



HAL
open science

Caractérisation d'un groupe de *Pseudomonas syringae* émergent sur kiwi

Pauline Duval

► **To cite this version:**

Pauline Duval. Caractérisation d'un groupe de *Pseudomonas syringae* émergent sur kiwi. [Stage] France. Institut Universitaire de Technologie d'Avignon (IUT d'Avignon), FRA. 2015, 27 p. hal-02800541

HAL Id: hal-02800541

<https://hal.inrae.fr/hal-02800541v1>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



IUT d'Avignon
Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse
337 chemin des Meinajaries
BP 1207
84911 Avignon cedex 9
+ 33 (0)4 90 84 14 00



INRA
Unité de Recherches de Pathologie végétale
Domaine St-Maurice
67 allée des Chênes
84143 Montfavet cedex

Caractérisation d'un groupe de *Pseudomonas syringae* émergent sur kiwi

Présenté par Pauline Duval
Année 2015



Rapport de stage pour l'obtention du DUT Génie Biologique option Agronomie

Maitre de stage : Odile Berge
Tuteur de stage à l'IUT : Michel Jobin



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

REMERCIEMENTS

Je remercie l'INRA et plus précisément l'unité Pathologie Végétale pour son accueil chaleureux et sa gentillesse.

Je tiens adresser un grand merci à ma maitre de stage, Odile Berge, pour son écoute, ses conseils, sa disponibilité et l'aide qu'elle m'a apportée pour le suivi des expérimentations. Entre les différents stagiaires et son travail, elle a su être présente tout au long du stage et je lui en suis très reconnaissante. Je tiens également à la remercier pour son soutien lorsque j'ai passé le concours pour rentrer en école d'ingénieur agronome.

Je souhaite remercier également Charlotte Chandeysson et Caroline Guilbaud pour leur précieuse aide lors des expérimentations mais aussi pour les connaissances techniques qu'elles m'ont apportées. Je tiens à remercier aussi Nathalie Truglio et toute l'équipe serre pour leurs mains vertes. J'ai particulièrement apprécié de suivre avec eux l'évolution des multiples plantes que j'ai exploitées pour mes expérimentations.

J'aimerais de même remercier toute l'équipe bactériologie pour sa bonne humeur et l'intérêt qu'ils ont porté à mon sujet et aux difficultés que j'ai rencontrées. Je me suis sentie très vite intégrée à l'équipe et j'ai pris plaisir à m'intéresser aux différents projets menés par l'équipe.

Je voudrais remercier également mon tuteur de stage, Michel Jobin, et l'IUT d'Avignon de m'avoir laissé l'opportunité de faire ce stage, qui pour moi a été une expérience très enrichissante.

Je remercie enfin toutes les autres personnes qui ont contribué au bon déroulement de mon stage, notamment Benoît et Jean-François pour leur humour et l'ambiance sympathique du bureau, mais aussi les autres stagiaires Cécile, Julie, Lucile et Lucie avec lesquelles j'ai pris plaisir à discuter et à partager mon repas le midi.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1. Structure d'accueil	1
2. Contexte de l'étude	2
2.1 <i>Pseudomonas syringae</i>	2
2.2 La bactériose du kiwi	4
2.3 Projet CASDAR-KIWI	4
2.4 Projet de stage	5
MATERIEL & METHODES	6
1. Origine des souches	6
1.1 Sélection des souches du phylogroupe 13	6
1.2 Caractéristiques des souches témoins	6
1.3 Profil box-pcr des souches utilisées	7
2. Observation des symptômes sur kiwi	8
2.1 Inoculation des kiwis et notation	8
2.2 Modifications de paramètres	9
2.3 Détection	9
3. Etude de la dynamique de croissance bactérienne sur kiwi	9
3.1 Inoculation des kiwis	9
3.2 Dénombrements	10
3.3 Analyses statistiques	10
3.4 Etude de la mobilité de la bactérie	11
4. Réalisation des gammes d'hôtes sur les espèces herbacées	11
4.1 Inoculation	11
4.2 Notation	12
4.3 Détection	12
4.4 Analyses des données	12
5. Tests d'inhibition par des composés phénoliques	12
5.1 Préparation des milieux	13
5.2 Mise en culture et lecture des tests	13
5.3 Exploitation des données	13
RESULTATS & DISCUSSION	15
1. Observation des symptômes sur kiwi	15
2. Etude de la dynamique de croissance bactérienne sur kiwi	17
3. Réalisation des gammes d'hôtes sur les espèces herbacées	18
4. Tests d'inhibition par des composés phénoliques	21

CONCLUSION	23
LISTE DES ABRÉVIATIONS	24
GLOSSAIRE	25
BIBLIOGRAPHIE	26
ANNEXES	28
Annexe 1 : Tableau de résultats de l'obtention des index de résistance aux composés phénoliques des souches du phylogroupe 13	28
Annexe 2 : Tableau représentant la caractérisation phénotypique de 786 souches et la diversité génétique du complexe de <i>P. syringae</i>	29

INTRODUCTION

Dans le cadre du Diplôme Universitaire Technologique Génie Biologique option agronomie, j'ai effectué un stage de 3 mois à l'unité Pathologie Végétale de l'INRA d'Avignon, qui a pour objectif de caractériser un groupe de *Pseudomonas syringae* potentiellement impliqué dans l'émergence de bactérioses sur kiwi.

1. Structure d'accueil

L'Institut National de la Recherche Agronomique est un organisme de recherche publique, créé en 1946 suite au contexte de guerre, où la France connaît de grandes pénuries alimentaires. L'objectif primaire étant de nourrir toute la population afin d'être autosuffisant, l'INRA a développé tout d'abord ses axes de recherche sur l'amélioration et le développement des techniques de production agricole en culture ou en élevage (INRA, 2012a).

Aujourd'hui, l'INRA a pour objectif de chercher de nouveaux systèmes agricoles pouvant nourrir la planète de façon saine et durable, c'est-à-dire de mettre en place des moyens pour créer des systèmes qui sont capables de fournir des produits en quantité et en qualité, tout en protégeant l'environnement et les ressources naturelles mais aussi en palliant la raréfaction des énergies fossiles.

L'INRA fait partie des EPST (Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique). Il est sous la double tutelle du ministère chargé de la Recherche et du ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. L'institut rassemble plus de 8000 agents titulaires répartis sur 17 centres régionaux et le siège social est localisé à Paris. L'INRA établit également de nombreux partenariats scientifiques tels que ceux avec les universités, l'enseignement agronomique et vétérinaire, les centres de recherche internationaux.

L'INRA travaille sur de nombreuses thématiques réparties en 13 départements de recherche qui sont constitués de différentes unités.

Le centre INRA Provence-Alpes-Côte d'Azur résulte de la fusion du centre d'Avignon et de Sophia Antipolis en 2010. Il est tourné principalement vers l'agroécologie des systèmes de culture sous serres et en vergers mais aussi vers la modélisation de l'impact du changement climatique à l'échelle du paysage (INRA, 2012b).

L'Unité Pathologie Végétale appartenant au département Santé des Plantes et Environnement (SPE) et situé sur le domaine St-Maurice de l'INRA d'Avignon, a pour objectif de développer des méthodes de contrôle efficaces et raisonnées des maladies des plantes dans le cadre d'une agriculture durable et de qualité. Elle focalise ses travaux de recherche principalement sur les

maladies virales, fongiques et bactériennes des espèces maraîchères ou arboricoles méditerranéennes, mais aussi sur le chancre coloré du platane ou encore les maladies virales des plantes ornementales (Morris, 2014). Plusieurs thématiques de recherche y sont développées :

- Mise au point d'outils de diagnostic fiable et efficace des maladies ;
- Prédiction des maladies émergentes par la compréhension de l'écologie et de l'évolution des agents phytopathogènes ;
- Caractérisation et déploiement de variétés résistantes durables aux maladies ;
- Développement et stratégie d'utilisation d'agents de contrôle biologique.

L'Unité Pathologie Végétale est constituée de 2 équipes de recherche : l'équipe « Virologie » et l'équipe « MISTRAL » résultant de la fusion de l'équipe « Bactériologie » et l'équipe « Mycologie ». L'équipe « MISTRAL Bactériologie » avec laquelle j'effectue mon stage étudie davantage la bactérie *P. syringae*. Elle mène ses travaux avec une approche écologique, elle s'intéresse particulièrement à l'environnement de la bactérie et les écosystèmes avec lesquelles elle interagit.

2. Contexte de l'étude

2.1 *Pseudomonas syringae*

P. syringae est une bactérie connue pour ses propriétés pathogènes chez les plantes. Déjà identifiée sur plus de 400 espèces végétales, la bactérie est un véritable bioagresseur aussi bien pour les cultures maraîchères, les céréales, les vergers arboricoles mais aussi pour les plantes ornementales (Bradbury, 1986). Elle n'entraîne pas forcément la mort des plantes infectées, elle se manifeste le plus souvent par des chancres, des nécroses foliaires ou tissulaires (Gaignard et Luisetti, 1993). Elle affecte ainsi considérablement la qualité de la production et est responsable de pertes agricoles et économiques conséquentes.

P. syringae possède de nombreux atouts impliqués dans son caractère pathogène. Ses propriétés glaçogène ou épiphyte* renforce son agressivité. En effet, les souches glaçogènes ont la capacité d'augmenter la température du point de congélation de l'eau et provoquent donc la destruction de cellules qui deviennent disponibles pour le développement bactérien à des températures où le végétal est normalement capable de résister au gel. De même, son caractère épiphyte lui permet de subsister au niveau de la phyllosphère*, elle devient ainsi un risque de source d'inoculum infectieux pour la plante (Hirano et Upper, 2000). De même, *P. syringae* possède un système de sécrétion de type III* capable d'injecter des protéines effectrices dans les cellules de la plante et ainsi de contourner très facilement son système immunitaire. La bactérie peut également attaquer la plante par synthèse de phytotoxines, de phytohormones et d'enzymes pectinolytiques* ou celles dégradant les composés phénoliques.

