthomonas* (Kim et al., 2018) pourraient être une voie non négligeable dans la recherche de méthodes de lutte contre cette bactérie (Martins et al., 2019).

La stratégie consisterait à faire muter la région du promoteur de la famille de gènes afin que les protéines TAL des bactéries ne puissent plus se lier au promoteur, de cette façon, ne pouvant se lier à l'ADN promoteur, les protéines TAL des bactéries ne peuvent pas induire l'expression des gènes correspondant chez le végétal. Par conséquent, les protéines TAL ne pourraient plus provoquer un état de susceptibilité à la maladie chez la plante. La résistance aux espèces de *Xanthomonas* par la mutation de gène de sensibilité au niveau des plantes a déjà été confirmée (Kim et al., 2018).

Des travaux ont déjà été engagés sur le blé, en tant qu'espèce polyploïde présentant des difficultés pratiques, concernant cette stratégie d'intervention (Arndell et al., 2019 ; Borisjuk et al., 2019)

# **EXPERIMENTATION**

## **II- EXPERIMENTATION :**

### **PARTIE 1 : CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES ISOLATS**

La caractérisation de *Xanthomonas* responsables de la maladie de la strie bactérienne en Algérie nous a amené à développer une stratégie de recherche à plusieurs volets. Cette démarche permettant à la fois de rechercher la maladie au champ durant les différents stades de la culture s'étend également à la recherche des différentes sources d'inoculum pouvant générer le développement de la maladie dès lors que les conditions environnementales le permettent.

Notre recherche a donc aussi ciblé la détection des bactéries au niveau des lots de semences. La semence contaminée est considérée comme la source primaire de l'inoculum pouvant le disséminer via les échanges commerciaux sur de longues distances et est connue comme étant un moyen d'introduction des pathogènes dans les zones indemnes.

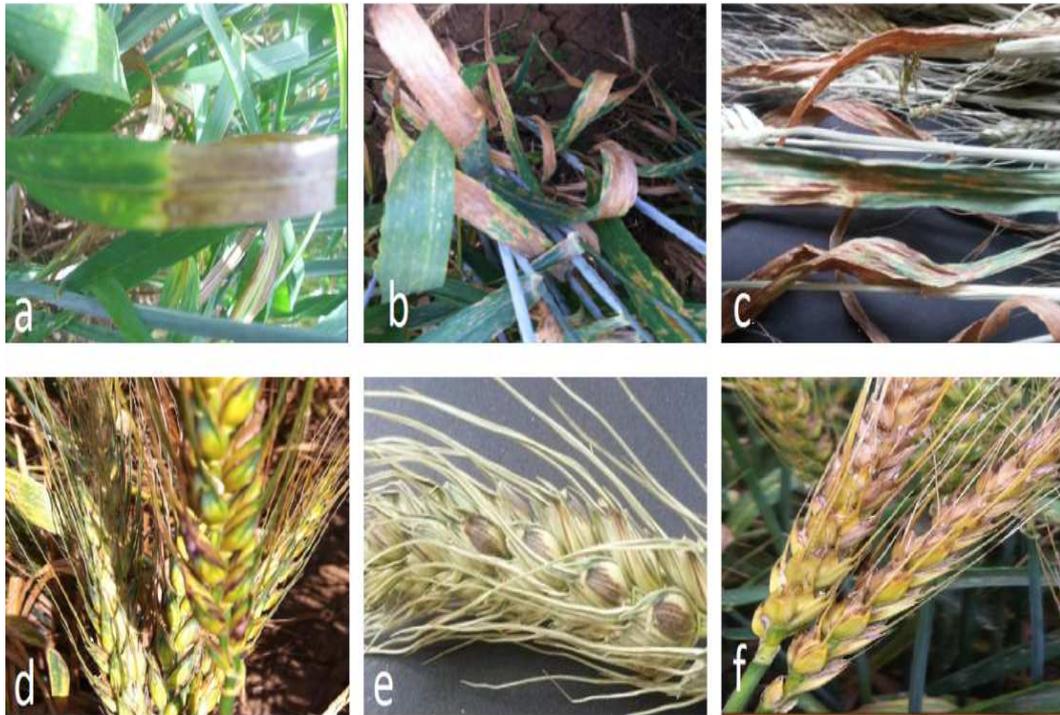
La conservation de la bactérie au niveau des résidus de récoltes a été longuement rapportée par les auteurs, les résidus enfouis dans le sol constituent en effet un réservoir non négligeable permettant une pérennisation du cycle de la maladie. La recherche de la bactérie au niveau des résidus de post récoltes, destinés à l'enfouissement est aussi initiée dans ce travail.

Le sol et particulièrement la rhizosphère constitue l'environnement le plus en contact avec le plant. Un sol contaminé pourrait transmettre la maladie à la plante d'une façon systémique. La recherche des bactéries est également abordée afin de prévoir d'éventuelles épidémies dues à la conservation du pathogène à ce niveau.

#### **1.1 MATERIEL ET METHODE**

##### **1.1.1 Prospections de champs céréaliers**

Des prospections ont été menées, pendant les stades tallage puis épiaison, au niveau des parcelles de blé dans des parcelles de particuliers dans les régions de Mouzaia, Koléa, El Afroun à l'ouest et Boumerdes à l'est algérois, dans des fermes-pilotes (Hamr El Ain et ) de la wilaya de Tipaza et des stations expérimentales ont également été prospectées dont la station de l'École National Supérieur d'Agronomie d'El-Harrach (INA), la station de L'INRA de Baraki, la station de l'ITGC de Oued Smar. Une collecte d'échantillons malades a également été effectuée dans quelques parcelles de la wilaya de Tiaret et dans la région d'El Goléa à Ghardaia. Les symptômes observés sont différents (figure 12).



**Figure 12: Symptômes notés en plein champ a et b: nécroses foliaires, c: nécrose en stries accompagnée de chlorose d, e, f : Symptômes de « Black chaff » sur épis.**

Le matériel végétal (échantillons de feuilles, tiges et épis) a été récolté au niveau de plusieurs champs céréaliers à différents stades de la culture, Des champs céréaliers sont prospectés au hasard et la collecte des échantillons a été effectuée en longeant les parcelles en diagonale, dans des exploitations privées situées à l'ouest Algérois.

Pour les stations expérimentales de l'ENSA, de l'ITGC (Oued Smar), vu, leur proximité du lieu d'analyse, elles ont été prospectées, plusieurs fois au cours du cycle de culture, et ce, durant trois campagnes successives; le but étant d'estimer l'ampleur des attaques bactériennes en fonction des stades de développement.

Certaines parcelles ont été revisitées après la récolte et des échantillons de résidus ont été prélevés avec une partie de la rhizosphère avant l'enfouissement et/ou le labour de la campagne suivante afin de vérifier une éventuelle conservation des bactéries au niveau des sites de prélèvement.

Des prélèvements d'échantillons à partir de lots de semences collectés au niveau de la station de multiplication de Oued Smar ont également été analysés.

Les échantillons malades, les résidus et les lots de semences sont triés au fur et à mesure et mis dans des sacs en papier, protégés par des sacs en plastique. Ces derniers sont ensuite conservés à 4°C pour une analyse ultérieure.

## **1.1.2 Analyse des échantillons malades et des lots de semences**

### **1.1.2.1 Isolement**

#### **1.1.2.1.1 Traitements des échantillons atteints**

Les isolements sont effectués sur les parties présentant des symptômes similaires de strie bactérienne ou de « black chaff », tels que décrits par Smith, (1917 ); et Zillinsky, (1983) pour la recherche de *Xanthomonas translucens*.

La méthode d'isolement utilisée dans ce cas est la technique classique de bactériologie qui consiste à dilacérer dans 2 à 3ml d'eau distillée stérile, un fragment atteint prélevé au niveau du plant atteint, de laisser diffuser pendant 10 à 15min les cellules bactériennes et d'ensemencer par la suite les milieux préconisés NA et WBC, en prenant soin de réaliser deux répétitions pour chacun. Une incubation des boîtes est réalisée à une température de 30°C pendant 3 à 7 jours pour le milieu WBC.

La lecture et le repiquage des colonies obtenues, sont effectués au fur et à mesure de l'apparition de colonies caractéristiques du genre.

#### **1.1.2.1.2 Analyse des résidus et des échantillons de la rhizosphère**

Le sol et les résidus de récolte sont broyés et tamisés, puis traités selon le protocole de Karavina (2008)

Pour le sol, 50 ml de sol sont mélangés avec 200 ml de PBS tween et dans le cas des résidus de récolte, 10 g de résidus (préalablement broyés au maximum possible) sont mélangés avec 50 ml du PBS tween. Les béciers contenant les échantillons de sol et les échantillons de résidus sont soumis à une agitation de 200 tr/min pendant 20 min, puis laissés à décanter pendant trois heures. Des dilutions sont effectuées à partir du surnageant et 1 ml est étalé sur les boîtes de Pétri contenant les milieux de culture WBC et NA et GYCA à raison de 2 répétitions par dilution. Les colonies présentant les caractéristiques (jaunes pâles, brillantes, rondes, lisses et convexes) décrites par Schaad et Forster (1989) sont repiquées après incubation de 3 à 7 jours à une température de 30°C.

#### **1.1.2.1.3. Analyses des lots de semences.**

##### **- Macération**

Les échantillons de semence prélevés à partir des lots de différentes variétés (Vitron, Hiddab (HD1220), Simeto, Tassili, Anza, Waha, Ain Abid, Acsad 901, Acsad 885, Med ben Bachir,

Oued zenati, Hedba3, GTA, Boussalem, Gamgoum r'khem, BTAR2, chen's, Anza, Arz, Langlois, Polinicum, Ofanto et Marouane), obtenues de la station expérimentale de l'ITGC Oued Smar sont analysés par la technique préconisée par Schaad et Forster (1985) et Schaad et Forster (1989). Ils recommandent de procéder à un lavage de l'échantillon de semences (soit 120g ou environ 3000g) dans une solution de 120 ml d'eau froide stérile et saline (0.85% NaCl) contenant une goutte de tween 20 et 5mg de benomyl. Le macérât est agité à 200 trs /min pendant 3 à 5 min à température ambiante. La suspension est laissée décanter pour une diffusion maximale des bactéries.

#### - **DILUTION ET ENSEMENCEMENT DES MACERAT DE SEMENCES**

Dans le but d'une optimisation de la technique d'isolement des bactéries à partir différents lots de semences, des dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) sont réalisées afin d'éliminer d'éventuelles bactéries antagonistes au *Xanthomonas* associées à la semence et de favoriser la croissance de l'espèce recherchée.

A partir de chacune des dilutions et de la solution mère, un volume de 20 $\mu$ l est prélevé et ensemencé sur les quatre milieux (WBC, NA, GYCA) (annexe 1) en réalisant 2 répétitions. Les boites sont par la suite incubées dans les mêmes conditions, à 30°C pendant 7 jours. Les colonies de *Xanthomonas* apparaissent au bout du 4eme jour d'incubation.

#### **1.1.3. Caractérisation préliminaire des isolats**

Une présélection de ces isolats est effectuée préalablement, sur la base de la capacité des isolats à produire une réaction d'hypersensibilité à un taux de  $10^9$ CFU/ml de la bactérie inoculée aux feuilles de tabac (*Nicotiana tabacum*) variété Xanthi afin de vérifier son pouvoir pathogène d'éliminer les bactéries saprophytes.

Les isolats déterminés pathogènes sont vérifiés pour la détermination de leur Gram se basant sur le test au KOH à 3% recommandé par Gregersen (1978). Le KOH permet de solubiliser les parois des bactéries Gram positives.

Leur mode d'utilisation du glucose est également étudié sur milieu Hugh et Leifson afin de ne retenir que les isolats oxydatifs

#### **1.1.4. Caractérisation physiologique et biochimique des isolats**

La caractérisation physiologique des isolats est réalisée en vérifiant, la croissance à 37°C (Bonnet, 1973) ainsi que la croissance à 2% et à 3% de NaCl.

L'identification biochimique de *Xanthomonas* est recommandée et décrite par plusieurs auteurs (Bradbury, 1986 ; Van den Mooter and Swings, 1990; Schaad et al., 2001).

Les tests essentiels pour l'établissement des profils relatifs aux *Xanthomonas* sont ceux recommandés par les auteurs (Bradbury, 1986; Van den Mooter and Swings, 1990; Schaad et al., 2001) dont la recherche de la catalase (Issac, 1948), la lipase du tween 80, la présence de la lipase qui consiste en l'hydrolyse du tween 80, révélée sur le milieu de sierra (1954), les cytochromes oxydases capables d'oxyder la forme réduite de dérivés N-méthylés du paraphénylènediamine en semi-quinone (Kovacs, 1956), l'hydrolyse de la caséine ainsi que la recherche de l'amylase et des enzymes pectinolytiques (Dickey et Kelman, 1988), la recherche de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase, l'utilisation du citrate comme seule source de carbone, la production du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) à partir de cystéine, la formation d'indole à partir du tryptophane, la liquéfaction de la gélatine, l'utilisation de sucres (Glucose, mannitol, inositol, rhamnose, saccharose, mélobiose et arabinose).

## **1.2. RESULTATS**

### **1.2.1. Observations des symptômes aux champs et prélèvement des échantillons**

Plusieurs champs céréaliers ont été prospectés durant les stades tallage et épiaison, les parcelles prospectées sont des champs de particuliers, des fermes pilotes et des stations expérimentales. Au niveau des fermes-pilotes et des parcelles de particuliers les variétés Vitron et Waha pour le blé dur et Hiddab pour le blé tendre sont les plus cultivées, cependant au niveau des stations expérimentales, plusieurs génotypes sont présents notamment des lignées hybrides non fixées. Lors des prospections, seuls les échantillons montrant des symptômes similaires à ceux décrits pour la strie bactérienne sont collectés (figure 12), les symptômes les plus fréquemment rencontrés sont des nécroses foliaires apicales, des striures nécrosées sur feuilles, des lésions saturées en eau dans les conditions humides à température élevée notamment après des périodes pluvieuses, des noircissements au niveau des tiges (gainés) et au niveau des nœuds lors du stade épiaison et des stries noires au niveau des glumes se manifestant, généralement sur l'épis entier. Les symptômes observés durant la période d'épiaison sont très similaires à ceux décrits pour l'espèce *X. translucens*. Ceux-ci se présentent souvent sous forme de nécroses en stries typiques sur les feuilles similaires à ceux rapportés pour la maladie de la strie foliaire (BLS). Les symptômes dits de « Blak chaff » se manifestent par un noircissement des épis avec des glumes striées en noire. Ce

symptôme de noircissement est surtout observé au niveau des stations expérimentales (de l'ENSA et de la station d'Oued Smar), les deux symptômes sont par ailleurs observés lors de la campagne 2016-2017 dans la région d'El Ménéa sous irrigation par pivot.

### **1.2.2 Symptomatologie et isolements des bactéries**

La plupart des symptômes observés sur les feuilles et les épis dans les champs en tant que zones mélaniques sur les glumes sont similaires à ceux décrits pour le "Bacterial Leaf Streak" et le "Black Chaff" sur le blé, ce qui montre que les conditions de température élevée, surtout lorsqu'elles sont associées à un taux d'humidité élevé. Les symptômes observés sont en effet décrits et rapportés par plusieurs auteurs (Smith, 1917 ; Johnson et Hagborg, 1944). Les souches sont principalement obtenues à partir d'échantillons provenant de champs irrigués et au niveau des parcelles de cultures menées sous pivot (irrigation par aspersion), particulièrement, dans des stations expérimentales dans des parcelles destinées à l'étude du comportement du génotype.

Les symptômes sont surtout observés au stade tallage et au stade épiaison. Les symptômes observés sur les feuilles sont ceux décrits dans la littérature (Vauterin *et al.*, 1995), sous forme de stries longitudinales aboutissant à des nécroses typiques (figure 12.c.), les symptômes notés sur les épis se présentent sous forme de stries noirâtres sur les glumes aboutissant à un noircissement généralisé des épis rappelant le symptôme décrit pour la maladie du Black Chaff (Duveiller *et al.*, 1997).

Les symptômes sont observés sur feuilles allant de l'apparition des lésions saturées en eau par temps humide à des nécroses foliaires. Ces types d'altérations sont surtout observés sur la variété Hiddab (HD1220). Les symptômes du noircissement des épis sont observés sur des lignées non fixées au niveau de la station expérimentale d'Oued Smar et sur la variété Simeto dans la région de El Ménéa ( El Goléa) au sud de l'Algérie, les parcelles affectées sont celles, menées par irrigation sous pivot, le climat de cette région étant un climat très favorable au développement de la maladie caractérisé par des écarts de température diurne et nocturne sensiblement importants. La région est connue par des nuits froides et des températures diurnes assez élevées.