Depuis une dizaine d'années, *P. syringae* est devenu un agent pathogène majeur pour les plantes ornementales et les arbres fruitiers, en causant d'énormes dégâts sur des plantes telles que le marronnier, le noisetier et le kiwi en plus de son importance historique sur les espèces de *Prunus* (abricotier, pêcher, prunier et cerisier). Actuellement la gestion et la prédiction de maladies par *P. syringae* chez les plantes représentent un enjeu majeur pour de nombreux scientifiques. Beaucoup de recherches portent sur l'interaction plante-bactérie dans le contexte agricole afin de mieux comprendre les paramètres génétiques ou biologiques impliqués dans l'émergence de maladies. L'équipe MISTRAL, elle, s'est intéressée particulièrement à l'environnement de la bactérie et ses interactions dans les écosystèmes plus naturels. L'équipe l'a isolée ainsi dans de nombreux substrats environnementaux non agricoles tels que des plantes sauvages, des litières, des prairies alpines mais aussi à des substrats liés au cycle de l'eau (Morris et al., 2013) tels que l'eau de source, l'eau de torrent, l'eau de montagne, l'eau de rivière ou l'eau d'irrigation, la neige, les précipitations (Fig. 1). Elle jouerait également un rôle dans le phénomène des bioprécipitations* (Morris et al., 2014), ce qui est un atout supplémentaire pour se propager rapidement dans l'environnement et s'adapter à de nouveaux milieux. La diversité des niches écologiques explique les différentes évolutions de *P. syringae* et fournit de véritables réservoirs pour de potentielles émergences.

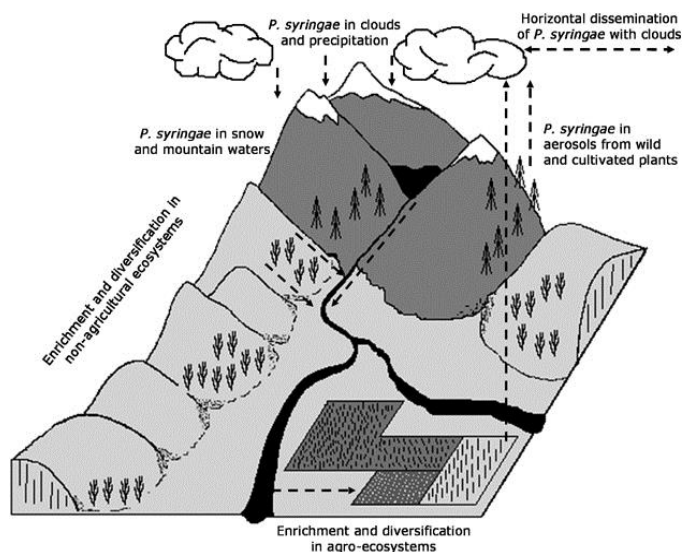


Figure 1: *Pseudomonas syringae* dans l'environnement (Morris et al., 2008)

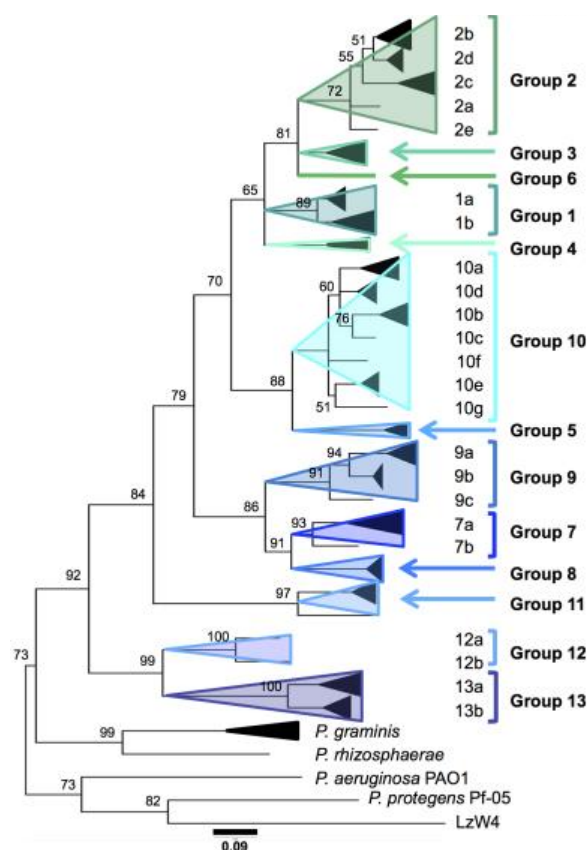


Figure 2 : Arbre phylogénétique construit à partir des gènes *cts*, *rpoD*, *gyrB* et *gapA* par méthode MLST (Berge et al., 2014)

P. syringae comprend une grande variabilité génétique. Certaines classifications existent, notamment celle des pathovars qui désigne des sous-espèces à partir des caractères pathogènes communs des souches bactériennes* et permet d'indiquer ainsi la gamme d'hôte relative à la souche (Gaignard et Luisetti, 1993). Néanmoins, ces classifications sont incomplètes, elles concernent seulement les souches pathogènes, ce qui a amené l'équipe MISTRAL à proposer une nouvelle classification incluant les souches environnementales qui ne sont pas systématiquement pathogènes. Cette classification (Berge et al., 2014) est basée sur l'analyse phylogénétique via la méthode MLST (MultiLocus Sequence Typing) à partir de 4 gènes constitutifs* du génome de *P. syringae* : les gènes *cts*, *rpoD*, *gyrB* et *gapA*. Cette classification dénombre 13 phylogroupes et 23 clades (Fig. 2).

2.2 La bactériose du kiwi

La culture du kiwi est très récente en Europe et connaît un fort essor ; dans le commerce, la variété Hayward est la plus cultivée. En 2008, une épidémie de *P. syringae* touche sévèrement les vergers d'Italie, premier exportateur mondial de kiwis, puis la France, l'Espagne, le Portugal mais aussi l'Australie et la Nouvelle-Zélande où la production de kiwi est le pilier économique de l'agriculture du pays (Bartoli et al., 2015). Les souches fréquemment identifiées dans ces épidémies appartiennent au phylogroupe 1 où elles forment un sous-groupe très homogène. D'autres souches sont répertoriées pathogènes comme des souches des phylogroupes 2 et 7 (Berge et al., 2014). La culture du kiwi étant toute nouvelle, peu d'études sur le kiwi existent. La recherche de solutions et de moyens de lutte progresse peu à peu.

2.3 Projet CASDAR-KIWI

En France, un projet gouvernemental de financement de recherche CASDAR-KIWI a été créé pour 2013-2015 afin d'améliorer des moyens de lutte contre ce pathogène dans les vergers français de kiwis. Six partenaires participent à ce projet : les centres de recherche de l'INRA d'Avignon dont l'équipe MISTRAL, et de l'ANSES, et les centres expérimentaux du CTIFL, de SEFRA, de FREDON Aquitaine et de l'INVENIO (ACTA and CTIFL, 2014).

Les objectifs principaux sont :

- d'évaluer la sensibilité des variétés de kiwi aux souches épidémiologiques mais aussi aux souches environnementales potentiellement émergentes
- d'étudier les structures biologiques et écologiques de la bactérie afin d'évaluer l'efficacité de différentes stratégies de lutte
- d'adapter et fiabiliser les outils de diagnostic.

Le laboratoire MISTRAL est ainsi impliqué davantage dans le premier objectif où s'inscrit le sujet de mon stage : caractérisation du phylogroupe 13 émergent sur le kiwi.

2.4 Projet de stage

Le phylogroupe 13 a été décrit tout d'abord dans des substrats environnementaux et ce groupe de souches ne comprenait pas de souches pathogènes. En effet, elles ne produisent pas de réaction d'hypersensibilité sur tabac, test indicateur du caractère pathogène et possèdent un système de sécrétion de type III atypique, peu efficace (Berge et al., 2014). Elles ne sont ni glaçogènes et ne produisent pas de toxine.

Plus récemment, des souches du phylogroupe 13 ont été isolées sur des arbres du kiwi contaminés de la bactériose en 2013 et 2014, ce qui a amené l'équipe à étudier davantage les fonctionnalités de ce phylogroupe afin de soumettre l'idée de leur rôle dans l'émergence de la bactériose.

L'objectif de mon stage est donc d'étudier les différents paramètres impliqués dans le caractère de pathogénécité de ces nouvelles souches du phylogroupe 13. Je suis amenée tout d'abord à observer l'évolution de symptômes sur des plants de kiwi inoculés afin de montrer si ces souches sont pathogènes. J'étudie également dans une autre expérimentation la dynamique de population de certaines souches sur des plants de kiwi afin de savoir si ces souches sont capables de coloniser les zones internes du végétal. Par ailleurs, je mène des expérimentations de gamme d'hôte afin d'étudier le pouvoir pathogène de ces souches sur diverses espèces végétales et la spécificité plante/ bactérie. Enfin, j'ai réalisé des tests d'inhibition de croissance par des composés phénoliques, molécules de défense chez les végétaux afin de savoir si les souches du phylogroupe 13 sont capables d'y résister.

MATERIEL & METHODES

1. Origine des souches

1.1 Sélection des souches du phylogroupe 13

La collection de l'équipe Mistral de l'INRA d'Avignon comprend 113 souches apparentées au phylogroupe 13. Six souches (tableau 1) ont été sélectionnées pour les différentes expérimentations de façon à représenter la diversité phylogénétique du phylogroupe mais aussi des habitats. La souche UB0246 nous intéresse particulièrement puisque Claudia Bartoli, ancienne doctorante à l'équipe MISTRAL avait observé des symptômes sur kiwi inoculés avec cette souche, sous serre en 2014.