Par ailleurs, l'observation des symptômes sur certaines parcelles a permis de constater que les attaques foliaires se situent au niveau des parties apicales (figure 12. a) et accompagnées de chloroses des tissus permettant de déduire la dissémination des bactéries à partir de l'apex de la feuille pouvant traduire une transmission par voie externe et contamination des plants

via des vecteurs biotiques ou abiotiques, la transmission des maladies causées par les espèces du genre *Xanthomonas* se fait souvent via les hydathodes véhiculées par les gouttelettes d'eau. Nous notons que ces ouvertures naturelles sont situées chez les monocotylédones à l'extrémité du système vasculaire au niveau de la partie apicale foliaire des (Jauneau et al., 2020). D'autres attaques foliaires sont représentées par des stries foliaires s'allongeant sur toute la surface des limbes (figure 12.c). La source d'inoculum pouvant aussi être systémique et dans ce cas plusieurs origines sont suspectées dont la semence et le sol, la bactérie peut, en effet, être conservée longtemps dans le sol et les débris végétaux (Boosalis, 1952 ; Cunfer, 1988 ; Malavolta Jr. et al., 2000 ; Gillings et Holmes, 2005 ; Malavolta et al., 2000).

Les isollements à partir des échantillons symptomatiques sur les différents milieux de culture y compris les milieux standards (LPGA et KB) utilisés pour mettre évidence toute la microflore ont permis une croissance en culture pure de mettre en évidence la présence en culture pure des bactéries. Celles-ci présentent des caractères morphologiques et culturaux typiques à ceux décrits pour le genre *Xanthomonas* recherché.

D'autre part, les résultats de l'étape de mise en chambre humide des échantillons de feuilles présentant des symptômes n'ont montré aucun développement mycélien. Cette étape est effectuée afin de vérifier une présence éventuelle d'espèces fongiques accompagnant les symptômes. La mise des fragments dans les conditions d'humidité a permis une exsudation abondante en stries tout le long du limbe.

D'autres parts, les isollements effectués à partir des lots de semences et des résidus ainsi qu'à partir des échantillons de la rhizosphère, nous ont permis d'obtenir une nouvelle collection d'isolats tous conformes aux caractères de l'espèce bactérienne recherchée.

Les échantillons étudiés proviennent de plusieurs sources, pour la recherche des bactéries ceux-ci sont prélevés à différents niveaux. La multiplication des sources d'isolement est adoptée dans ce travail afin de vérifier la présence et la capacité à la conservation de ces bactéries. Cette stratégie est aussi initiée afin de définir les différentes sources d'inoculum responsables de l'installation de la maladie.

Les isollements sont, effectués sur les échantillons de plants atteints présentant des symptômes. L'analyse des résidus de récoltes et de la rhizosphère est réalisée dans le but vérifier la présence et par voie de conséquence, la conservation du pathogène à ces niveaux. L'analyse de lots de semences destinées à la multiplication et/ou aussi au niveau de lots de

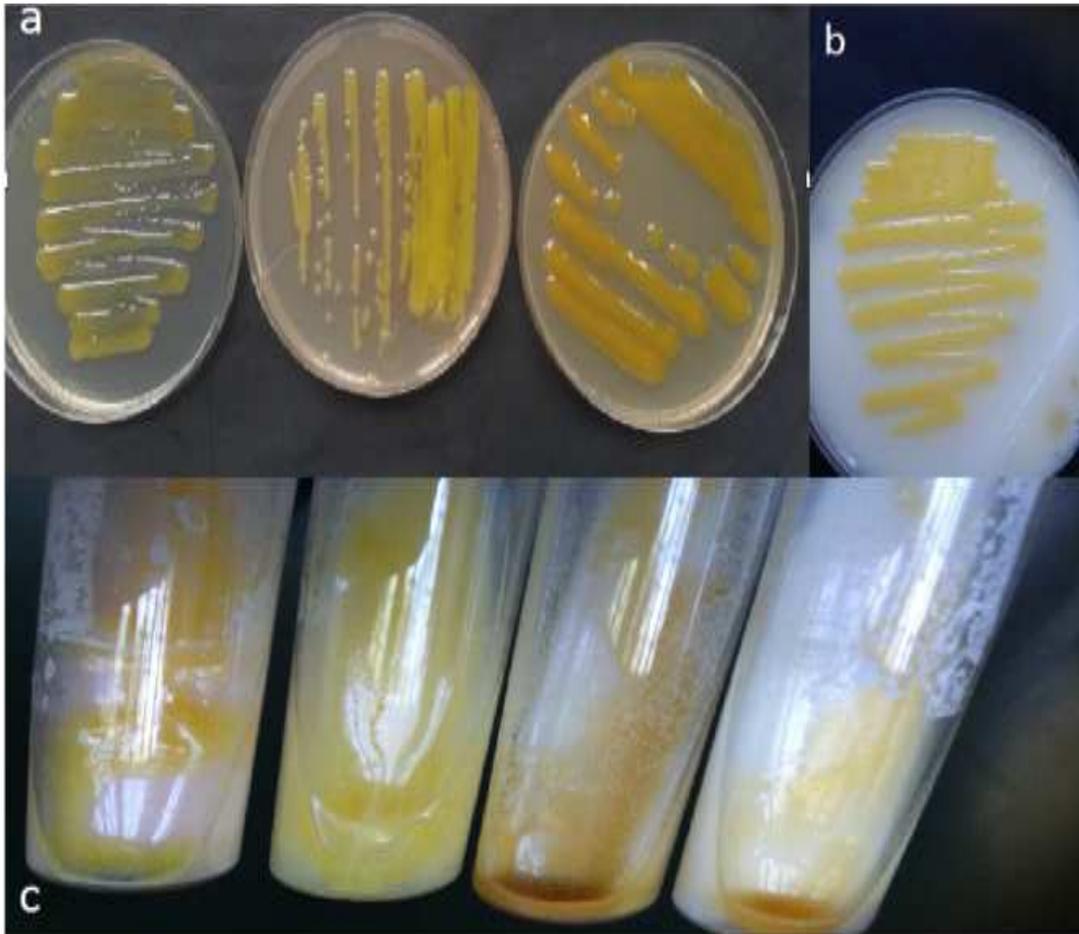
semences destinés à la multiplication et aux études de comportement variétal et sa transmission éventuelle.

### **1.2.3 Caractères morphologiques et cultureux et diversités des profils biochimiques et physiologiques des isolats**

Les isolats retenus pour cette étude sont triés sur la base des caractères morphologiques et cultureux du genre *Xanthomonas* et de l'espèce *X. translucens* (figure 13 et 14) décrits par plusieurs auteurs, dont Bradbury (1986) et Schaad et *al.* (2001). Les caractères descriptifs et discriminants sont rapportés par plusieurs auteurs. Les isolats sont Gram négatifs, présentent, une pigmentation jaune liée à la présence du pigment xanthomonadine favorisant la protection de bactérie durant la phase épiphyte contre les radiations de la lumière naturelle (Rajagopal et *al.*, 1997 ; Poplawsky, et *al.*, 2000 ; Chun, 2002), les colonies des bactéries sont bombées, convexes, brillantes et muqueuses révélant une production relativement importante de xanthane (Garcia-Ochoa et *al.*, 2000; Freitas et *al.*, 2011), hétéropolysaccharide, produit d'une façon extracellulaire, connue sous le nom de gomme de xanthane ou d'exsudats transmembranaires observés *in-vivo* sur les feuilles.



**Figure 13:Caractères morphologiques et cultureux des isolats sur milieu NA.**



**Figure 14: Caractères morphologiques et culturels des isolats (a :sur milieu NA, b :sur milieu GYCA en boîte et c :milieu GYCA en tube en tube).**

Les isolats obtenus des différentes origines dont les échantillons symptomatiques, les lots de semences, les résidus et les échantillons de sol présentent dans leur grande majorité, les caractères culturels de *Xanthomonas*. Soumis aux tests physiologiques et biochimiques recommandés par Bradbury (1986), Schaad *et al.*, 2001 et Van den Mooter et Swings, 1990), ces isolats (figure 15) reproduisent la réaction d'hypersensibilité sur tabac, révélant leur pouvoir pathogène se montrent conformes pour la plupart au profil des caractères phénotypiques de l'espèce *X. translucens*. Cependant, nous avons pu noter au niveau des résultats de certains tests des réponses non conformes à celles du profil de l'espèce en question (tableau 6). Cette variabilité par rapport au profil biochimique de l'espèce, concernant quelques isolats dénote la présence d'une diversité au niveau de la collection

d'isolats et révèle ainsi des profils différents sollicitant ainsi une caractérisation plus approfondie.

Les isolats sont pour la plupart négatifs pour le test de nitrate réductase, positifs pour le test de l'hydrolyse de l'esculine, pour la levane sucrase, pour la production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), positifs pour la production de l'enzyme catalase. Les réponses aux caractères physiologique sont également pour la plupart positifs pour la croissance à 35°C et également pour les concentrations de chlorure de sodium (Bouillon nutritif à 2%, NaCl). Les isolats montrent une absence de croissance à une concentration de 5% de NaCl et ne produisent pas d'enzymes cytochrome-oxydase. Nous notons par ailleurs qu'il existe des réponses non conformes au profil biochimique de *X. translucens* pour certains caractères révélant une certaine diversité parmi les isolats (tableau6).

**Tableau 6: Diversité des caractères biochimiques**

Tests Souches	NR	BG	LS	PL	35°C	2%NaCl	5%NaCl	CL	CIT	CO	HC	GA	AL	LP	H2S	Am	HR	Origines
<i>X.t.pv.u.*</i>	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	
X1	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	Strie foliaire
X2	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Strie foliaire
X3	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Strie foliaire
X4	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	Strie foliaire
X5	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Strie foliaire
X6	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Strie foliaire
X7	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	Strie foliaire
X8	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	« Black chaff »
X9	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	« Black chaff »
X10	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-		+	« Black chaff »
X11	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	« Black chaff »
X12	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Résidus /BT
X13	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	Résidus /BT
X14	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	Résidus /BT
X15	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	« Black chaff »
X16	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	Black chaff
X17	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	Black chaff
X18	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	Résidus/BT
X19	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Résidus/BT
X20	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Résidus/BT
X21	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Résidus/BT
X22	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	Résidus/BT
X23	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Résidus/BT
X24	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	Rhizosphère/BT
X25	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Rhizosphère/BT
X26	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Résidus/BT
X27	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Rhizosphère/BT
X28	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	Rhizosphère/BT
X29	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Rhizosphère/BT
X30	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	Rhizosphère/BT
X31	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+		+	Rhizosphère/BT
X32	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	Résidus/BT
X33	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+		+	Résidus/BT
X34	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	Résidus/BT

X35	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	Résidu/BT
X35	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	Rhizosphère/BT
X36	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	Rhizosphère/BT
X37	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	Rhizosphère BD
X38	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	Rhizosphère/BT
X39	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	Rhizosphère/BT
X40	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	Rhizosphère/BT
X41	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	Rhizosphère/BT
X42	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	Rhizosphère/BT
X43	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	Rhizosphère/BT
X44	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	Rhizosphère/BT
X45	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	Rhizosphère/BT
X46	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	Rhizosphère/BT
X47	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	Rhizosphère/BT
X48	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	Symptôme BD
X49	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	Semences/BD
X50	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	Semences/BD
X51	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	Semences/BD
X52	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	Semences/BD
X53	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	Semences/BD
X54	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	Semences/BD
X55	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	Semences/BT
X56	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	Semences/BT
X57	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	Semences/BT
X58	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	Résidu/BT
X59	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	Résidu/BT
X60	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	Rhizosphère/BT
X61	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	Rhizosphère/BT
X62	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	Résidu/BT
X63	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	Rhizosphère/BT
X64	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	Rhizosphère/BT
X65	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	Rhizosphère/BT
X66	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	Rhizosphère/BT
X67	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	Rhizosphère/BT

\*Souche de référence (*Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* souche UPB753 (Bragard *et al.*, 1995)

NR-Nitrate réductase/ BG-beta galactosidase/LS-Levane sucrase /PL-Pectinolyse/ CIT-citrate/ CO-cytochromes oxydases/ HC-hydrolyse de la caséine/ GA-gélatinase/ AL-arginine dihydrolase/ LP-lipase/ Am-Amylase /HR- réaction d'hypersensibilité

## **PARTIE 2: TYPAGE MOLECULAIRE PAR PCR ET SEQUENÇAGE**

Cette caractérisation est menée en plusieurs étapes, en commençant par l'extraction et la purification de l'ADN des souches, l'amplification d'une séquence spécifique. L'amplification par la méthode PCR classique (Polymerase Chain Reaction) d'une séquence conservée chez l'espèce *Xanthomonastranslucens* permettrait, selon les auteurs (Maes et al., 1996) de différencier cette espèce avec ses pathovars de toutes les autres espèces de *Xanthomonas* phytopathogènes. Cette identification pourrait en effet confirmer toute la démarche basée sur l'observation des symptômes en plein champ et le diagnostic établi au laboratoire avec les outils classiques visant une caractérisation phénotypique. Toutefois, baser une identification sur une PCR ciblant un seul gène peut être considéré comme risqué, au vu de notre connaissance actuelle de la diversité des *Xanthomonas* et de la capacité d'échange entre bactéries. Cette approche est donc complétée par un séquençage de plusieurs gènes relevant de schémas recommandés par plusieurs (Almeida et al., 2010, Potnis et al., 2019). L'approche adoptée pour ce travail est basée sur l'amplification et le séquençage des gènes de ménage, l'analyse des séquences, l'alignement des séquences avec les celles des souches types disponibles dans les différentes bases de données dont NCBI et PAMDB, l'enregistrement des séquences dans la banque de gènes (Genebank), la vérification du degré de similitude et la construction des arbres phylogénétiques relatifs à chaque gène individuellement, puis, la concaténation des séquences pour la construction de l'arbre consensus. L'étude phylogénétique menée ici est fondée sur l'utilisation de différentes approches et logiciels, dont « phylogeny.fr pipeline » et les logiciels Mega7, Geneious (Vs.11 .4.0) et l'approche bayésienne basée sur les probabilités postérieures sur M. Bayes, cette étude est réalisée dans le but de compléter et confirmer l'identification et la caractérisation des souches étudiées.

### **2.1 MATERIELS ET METHODES**

#### **2.1.1 Extraction de l'ADN**

L'extraction d'ADN est réalisée sur des cultures jeunes en utilisant le Kit d'extraction (Wizard® Genomic DNA Purification Kit), L'ADN peut être également isolé par une simple lyse par exposition des bactéries à une température de 95°C pendant 7 mn (Maes et al.,1996)

#### **2.1.2 Caractérisation par amplification spécifique**

L'amplification par PCR du gène spécifique de l'alanine tRNA « alanine-specific tRNA gene » localisé au niveau de la région 16S-23S a été décrite par (Maes et al., 1996).

L'amplification est réalisée dans un mélange réactionnel légèrement modifié par rapport à celui recommandé par les mêmes le volume total de ce mélange étant 25µl contenant, 5 µl de 5 X tampon de PCR, 2.5µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.75 µl dNTP (25mM), 0.5µL de chaque amorce à 10µM T1, 5' CCGCCATAGGGCGGAGCACCCCGAT et T2, 5'GCAGGTGCGACGTTTGCAGAGGGATCTGCAAATC 3' 2.5 µL DNA de chaque souche (50 ng µL<sup>-1</sup>), 0.2 µL Taq polymerase (Promega) et 13.05 µL d'eau distillée stérile l'amplification est réalisée selon le programme: 90°C for 2 min, 29 cycles of 93 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72°C for 30 s, et une extension de 10min à 72 C. Les produit PCR sont révélés sur un gel d'électrophorèse a 2% d'agarose dans du tampon TAE (annexe), coloré avec le Midori green (Nippon Genetics Europe). La visualisation est réalisée sous lumière ultra-violette.

### 2.1.3. Caractérisation avec le séquençage des gènes de ménage

L'amplification des gènes faisant partie du schéma du typage des multilocus (MLST) ciblant les gènes de ménages (*rpoD*, *gyrB*, *atpD* et *dnak*) est réalisée en utilisant les amorces et la technique recommandées par (Fargier and Manceau, 2007, Mhedbi-Hajriet *al.*,2013). Le séquençage étant effectué dans le sens et l'anti-sens pour tous les gènes( tableau 7).

- **Fonctions des gènes séquencé**

***Atp D*** : Code pour la Sous-unité bêta de l'ATP synthase ; produit de l'ATP à partir de l'ADP en présence d'un gradient de protons à travers la membrane. Les sites catalytiques sont principalement hébergés par les sous-unités bêta et appartient à la famille des chaînes alpha/bêta de l'ATPase (Gaunt et *al.*, 2001; Christensen et *al.* , 2004)

***DnaK*** : Code pour la protéine chaperon *Dnak*; qui agit comme un chaperon. Le rôle des protéines chaperon est de prévenir les dommages potentiellement causés par une perte de fonction protéique due à un mauvais repliement tridimensionnel, La structure des protéines est sensible à la chaleur, ces protéines chaperones évitent que les structures protéiques se dénaturent par un stress ou un choc thermique et perdent leurs fonctions biologiques. Le rôle des protéines chaperones étant d'aider au repliement des protéines en évitant la formation d'agrégats entre les domaines hydrophobes encore présents à la surface des chaînes polypeptidiques partiellement repliées (Morange, 2000 ; Stepkowski et *al.*,2003; Stepkowski et *al.*, 2007)

***GyrB*** : ADN gyrase sous-unité B; topoisomérase de type II qui superpose négativement l'ADN double brin circulaire fermé de manière dépendante de l'ATP pour moduler la topologie de

l'ADN et maintenir les chromosomes dans un état de sous-enroulement. La supercoillation négative favorise la séparation des brins, ainsi que la réplication, la transcription, la recombinaison et la réparation de l'ADN. (Papillon et al 2014 )

**RpoD** : ARN polymérase facteur sigma-70 rpoD ; les facteurs Sigma sont des facteurs d'initiation qui favorisent l'attachement de l'ARN polymérase à des sites d'initiation spécifiques et qui seront par la suite libérés, la sous-unité sigma de l'ARN polymérase bactérienne est impliquée dans toutes les étapes de l'initiation de la transcription et l'expression des gènes. Notamment les gènes de ménage dans la plupart des bactéries (Miura et al.,2015). Les sous-unités sigma sont également capables d'activer les gènes de virulence des bactéries pathogènes et sont impliquées dans la persistance aux traitements antibiotiques (Benabad, 2016)

**Tableau 7: Les gènes séquencés**

Gène	Temperature d'hybridation (°C)	Séquence (5'-3')	Taille du fragment (bp)
<i>AtpD</i>	60	F: GGGCAAGATCGTTCAGAT R: GCTCTTGGTCGAGGTGAT	868
<i>DnaK</i>	60	F: GGTATTGACCTCGGCACCAC R: ACCTTCGGCATAACGGGTCT	1034
<i>GyrB</i>	60	F: TGC GCGGCAAGATCCTCAAC R: GCGTTGTCCTCGATGAAGTC	1051
<i>RpoD</i>	60	F: ATGGCCAACGAACGTCCTGC R: AACTTGTAACCGCGACGGTATTCG	1313

La réaction de l'amplification est réalisée dans un volume de 50µl contenant 1 X Gotaq®buffer, 200 µm dntp,0.5µm de chaque amorce 0.4 U of Gotaq®DNA polymerase (Promega), and 3 ng d'ADN de chaque échantillon avec un programme initié par une dénaturation à 94°C pendant 2 min et 30 cycles de dénaturation pendant 1 min at 94 °C, une hybridation for 1.5 min à 60 C, et une extension pendant 1.5 min à 72 C, et une extension finale pendant 10 min à 72 C. Un volume de 8 µl du produit PCR est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose de 1.5% dans un tampon TAE, coloré avec du Midori green et visualisé sous UV. Après purification avec un kit de purification d'ADN (Wizard®PCR clean-up kit Promega), les amplifiats sont séquencés avec les amorces forward et reverse en utilisant le kit Bigdye Terminator v3.1cycle sequencing kit (Applied Biosystems, UK). Les séquences forward et reverse sont alignée et manuellement analysées et corrigée puis enregistrée et déposées dans la banque de données Genbank (tableau 8

Tableau 8: Description des isolats

Isolats	Gène partiel	Code	Échantillon	Symptôme	Hôte	Cultivar/variété	Origine	
X1	<i>gyrB</i> <i>rpoD</i>	<b>MF142045</b> <b>MF142046</b>	Feuille	Strie foliaire	Blé	Simeto	El Golea	
X2	<i>gyrB</i>	<b>MF142047</b>	Feuille	Strie foliaire	Blé	Simeto	El Golea	
X3	<i>gyrB</i>	<b>MF142048</b>	Feuille	Strie foliaire	Blé	Simeto	El Golea	
X4	<i>gyrB</i>	MF142049	Feuille	Strie foliaire	Blé	Simeto	El Golea	
X5.	<i>gyrB</i>	MF142050	Résidus récolte	de	Asymptomatique	Blé	Hiddab(HD1220)	Station expérimentale /Algers
X7	<i>gyrB</i> <i>rpoD</i> <i>AtpD</i> <i>dnaK</i>	MH383250 MH383251 MH383252 MH383253	Résidus récolte	de	Asymptomatique	Blé	Hiddab(HD1220)	Station expérimentale /Algers
X8	<i>gyrB</i> <i>rpoD</i>	MF142051 MF142052	Épis		Black chaff	Blé	Simeto	El Golea
X12	<i>gyrB</i> <i>rpoD</i>	MF142053 MF142054	Résidus récolte	de	Asymptomatique	Blé	Hiddab(HD1220)	Station expérimentale /Algers
X13	<i>gyrB</i> <i>rpoD</i>	MF142055 MF142056	Résidus récolte	de	Asymptomatique	Blé	Hiddab(HD1220)	Station expérimentale /Algers
X14	<i>gyrB</i> <i>RpoD</i> <i>Atpd</i>	MH383254 MH383255 MH383256	Résidus récolte	de	Asymptomatique	Blé	Hiddab(HD1220)	Station expérimentale /Algers
X16	<i>gyrB</i>	MF142057	Épis		Black chaff	Blé	Lignée	Station expérimentale /Algers
X17	<i>gyrB</i>	MF142058	Épis		Black chaff	Blé	Lignée	Station expérimentale /Algers

## 2.1.4. Analyse phylogénétique

### 2.1.4.1. Analyse des séquences des gènes MLSA

Les séquençages après amplification sont réalisés dans le sens et l'anti sens pour les gènes de ménage (tableau 7) *rpoD* (codant pour l'ARN polymérase facteur sigma-70) et *gyrB* (codant pour la sous-unité B de l'ADN gyrase) des souches en utilisant les amorces recommandées par (Fargier and Manceau, 2007, Mhedbi-Hajri *et al.*, 2013). Selon Mhedbi-Hajri *et al.*, (2013), le poids des gènes étant de 1313 et 1051 respectivement pour les gènes *rpoD* et *gyrB*.

Des séquençages supplémentaires de deux autres gènes *atpD* et *dnaK* faisant également partie du schéma MLSA (Fargier and Manceau, 2007, Mhedbi-Hajri *et al.*, 2013) sont réalisés dans le but de confirmer des résultats révélés par la première analyse des séquences.

Les séquences obtenues sont traitées à l'aide du logiciel 'CodonCode Aligner' (vs 4.1) et ajustées selon la séquence consensus après avoir traduit les nucléotides en séquences d'acides aminés.

Les séquences des nucléotides sont alignées séparément en utilisant l'alignement des acides aminés comme modèle. Les régions d'alignements présentes dans les parties non chevauchantes ont été éliminées manuellement, La détermination des cadres de lecture ouverts ou phase ouverte de lecture dit ORF en anglais « **Open Reading Frame** » des séquences brutes données par les chromatogrammes **est effectuée** en les soumettant en ligne sur le site ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)., Cette étape permet de déterminer la partie de la séquence susceptible d'être traduite en protéine ou en peptide, comprenant le codon start et un codon stop.

### 2.1.4.2. Alignement et construction des arbres phylogénétiques

Cette analyse est effectuée dans le but de positionner les souches et de déterminer leur phylogénie respective et les relier ainsi, à leurs taxons respectifs parmi les espèces de *Xanthomonas*. Pour cela, une collection de séquences est établie (tableau 9) en ayant recours à plusieurs sources. Des séquences partielles des gènes ciblés dans cette étude, sont en effet, récupérées à partir des banques de gènes, GenBank et PAMDB (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.pamdb.org>) (Almeida *et al.*, 2010; Sayers *et al.*, 2019). Pour des souches et des pathovars récemment décrits, et dont les multi-loci ne sont pas représentés dans PAMDB telles que *Xanthomonas pseudalbilineans*, *X. maliensis*, *X. floridensis*, *X. nasturtii*, and *X. prunicola*, les séquences correspondant aux gènes respectifs sont récupérées directement à partir des séquences génomiques (Pieretti *et al.*, 2015 ; Triplett *et al.*, 2015; Hersemann *et al.*, 2016b; Vicente *et al.*, 2017; López *et al.*, 2018).

Le travail étant réalisé en plusieurs étapes d'analyse.

La première analyse: Cette étape est consacrée à l'étude de la phylogénie d'une dizaine de souches présentant une similarité exprimée par le blast des séquences de gènes *rpoD* et *gyrB* sur le site ncbi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), pour cette série de souches, alignement multiple est effectué en ligne en utilisant l'algorithme MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (Edgar, 2004). Les arbres correspondant à chaque gène sont générés en utilisant « phylogeny.fr pipeline » en utilisant tous les paramètres par défaut, (<http://www.phylogeny.fr>) (Dereeper *et al.*, 2008). Les fichiers au format Newick sont générés et la construction et la visualisation des arbres sont réalisées en ligne utilisant le site « iTOL »(<https://itol.embl.de>) (Letunic and Bork, 2011)

La deuxième analyse : Cette deuxième étape, consiste en une analyse phylogénétique générale de l'ensemble des séquences est réalisée afin de déterminer la phylogénie des souches et leurs positionnements par rapport aux différentes espèces de *Xanthomonas* décrites dont les séquences des gènes étudiés sont disponibles. Cette analyse est effectuée en commençant par la détermination du meilleur modèle de substitution et d'ajustement des nucléotides, pour la construction d'arbres ML, cette étape est effectuée sur les logiciels d'analyse Mega7 (Kumar *et al.*, 2008). Pour cette étape l'analyse phylogénétique est effectuée avec deux stratégies, la première étant basée sur l'approche du bootstrap non paramétrique, la seconde basée sur les procédures bayésiennes en termes de probabilités postérieures. L'alignement et la construction des arbres phylogénétiques sont réalisés en utilisant les trois logiciels Mega7, Geneious (Vs.11.4.0) et M. Bayes basés sur les probabilités postérieures. L'utilisation des différents logiciels dans cette analyse permet de vérifier de comparer les différentes approches données par chaque programme afin d'asseoir les résultats de la phylogénie de nos souches et de les positionner d'une façon concrète parmi toutes les espèces de *Xanthomonadaceae* espèces de *Xanthomonas*. Cette analyse est réalisée également pour les séquences des gènes *gyrB* et *rpoD*.

La troisième analyse : Cette étape est effectuée en utilisant l'approche de la concaténation des gènes. Cette approche est réalisée dans le but de vérifier la topologie de l'arbre consensus généré par la concaténation des deux gènes pour confirmer la phylogénie de toutes les souches séquencées. Cette analyse est effectuée sur Le logiciel Mega7 (Kumar *et al.*, 2008).

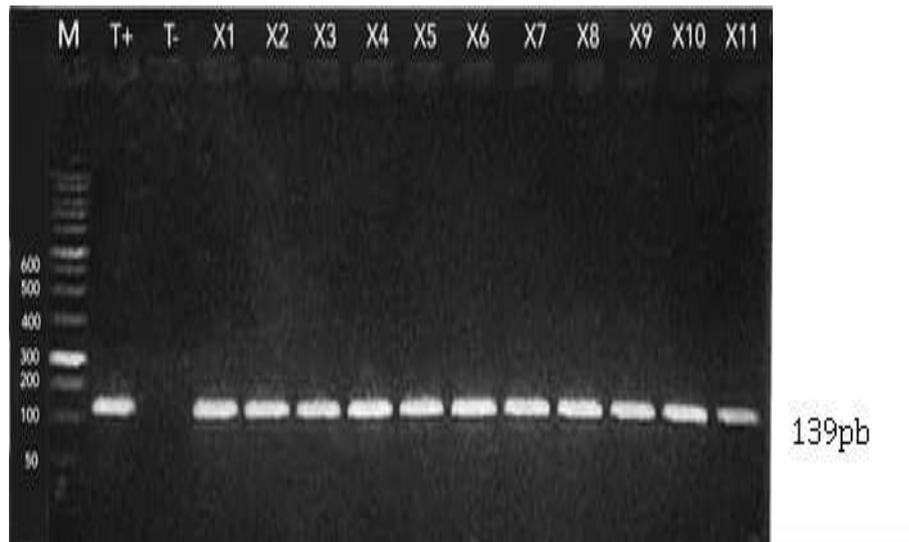
La quatrième analyse : Cette étape concerne l'analyse des séquences des gènes *atpD* et *dnaK* ayant fait l'objet d'un séquençage supplémentaire, cette étape est réalisée afin de vérifier le positionnement des souches qui en se référant au blast présentent un profil différent. Les arbres relatifs à chacun des gènes réalisés Cette analyse des séquences des deux gènes *atpD* et *dnaK* faisant également partie du schéma MLSA est réalisée dans le but de confirmer des résultats révélés par la première analyse des séquences.

Nous notons que les arbres bayésiens de consensus obtenus pour les gènes individuels et la concaténation ont été visualisés avec le logiciel FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2012).

## 2.2. RESULTATS

### 2.2.1. Attribution des isolats à l'espèce *X. translucens*

La caractérisation des isolats se basant sur le protocole développé pour la détection de *Xanthomonastranslucens* par Maes et al. (1996), a permis l'amplification en utilisant les amorces T1 et T2 du fragment spécifique de 139-bp (figure15). Cette analyse spécifique nous a permis de faire un tri supplémentaire au niveau des souches, la technique permet selon Maes et al., (1996) de pallier les confusions des bactéries appartenant à cette espèce avec des bactéries ayant des caractères morphologiquement, similaires. La technique permet selon Maes et al., (1996) d'identifier les souches appartenant au groupe *translucens* avec tous les pathovars intervenant sur les céréales, sur les graminées et aussi sur quelques dicotylédones (Roman-Reyna, et al., 2020, Facelli et al. 2009) ; cette technique permet d'éviter la confusion des pathovars de cette espèce avec des bactéries ayant des caractères phénotypiques similaires. Cette caractérisation spécifique, se basant sur le protocole développé pour la détection de *Xanthomonastranslucens*, nous a permis d'une part de soutenir une fois de plus, l'hypothèse de l'attribution des souches étudiées à l'espèce *X. translucens* et d'autre part d'écarter toutes les bactéries possédant des caractères morphologiques, cultureux, biochimiques et physiologiques similaires à l'espèce *X. translucens* mais n'ayant pas répondu à l'amplification de la bande spécifique.



**Figure 15: Amplification de la bande spécifique 139 pb caractéristique de *X. translucens* amplifiée avec les amorces T1 et T2.**

### 2.2.2 Reclassification des isolats sur la base des alignements et des analyses phylogénétiques.

L'espèce *X. translucens* selon plusieurs auteurs (Giblot-Ducray *et al.*, 2009 ; Langlois, 2016 ; Sapkota *et al.*, 2020) est une espèce qui regroupe plusieurs pathovars (*undulosa*, *translucens*, *cerealis*, *hordei*, *etsecalis*; *graminis* group pathovars: *arrhenatheri*, *graminis*, *poae*, *phlei* et *pistaciae*). Dans le but de confirmer la caractérisation établie selon les critères phénotypique et de relier les souches isolées à cette espèce du point de vue génétique /génomique. La caractérisation moléculaire menée, dans le but de confirmer la caractérisation phénotypique est aussi établie pour relier les souches isolées à l'espèce *X. translucens* du point de vue génétique/génomique. L'Amplification et le séquençage des gènes (tableau 7) *rpoD* (codant pour l'ARN polymérase facteur sigma-70), *gyrB* (codant pour la sous-unité B de l'ADN gyrase) des souches tel que recommandé par (Fargier and Manceau, 2007, Mhedbi-Hajri *et al.*, 2013), nous a permis de mettre en évidence une diversité au niveau des isolats montrant ainsi la présence de souches appartenant aux deux clades I et II.

Le séquençage réalisé dans le sens et l'anti-sens pour chaque souche a permis d'obtenir plusieurs séquences pour les gènes *rpoD* et *gyrB*. Le blast de la plupart des souches a permis de montrer une cohérence avec les résultats obtenus avec des amorces spécifiques, les séquences alignées avec celles des données indiquent que les souches sont proches de l'espèce *Xanthomonas translucens* particulièrement des pathovars *graminis*, *undulosa* et *translucens* avec des similarités moyennes de 98% à 100%. Les séquences ont été enregistrées dans la base de

données de la banque de gènes avec des numéros d'accès disponibles attribués et le « protein\_id » (Tableau 9).

La première analyse phylogénétique avec l’algorithme(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) (Edgar, 2004). Concernant la collection des dix souches nous a permis de les attribuer au clade I des *Xanthomonadaceae*. Les arbres ( figure 17 a et b) sont générés en utilisant les paramètres par défaut sur phylogeny.fr pipeline, (<http://www.phylogeny.fr>) (Dereeper *et al.*, 2008). Ce clade regroupe les espèces *Xanthomonas hyacinthi*, *Xanthomonas theicola* et *Xanthomonas translucens* avec tous ses pathovars. Cependant la topologie des arbres générés pour les séquences des deux gènes de nos souches montre avec précision (figure 17) que les souches ne sont pas directement reliées aux pathovars de l’espèce *X. translucens* et forment un groupe à part suggérant leur appartenance à une nouvelle espèce avec la souche NCPPB 2654 isolée à partir de *Phaseolus vulgaris* au Royaume Uni en 1974.