Tableau 1 : Caractéristiques des souches du phylogroupe 13 sélectionnées pour l'étude.

Souche	Provenance	Echantillon d'origine	Localisation	Année
CB12	Verger kiwis	Rameau mort	Beaumont-Monteaux (26)	2013
CB16	Verger kiwis	Feuilles de rameau sur branche malade	Châteauneuf sur Isère (26)	2013
CB20	Verger kiwis	Bourgeon de tige, rameau sain, arbre sain	Beaumont-Monteaux (26)	2013
CCE0076	Eau torrent		Ceillac (05)	
K4.02.03A.23	Verger kiwis	Bourgeon de feuille, arbre contaminé	Châteauneuf sur Isère (26)	2014
UB0246	Eau torrent		Ubaye (05)	

1.2 Caractéristiques des souches témoins

La souche NCPPB 2445 est utilisée comme témoin neutre pour les différentes expérimentations. Diverses souches ont été également utilisées comme témoins positifs (tableau 2), notamment la souche épidémique de la bactériose du kiwi, la plus répandue (CFBP7286). Cette souche nommée *P. syringae* pv *actinidiae*, appartient au phylogroupe 1 et elle a été identifiée la première fois dans les vergers du cultivar Hayward en Italie. Elle est détectée dans tous les pays atteints de bactérioses où elle cause de sérieux dégâts dévastateurs.

Tableau 2 : Caractéristiques des souches témoins

Souche	Identification	Phylogroupe de <i>P. syringae</i>	Année d'isolement	Isolement	Localisation
NCPPB2445	<i>P. corrugata</i>		1972	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Royaume-Uni
CFBP7286	<i>P. syringae</i>	1	2008	Kiwis malades	Italie (Lazio)
CC1582	<i>P. syringae</i>	7	2006	Biofilm épilithe	France (05)
CFBP1754	<i>P. syringae</i>	2	1973	<i>Malus sylvestris</i>	Canada
CFBP1702	<i>P. syringae</i>	1	1978	<i>Viburnum</i> sp. ()	USA
41A	<i>P. syringae</i>	2		Abricotier malade	France (26)

1.3 Profil box-pcr des souches utilisées

Les profils box-pcr sont des empreintes génétiques permettant de distinguer des souches entre-elles. Cette technique nécessite seulement une amorce qui correspond à la séquence nucléotidique d'une séquence répétée du génome bactérien. On obtient alors par PCR plusieurs bandes de taille différente séparées par électrophorèse qui forment un profil spécifique à la souche.

Ces empreintes sont réalisées dans le but de vérifier le cycle de Koch. En effet, lors des différentes inoculations effectuées pendant les expérimentations, la comparaison des profils box-pcr des souches isolées à partir des symptômes et des souches initiales inoculées permet de confirmer si la souche initiale est bien responsable des symptômes.

Les box-pcr sont réalisées avec le kit *Multiplex Quiagen* (référence 206143). Pour un échantillon, 12.5 µL de solution 2Xquiagen ;

3' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG – 5'

Figure 3: Séquence nucléotidique du primer Box A1R

0.5 µL de solution du primer Box A1R (Fig. 3)

à 100 pMol/ µL ; 7.5 µL d'eau milliQ et 2.5 µL de solution Q sont ajoutés pour la préparation du « mix », puis 2 µL de suspension bactérienne ajustée à 10⁸ CFU/mL par mesure d'absorbance (580 nm).

Le programme du thermocycleur comprend une 1^{ère} étape de 15 min à 96°C ; une 2^{ème} étape constituée d'une 1^{ère} phase d'une minute à 94°C, d'une 2^{ème} phase d'une minute à 53°C et d'une 3^{ème} phase de 8 minutes à 65°C. Cette 2^{ème} étape est répétée 29 fois, puis intervient une 3^{ème} étape de 10 minutes à 65°C et enfin une dernière étape à 10°C.

La PCR une fois terminée, 3µL de tampon de charge sont ajoutés par échantillon. Celui-ci est alors déposé sur un gel d'agarose à 1.5 % et à 1% de BET avec des puits de 0,75 mm d'épaisseur. Les marqueurs 100 pb et 1kb sont également déposés sur le gel. La migration du gel s'effectue à 75 volts pendant 1 heure.

Les profils de chaque souche présentent des bandes suffisamment différentes pour identifier les souches isolées suite à l'expérimentation (Fig. 4).

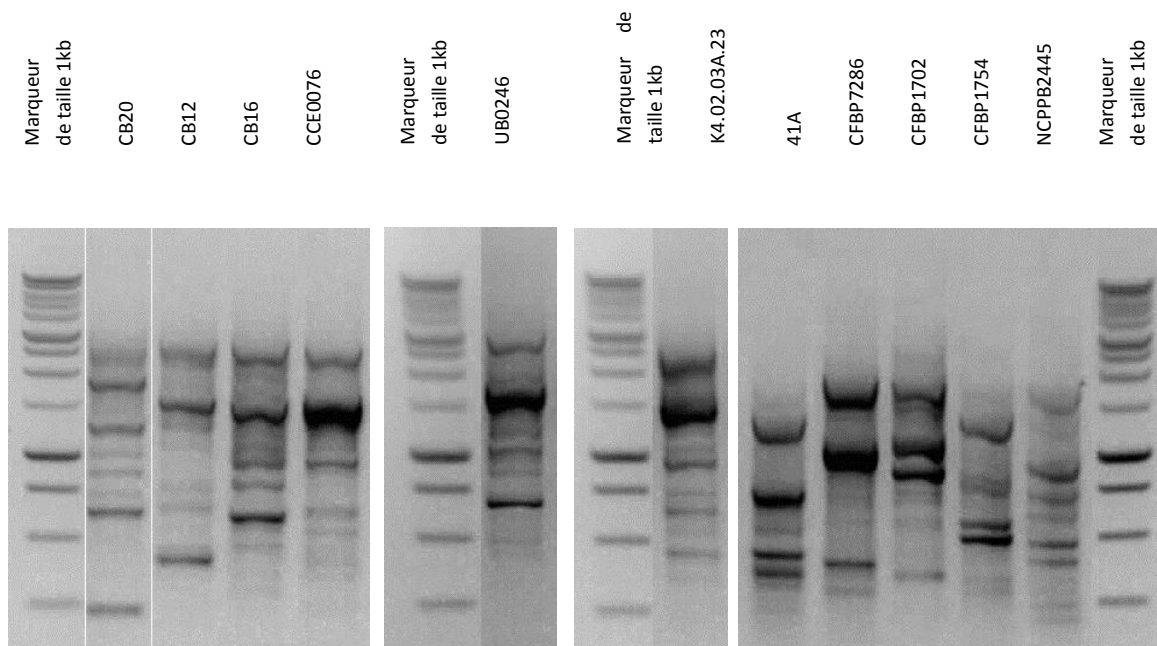


Figure 4 : Empreintes génétiques réalisées par BOX-PCR des souches utilisées pour inoculer les plantes

2. Observation des symptômes sur kiwi

2.1 Inoculation des kiwis et notation

Ces travaux font suite à ceux de Claudia Bartoli, ex doctorante au laboratoire et qui avait observé des symptômes sur kiwis suite à l'inoculation de la souche UB246. Différentes conditions d'expérimentations seront testées pour tenter de reproduire ce résultat et connaître les facteurs de déclenchement du pouvoir pathogène chez cette souche ainsi que celles du phylogroupe 13. Nous travaillons pour cette expérimentation avec les six souches du phylogroupe 13 sélectionnées. La CFBP 7286 est utilisée comme témoin positif, la souche NCCPB 2445 comme témoin neutre et l'eau comme témoin négatif. Le témoin neutre permet de voir si la présence de bactéries non pathogènes a un impact supplémentaire à l'eau sur les plants de kiwi. Trois plants femelles de kiwi de la variété Hayward au stade 4-5 feuilles (Fig. 5) sont inoculés par type de souche, soit 27 plants au total.



Figure 5 : Plants de kiwi au stade 4-5 feuilles. Arrière fond : système de cooling.

Les plants sont blessés superficiellement à l'aide d'une seringue au niveau de l'aisselle d'une feuille. Une goutte de 10 μ L de suspension bactérienne à 10^6 CFU/mL y est alors déposée. Du parafilm est ensuite ajouté autour de la tige au niveau du point d'inoculation.

Les kiwis sont exposés sous serre près du système de cooling* de celle-ci, de façon à ce qu'ils soient dans des conditions fraîches et humides, conditions favorables au développement de *P. syringae*.

Les symptômes sont décrits qualitativement tous les 7 jours pendant 3 semaines.

2.2 Modifications de paramètres

Une seconde inoculation a été effectuée sur les plants de kiwi déjà inoculés à l'aisselle d'une autre feuille afin de tester l'effet d'une concentration plus élevée (10^8 CFU/mL) sur le développement des symptômes.

Une 3^{ème} inoculation à 10^8 CFU/mL a été également réalisée. Les plants de kiwi ont été cette fois-ci installés sous un dispositif de tentes (Fig. 6) pour tester une hygrométrie à 100%, favorable au développement des symptômes.



Figure 6 : Dispositif de tentes

De nouveaux plants de kiwi ont été inoculés à 10^8 CFU/mL et exposés en chambre climatique de culture (Fig. 7) pour tester des conditions qui combinent une hygrométrie élevée et une température plus tempérée que sous la « tente ». La chambre de culture est régulée avec 14 heures d'éclairage à 22°C et 10 heures d'obscurité à 20°C et 85% d'hygrométrie.



Figure 7 :
Chambre climatique avec
éclairage à LED

2.3 Détection

Les tiges de kiwi sont désinfectées dans un bain de solution d'hypochlorite de sodium à 4° chlorométrique pendant une minute puis sont rincées à l'eau stérile pour enfin être séchées. Le tissu interne du point d'inoculation est prélevé à l'aide d'outils stériles pour être broyé avec 500 μ L d'eau stérile. A partir du broyat obtenu, une goutte est étalée par stries sur un milieu TSA $1/10^{\text{ème}}$ + cycloheximide à 80 mg/L. Les milieux sont alors incubés à 25°C pendant 48 heures. Les colonies isolées à partir de ces milieux sont ensuite analysées par box-pcr pour comparer leurs profils à ceux des souches initiales inoculées.

3. Etude de la dynamique de croissance bactérienne sur kiwi

3.1 Inoculation des kiwis

Trois souches du phylogroupe 13 ont été choisies parmi les six : les souches UB0246, K4.02.03A.23 et CB12. L'eau représente le témoin négatif, la souche NCCPB 2445 est utilisée en tant que témoin neutre et la souche CFBP 7286



Figure 8 : Plants de kiwi au stade 10-15 feuilles sous un dispositif de tentes

en tant que témoin positif. Neuf plants de kiwi au stade 10-15 feuilles sont inoculés par type de souche (Fig. 8).

Les plants sont blessés de la même façon que l'expérimentation précédente au niveau de l'aisselle d'une feuille puis inoculés d'une goutte de 20 µL de suspension bactérienne à 10⁵ CFU/mL. La zone d'inoculum est ensuite entourée de parafilm sans que celui-ci touche la goutte.

Les plants de kiwi sont ensuite disposés sous un dispositif de tentes comprenant des aquanappes* de façon à obtenir une hygrométrie de 100%.

3.2 Dénombrements

Pour chaque type de souche, les tiges de trois arbres sont prélevées à 7, 14 et 21 jours après l'inoculation. Ces tiges sont désinfectées dans un bain de solution d'hypochlorite de sodium à 4° chlorométrique pendant une minute puis sont rincées à l'eau stérile pour être séchées.

La zone du point d'inoculation est ensuite prélevée à l'aide d'outils stériles, la masse de tissu est alors pesée puis broyée avec 500 µL d'eau stérile. Les dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁶ sont ensuite réalisées à partir du broyat obtenu. Trois gouttes de 20 µL de chaque dilution, sont déposées sur un milieu TSA 1/ 10^{ème} additionné d'un antifongique, la cycloheximide (80 mg/L), puis étalées par basculement vertical. Les milieux de culture sont incubés à température ambiante (environ 25°C) pendant 48 heures.

Pour la préparation du milieu de culture, le milieu TSA 1/10^{ème} + cycloheximide à 80 mg/L comprend pour un litre d'eau permutée : 3 g de TSA et 15 g d'agar. La cycloheximide est ajoutée après le passage à l'autoclave à la concentration voulue.

Les colonies sont ensuite dénombrées pour chaque dilution.

3.3 Analyses statistiques

Via le logiciel Excel, la moyenne des colonies dénombrées sur les trois gouttes étalées est réalisée pour chaque dilution. Le nombre de bactéries par la masse de tissu prélevé est ensuite calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Nombre de bactéries par masse de tissu prélevé} = \frac{V \text{ total d'eau}}{V \text{ goutte}} \times f \times N \times \frac{1}{m}$$

Avec :

- $V \text{ total d'eau}$ = volume d'eau ajouté au broyat (500 µL)
- $V \text{ goutte}$ = volume de la goutte (20 µL)
- f = facteur de dilution
- N = nombre moyen de bactéries dénombrées
- m = masse de tissu prélevé pour le broyat en gramme

Une moyenne des valeurs trouvées par les différentes dilutions est effectuée pour chaque souche. Une transformation logarithmique est ensuite appliquée.

Les données sont alors traitées avec le logiciel statistique R version 3.2.1 et l'interface RStudio version © 2009-2015 RStudio, Inc. La normalité des données a été analysée avec le test Shapiro et l'homogénéité des variances avec le test Bartlett. Lorsque ces tests ont été positifs, une anova 1 a été réalisée afin de comparer significativement la croissance des différentes souches. Si ce n'est le cas, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été effectué. En cas de différence significative, le test post-hoc TukeyHSD a été réalisé pour identifier les souches significativement différentes lorsque les données étaient normales.

3.4 Etude de la mobilité de la bactérie

Lors des prélèvements des points d'inoculation, des portions de tige déshabillée de leur tissu externe sont également prélevées à 5 et 7 cm en dessous et au-dessus de la zone du point d'inoculation pour être ensuite mis en culture sur un milieu TSA 1/10^{ème} + cycloheximide à 80 mg/L. Les milieux de culture sont également incubés à température ambiante pendant 48 heures.

Les bactéries présentes en milieux de culture sont ensuite mises en plaque afin d'être identifiées ou non par box-pcr.

4. Réalisation des gammes d'hôtes sur les espèces herbacées

4.1 Inoculation

Cette expérimentation reprend les travaux du scientifique Jay Ram Lamichhane qui a étudié l'interaction bactérie/ plante de nombreuses souches de *P. syringae*, appartenant à différents phylogroupes. Six espèces annuelles parmi celles testées par M. Lamichhane et représentant l'étendue de ses résultats, ont été sélectionnées pour notre expérimentation. Il s'agit des espèces *Cucumis melo* cultivar Vedrantaïs ; *Vicia Faba* cultivar Agua Dulce ; *Spinacia oleracea* cultivar Giant d'hiver, *Helianthus annuus* cultivar Solarius, *Solanum lycopersicum* cultivar Monalbo et *Sinapis alba* cultivar Bladue Architect. Ces espèces sont inoculées à une vingtaine de jours après la date de semis.

Les souches du phylogroupe 13, UB0246, K4.02.03A.23 et CB12 ont été sélectionnées pour cette expérimentation. Les souches CFBP 7286, CFBP 1702, CFBP 1754, CC1582 et 41A sont utilisées comme témoins positifs, l'eau comme témoin négatif et la souche NCCPB 2445 comme témoin neutre.

Quatre plants de chaque espèce herbacée sont inoculés par type de souche. Trois lésions espacées de 5 cm sont effectuées sur la tige du végétal. Une goutte de 10 µL d'une suspension bactérienne à 10⁸ CFU/mL est déposée sur chaque lésion ; une dizaine de gouttes de 10 µL est

également déposée sur la surface supérieure d'une feuille non blessée. Les espèces sont placées en serre pendant une quinzaine de jours.

4.2 Notation

Une grille de notation (tableau 3) a été établie pour quantifier les symptômes observés sur les plants. Les notations de symptômes sont relevées à 5, 10 et 15 jours après l'inoculation pour chaque espèce.

Tableau 3 : Grille de notation des symptômes sur espèces annuelles

Note	Symptômes	Caractéristiques
4	Symptômes très sévères	> 10 lésions par feuille et/ou nécrose sur tige (>10 mm)
3	Symptômes sévères	> 10 lésions par feuille et/ou nécrose sur tige (5-10 mm)
2	Symptômes modérés	5- à 10 lésions par feuille et/ou nécrose sur tige (<5 mm)
1	Faibles symptômes	< 5 lésions/ feuille et absence de symptômes sur tige
0	Absence de symptômes	Feuilles et tige saines

4.3 Détection

Les tiges comprenant les trois points d'inoculation sont prélevées pour être découpées de façon longitudinale afin d'observer la vascularisation interne de la bactérie. Le tissu de la zone du point d'inoculation est ensuite prélevé dans 500 µL d'eau stérile pour être broyé. Une goutte du broyat est ensuite étalée par stries sur milieu TSA 1/10^{ème} + cycloheximide à 80 mg/L. Les milieux de culture sont alors incubés à 25°C pendant 48 heures. Le profil de colonies isolées est alors réalisé par box-pcr puis comparé avec celui des souches initiales inoculées afin de vérifier le cycle de Koch.

4.4 Analyses des données

L'analyse des données se porte seulement sur les notations relevées à 15 jours après l'inoculation. Une moyenne des 4 répliques est réalisée pour chaque souche est espèce végétale. Les données sont répertoriées dans un tableau.

5. Tests d'inhibition par des composés phénoliques

Les végétaux utilisent de nombreux composés phénoliques comme moyen de défense contre les microorganismes tels que les champignons ou les bactéries, en particulier les ligneux. Certaines bactéries possèdent des gènes spécifiques pour contourner ce système de défense, appelés parfois *woody genes*. Grâce à ces gènes, elles sont capables soit de dégrader les composés phénoliques et de les utiliser pour leur croissance, soit de les détoxifier sans les assimiler ce qui leur permet de survivre dans la plante. Dans les deux cas, elles ont un atout supplémentaire pour être potentiellement pathogènes. L'utilisation de milieux avec une source

de carbone contenant des composés phénoliques permet de savoir si ces composés phénoliques inhibent ou non la croissance des bactéries et donc d'avoir un indicateur sur la capacité des souches à résister à ces composés phénoliques.

5.1 Préparation des milieux

Quatre composés phénoliques sont testés à des concentrations différentes : l'acide gallique à 50, 30, 20, 10 mg/L ; l'acide tannique à 100, 50, 30 mg/L ; l'acide caféique à 100, 50 mg/L ; la myricétine à 10, 1 mg/L.