**Tableau 9: Les séquences d’ADN utilisées dans l’étude phylogénétique**

Espèce	Souche	Status <sup>a</sup>	PAMDB <sup>b</sup>	<i>gyrB</i> <sup>c</sup>	<i>rpoD</i> <sup>c</sup>
<i>Xanthomonas</i> sp. (Algeria)	X1			MF142045	MF142046
<i>X. albilineans</i>	ICMP 196	Type	673	13	12
<i>X. albilineans</i>	ICMP 8679		736		61
<i>X. arboricola</i> pv. <i>arboricola</i>	ICMP 35	Pathotype	661	4	
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	ICMP 50	Type	662	5	
<i>X. bromi</i>	ICMP 12545		760	79	
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	ICMP 13	Type	658	1	
<i>X. cassavae</i>	ICMP 204	Pathotype	675	14	
<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>	LMG 9322	Type		JPYD00000000	
<i>X. codiae</i>	ICMP 9512		744	68	
<i>X. cucurbitae</i>	ICMP 2299	Pathotype	695	35	
<i>X. cynarae</i>	ICMP 16775	Type	769	82	
<i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i>	ICMP 109	Type	665	8	
<i>X. floridensis</i>	WHRI 8848	Type		LXNG00000000	
<i>X. fragariae</i>	ICMP 5715	Type	706	28	
<i>X. hortorum</i> pv. <i>taraxaci</i>	ICMP 579	Pathotype	684	27	
<i>X. hyacinthi</i>	ICMP 188		669		9
<i>X. hyacinthi</i>	ICMP 189	Pathotype	670	10	10
<i>X. maliensis</i>	97M	Type		AQPR00000000	
<i>X. melonis</i>	ICMP 8683		739	65	
<i>X. nasturtii</i>	WHRI 8853	Type		LYMI00000000	
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	ICMP 3125	Pathotype	699	39	
<i>X. phaseoli</i>	LMG 29033	Type		KT585789	
<i>X. pisi</i>	LMG 847		194	25	
<i>X. populi</i>	ICMP 5816	Type	720	53	
<i>X. prunicola</i>	CFBP 8353	Type		PHKV00000000	
“ <i>X. pseudalbilineans</i> ”	GPE39			JZH00000000	JZH00000000
“ <i>X. pseudalbilineans</i> ”	MUS060			JZIM00000000	JZIM00000000
<i>X. sacchari</i>	ICMP 16916		771	83	79
<i>X. sacchari</i>	ICMP 16918		773		81
<i>X. theicola</i>	ICMP 6774	Pathotype	726	56	57
<i>X. translucens</i> pv. <i>arrhenateri</i>	LMG 727	Pathotype			CXOI00000000
<i>X. translucens</i> pv. <i>cerealis</i>	ICMP 1409	Pathotype	689		31

<i>X. translucens</i> pv. <i>graminis</i>	ICMP 5733	Pathotype	710		45
<i>X. translucens</i> pv. <i>phlei</i>	LMG 730	Pathotype			CXOJ00000000
<i>X. translucens</i> pv. <i>poae</i>	LMG 728	Pathotype			CXOK00000000
<i>X. translucens</i> pv. <i>secalis</i>	ICMP 5749	Pathotype	713		48
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	ICMP 5752	Type	714	50	49
<i>X. translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	ICMP 5755	Pathotype	715		50
<i>X. vesicatoria</i>	ICMP 3103	Pathotype	698	38	
<i>X. vesicatoria</i>	ICMP 63	Type	664	7	
<i>X. campestris</i> pv. <i>cannabis</i>	NCPPB 2877	Slc 1		EU285190	
<i>X. campestris</i> pv. <i>eucalypti</i>	NCPPB 2337	Slc 2		EU285181	
<i>Xanthomonas</i> sp.	NCPPB 1067	Slc 3		EU285064	
<i>X. campestris</i> pv. <i>badrii</i>	NCPPB 571	Slc 4		EU285199	
<i>Xanthomonas</i> sp.	NCPPB 2654	Slc 5		EU285081	
<i>X. campestris</i> pv. <i>phormiicola</i>	NCPPB 2983	Slc 6		EU285211	
<i>Xanthomonas</i> sp.	NCPPB 2250	Slc 7		EU285078	

<sup>a</sup> Status de pathotype, type ou espèce.

<sup>b</sup> Le code indiqué sur le site PAMDB.

<sup>c</sup> "Accession number" est indiqué sur NCBI GenBank et PAMDB

L'analyse de l'ensemble des souches réalisée pour les gènes *rpoD* et *gyrB*, en utilisant le logiciel, « phylogeny.fr pipeline » (figure 16,17) et le logiciel Mega 7, avec le modèle (GTR+G+I) (Annexe 2), comme étant le meilleur modèle de substitution et d'ajustement des nucléotides parmi 24 autres modèles de substitution pour la construction d'arbres ML (figure 18) cette analyse étant basée sur l'approche du bootstrap non paramétrique avec un bootstrap de 1000 réplifications. L'analyse complétée à titre comparatif avec l'étude basée sur les probabilités postérieures en utilisant la méthode bayésienne sur le programme M. Bayes dont l'arbre consensus visualisé et tracé sur Geneious (Vs.11 .4.0). (figure 19), toutes ces analyses nous ont permis d'obtenir des topologies pour les arbres générés pour les deux gènes, toutes similaires. Nous notons que, l'analyse menée sur la totalité des souches a rassemblé les souches Algériennes en deux groupes monophylétiques différents sur deux clades différents le Clade I et le Clade II (Young et al., 2008 ; Gardiner et al., 2014 ; Pesce et al., 2018; Sapkota et al., 2020).

Le premier groupe appartenant au clade (I), celui-ci regroupe la plupart des souches séquencées et les relie au groupe *translucens*, tout en les reliant fortement aux espèces *phormiicola*, *hyacinthi* et *theicola*. Le second groupe appartenant au Clade (II) a rassemblé deux souches X7 et X14 et les relie fortement au groupe *campestris*, en particulier au pathovar *raphani*. Les deux pathovars étant responsables de taches foliaires, de la nervation noire et de la pourriture noire des *Brassicaceae*. Les résultats des deux premiers gènes (*gyrB* et *rpoD*) sont confirmés par l'analyse et la phylogénie basée sur les deux gènes supplémentaires (*atpD* et *DnaK*) les reliant au taxon *X. campestris* (figure 20 et 21) respectivement.

Les valeurs des bootstrap viennent confirmer la robustesse de l'analyse, une valeur de 99 bootstrap est donnée sur le modèle ML et de 100% pour l'analyse bayésienne (Figure 19). De

plus, les distances obtenues pour les séquences du gène *gyrB* et les distances gènes concaténés respectivement (tableau 5a et 5b, annexe) obtenues sur le logiciel Geneious ont clairement illustré les similitudes.

Les topologies, indépendamment des stratégies phylogénétiques (ML ou bayésiennes) employées des différents arbres convergent et séparent les souches en deux groupes et les relient aux deux clades I et II.

La quatrième analyse basée sur la concaténation des séquences des gènes (*gyrB-rpoD*) réalisée simultanément avec les deux approches aboutit à des constructions phylogénétiques (figures 19 c ) similaires à toutes celles obtenues par les autres analyses.

Les valeurs des bootstrap viennent confirmer la robustesse de l'analyse, une valeur de 99 bootstrap est donnée sur le modèle ML et de 100% pour l'analyse bayésienne. De plus, les distances obtenues pour la séquence du gène *gyrB* et les distances gènes concaténés respectivement (annexe tableau 5a et 5b ) obtenues sur le logiciel Geneious ont clairement illustré les similitudes.

D'autre part, cette étude comparative nous a permis d'éliminer tous les isolats retenus au départ sur la base des caractères phénotypiques et dont les séquences nucléotidiques présentent un taux de similarité élevé avec d'autres genres dont le genre *Stenotrophomonas* avec un taux de similarité proche de 96%, (tableau : similarités des séquences nucléotidiques des gènes). Nous notons que dans ces cas précis, les bactéries proches de ce genre sont isolées pour la plupart à partir de la rhizosphère et des résidus de récolte. Les bactéries du genre *Stenotrophomonas* sont très similaires aux bactéries du genre *Xanthomonas*, du point de vue phénotypique. Le genre en question n'a été séparé du genre *Xanthomonas* qu'en 1993 (Palleroni et Bradbury, 1993). Le séquençage des gènes de ménages nous a dans un autre volet permis de séparer sur la base de l'étude phylogénétique les deux groupes de souches appartenant au genre *Xanthomonas* et de confirmer la nécessité de la caractérisation moléculaire pour l'identification des agents pathogènes, Cette étude confirme que l'observation des symptômes et le diagnostic classique ne sont pas suffisants pour une détermination précise des agents pathogènes.

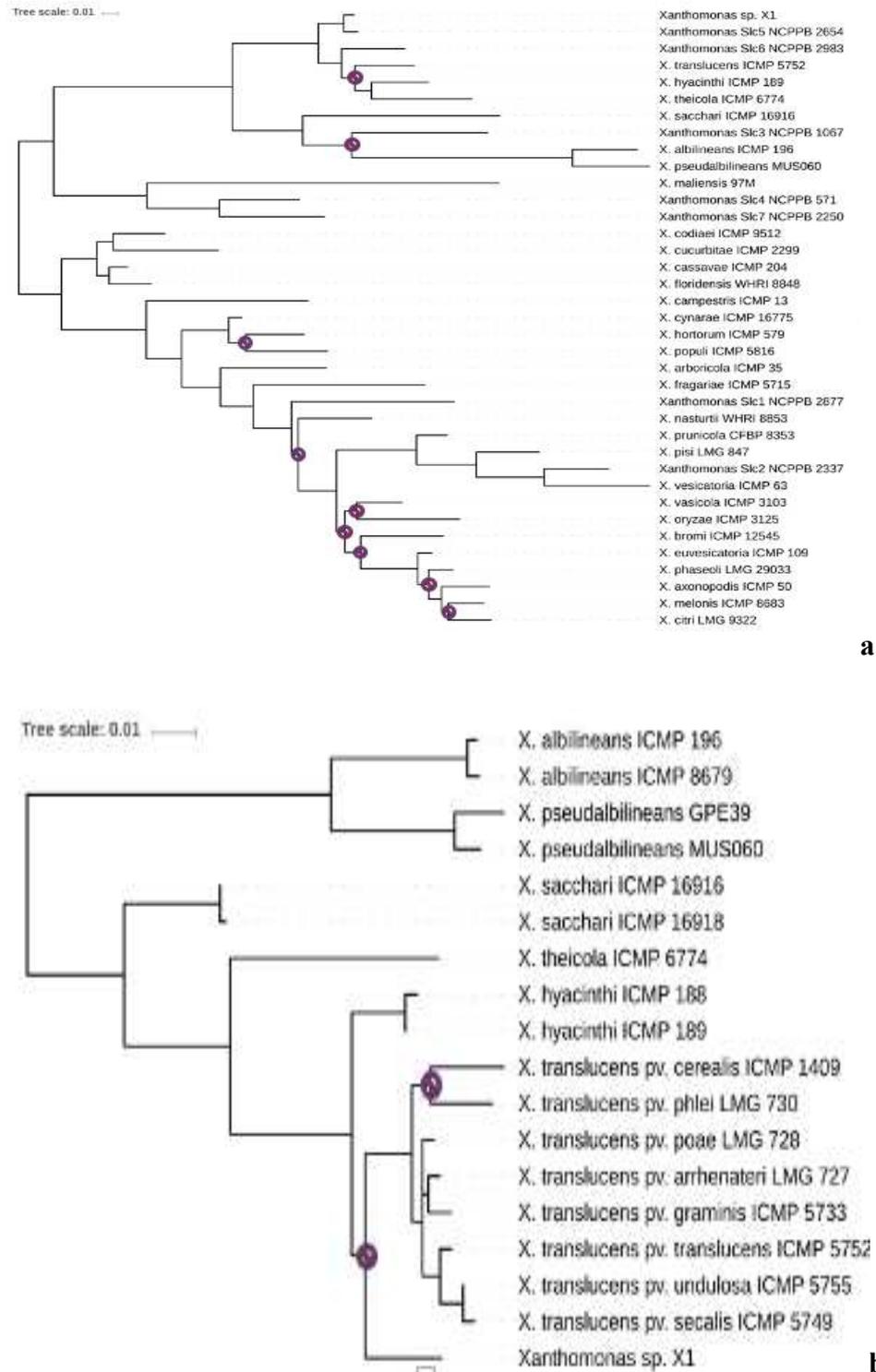


Figure 16: Arbres phylogénétique des genes a) *GyrB* et b) *rpoD* construits par l’algorithme (<http://www.phylogeny.fr>) (Dereeper et al., 2008).

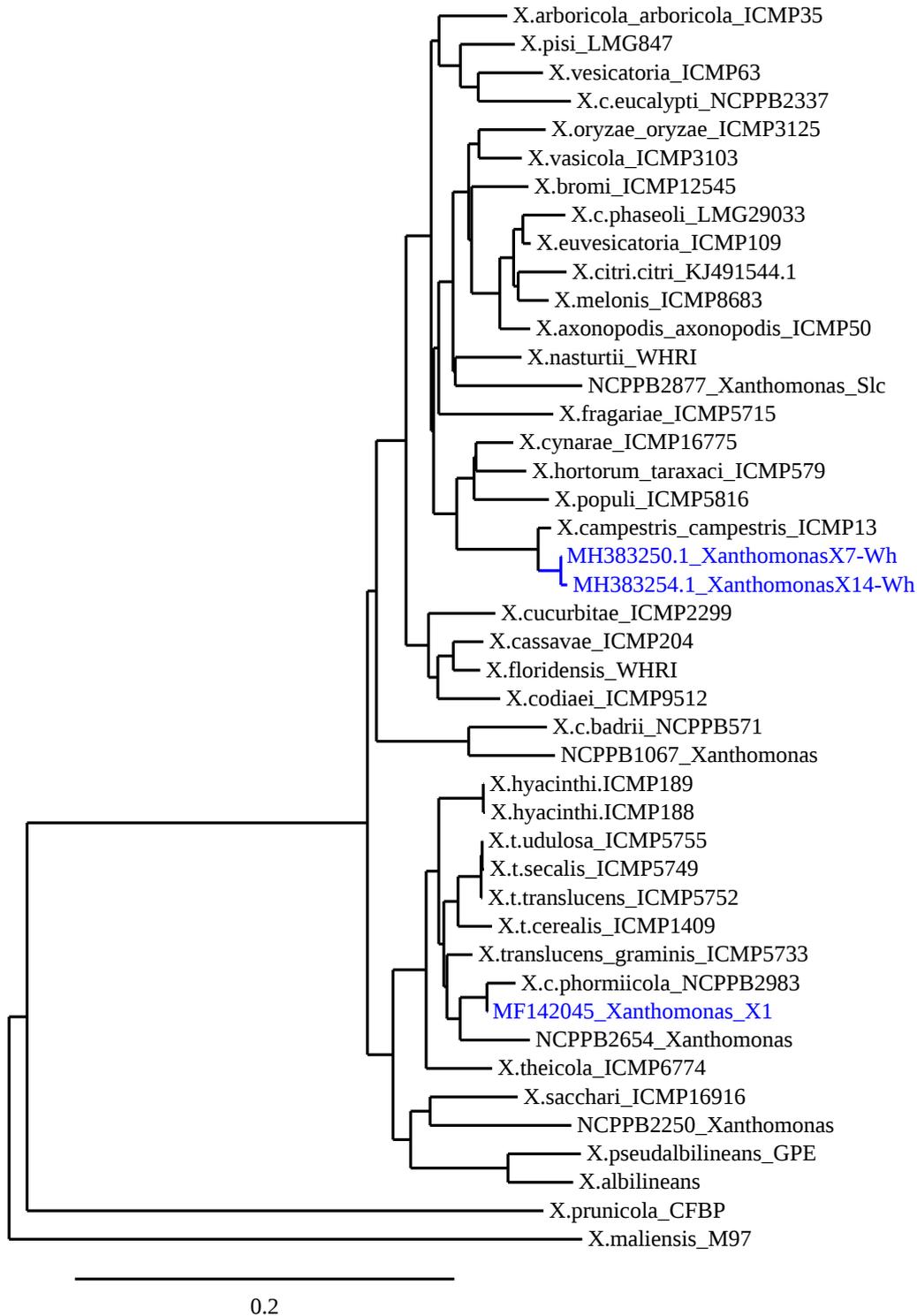


Figure 17: Arbre phylogénétique du gène *gyrB* des isolats liés aux clade 1 et 2 construit par l'algorithme (<http://www.phylogeny.fr>) (Dereeper et al., 2008).