Un milieu minimum est préparé en amont de l'ajout de ces composés phénoliques. Il contient pour un litre d'eau permutée : 5 g de KH_2PO_4 ; 1,5 g de K_2HPO_4 ; 1 g de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; 0,33 g de MgCl_2 et 0,1 g de NaCl ; 15 mL de glycérol et 15 g d'agar. Le pH doit être ajusté à 6,5. Le milieu est ensuite stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 30 minutes. Une solution contenant 1g/L de glucose précédemment filtré à 0,22 microns est ensuite ajouté au milieu stérilisé. Les composés phénoliques sont alors ajoutés afin d'obtenir les concentrations voulues. Les milieux sont coulés dans des petites boîtes de Petri. Onze types de milieux phénoliques sont ainsi réalisés, ainsi qu'un milieu minimum sans composés phénolique qui sert de témoin.

5.2 Mise en culture et lecture des tests

Une grande partie de la collection des souches du phylogroupe 13 de l'équipe Mistral ont déjà été testées (C. Bartoli, communication personnelle). Trente-sept souches non encore analysées sont ici testées sur les différents milieux phénoliques préparés. La souche CCE0668 sert de témoin positif et la souche CFPB 4097, de témoin négatif.

Une goutte de suspension bactérienne à 10^8 CFU/ mL ($A_{580\text{ nm}} = 0,06$) est déposée pour chaque boîte de milieu de culture. Les boîtes sont conservées à température ambiante à l'obscurité.

Les lectures des tests se font 5 jours après la mise en culture puis toutes les semaines pendant 3 semaines. Le témoin glycérol indique si la souche est capable de pousser sur le milieu minimum. La présence de colonies sur les différents milieux phénoliques indique que la souche n'est pas inhibée par ceux-ci et vice-versa. Tous les résultats sont alors répertoriés dans un tableau.

5.3 Exploitation des données

Pour chaque souche et type de composés phénoliques, la concentration maximum de croissance est notée. Un index d'utilisation des composés phénoliques est ensuite calculé via l'utilisation du logiciel Excel de la façon suivante :

$$I_{souche} = \sum \frac{\text{Concentration maximum de croissance}}{\text{Concentration maximum testée}} \text{ composé phénolique}$$

Cet indice varie de 0 à 4. Les indices de souches déjà testées sont ajoutés aux indices calculés. Une comparaison des indices de chaque souche est réalisée en fonction des substrats d'origine des souches ou de leur sous-groupe via le logiciel R suivant le même raisonnement du paragraphe 3.3. Des boîtes à moustaches représentant les index d'utilisation par phylogroupe sont également réalisés.

RESULTATS & DISCUSSION

1. Observation des symptômes sur kiwi

Lors de la première expérimentation, l'observation des témoins à 14 jours après l'inoculation (Fig. 9) montre une phase de cicatrisation des blessures pour les témoins négatif et neutre alors que pour le témoin positif, nous observons une zone brune nécrosée se former autour du point d'inoculation. Les souches du phylogroupe 13 (Fig.10) sont comparables aux témoins neutre et négatif, nous observons seulement des cicatrisations. Par la suite, il y a eu peu de changements, les cicatrisations ont continué d'avancer (Fig. 9 ; 1' et 2'), nous avons observé également la tombée de la feuille d'inoculation chez les témoins positifs à partir de 45 jours après l'inoculation.

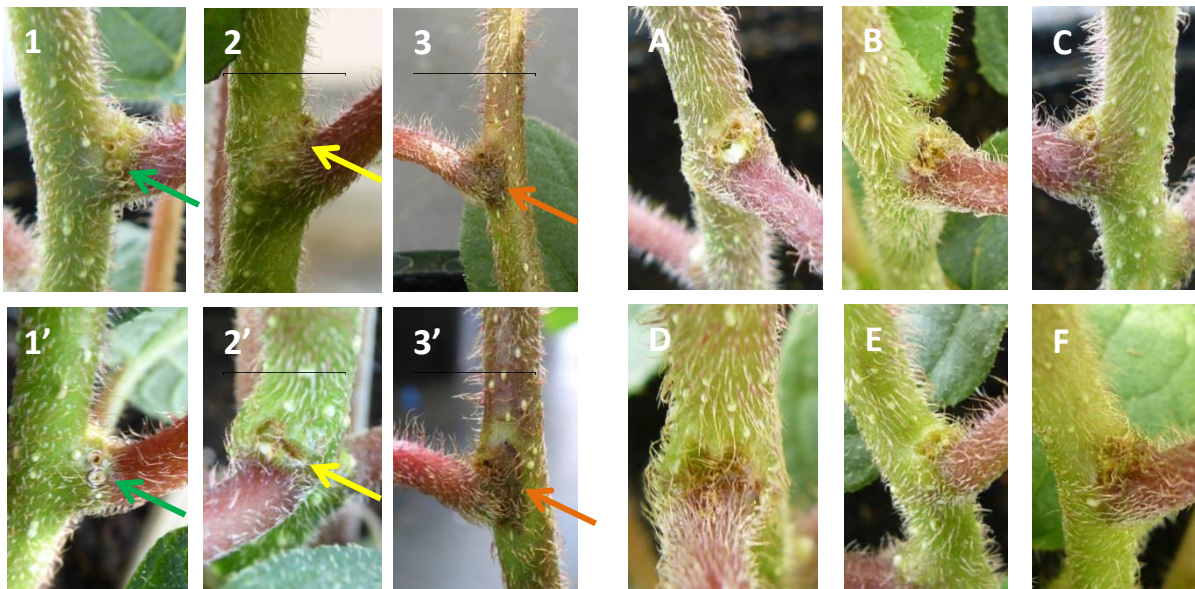


Figure 9 : Observation des points d'inoculation des témoins à 14 et 21 jours (') après inoculation ; (1) Eau – témoin négatif ; (2) NCPPB 2445 – témoin neutre ; (3) CFBP 7286 – témoin positif

Figure 10 : Observation des points d'inoculation des souches du PG13 à 14 jours après inoculation ; (A) UB0246 ; (B) CB12 ; (C) CB16 ; (D) CB20 ; (E) CCE0076 et (F) K4.02.03A.23

La souche CFBP 7286 a provoqué des symptômes, l'expérience a donc bien fonctionné. Cependant, nous attendions des symptômes plus importants avec la souche UB0246 comme ceux obtenus en 2014 par C. Bartoli (communication personnelle), ce qui nous a amené à effectuer d'autres inoculations en changeant différents paramètres. En effet C. Bartoli avait déjà observé que le résultat de l'inoculation d'UB0246 au kiwi était variable, provoquant ou non des symptômes importants.

Nous n'avons pas observé de symptômes lors des deuxième et troisième inoculations. Les observations sont similaires à la première inoculation, les symptômes émis par le témoin positif CFBP 7286 sont même plus réduits que la première fois. Il en est de même pour les plants de kiwi disposés en chambre de culture.

Cette souche CFBP 7286 a fait pourtant des ravages en vergers de culture, elle est connue pour se propager et agir très rapidement. Les conditions environnementales sous serre sont bien différentes de celles des vergers où les plants de kiwi sont confrontés aux aléas climatiques tels que le vent, la pluie, le soleil, le gel et les changements brutaux de température ou d'humidité et à des conditions édaphiques différentes. De plus, des temps de latence d'un an ou plus ont été observés aux champs, c'est-à-dire que la bactérie est présente sur les arbres sains et attend les conditions idéales pour se développer. Cet intervalle de temps rajoute une difficulté supplémentaire pour interpréter les résultats et caractériser une souche pathogène.

Nous maîtrisons encore très mal les conditions nécessaires au développement de cette bactérie. L'humidité est un facteur apparemment important pour le développement de *P. syringae* d'après Joël Vanneste spécialiste de la bactériose du kiwi en Nouvelle Zélande, (Vanneste et al., 2012). Le dispositif de tentes avec les aquanappes permet de saturer l'atmosphère en vapeur d'eau pour obtenir une hygrométrie de 100% ; toutefois cette année, les températures des mois de juin et juillet dépassaient fréquemment les 30°C sous serre. Or, les populations de *P. syringae* chutent lorsque les températures sont supérieures à 25°C (Serizawa et Ichikawa, 1993). La température idéale de développement des symptômes par la bactérie est aux alentours de 20°C, ce qui expliquerait l'absence de symptômes lors de l'inoculation sous les dispositifs de tentes.

Claudia Bartoli avait réussi à obtenir des symptômes avec la souche UB0246 en juin 2014. Nous avons mené notre expérience à la même période afin d'être dans les conditions les plus similaires possibles. Nous avons donc voulu comparer les relevés de températures entre 2014 et 2015 afin de savoir si ce paramètre diffère fortement. Le tableau 4 nous confirme que ce n'est pas le cas.

Tableau 4 : Relevé des températures en serre JT Provence où ont été disposés les plants de kiwi

	Semaine	T mini	T maxi	Tm nuit	Tm jour	HR mini	HR maxi
Année 2015	24	20	36	-	-	70	100
	25	19,5	32,5	21,5	27,5	74	100
	26	20	33	21,5	27,5	55	100
Année 2014	24	18	34	22	27	40	100
	25	15	32	20	25	30	100
	26	19	33	22	26	30	100

T : température ; mini : minimale ; maxi : maximale ; m moyenne ; HR : humidité relative

Les essais en chambre climatique à 22°C ont également abouti à de très faibles symptômes avec la souche CFBP 7286 et pas de symptômes avec les autres souches. Le paramètre de la température reste insuffisant, d'autres sont certainement en jeu. Les souches du phylogroupe 13 semblent dans nos conditions, non pathogènes pour les plants de kiwi.

2. Etude de la dynamique de croissance bactérienne sur kiwi

La comparaison des abondances des souches à 7, 14 et 21 jours après inoculation révèle quelques différences, toutefois non significatives au risque 5 % à 7 ($F = 0,87$ et $P = 0,52$) et 14 ($\chi^2 = 2,23$ et $P = 0,69$) jours après inoculation. A 21 jours ($F = 6,41$ et $P = 0,008$), on peut constater que l'abondance de la souche témoin NCPPB 2445 est significativement supérieure à celles des souches CB12 et UB0246 (test post-hoc TukeyHSD) (Fig. 11).

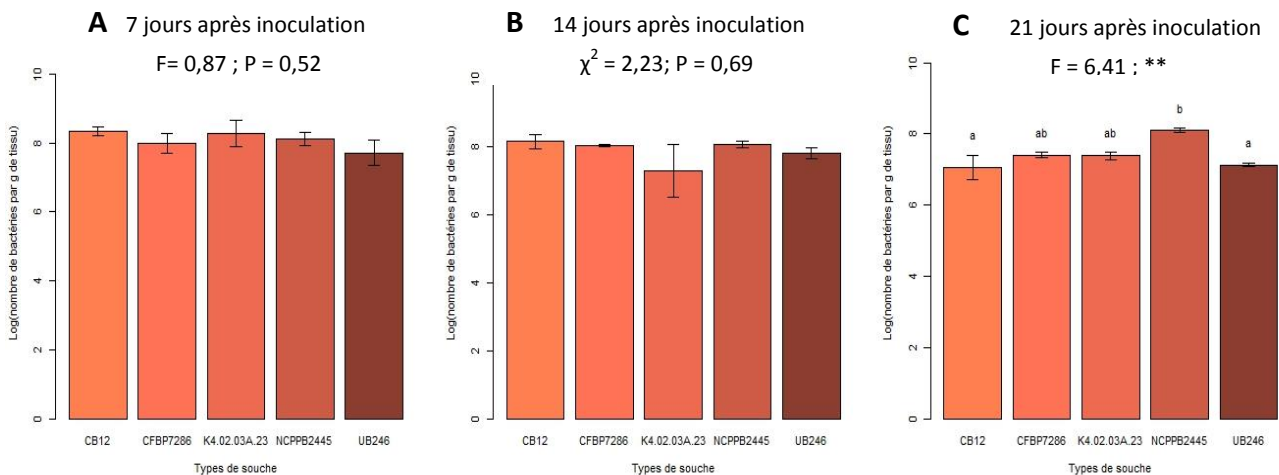


Figure 11 : Comparaison de la quantité de bactéries au niveau du point d'inoculation (log(CFU/g)) à 7 (A), 14 (B), et 21 (C) jours après inoculations. La valeur statistique F (ANOVA) ou χ^2 (Kruskal-Wallis) et le p-value (** : $p < 0,01$) sont indiqués au-dessus des barres. Les lettres communes indiquent l'absence de différence significative entre les souches selon le test TukeyHSD.

Lorsque nous observons la dynamique des populations au cours du temps (Fig. 12), nous pouvons voir la phase de croissance exponentielle lors des 7 premiers jours. Les abondances diminuent ensuite progressivement excepté pour la souche témoin neutre NCPPB 2445 qui se maintient significativement par rapport aux souches UB0246 et CB12.

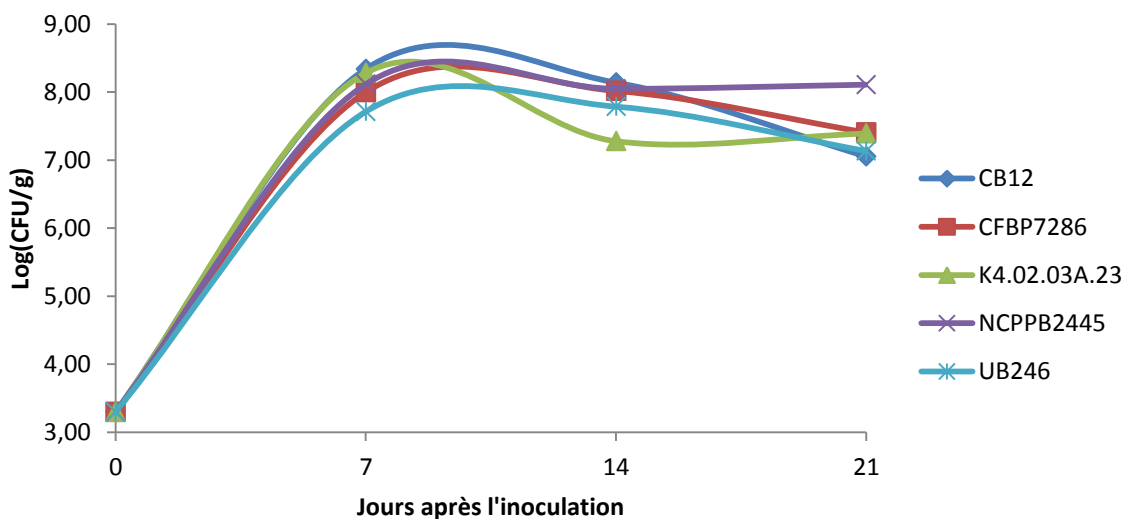


Figure 12 : Suivi de la dynamique des populations au cours du temps

Des clones des souches CB12 et K4.02.03A.23 ont été identifiés par comparaison des profils de bandes des box-pcr (Fig. 13) avec les souches initialement inoculées. Les clones de CB12 sont issus des prélèvements réalisés à 14 jours après inoculations à 5 et 7 cm en dessous du point d'inoculation d'un échantillon et à 7 cm au-dessus. De même un clone de K4.02.03A.23 a été identifié à 7 cm en dessous du point d'inoculation d'un échantillon.

Nous n'avons pas pu observer la présence de bactéries inoculées avec les autres échantillons, la présence de champignons pour certaines souches gêne la lecture. De même, le protocole de désinfection avec le bain d'eau de javel à 1 min a pu avoir un effet délétère sur les souches. Nous pouvons donc seulement affirmer que CB12 et K4.02.03A.23 ont une mobilité, nous ne pouvons pas conclure pour les autres souches.

Ces informations confortent l'idée que les souches du phylogroupe 13 ont la capacité de coloniser les zones internes du végétal et de se déplacer sans perturber la plante. Elles sont ainsi capables de mener une vie endophyte*.

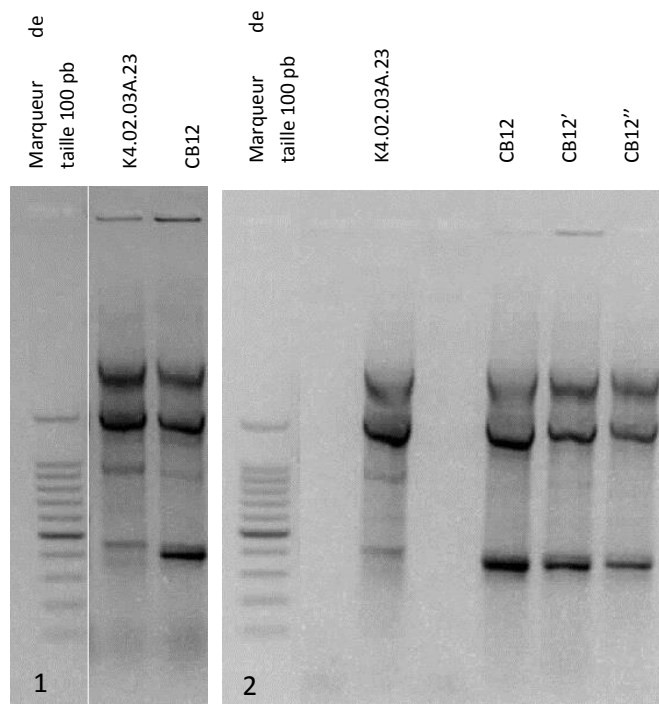


Figure 13: Exemple de profils de bandes obtenus par électrophorèse après box-pcr. (1) Souches de la collection ; (2) Souches identifiées sur les échantillons après l'expérimentation.

Le caractère endophyte est un indicateur important dans le développement ou l'émergence d'une maladie. En effet, la présence de souches non systématiquement pathogènes dans les zones internes du végétal pourrait jouer un rôle dans l'attaque de souches pathogènes par exemple ou bien, la cohabitation de souches pourrait entraîner aussi l'échange d'information génétique via les transferts horizontaux de gènes*.

3. Réalisation des gammes d'hôtes sur les espèces herbacées

En général, le terme de « gamme d'hôtes » désigne les plantes susceptibles aux maladies via un agent pathogène. Le but de cette expérimentation ici est d'étudier les différents types d'interaction entre plante/ bactérie. En effet, dans nos travaux, nous qualifions cette fois, une plante hôte comme une plante capable d'interagir avec la bactérie, cela peut se traduire par des maladies, des réactions de défenses ou d'hypersensibilité, des réactions de résistances, des éclaircissements foliaires etc ...

Les notes attribuées concernent toutes les réactions confondues. Les moyennes de notes suite à l'observation de symptômes à 15 jours après inoculation figurent dans le tableau 5. La souche témoin neutre NCPPB 2445 n'agit pas toujours comme l'eau (Fig. 15).

Les souches des témoins positifs les plus agressives sont les souches CC1582 et 41A (Fig. 14).

Les souches du phylogroupe 13, UB0246, K4.02.03A.23 et CB12 ne provoquent globalement pas de symptômes mis à part la souche UB0246 sur le tournesol.

Tableau 5 : Description quantitative des symptômes observés sur les différentes espèces herbacées à 15 jours après inoculation (échelle de 0 à 4 ; cf. paragraphe 4.2).