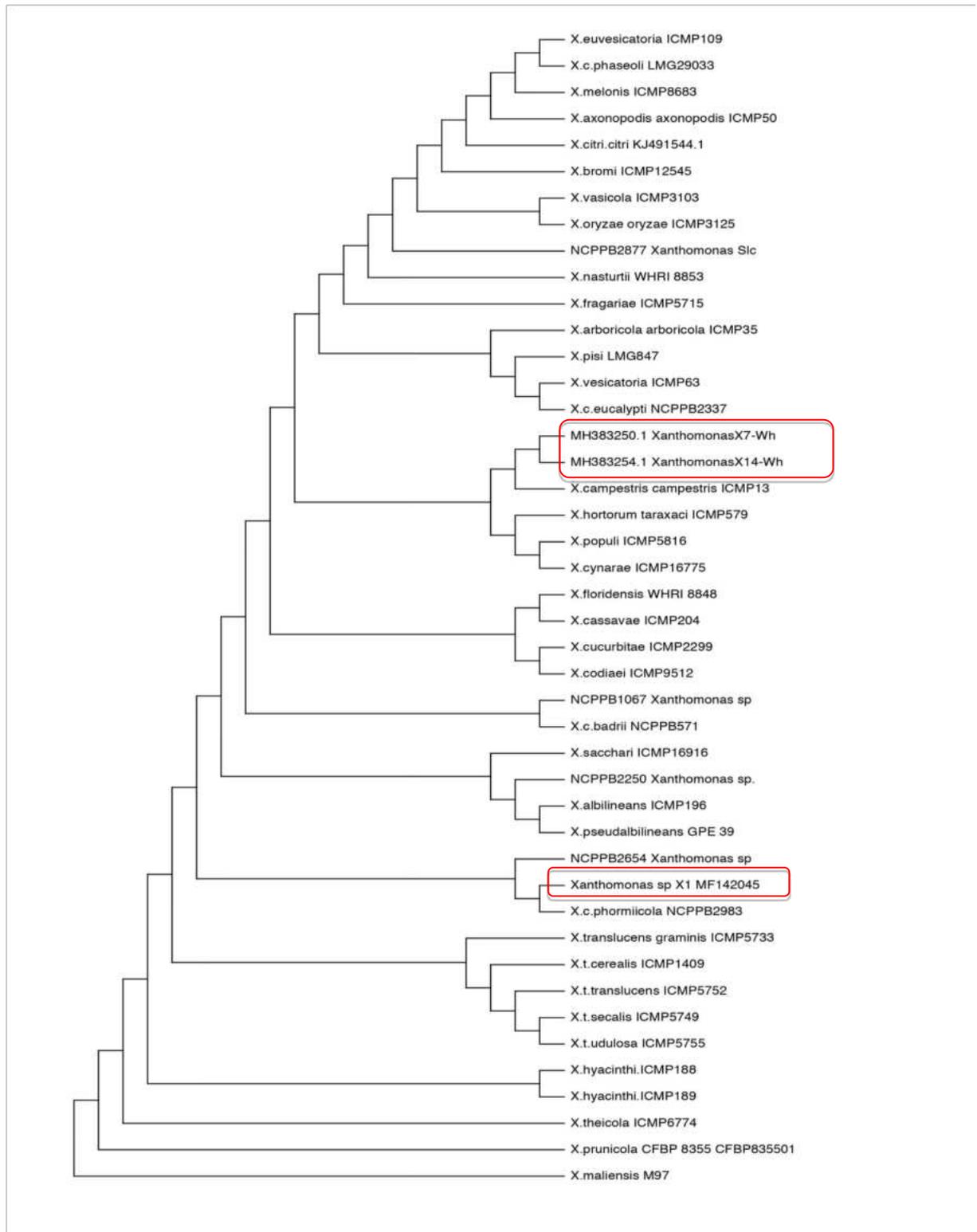


Figure 18: Arbre phylogénétique du gene *gyrB* des isolats liés aux clade 1 et 2 construit avec sur MEGA 7, avec “fit-substitution model” (GTR+G+I).

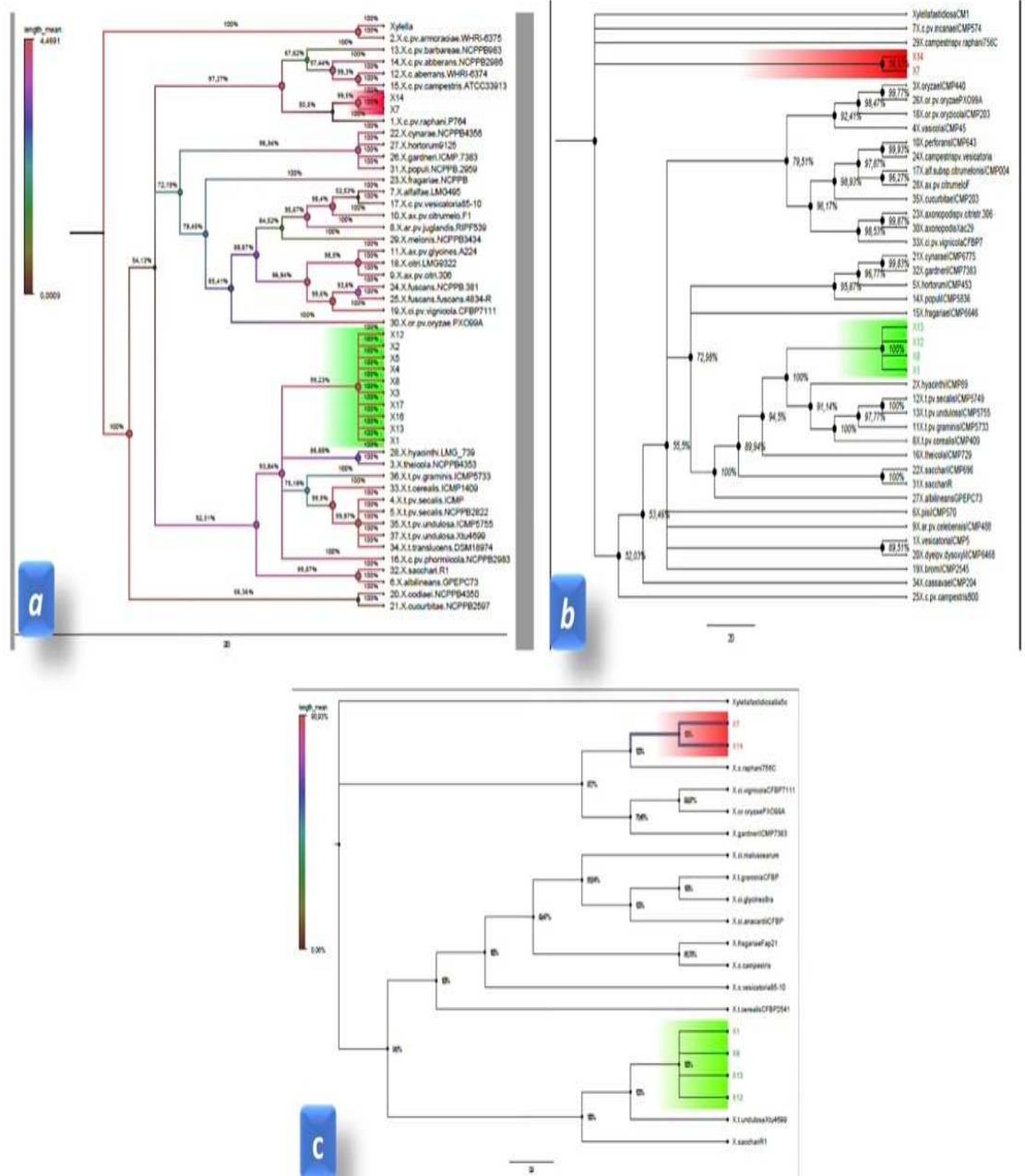
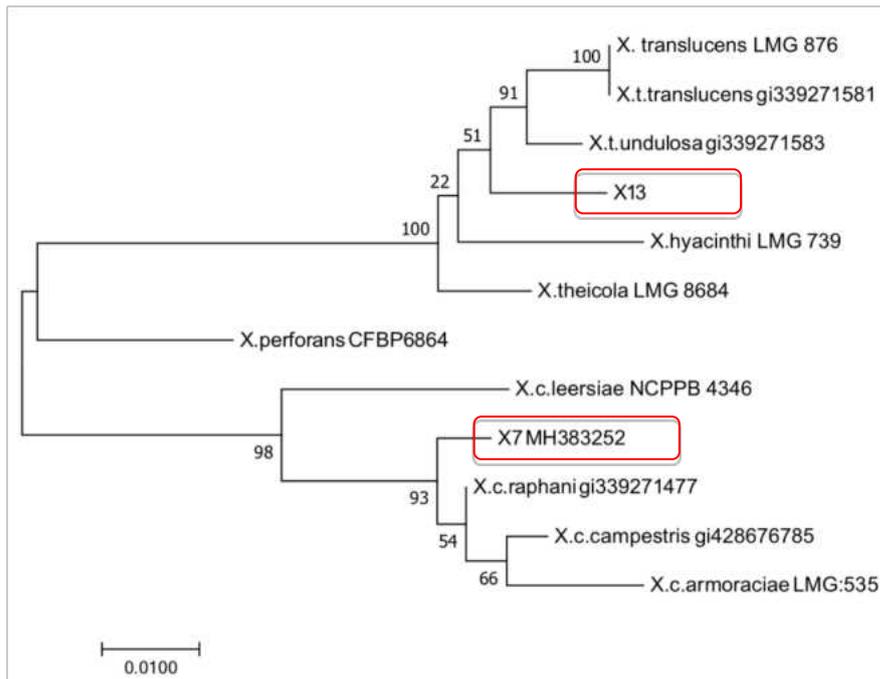
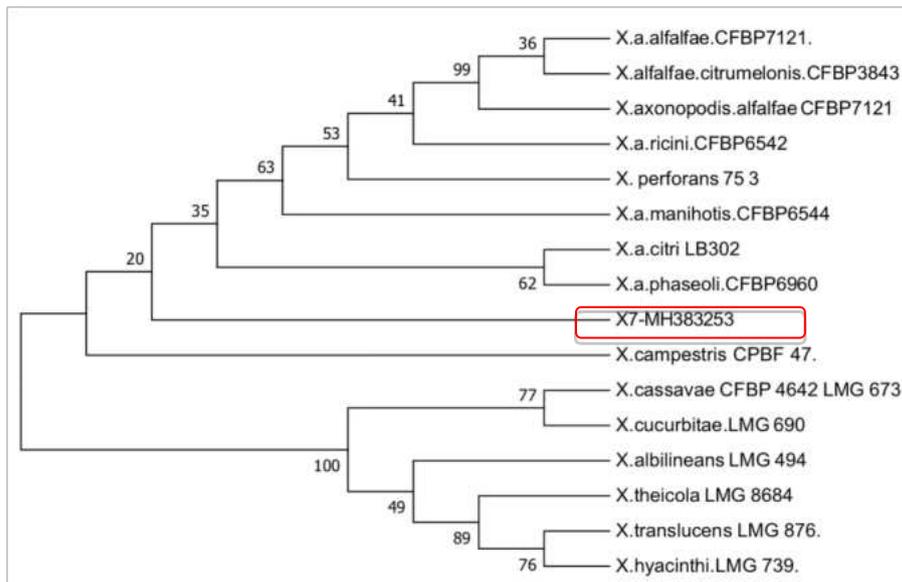


Figure 19: Analyse phylogénétique des séquences des gènes générée avec Mr Bayes, l'Arbre consensus, tracé sur Genious a) gène *gyrB*, b) gène *rpoD*, c) concaténation des gènes *rpoD* et *gyrB*.



**Figure 20:** Analyse phylogénétique des séquences du gène *atpD* des genes sur MEGA7,avec “fit-substitution model” (GTR+G+I).



**Figure 21:** Analyse phylogénétique des séquences du gène *Dnak* sur MEGA7,avec “fit-substitution model” (GTR+G+I)

### **PARTIE 3 : ETUDE DU POUVOIR PATHOGENE DES SOUCHES**

La vérification du pouvoir pathogène des isolats est effectuée en plusieurs étapes, sur plusieurs espèces dont des génotypes de blé, d'orge d'avoine et de *Brassicaceae*.

Dans cette étude, plusieurs méthodes d'inoculation (immersion, aspersion, infiltration, pique) sont adoptées afin de vérifier l'expression des symptômes de la maladie et de pallier les limites de chacune des techniques. L'adoption de la diversification des techniques est réalisée dans le but de reproduire d'une façon optimale les conditions de l'infection naturelle.

L'inoculation est réalisée sur des génotypes de blé tendre, de blé dur et d'orge multipliés en Algérie, incluant les variétés à partir desquelles les souches ont été isolées (hôte homologue). Cette étude est effectuée d'une part, pour compléter le schéma des postulats de Koch et d'autre part pour évaluer le pouvoir pathogène et le degré d'agressivité des souches par rapport aux différents génotypes de céréales étudiés. L'objectif étant une fois de plus, la confirmation de l'identité des souches déjà caractérisées d'un point de vue phénotypique et génétique.

Cette étude est réalisée en plusieurs phases :

Une étude globale du pouvoir pathogène est réalisée sur l'ensemble des souches. Cette étude vise à déterminer d'une part le pouvoir pathogène des souches, de reproduire les symptômes observés sur le terrain pour les souches isolées à partir des échantillons atteints et d'éliminer toutes les bactéries n'ayant pas généré de symptômes sur les plants inoculés. Cette étude est réalisée en utilisant les quatre techniques d'inoculation par pique, par aspersion, par immersion et par infiltration.

Une autre étape de ce travail est menée sur une collection de 30 souches caractérisées pour lesquelles l'étude du pouvoir pathogène est réalisée. Cette fois l'étude est réalisée sur trois espèces de céréales (orge, avoine et blé) afin de vérifier la compatibilité hôte-pathogène, l'étude constitue une approche qui vise à déceler une variabilité dans les réponses des souches par rapport aux espèces de céréales étudiées conduisant à la détermination du pathovar, la classification notion du pathovar étant étroitement liée à la gamme d'hôtes de cette bactérie (Boosalis, 1952; Bradbury, 1986, Bragard *et al.*, 1995)

La gamme utilisée est composée de blé, d'orge et d'avoine. Cette étude est réalisée au niveau de l'unité de phytopathologie de l'institut « Applied Microbiology-Phytopathology, Earth and Life Institute », UC Louvain, Louvain-la-Neuve, en Belgique.

Une étude supplémentaire est entreprise dans le but de vérifier les données atypiques auxquelles ont aboutis les résultats du séquençage pour un certain nombre de souches. Cette étape consiste à introduire dans la gamme des espèces de céréales étudiées des espèces de *Brassicaceae* (chou, chou-fleur, navet et radis) afin de vérifier les résultats obtenus par la caractérisation moléculaire de celles-ci.

Les inoculations sont toutes réalisées sous des conditions contrôlées de température et d'humidité optimales pour le genre *Xanthomonas*.

### 3.1. MATERIELS ET METHODES

#### 3.1.1. Préparation du matériel végétal

##### 3.1.1.1. Plants de blé pour la première étude

Plusieurs génotypes de blé sont utilisés pour la vérification du pouvoir pathogène des souches d'une part et pour déterminer le comportement de ces variétés vis-à-vis de celles-ci. Les variétés utilisées sont (Vitron, Hiddab (HD1220), Simeto, Tassili, Anza, Waha, Ain Abid, Acsad 901, Acsad 885, Med ben Bachir, Oued zenati, Hedba3, GTA, Boussalem, Gamgoum r'khem, BTAR2, chen's, Anza, Arz, Langlois, Polinicum, Ofanto et Marouane. Certains de ces génotypes (08) parmi ceux utilisés dans cette étude sont caractérisés des points de vue agromorphologiques, biochimiques et physiologiques, dans une étude d'amélioration génétique, visant à identifier des géniteurs performants (Kirouani *et al.*, 2019).

Le semis est réalisé à raison de neuf grains par pot. Un test de germination (annexe) est préalablement établi pour chacun des lots de semence.

Le substrat utilisé pour le semis est composé d'un mélange de 2/3 terre et de 1/3 terreaux stériles. Les plants sont élevés à une température ambiante pendant 21 jours jusqu'au stade 3 feuilles.

##### 3.1.1.2. Plant de blé orge et avoine pour la deuxième étude

L'étude est réalisée au niveau de l'unité de phytopathologie de l'institut « Applied Microbiology-Phytopathology, Earth and Life Institute », UC Louvain, Louvain-la-Neuve, en Belgique. Les espèces inoculées dans cette étude sont le blé tendre représenté par la variété Toison d'or, l'avoine représentée par une lignée obtenue à la ferme de l'UCL et l'orge par la variété Corona). Le semis est réalisé à raison de neuf grains par pot à raison d'un pot par souche soit trente pots par espèce. L'élevage des plants est réalisé à température ambiante jusqu'au stade 3 feuilles d'inoculation recommandé pour l'inoculation.

### 3.1.1.3. Plant de *Brassicaceae*

Le semis est réalisé dans des pots de 9 cm de diamètre pour l'inoculation des jeunes plantules où 9 graines sont semées par pot. Des pots de 19 cm de diamètre réservés le repiquage de plants pour les inoculations des plants adultes, seule l'espèce *Brassica oleracea* (chou) est utilisée inoculée au stade adulte à raison d'un plant adulte (mois) par pot est destiné à l'inoculation.