	Tomates	Tournesols	Epinards	Fèves	Moutardes	Melons
Témoin eau	0	0	0	0	0	0
NCPPB2445	0	0	1	2	0	1
CFBP7286	1	1	1	3	1	0
CFBP1754	1	3	1	1	0	0
CFBP1702	1	1	1	3	1	0
CC1582	4	4	3	4	3	4
41A	2	2	3	4	3	4
UB246	0	3	1	2	0	0
K4.02.03A.23	0	0	1	1	0	0
CB12	0	1	1	1	0	0



Figure 14 : Exemples de symptômes avec les souches les plus agressives. (1) 41A sur melon ; (2) 41A sur fève ; (3) CC1582 sur tomate ; (4) CC1582 sur tournesol

L'observation interne du végétal peut montrer des zones de vascularisation par la bactérie qui sont indicatrices de symptômes pathogènes (Fig. 16). Certaines souches semblent avoir une note relativement basse et pourtant lors de l'observation interne, des traces de vascularisation sont présentes, c'est le cas de la souche CFBP 7286 sur le plant de tomate et de K4.02.03A.23 sur tournesol. Ces vascularisations sont toutefois, moindres par rapport à la souche 41A sur fève ou melon par exemple.



Figure 15 : Différences de symptômes entre le témoin eau (à gauche) et la souche NCPPB2445, témoin neutre (à droite). (A) Melon ; (B) Fève ; (C) Epinards



Figure 16 : Vascularisation de différentes souches. (1) 41A sur fève ; (2) 41A sur melon ; (3) 1754 sur tomate ; (4) CC1582 sur tournesol ; (5) K4.02.03A.23 sur tournesol et (6) CFBP 7286 sur tomate

Toutes les espèces annuelles ne semblent donc pas être des plantes hôtes des souches du phylogroupe 13 étudiées, mis à part la fève et le tournesol qui semblent être plus sensibles à UB0246. Mais globalement, ces souches ne provoquent pas de symptômes à la surface ou en zone interne du végétal. Elles ont été également détectées au niveau des points d'inoculation via box-pcr en fin d'expérimentation, ce qui peut être cohérent avec la vie endophyte de ces souches. Néanmoins, il faudrait faire des expérimentations supplémentaires avec des quantifications d'abondance bactérienne pour suivre la dynamique de croissance de ces souches sur les différentes espèces annuelles.

La comparaison de ces résultats avec ceux de Jay Ram Lamichhane obtenus en 2013 laisse quelques incohérences pour certaines souches. La reprise du protocole et la façon d'interpréter l'observation des symptômes d'une personne à une autre restent délicates. L'âge des plantes et les différences de températures sous serre aux périodes de juin 2013 et 2015 peuvent également jouer un rôle dans la différence de résultats obtenus. Ces indications peuvent ainsi remettre en question la fiabilité des résultats ou du moins, les critères ou les conditions qui permettent de qualifier une bactérie de pathogène.

La question de plante hôte reste également délicate. En effet, un hôte de façon générale est un organisme hébergeant un autre organisme. En virologie, cette définition est conforme : une plante hôte est une plante qui est capable d'héberger le virus, celui-ci est capable de se reproduire sans pour autant infecter la plante. En bactériologie, cette définition est plus ambiguë dans le domaine végétal. Pour certains scientifiques, la plante hôte est considérée comme une plante hébergeant tout type de bactéries, des bactéries endophytes, non pathogènes pour la plante ou des bactéries pathogènes. D'autres considèrent une plante hôte comme une plante susceptible aux maladies engendrées par une bactérie. Dans notre cas, toutes les réactions sont confondues, il est donc difficile de qualifier en fonction des symptômes observés, une souche pathogène pour une espèce végétale donnée. En fonction de l'endroit où nous inoculons, de l'âge de la plante, le sexe de celle-ci s'il s'agit d'une espèce dioïque, nous observons déjà une variabilité, sans prendre compte des paramètres externes tels que la température, l'éclairement ou l'humidité etc...

4. Tests d'inhibition par des composés phénoliques

Suite à l'obtention d'index de résistance aux composés phénoliques pour différentes souches du phylogroupe 13 (annexe 1), les comparaisons en fonction du type de substrat d'origine des souches ou des sous-groupes ont démontré que le type de milieu ($\chi^2 = 7,49$ et $P = 0,28$) ou la proximité génétique ($\chi^2 = 16,35$ et $p = 0,36$) n'ont pas d'effet significatifs sur la capacité de croissance des souches en présence de composés phénoliques (Fig. 17).

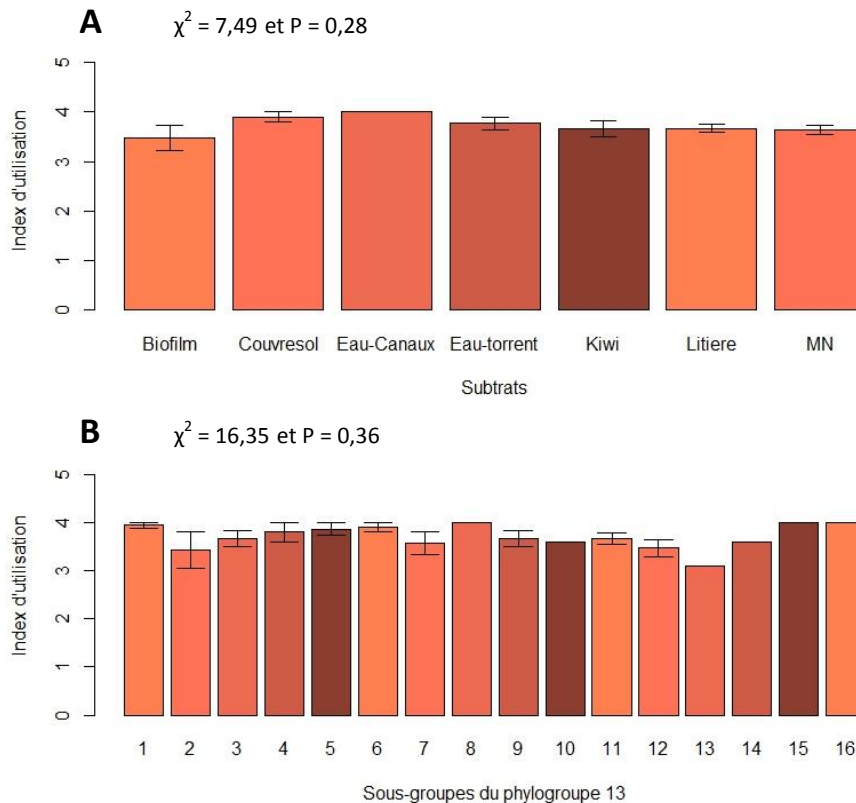


Figure 17 : Comparaison des index d'utilisation des composés phénoliques des souches du phylogroupe 13 en fonction de leur substrat d'origine (A) ou de leur sous-groupe phylogénétique (B)

Les index de résistance du phylogroupe 13 ont été également comparés avec les index de souches de *P. syringae* appartenant à d'autres phylogroupes (Fig. 18). Nous pouvons observer que le phylogroupe 13 est parmi les plus homogènes avec les phylogroupes 7 et 9 contrairement à d'autres phylogroupes qui présentent une plus grande variabilité, comme le 1 et le 10 par exemple.

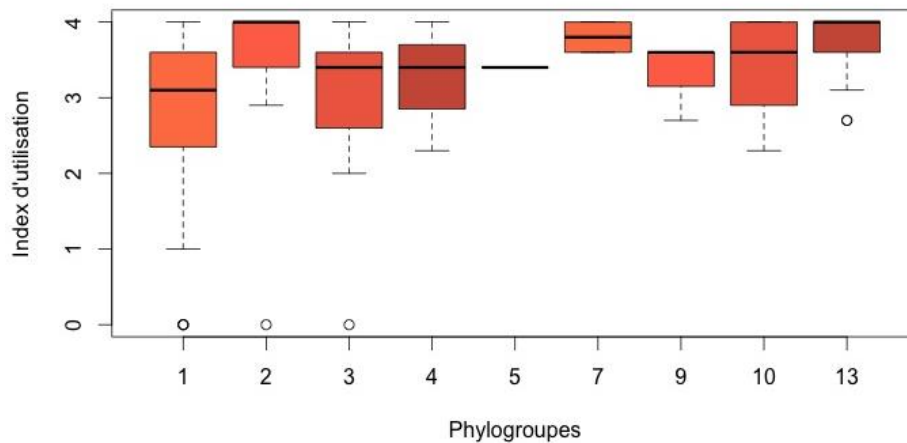


Figure 18 : Boîtes à moustache représentant les index de résistance des aux composés phénoliques en fonction des différents phylogroupes de *P. syringae*

Cette homogénéité des souches du phylogroupe 13 est cohérente avec ce qui est connu de ce phylogroupe caractérisé par des phénotypes assez stables (annexe 2). En effet, les autres tests biochimiques ne présentent le plus souvent pas de variabilité (sauf pour la fluorescence sur KB) contrairement à d'autres phylogroupes (Berge et al., 2014).

L'index d'utilisation des composés phénoliques est particulièrement élevé chez le phylogroupe 13 ce qui conforte l'idée de vie endophyte de ces souches. La capacité à résister aux composés phénoliques est un moyen pour elles de coloniser les zones internes du végétal, et en particulier chez les espèces ligneuses. Il serait intéressant de tester la capacité endophytique de ces souches sur des espèces ligneuses comme par exemple les *Prunus* bien connus aussi pour être affectés par la bactériose avec d'autres lignées de *P. syringae*. Cet atout leur permettrait peut-être de favoriser d'autres types de souches pour leur colonisation ou l'attaque du végétal.