Les variétés de chou (*Brassica oleracea*) utilisées sont, la variété Chou de Milan de Pontoise 2, La variété Chou Milan gros de vertus, la variété Lucien Clause chou rouge tête noire 3 et la variété boule de neige de chou-fleur (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Des variétés inconnues de navet (*Brassica rapa* syn. *Brassica napus*) et de radis (*Raphanus sativus*).

### 3.1.2. Préparation de l'inoculum.

Pour les inoculations par aspersion, par trempage (immersion) et infiltration, l'inoculum utilisé est à  $10^7$ cfu/ml, la préparation des suspensions bactériennes est réalisée à partir de cultures bactériennes pures de 24hensemencées sur gélose nutritive (NA). La concentration de la suspension étant fixée par la méthode de dénombrement cellulaire pour une confirmation de la viabilité de l'inoculum.

Pour la méthode d'inoculation par pique, la crème bactérienne utilisée est obtenue par ensemencement et purification sur gélose nutritive (NA) cultivée pendant 24 à 48h à 30°C.

L'inoculation des *Brassicaceae* est réalisée avec six (06) souches dont la caractérisation moléculaire a abouti à des séquences proches de celles de l'espèce *X. campestris*(tableau 7).

### 3.1.3. Méthodes d'inoculation

Cette étude consiste en l'inoculation de toutes les souches adoptant les quatre méthodes d'inoculation afin de vérifier l'évolution des symptômes. Les quatre méthodes sont recommandées par plusieurs auteurs. Les techniques présentent chacune des avantages et limites, leur combinaison consiste à optimiser la fiabilité et la cohérence des résultats, l'inoculation par aspersion est recommandée par Noval (1989), cette technique consiste à asperger les plants avec la suspension bactérienne, en prenant la précaution de couvrir préalablement les plants avec des sacs en plastique permettant d'empêcher la dispersion de l'inoculum et l'optimisation des conditions d'humidité optimales. Pour les plants témoins, des plantules sont inoculées avec de l'eau distillée stérile et sont maintenues dans les mêmes conditions. L'inoculation par pique est recommandée par Colin et *al.*, (1990), Bragard et Maraite, (1992), Ferauge et Maraite,(1992) et Bragard et *al.*, (1995), Cette technique consiste à

faire trois piqûres espacées au niveau de la gaine des plantules de blé à l'aide d'une aiguille stérile chargée de crème bactérienne. L'inoculation par immersion décrite par Darsonval A et *al.*, (2009), Cette technique consiste à tremper les jeunes plantules et les plantes adultes dans une suspension bactérienne pendant 20 à 30s. Pour les plants témoins, des plantules ont été trempées dans de l'eau distillée stérile et sont maintenues dans les mêmes conditions.

L'inoculation par infiltration La technique d'inoculation par infiltration (Bragard et Maraite 1992). Cette technique consiste à infiltrer la suspension à la face supérieure de la feuille à l'aide d'une seringue démunie de l'aiguille, en prenant soin de faire une blessure par une légère piqûre à l'aide de l'aiguille. L'inoculum est infiltré de façon à avoir une zone saturée en eau d'environ 1cm. Pour les plants témoins, des plantules ont été infiltrées avec de l'eau distillée et sont maintenues dans les mêmes conditions.

Concernant l'inoculation des *Brassicaceae*, seule la méthode d'immersion est utilisée au stade 3 feuilles pour les jeunes plantules, l'inoculation des plants adultes est réalisée sur des plants âgés de 3mois.

Les conditions adoptées pour l'ensemble des protocoles sont des conditions optimales favorisant l'expression de la maladie soit 28°C de température et 95% d'humidité relative avec une photopériode de 16h/8h (jour/nuit). Les symptômes sont notés au fur et mesure de leur apparition.

#### **3.1.4. Dispositif expérimental**

Dans cette étude nous nous sommes basés sur les recommandations de plusieurs auteurs concernant la diversification des méthodes d'inoculation. Les méthodes pouvant aboutir à des symptômes différents et présenter une différence dans la durée d'apparition des premiers signes de la maladie, la manifestation des symptômes pourrait aussi être différente en fonction des génotypes inoculés.

##### **-Inoculation du blé**

Toutes les souches ayant répondu positivement à la réaction d'hypersensibilité sur tabac ont été inoculées aux plantules de blé. Chaque souche à raison de 2 répétitions soit deux pots par souche (9X2 répétitions) avec un pot de plants utilisés comme témoin négatif, inoculé à l'eau distillée stérile.

Les pots sont couverts de sachet en plastique et maintenus à une température de 28°C avec une photopériode de 16h/8h (jour/nuit), et une humidité de 95%.

### **-Inoculation des *Brassicaceae***

Les souches isolées à partir de résidus ayant donné des séquences proches de l'espèce *X.campestris* sont inoculées sur quatre espèces de *Brassicaceae*. L'inoculation par immersion est réalisée en deux étapes, la première étape consiste à inoculer des plantules de 20 jours à raison de deux pots par variété et par souche contenant chacun 9 plants, soit l'inoculation de 9 plants/souche/variété. Dans cette première étape l'inoculation est effectuée en parallèle avec des plantules de blé au stade 3 feuilles à raison de 9 plants par pot pour les mêmes souches. Le cultivar de blé utilisé dans cette partie du travail est un cultivar, constaté, relativement sensible dans l'étude précédente. Dans la deuxième étape, l'inoculation est réalisée sur des plants adultes de 70 jours, 5 plants par souche et par variété à raison de 01 plant par pot. Des inoculations de plantules et de plants adultes avec de l'eau distillée stérile sont réalisées comme témoins négatifs.

#### **3.1.5. Les notations**

Une observation quotidienne est réalisée dans le but de noter l'évolution des symptômes. Les résultats sont notés le 3<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup>, 9<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour selon les recommandations (Bragard *et al.*, 1997). Plusieurs échelles d'évaluation des symptômes sont recommandées par les auteurs dont celle de Mehta, 1990, évaluant les symptômes sur la base de la taille des lésions avec une échelle allant de 0 à 4 et l'échelle de MilusetMirlohi (1994), basée sur le pourcentage de la surface des lésions saturées sur le total du limbe, variant de 0 à 6.

#### **3.1.6. Ré-isolément et re-identification**

Les plants inoculés présentant des symptômes typiques sont soumis à un réisolement afin de compléter le schéma des postulats de Koch. Un isolement classique est effectué sur un fragment atteint du plant inoculé, les bactéries obtenues sont identifiées du point de vue phénotypique soit en se basant sur la caractérisation morphologique des colonies et les tests biochimiques et culturels déjà établis

### **3.2. RESULTATS**

Tous les isolats testés par inoculation d'une suspension de  $10^9$  Cfu/ml dans l'espace internervaire du limbe de la feuille de tabac ayant donné une réaction d'hypersensibilité (Figure 22) sont retenus pour les tests complémentaires d'identification.



**Figure 22: Réponse positive au test différentiel de pathogénicité Réaction d'hypersensibilité positive**

### 3.2.1. Diversité et spécificité des symptômes

Les différentes techniques d'inoculation révèlent approximativement les mêmes résultats visibles sur les plants inoculés, la série de symptômes décrits dans la littérature sont observés après 7 à 8 jours de la date d'inoculation. Parmi les symptômes les plus caractéristiques, de la reproduction de la maladie, les lésions saturées en eau, le symptôme est dit aussi aspect graisseux (figure 23). Ce type de symptôme est souvent typiquement accompagné par des exsudats abondants sous forme de gouttelettes suintant des lésions notamment sur d'autres espèces céréalières inoculées.

En effet, Les symptômes obtenus par inoculations des espèces de blé orge et avoine effectués à la station expérimentale de l'UCL, se présentent sur avoine (ferme UCL) et blé (toison d'or) sous forme de ramollissement et macération des tissus de la gaine accompagnée d'un aspect graisseux sur tige et un aspect graisseux accompagné d'exsudats sur les feuilles cotylédonaire (basales). Un symptôme de stries noires allongée est obtenu avec l'inoculation sur orge (corola). Un autre symptôme atypique provoqué par l'inoculation des plantules de blé par certains isolats est observé sous forme de noircissement des tissus foliaires. Ce type de symptômes de noircissement des tissus parenchymateux n'a pas été décrit pour la maladie relevant aussi des interrogations sur le mode d'action des souches et leur identité. Ce résultat atypique requiert une investigation supplémentaire quant à l'identité des souches inoculées.

Pour la méthode d'inoculation par piqûre, la nécrose initialement localisée s'élargit et affecte tout le limbe de la feuille, montrant des gouttelettes d'exsudat. La technique d'inoculation étant favorisée par la combinaison à la fois les conditions de température et d'humidité propices à la maladie (Duveiller et Maraite, 1993 ; Duveiller et *al*, 1997b). Les résultats confirment que les souches attribuées aux espèces de *Xanthomonas* sont pathogènes sur les cultivars de blé inoculés, particulièrement sur le cultivar Acsad 885 qui s'avère sensible à la plupart des souches

inoculées. L'attribution des souches à l'espèce *X. translucens* est ainsi fortement soutenue par tous les caractères étudiés, de plus souches pour la plupart sont isolées à partir d'échantillons symptomatique de blé. Les différents résultats de la caractérisation culturelle et morphologique obtenus, ainsi que des profils biochimiques et physiologiques ajoutés aux résultats du pouvoir pathogène, qui se caractérisent souvent par l'apparition typique de lésions saturées en eau, d'aspect grasseux accompagné d'exsudats se rejoignent. Tous ces résultats obtenus combinés semblent soutenir l'appartenance des souches étudiées à l'espèce *X. translucens*. De plus, les symptômes observés au champ et reproduits par inoculations artificielles sont proches de ceux causés par les espèces du groupe *translucens*.

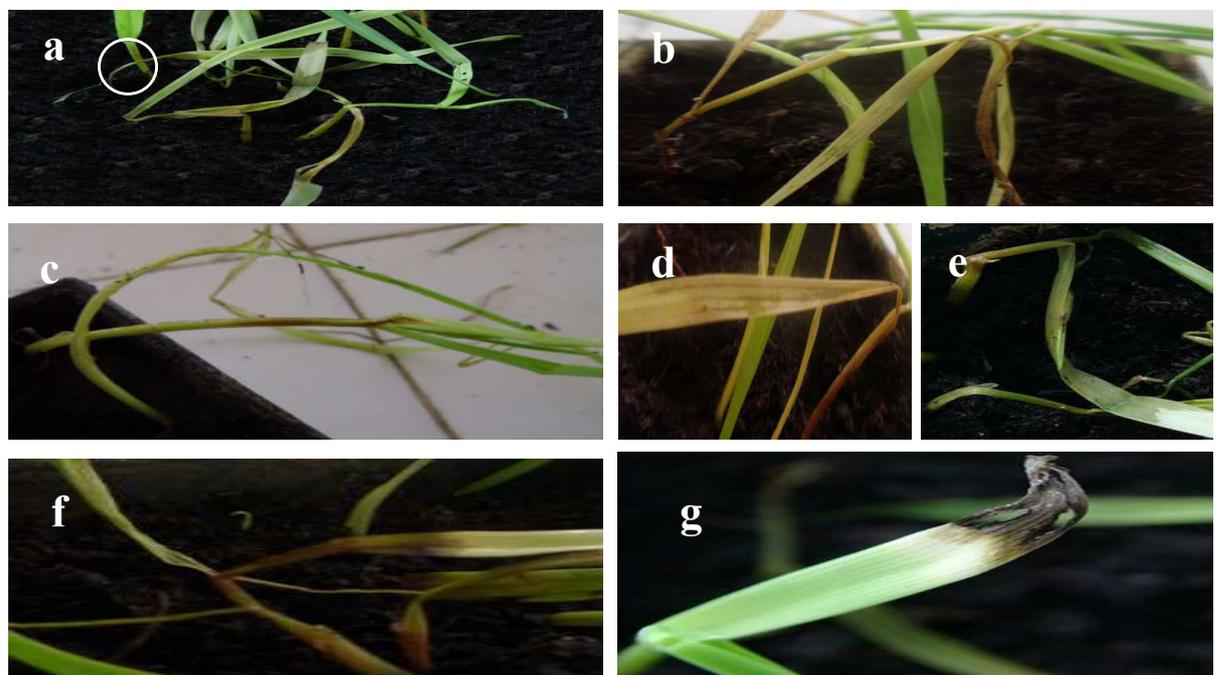
Néanmoins, le symptôme de noircissement des tissus foliaires au niveau des points d'inoculation sur blé ( figure 23, g) semble atypique. Bien que décrit pour l'espèce de *Xanthomonas campestris* intervenant sur les espèces de *Brassicaceae*, ce symptôme ne semble pas commun sur les feuilles de blé et n'a jamais été décrit auparavant pour la maladie de la strie bactérienne (BLS). L'identification basée uniquement sur la pathogénèse semble de ce fait, insuffisante et impose une investigation supplémentaire tournée vers l'élargissement de la gamme d'hôtes aux espèces hôtes de l'espèce *campestris* notamment les *Brassicaceae*. Nous notons par ailleurs que, la caractérisation moléculaire basée sur le séquençage des gènes MLSA semble être en parfaite corrélation avec ces résultats.

Pour les techniques d'inoculation par aspersion et par immersion les résultats obtenus, 8 à 9 jours après inoculation sont similaires et sont représentés par des aspects grasseux évoluant en des zones saturées élargies avec des gouttelettes d'exsudats (figure 24) similaires à ceux décrits pour *X. translucens* et rapportés par plusieurs auteurs. Nous notons que les résultats obtenus par l'utilisation de ces deux types d'inoculation sont relativement identiques, La durée attendue pour l'apparition des symptômes et le type de

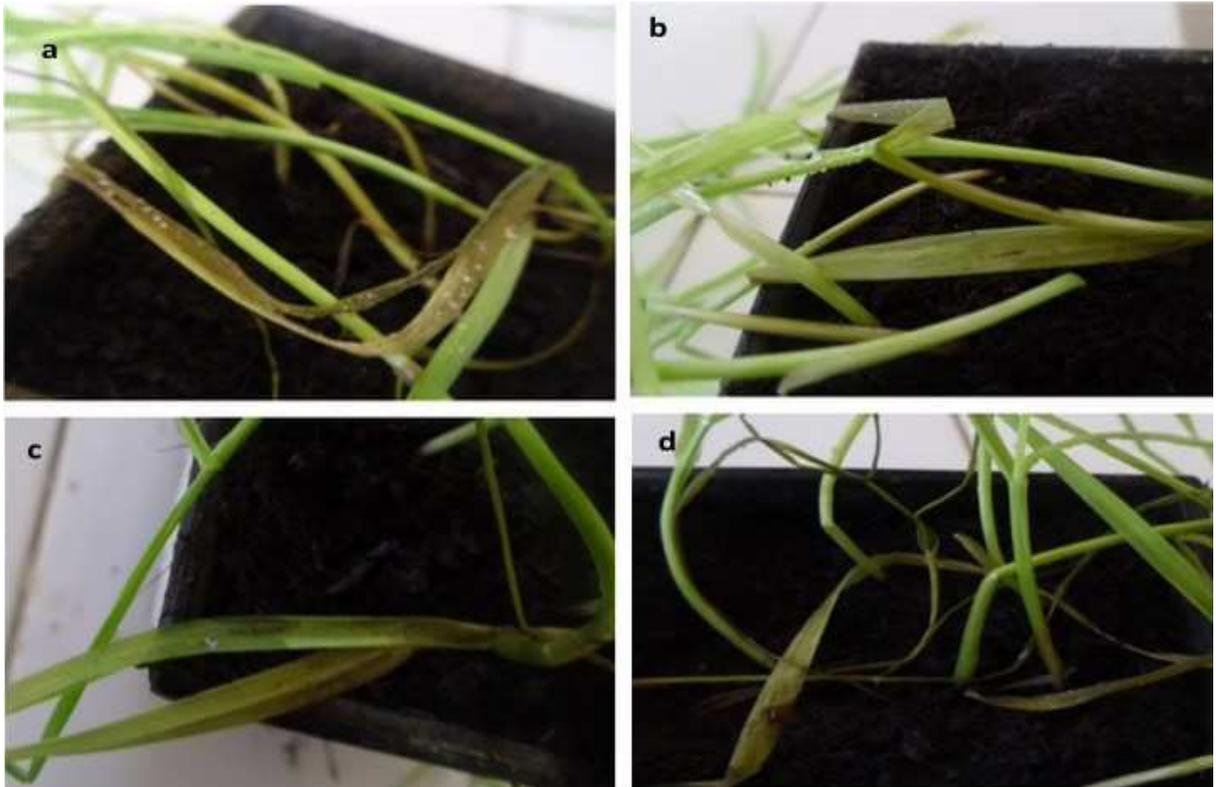
Les plantules inoculées par infiltration sur une zone de 1cm du limbe a permis d'observer des zones saturées en eau translucide (figure 23, e et f ) au bout de 7 jours. La progression des lésions est généralisée parfois jusqu'à atteindre l'apex de la feuille, la coalescence des lésions est rapportée par Duveiller et *al.*, (2002) et Kaur et *al.*,(2002). Le symptôme est souvent accompagné de chlorose (figure 25).

Nous notons que l'étude du pouvoir pathogène effectuée sur plusieurs génotypes a révélé une série de symptômes rapportés par plusieurs auteurs concernant l'infection par l'espèce *X. translucens*, cependant, bien que les symptômes soient identiques pour l'ensemble des génotypes, certains génotypes semblent plus sensibles et présentent de lésions beaucoup plus

élargies menant parfois au dépérissement total des feuilles en un temps relativement court. Selon les deux échelles d'évaluation de Mehta (1990) et de Milus et Mirlohi (1994), les souches peuvent atteindre dans les conditions optimales le degré le plus élevé notamment pour les variétés Acsad 885 et aussi HD1220, chen's, Med ben Bachir, Boussalem, Simeto, BTAR2 , Oued zenati, Hedba3, GTA, Longeois, Gamgoum R'kheim. Les variétés Vitron, Tassili, Waha, Ain Abid, Acsad 901, Anza, Arz, Langlois, Polinicum, Ofanto et Marouane se sont montrées relativement moins sensibles. Une évaluation basée sur le nombre de plants ayant présenté des symptômes par rapport au nombre total de plants inoculés confirme également la sensibilité des variétés Acsad 885, HD1220, chen's, Med ben Bachir, Boussalem, Simeto par rapport autres variétés étudiées.



**Figure 23: Symptômes reproduits par inoculation artificielle par pique (a : nécrose du point d'inoculation b, c, d : progression de la nécrose tout au long de la gaine, e et f: progression des zones saturée tout au long du limbe nécrosé, g : noircissement des tissus**



**Figure 24:** Symptômes produits par inoculation artificielle par immersion (a : Nécroses accompagnées de zones saturées en eau et de gouttelettes d'exsudats b : nécrose en strie, c : lésions saturées coalescentes : gouttelettes d'exsudat et dépérissement des feuille



**Figure 25:** Symptômes reproduits par inoculation artificielle par infiltration (a : zone saturée après 3 jours d'incubation, b: zone saturée accompagnée de nécrose c et d progression des nécroses et dépérissement des feuilles).

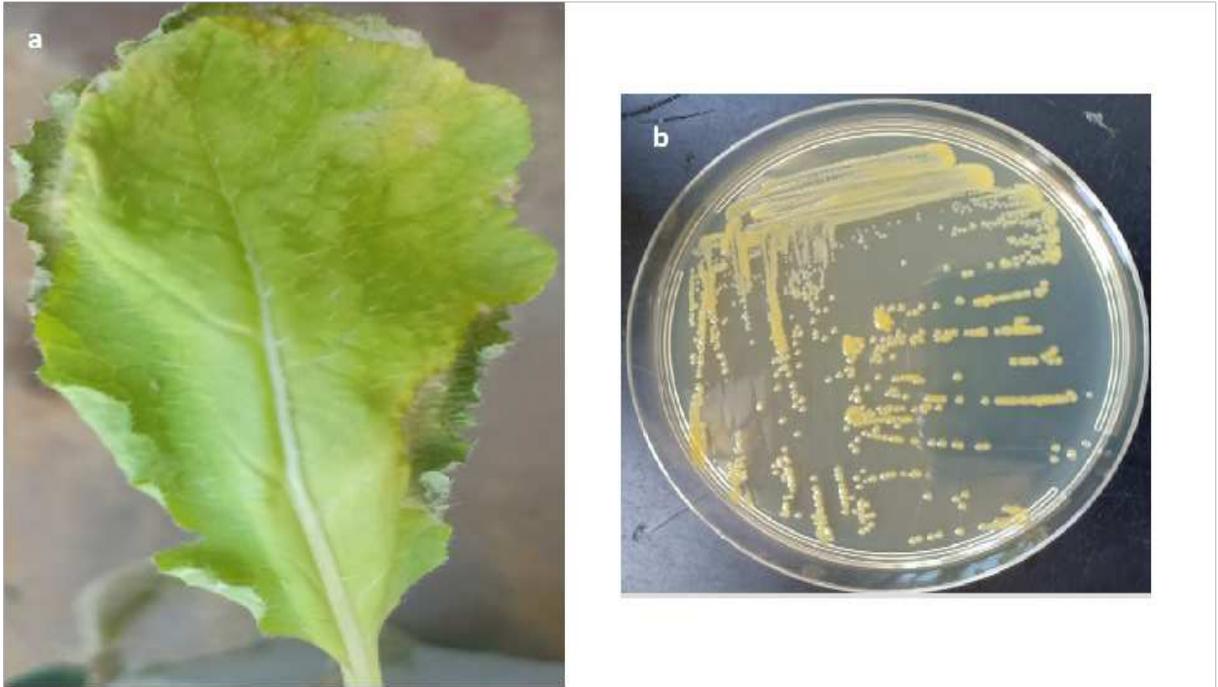
### 3.2.2. Confirmation de l'atypie des symptômes sur blé par la réaction spécifique des *Brassicaceae*

L'inoculation sur les espèces de *Brassicaceae* avec les souches ayant provoqué le symptôme de noircissement révèle des résultats suggérant une atypie évidente. Les symptômes obtenus sont ceux décrits pour l'espèce *X. campestris* et ses pathovars à savoir *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et *X.c. pv .raphani*. Les symptômes sur jeunes plantules (figure 25a et figure25b) et sur plants adultes (figure 25c), se présentent tels que décrits dans la bibliographie sur les *Brassicaceae* (Vicente and al, 2013). Les symptômes obtenus par l'inoculation des *Brassicaceae* sont très caractéristiques, montrant des nécroses en V sur les parties marginales des feuilles ou de lésions nécrotiques sur le limbe (figure 25).

Le réisolement des bactéries (figure 26b) et leur ré-identification par les tests préliminaires culturaux et biochimiques a permis d'accomplir l'ensemble des postulats de Koch classiquement nécessaires à l'établissement du diagnostic adéquat et à la confirmation des hypothèses de départ avec la reproduction typique des symptômes (figure26a et 27)



**Figure 24: Symptômes obtenus par inoculations des souches sur les plantules et plants adultes de chou (*Brassica oleracea*). a et b: Symptômes sur jeunes plantules.c :Symptômes sur plants adultes**



**Figure 25: Ré-isolement à partir de la feuille de chou inoculée par immersion avec la souche X7. a : feuille de chou présentant des symptômes 8j après inoculation b : Culture pure obtenue après réisolement sur NA (48h d'incubation à 30°C)**



**Figure 26: Reproduction des symptômes sur feuille de chou 8j après inoculation par immersion par la souche X14**

---

## DISCUSSION

La plupart des symptômes observés sur les feuilles et les épis dans les champs en tant que zones mélaniques sur les glumes sont similaires à ceux décrits pour la strie bactérienne "Bacterial leaf streak" et le noircissement des épis "Black Chaff" sur le blé, ce qui montre que les conditions de température élevée, surtout lorsqu'elles sont combinées avec une humidité élevée peuvent influencer le développement des symptômes, ceux-ci ont été décrits depuis longtemps pour cette maladie (Smith, 1917 ; Johnson et Hagborg, 1944) ; les souches sont principalement obtenues à partir d'échantillons provenant de champs irrigués par aspersion ou dans des stations expérimentales pour la sélection et aussi dans les dans des parcelles destinées à l'étude du comportement des génotypes à des fins de multiplication.

L'inoculation des plantules de blé au stade de trois feuilles a montré, au huitième jour de l'inoculation, des lésions saturées en eau et des nécroses au niveau des zones inoculées provoquant la mort des tissus. Pour la méthode d'inoculation par piqûre, la nécrose initialement localisée s'élargit et affecte tout le limbe de la feuille, montrant des gouttelettes d'exsudat. Notre technique d'inoculation est réalisée dans des conditions de température et d'humidité propices à la maladie (Duveiller et Maraite, 1993 ; Duveiller et *al*, 1997b). Les résultats ont confirmé que les souches liées aux espèces de *Xanthomonas* sont pathogènes sur le blé, notamment sur les cultivars sensibles dont cv Acsad 885. D'après les premières descriptions, en raison de leur présence et de leur isolement dans le blé, ces souches sont attribuées à l'espèce *X. translucens*. Les symptômes observés en plein champ et par inoculation artificielle sont similaires à ceux causés par les espèces pathogènes des céréales du groupe translucens.

Un réisolement des bactéries identifiées identiques à celles ayant été isolées à partir des échantillons traités, nous a permis de vérifier le dernier postulat de Koch pour relier les symptômes à l'attaque des bactéries suspectées.

La caractérisation moléculaire des souches effectuées afin de compléter le parcours d'identification et les résultats de cette étude ont montré que l'amplification PCR utilisant les amorces T1 et T2 recommandées par Maes et *al* (1996) a donné le fragment attendu de 139 pb pour toutes et les relie également à l'espèce *X. translucens*. Nous notons, par ailleurs, qu'une caractérisation supplémentaire s'est avérée nécessaire pour une pour soutenir et confirmer des résultats de la pathogénicité.

---

L'approche utilisée afin d'accomplir cette confirmation est proposée par Maiden et al., (1998) pour l'étude des populations. Cette approche se base sur des analyses de séquences multilocus (MLSA) des gènes de ménage. Le typage de séquences multilocus (MLST) permet une comparaison génétique directe des souches, cette approche est utilisée pour différencier des taxons étroitement apparentés, affiner la résolution des structures de population au sein des taxons et également, prédire la virulence des souches (Fayette et al., 2016 ; Peng et al. 2016 ; Curland et al., 2018). Les résultats obtenus par cette méthode sont très reproductibles et les séquences alléliques peuvent être récupérées dans des bases de données d'archives, telles que la base de données des microbes associés aux plantes et aux environnements (PAMDB) (Almeida et al. 2010 ; Langlois et al., 2017 ; Curland et al., 2018).

Les séquences de deux gènes (*gyrB* et *rpoD*), faisant partie aussi du schéma MLST-MLSA sont analysées et le taux de similarité relevé nous a permis de regrouper les souches et de mettre en évidence deux groupes distincts en corrélation avec le test de pathogénicité appartenant respectivement aux clades I et II renfermant respectivement les groupes *translucens* et *campestris*.

Comme la présence d'espèces *campestris* sur le blé n'est pas très courante, une confirmation supplémentaire est fournie par l'analyse des séquences des gènes *atpD* et *dnaK* et le test de pathogénicité sur les *Brassicaceae* a confirmé les résultats donnés par l'analyse des séquences des gènes *gyrB* et *rpoD*. Les symptômes présentés sur les feuilles de *Brassica oleracea* var *sabauda* et *Brassica oleracea* var *botrytis* sont similaires à ceux décrits dans la littérature (Vicente et al., 2006) pour *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* et *raphani* sur leurs hôtes. Ces résultats soutiennent fortement l'hypothèse de la présence de cette espèce sur le blé et la possibilité de sa présence généralisée en conditions humides. Sauer (1993) a rapporté que des espèces de *Brassicaceae* comme *Brassica nigra* sont souvent transportées accidentellement avec le grain de céréale et que les mauvaises herbes ont été associées et se sont répandues avec les cultures céréalières (blé et orge) depuis le début de l'agriculture au Néolithique. En outre, le colza spontané (*Brassica napus*) a été signalé comme une mauvaise herbe importante dans de nombreuses rotations de cultures en raison de la persistance et de la dormance des graines. L'impact sur la compétitivité et le rendement du colza spontané dans les rotations de cultures a été largement étudié dans les cultures de blé d'hiver et de printemps (Krato et Petersen, 2012). Il convient également de noter que le *Brassica napus* cultivé est largement utilisé dans les rotations de blé et que des études récentes suggèrent la nécessité d'étudier les éventuels intrants de cultures tels que le colza pour les rotations de céréales en termes agronomiques, économiques

---

et environnementaux (Schneider, 2010), l'espèce *Brassica napus* est signalée comme étant sensible à plusieurs pathogènes, notamment *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939, pv. *aberrans* et pv. *raphani* (Popović et al 2013, Anderson 2017 et Mamum et al, 2020). Ces rapports pertinents nous permettent d'émettre l'hypothèse que la transmission et l'adaptation de cet agent pathogène au blé en tant que porteur symptomatique ne sont pas exclues. Plusieurs aspects sont actuellement ciblés comme étant à l'origine de l'émergence de nouveaux pathosystèmes et de nouvelles maladies, notamment les modifications de l'environnement de l'hôte, de l'écologie du pathogène et des zones géographiques, toutes causées principalement par l'augmentation du flux de matériel végétal et l'élargissement de la gamme d'hôtes (Morris et al., 2017, Bartoli et al., 2016). Les bactéries pathogènes des plantes du genre *Xanthomonas* provoquent une grande variété de maladies, environ 124 chez les plantes cultivées monocotylédones et 268 chez les dicotylédones d'importance économique dans le monde entier, sous un climat chaud et humide (Leys et al., 1984 ; Chan et Goodwin, 1999). Les *Xanthomonadaceae* sont surtout connues par leurs membres pathogènes et principalement pour la partie de leur cycle de vie passée en tant que pathogènes. Les bactéries épiphytes sont capables d'atteindre leur densité malgré des conditions difficiles, les voies de survie en surface peuvent jouer un rôle important pendant les stades d'infection (Pfeilmeier et al. 2016). D'autre part, la phase épiphytique, souvent négligée, a empêché la définition précise de leur gamme d'hôtes. En excluant généralement les hôtes asymptomatiques potentiels, la gamme d'hôtes des *Xanthomonas* est loin d'être définitivement établie (Jacques et al., 2016). En outre, la phase épiphytique peut être considérée comme un réservoir de la maladie et représente donc le site où l'agent infectieux survit. Les espèces végétales non-hôtes pourraient soutenir et maintenir des populations épiphytes d'espèces de *Xanthomonas* à longue durée de vie (Angeles-Ramos et al., 1991, Silva et al., 2017, Zarei et al., 2018). Au cours du processus d'infection des plantes, les agents pathogènes ont développé différents mécanismes moléculaires qui assurent l'adhésion à la cellule hôte, la colonisation et la dissémination, ainsi que différentes stratégies pour prolonger leur survie chez l'hôte (Gottig et al., 2010). Le pathogène agit en atténuant la défense de la plante et en modifiant la structure de la cellule hôte (Akimoto-Tomiya et al., 2014). Il a été démontré que différentes molécules contribuent à la colonisation et à l'infection de la surface des plantes, notamment le xanthane, les adhésines, le levane et l'alginate (Dunger et al., 2007, Freeman et al., 2013 ; Pfeilmeier et al., 2016). L'adaptation de l'hôte peut également être conférée par une combinaison de protéines effectrices spécifiques au pathovar (Hersemann et al., 2017). Ces formes d'adaptabilité peuvent soutenir et élucider les résultats inhabituels

---

obtenus pour la plupart des souches de la collection phylogénétiquement fermées au groupe *translucens* et à l'espèce *X. phormiicola* et surtout pour les deux (X7 et X14) liées au groupe *campestris*. En effet, pour ces deux isolats, l'observation de leur comportement par inoculation artificielle a permis de mettre en évidence des symptômes typiques sur le blé, évocateurs de la strie foliaire bactérienne provoquée par les espèces du groupe *translucens* sur les céréales, et de générer en même temps des symptômes typiques sur les *Brassicaceae* similaires à ceux provoqués par les espèces du groupe *campestris*.

La classification du genre *Xanthomonas* est continuellement révisée, et plus encore avec les résultats obtenus par des séquences génomiques comparatives. L'attribution de plusieurs espèces et annonce de nouveaux pathovars et races (Vauterin et al 1995, Rodriguez et al, 2012) en particulier pour les espèces *Xanthomonas translucens* et *campestris* est de plus en plus fréquente (Fargier et Manceau, 2007, Gardiner et al, 2014, Jaenicke et al, 2016, Hersemann et al, 2017, Langlois et al, 2017, Pesce et al, 2017)

Au cours de leur stratégie épiphytie, les espèces du genre *Xanthomonas* survivent indifféremment sur des plantes hôtes et non hôtes et développent des mécanismes spécifiques à chacune, en plus de l'adaptation de leur propre métabolisme (Delmotte et al, 2009).

Les résultats de cette étude apportent de nouveaux éléments qui soutiennent la présence inattendue d'espèces de *Xanthomonas* non encore découvertes sur le blé, la capacité des espèces de *Xanthomonas* à s'adapter à de nouveaux hôtes et à être transmises à terme par les cultures voisines ou par la repousse des cultures précédentes soit par les plantes spontanées accompagnant les cultures affectées.

D'autre part, la détection inattendue de l'association *raphani*-blé peut changer la manière de gérer le développement de maladies qui étaient principalement basées sur la description des symptômes. De plus, la présence de plusieurs espèces de *Xanthomonas* liées aux translucides et aux espèces de *campestris* sur le même blé hôte, rend cette culture très vulnérable et suggère qu'elle peut abriter autant de pathogènes que les plantes spontanées qui l'accompagnent.

## CONCLUSION GENERALE

## CONCLUSION GENERALE

Les résultats de ce travail soulignent le premier signalement de la présence de souches atypiques généralement identifiées comme étant *Xanthomonas translucens* en Algérie sur la base des caractères phénotypiques, nous notons par ailleurs que l'approche habituelle basée sur l'identification et la caractérisation des *Xanthomonas* orientée vers les symptômes et maladies produites a sans doute biaisé et produit une vision qui reste limitée, sans mettre en évidence le grand nombre de *Xanthomonas* associés aux plantes et relativement peu étudiés jusqu'à présent. D'autre part, les résultats laissent à supposer, la possibilité d'entrées multiples de ces bactéries dont celles associées éventuellement aux semences de céréales ou de *Brassicaceae*. Les éléments supplémentaires auxquels a abouti ce travail soutiennent le principe de l'évolution de la pathogénicité en relation avec les différents microclimats de la région, apportant des réponses à l'apparition de nouvelles maladies en révélant les facteurs responsables de la survie des microorganismes (Van Baarlen et al., 2006).

Ce travail ouvre le champ à de nombreuses perspectives, en effet, la génomique comparative, apportera indubitablement, un soutien supplémentaire aux résultats déjà fournis dans ce travail, essentiellement basés sur une analyse de séquences multilocus comme le propose (Young et al., 2008).

La présence d'espèces de *Xanthomonas* apparentées aux groupes *X. translucens* et *X. campestris* sur le blé montre que les espèces de ce genre ont une grande capacité de transmission et d'adaptation à différents hôtes et peuvent survivre sur des plantes spontanées ou cultivées, passant facilement de dicotylédones à monocotylédones et inversement. Cela permet d'ajouter de nouveaux éléments aux stratégies développées pour sa lutte, premier objectif de ce travail. Les résultats soulignent également, les contraintes de l'étude des maladies basée uniquement sur l'observation des symptômes, et la présence de plus en plus fréquente d'agents pathogènes associés à une même culture, la rendant plus vulnérable notamment dans des conditions climatiques appropriées aux épidémies. Cette étude souligne une fois de plus l'importance qu'il convient d'accorder à l'étude du système de rotation dans les stratégies de lutte et souligne l'importance de la mise en place d'un diagnostic rigoureux quant à l'analyse des semences et de tout matériel végétal aux frontières.

## ملخص

الحبوب هي أحادية الفلقة تنتمي إلى رتبة *Poales* وعائلة *Poaceae* أو *Gramineae*. هذه أنواع تتميز بمعايير نباتية خاصة. من بين أنواع الحبوب، يعتبر القمح أهم مورد للاستهلاك البشري، حيث تخصص له مساحة أكبر من الأراضي على كوكب الأرض مقارنة بأي محصول آخر. تستخدم زراعة القمح في الجزائر كلاً من الأنماط الجينية المحلية التقليدية والأنماط الجينية المدخلة. تشتهر الأصناف المحلية بإمكانيات إنتاجها المحدودة نسبياً، من ناحية الضغوط الانتقائية الشديدة، التي تمارسها بشكل أساسي العوامل البيئية أو حتى مرتبطة بإدخال الأنماط الجينية المعروفة بإمكانياتها الإنتاجية العالية. غالباً ما تختفي هذه الأنماط الجينية بسبب ضعفها. تم إجراء العديد من الدراسات حول العوامل المختلفة وخاصة العوامل الحيوية بما في ذلك الآفات والأمراض الفيروسية والفطرية وخاصة البكتيرية للقمح. تخضع الحبوب بالفعل لعدة أمراض بكتيرية تنتقل بعدة طرق. من بين خزانات اللقاح البكتيري، البذور. تعتبر البذور المصدر الرئيسي لمسببات الأمراض، والتي يمكن أن تلتنصق (في طبقات البذور) ويمكن أن تنتقل بسهولة إلى النبات وأيضاً إلى الجذور أثناء الإنبات. أكثر الأمراض المعروفة بتأثيرها الاقتصادي على الحبوب بشكل عام وعلى القمح بشكل خاص هي تلك الأمراض المرتبطة بجنس *Xanthomonas* التي تقتصر عادةً على الممرضات المختلفة من النوع *X. translucens*. لذلك تم تكريس هذا العمل للبحث عن مرض الخط البكتيري الناجم عن *Xanthomonas translucens*، والذي ينشط على الحبوب بواسطة مسببات مرضية مختلفة (*cerealis*، *translucens*، *graminis*، *undulosa*، . . .). تأثير هذه البكتيريا على المحصول كبير جداً. يكون تأثير هذا المرض أكثر أهمية عندما تكون الظروف المناخية مواتية. بالإضافة إلى ذلك، فإن الحفاظ على هذه البكتيريا في البذور، الجذور، وبقايا النبات ونباتات عفوية. . . يشكل خزاناً مهماً لتجديد اللقاح. يتم تحديث التسميات والتصنيفات المثيرة للجدل لأعضاء هذه المجموعة بانتظام. غالباً ما ترتبط هذه المراجعات المستمرة بتطور تقنيات التوصيف الجديدة. يتعلق هذا العمل، من ناحية، بدراسة مرض الخط البكتيري في الحقول. ولهذه الغاية، تم بدأ هذا العمل من خلال مسح لعدد من مناطق إنتاج القمح في الجزائر العاصمة وتبليز والبيورة وبومرداس، بما في ذلك قطع أراضي في منطقة المنية (غرداية) في جنوب البلاد وفي غرب البلاد في منطقة تيارت. تشمل حقول القمح التي تم مسحها محطات تجريبية ومزارع نموذجية وحقول خاصة. كما تضمنت الدراسة أيضاً تحليل نباتات تظهر أعراضاً نموذجية للمرض. فحصت هذه الدراسة أيضاً وجود العامل الممرض والاحتفاظ به على مستوى التربة وأيضاً في مخلفات المحاصيل من المناطق التي ظهرت عليها أعراض مشابهة للهجمات البكتيرية. تم تخصيص جزء من هذا العمل للتحقق من الحالة الصحية، فيما يتعلق بالعامل البكتيري على مستوى كميات معينة من البذور المنتجة والمضاعفة في الجزائر العزل من العينات المختلفة باستخدام التقنيات الموصى بها في كل حالة (البذور ومخلفات المحاصيل والتربة). تم إجراء التحليل على المناطق التي تظهر أعراضاً مشابهة للخطوط البكتيرية أو "القشر الأسود" التي تسببها *Xanthomonas*. يتكون توصيف العزلات من تحديد كيميائي حيوي وجزيئي، كما تم اختبار السلالات من أجل إمرضها. يعتمد التوصيف الجزيئي للسلالات على تحديد السلالات عن طريق تضخيم الجين PCR للتسلسل المحفوظ في أنواع *Xanthomonas* وإكماله من خلال تسلسل جينات معينة تنتمي إلى مخطط MLST الذي أوصى به العديد من الباحثين. تقدم نتائج هذه الدراسة عناصر جديدة تؤكد الوجود غير المتوقع لأنواع *Xanthomonas* التي لم يتم وصفها بعد على القمح، وقدرة هذه الأنواع *Xanthomonas* على التكيف مع مضيفات جديدة وربما تنتقل عن طريق المحاصيل المجاورة أو عن طريق إعادة نمو الحبوب من المحصول السابق، أو عن طريق الحبوب المصاحبة للمحاصيل المتضررة. من ناحية أخرى، قد يؤدي الكشف غير المتوقع عن *Xanthomonas raphani* مع القمح إلى تغيير طريقة إدارة تطور الأمراض التي كانت تعتمد بشكل أساسي على وصف الأعراض. علاوة على ذلك، فإن وجود العديد من أنواع *Xanthomonas* المرتبطة بأنواع *Xanthomonas translucens* من Clade I و *X. campestris* من Clade II، على نفس المضيف، أي القمح، يجعل هذا المحصول ضعيفاً للغاية ويمكن أن يشير إلى أنه يمكن أن يؤدي العديد من مسببات الأمراض مثل النباتات العفوية التي تصاحبها وتلك التي يمكن وضعها في نظام الدوران الخاص بها. تؤكد هذه النتائج أيضاً على الإشارة الأولى للسلالات غير النمطية التي تم تحديدها عموماً في الجزائر، على أساس السمات المظهرية على أنها *Xanthomonas translucens*.

الكلمات الدالة: *X. campestris* / *Xanthomonas translucens* - الخط البكتيري / والقشر الأسود - / القمح

## Abstract

Cereals are monocotyledons belonging to the order *Poales* and the family *Poaceae* or *Gramineae*. They are species characterized by particular botanical criteria. Among cereal species, wheat, the most important resource for human food, with more land on the planet devoted to it than any other crop. Wheat cultivation in Algeria uses both traditional local genotypes and introduced genotypes. The local varieties are known by a rather limited production potential, on the one hand by intense selective pressures, mainly exerted by environmental factors or else linked to the introduction of genotypes known for their high production potential. These genotypes often disappear because of their vulnerability.

Numerous studies have been carried out on the various factors and mainly biotic factors including pests, viral, fungal and especially bacterial diseases of wheat. Cereals are indeed subject to several bacterial diseases, transmitted via several pathways. Among the reservoirs of bacterial inoculum, the seed. The seed is considered as the primary source of pathogens, which can settle on (in teguments) and in the seed and can be easily transmitted to the plant and also to the rhizosphere during germination. The diseases best known for their economic impact on cereals in general and on wheat in particular are those associated with the genus *Xanthomonas* commonly limited to the different pathovars of the species *X. translucens*

This work is therefore dedicated to the search for the bacterial streak disease caused, by *Xanthomonas translucens*, which is active on cereals by various pathovars (*cerealis*, *translucens*, *graminis*, *undulosa*...). The impact of these bacteria on yield is quite significant. The impact of this disease is all the more important under favourable climatic conditions. Also, the conservation of this bacterium in the seed, rhizosphere, plant debris and spontaneous grasses constitutes a significant reservoir for the regeneration of the inoculum. The highly controversial nomenclature and classification of the members of this group is regularly updated. These continual revisions are often linked to the evolution of new characterization techniques.

This work concerns, on the one hand, the study of the bacterial streak disease of wheat in the field. For this purpose, several wheat plots were prospected in Algiers, Tipaza, Bouira, Boumerdes regions, including plots in the region of El Ménéa (Ghardaia) and Tiaret, respectively in the south and west of the country. The wheat fields prospected include experimental stations, pilot farms and private fields. The study also included the analysis of plants showing typical symptoms of the disease

On the other hand, this study also examined the presence and conservation of the pathogen at soil level and also in the crop residues of areas that showed symptoms similar to the bacterial attacks. A part of this work is devoted to the verification of the sanitary state, with regard to the bacterial streak agent of some seed lots produced and multiplied in Algeria. Isolations from the different samples by the techniques recommended in each case (seed, crop residues and soil), in the literature. The analysis is performed on areas with similar symptoms of bacterial streaking or "black chaff" (Smith, 1917; Zillinsky, 1983) caused by *Xanthomonas translucens*. Characterization of the isolates, consists on biochemical and molecular identification and strains were tested for their pathogenicity. The molecular characterization of the strains is based on the identification of strains using PCR (Polymerase Chain Reaction) gene amplification of the sequence conserved in the *Xanthomonas* species and completed by the sequencing of some genes belonging to the MLST scheme recommended by several authors.

The results of this study provide new elements that support the unexpected presence of as yet undiscovered *Xanthomonas* species on wheat, the ability of *Xanthomonas* species to adapt to new hosts and to be eventually transmitted by neighboring crops or by regrowth of plants from previous crops or by volunteer plants accompanying affected crops.

On the other hand, the unexpected detection of the *raphani*-wheat association may change the way of managing the development of diseases that were mainly based on the description of symptoms. In addition, the presence of several *Xanthomonas* species related to Clade I species *Xanthomonas translucens* and Clade II species *X. campestris* on the same host, namely wheat, makes this crop very vulnerable and could suggest that it may harbor as many pathogens as the accompanying volunteer plants and those that could be put in its rotation system.

These results also, underline the first report of the presence of atypical strains generally identified in Algeria, on the basis of phenotypic traits as *Xanthomonas translucens*.

Key words: Wheat/bacterial streaks /"black chaff" /*Xanthomonas translucens*/ *X. campestris*

## Résumé :

Les céréales sont des monocotylédones appartenant à l'ordre des *Poales* et à la famille des *Poaceae* ou *Gramineae*. Ce sont des espèces caractérisées par des critères botaniques particuliers. Parmi les espèces céréalières, le blé est la ressource la plus importante pour l'alimentation humaine, avec plus de terres sur la planète qui lui sont consacrées que toute autre culture. La culture du blé en Algérie utilise à la fois des génotypes locaux traditionnels et des génotypes introduits. Les variétés locales sont connues par un potentiel de production assez limité, d'une part par des pressions sélectives intenses, principalement exercées par des facteurs environnementaux ou encore liées à l'introduction de génotypes connus pour leur fort potentiel de production. Ces génotypes disparaissent souvent en raison de leur vulnérabilité. De nombreuses études ont été menées sur les différents facteurs et principalement sur les facteurs biotiques dont les ravageurs, les maladies virales, fongiques et surtout bactériennes du blé. Les céréales sont en effet sujettes à plusieurs maladies bactériennes, transmises par plusieurs voies. Parmi les réservoirs de l'inoculum bactérien, la semence. La semence est considérée comme la source principale d'agents pathogènes, qui peuvent se fixer sur (dans les téguments) et peuvent être facilement transmis à la plante et aussi à la rhizosphère pendant la germination. Les maladies les plus connues pour leur impact économique sur les céréales en général et sur le blé en particulier sont celles associées au genre *Xanthomonas* communément limité aux différents pathovars de l'espèce *X. translucens* responsable de la strie bactérienne et du Black chaff. Ce travail est donc consacré à la recherche de la maladie de la strie bactérienne causée, par *Xanthomonas translucens*, qui est active sur les céréales par différents pathovars (*cerealis*, *translucens*, *graminis*, *undulosa*...). L'impact de ces bactéries sur le rendement est assez important. L'impact de cette maladie est d'autant plus important que les conditions climatiques sont favorables. De plus, la conservation de cette bactérie dans la semence, la rhizosphère, les débris végétaux et les plantes spontanées constitue un réservoir important pour la régénération de l'inoculum. La nomenclature et la classification très controversées des membres de ce groupe sont régulièrement mises à jour. Ces révisions continuelles sont souvent liées à l'évolution des nouvelles techniques de caractérisation. Ce travail concerne, d'une part, l'étude de la maladie des stries bactériennes du blé en plein champ. A cet effet, plusieurs parcelles de blé ont été prospectées dans les régions d'Alger, Tipaza, Bouira, Boumerdes, dans les régions d'El Ménéa (Ghardaia) et de Tiaret respectivement au sud et à l'ouest du pays. Les champs de blé prospectés comprennent des stations expérimentales, des fermes pilotes et des champs privés. L'étude comprenait également l'analyse de plantes présentant des symptômes typiques de la maladie. Cette étude a également examiné la présence et la conservation de l'agent pathogène au niveau du sol et aussi dans les résidus de culture des zones qui présentaient des symptômes similaires aux attaques bactériennes. Une partie de ce travail est consacrée à la vérification de l'état sanitaire, en ce qui concerne l'agent bactérien au niveau de certains lots de semences produites et multipliées en Algérie, l'isolement au niveau des différents échantillons par les techniques recommandées dans chaque cas (semences, résidus de culture et sol). L'analyse est effectuée sur des zones présentant des symptômes similaires de stries bactériennes ou de "black chaff" (Smith, 1917 ; Zillinsky, 1983) causées par *Xanthomonas translucens*. La caractérisation des isolats, consiste en une identification biochimique et moléculaire et les souches ont aussi été testées pour leur pathogénicité. La caractérisation moléculaire des souches est basée sur l'identification des souches par amplification génique PCR (Polymerase Chain Reaction) de la séquence conservée dans l'espèce *Xanthomonas* et complétée par le séquençage de certains gènes appartenant au schéma MLST recommandé par plusieurs auteurs. Les résultats de cette étude fournissent de nouveaux éléments qui confirment la présence inattendue d'espèces de *Xanthomonas* non encore décrites sur le blé, la capacité de ces espèces de *Xanthomonas* à s'adapter à de nouveaux hôtes et éventuellement transmises par des cultures voisines ou par la repousse des grains du précédent cultural, ou par des grains accompagnant les cultures touchées. D'autre part, la détection inattendue de l'association *raphani* - blé peut modifier la manière de gérer le développement de maladies qui étaient principalement basées sur la description des symptômes. En outre, la présence de plusieurs espèces de *Xanthomonas* liées à l'espèce *Xanthomonas translucens* du Clade I et à l'espèce *X. campestris* du Clade II, sur le même hôte, à savoir le blé, rend cette culture très vulnérable et pourrait suggérer qu'elle pourrait abriter autant d'agents pathogènes que les plantes spontanées qui l'accompagnent et celles qui pourraient être mises dans son système de rotation. Ces résultats soulignent également la première signalisation de souches atypiques généralement identifiées en Algérie, sur la base de traits phénotypiques comme étant *Xanthomonas translucens*.

**Mots clés :** Blé/ Stries bactériennes / "Black Chaff" / *Xanthomonas translucens* / *X. campestris*.