CONCLUSION

Même si les souches du phylogroupe 13 proviennent de différents habitats, environnementaux (torrents alpins), ou cultivés (vergers de kiwis), elles forment un groupe particulièrement homogène vis-à-vis des phénotypes. D'après nos travaux, elles semblent avoir la capacité à mener une vie endophyte sans perturber la plante et ne semblent pas pathogènes. Néanmoins, nous pensons qu'elles pourraient avoir un rôle dans le développement de maladies. En effet, nous nous sommes beaucoup questionnés sur les facteurs environnementaux externes nécessaires pour que *P. syringae* se développe et il reste bien d'autres facteurs à explorer, tels que les facteurs biotiques. L'interaction entre différents types de bactéries pourrait avoir un lien avec le développement de maladies, c'est-à-dire que le pouvoir pathogène d'une bactérie serait renforcé ou plus probablement déclenché en présence d'une autre bactérie, ou d'une population bactérienne particulière. C'est le cas du thé par exemple, où des souches de *Xanthomonas* sp. ayant une activité glaçogène affaiblissent la plante et créent de nombreuses blessures, ce qui donne l'opportunité à la bactérie pathogène *P. syringae* pv *theae* d'attaquer la plante (Tomihama et Nishi, 2000). Nous pouvons ainsi nous inspirer de ce modèle pour le phylogroupe 13. Ces souches ont la capacité de résister aux composés phénoliques, et pourraient donc permettre la colonisation d'autres bactéries plus sensibles. Ce facteur biotique pourrait être une hypothèse possible, pour l'instant, les souches du phylogroupe 13 n'ont pas de rôle véritablement défini.

Pour finir, j'ai beaucoup apprécié mon stage et j'ai pris énormément de plaisir à m'investir dans le projet. J'ai eu un grand intérêt pour les thématiques abordées sur cette bactérie. Les échanges au contact de chercheurs, d'ingénieurs et de techniciens ont été pour moi très enrichissants ; ils m'ont permis d'affiner ma réflexion et mon analyse critique. J'ai pu également mettre en pratique mes connaissances techniques et les améliorer davantage. Ce stage m'a permis ainsi d'avoir une idée concrète de la vie professionnelle et particulièrement du monde de la recherche. Il a conforté de même, l'idée de continuer mes études en école d'ingénieur agronome et de me spécialiser dans les sciences végétales, notamment en protection des cultures.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANSES : Agence **N**ationale de **S**écurité sanitaire de l'alimentation, de l'**E**nvironnement et du travail

BET : **B**romure d'**É**thidium

CTIFL : Centre **T**echnique **I**nterprofessionnel des **F**ruits & **L**égumes

CASDAR : **C**ompte d'**A**ffectation **S**péciale au « **D**éveloppement **A**gricole et **R**ural »

FREDON : **F**édération **R**égionale **E**xpérimentale de **D**éfense contre les **O**rganismes **N**uisibles

MISTRAL : **M**icrobiologie des agroéco-**S**ystèmes : **T**Ransfert de connaissances sur **L**'histoire de vie d'agents phytopathogènes vers la protection des plantes et les processus climatiques

PCR : **P**olymerase **C**hain **R**eaction

SEFRA : **S**tation **E**xpérimentale **F**ruits de **R**hône-**A**lpes

TSA : **T**ryptic **S**oy **A**gar

GLOSSAIRE

Aquanappes : tapis feutré d'apparence laineuse qui permet de retenir l'eau.

Bioprécipitations : Il s'agit d'un concept qui propose l'implication des bactéries dans le phénomène des précipitations. En effet, la formation de glace dans les nuages est nécessaire pour la neige et la plupart des précipitations. Les particules de poussière et de suie peuvent servir de noyaux de glace, mais les noyaux de glace biologiques sont capables de catalyser la congélation à des températures beaucoup plus chaudes.

Endophyte : Les endophytes sont des microorganismes qui vivent dans les zones internes du végétal sans perturber le fonctionnement de celui-ci.

Epiphyte : Organisme vivant à la surface d'un végétal.

Enzymes pectinolytiques : enzymes capables de dégrader la pectine, polysaccharide que l'on retrouve en abondance dans les parois primaires des cellules végétales.

Gène constitutif : gène qui assure les fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules. Ils sont toujours exprimés et ne nécessitent pas de régulation.

Phyllosphère : en biologie végétale, il s'agit d'un habitat localisé sur les feuilles et gaines foliaires où peut se développer une microflore active.

Souche bactérienne : Une souche est une population d'organismes qui descend d'un seul organisme ou de la culture isolat pur. Les souches d'une même espèce peuvent différer légèrement de l'autre à bien des égards. Elle fait partie d'une espèce bactérienne mais est différente des autres bactéries de la même espèce par une différence mineure mais identifiable.

Système de cooling : dispositif d'aération quadrillé en carton où de l'eau coule à travers pour refroidir l'air entrant en serre.

Système de sécrétion de type III : La bactérie possède plusieurs systèmes de sécrétions ayant pour rôle le transport de toxines et d'effecteurs du cytoplasme vers le milieu extérieur ou vers le cytoplasme d'une cellule cible. Le système de sécrétion de type III possède une base ancrée dans la membrane ainsi qu'une aiguille creuse formée d'une seule protéine polymérisée, par laquelle des effecteurs, capables de manipuler les fonctions de l'hôte, sont transloqués directement dans le cytoplasme de la cellule cible.

Transferts horizontaux de gènes : Il s'agit d'un processus dans lequel un organisme intègre du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant.

BIBLIOGRAPHIE

Articles scientifiques

- Bartoli, C., Lamichhane, J.R., Berge, O., Guilbaud, C., Varvaro, L., Balestra, G.M., Vinatzer, B.A., Morris, C.E., 2015. A framework to gauge the epidemic potential of plant pathogens in environmental reservoirs: the example of kiwifruit canker: The epidemic potential of plant pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 16, 137–149.
- Berge, O., Monteil, C.L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D.C., Morris, C.E., 2014. A User's Guide to a Data Base of the Diversity of *Pseudomonas syringae* and Its Application to Classifying Strains in This Phylogenetic Complex. *PLoS ONE* 9, e105547.
- Bradbury, J.F., 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International, Farnham Royal, Slough, UK.
- Gaignard, J.L., Luisetti, J., 1993. *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agron. Sustain. Dev.* 13, 38.
- Hirano, S.S., Upper, C.D., 2000. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 624–653.
- Morris, C.E., Conen, F., Alex Huffman, J., Phillips, V., Pöschl, U., Sands, D.C., 2014. Bioprecipitation: a feedback cycle linking Earth history, ecosystem dynamics and land use through biological ice nucleators in the atmosphere. *Glob. Change Biol.* 20, 341–351.
- Morris, C.E., Monteil, C.L., Berge, O., 2013. The Life History of *Pseudomonas syringae*: Linking Agriculture to Earth System Processes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 85–104.
- Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., Thompson, B.M., 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J.* 2, 321–334.
- Serizawa, S., Ichikawa, T., 1993. Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 3. The seasonal changes of bacterial population in lesions and of its exudation from lesion. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59, 469–476.
- Tomihama, T., Nishi, Y., 2000. Interactions between *Pseudomonas syringae* pv. theae and ice nucleation-active bacteria. 3) Population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. theae, ice nucleation-active *Pseudomonas* sp. and *Xanthomonas* sp. in tea fields. *Proc. Assoc. Plant Prot. Kyushu* 46, 66–69.

Vanneste, J.L., Yu, J., Cornish, D.A., Tanner, D.J., Windner, R., Chapman, J.R., Taylor, R.K., Mackay, J.F., Dowlut, S., 2012. Identification, Virulence, and Distribution of Two Biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Plant Dis.* 97, 708–719.

Sites web

ACTA, CTIFL, 2014. CASDAR en Arboriculture [WWW Document]. Ecophytic. URL <http://arboriculture.ecophytopic.fr/arbo/innovation-en-marche/autres-reseaux/casdar-en-arboriculture> (accessed 6.13.15).

INRA, 2012a. Qui sommes-nous ? [WWW Document]. URL <http://institut.inra.fr/> (accessed 7.23.15).

INRA, 2012b. Provence-Alpes-Côte d'Azur [WWW Document]. URL <http://www.paca.inra.fr/> (accessed 7.23.15).

Morris, C., 2014. MISTRAL [WWW Document]. URL http://www6.paca.inra.fr/pathologie_vegetale/Nos-recherches/MISTRAL (accessed 7.23.15).

ANNEXES

Annexe 1 : Tableau de résultats de l'obtention des index de résistance aux composés phénoliques des souches du phylogroupe 13

Strain	Tannic acid (/100)	Gallic acid (/50)	Caffeic acid (/100)	Myricitin (/10)	Utilisation index
CB19	100	10	50	10	2,7
CB20	100	50	100	10	4
CB12	100	50	100	1	3,1
CB16	100	30	100	10	3,6
CCE0076	100	50	100	10	4
CCE0237	100	50	100	10	4
CCE0646	100	50	100	10	4
CCE0679	100	30	100	10	3,6
CCE0748	100	50	100	10	4
CCE0889	100	30	100	10	3,6
CEB0004	100	30	100	10	3,6
CSZ0294	100	30	100	10	3,6
CSZ0318	100	30	100	10	3,6
CSZ0324	100	50	100	10	4
CSZ0385	100	50	100	10	4
CVB0093	100	30	100	1	2,7
K1.01.02A.06	100	50	100	10	4
K1.01.03E.10	100	50	100	10	4
K1.01.03E.20	100	50	100	10	4
K1.01.03E.25	100	50	100	10	4
K1.01.04E.06	100	50	100	10	4
K1.02.05A.17	100	50	100	10	4
K2.01.02A.06	100	30	100	10	3,6
K2.02.02E.13	100	50	100	10	4
K3.01.02A.02	100	50	100	10	4
K3.01.03E.09	100	50	100	10	4
K4.01.04E.07	100	50	100	10	4
K4.02.01E.11	100	50	100	1	3,1
K4.02.03A.23	100	50	100	10	4
LNW0022	100	50	100	10	4
P.t.K3.26	100	50	100	10	4
SZB0014	100	50	100	1	3,1
SZB0067	100	50	100	10	4
SZB0082	100	50	100	10	4
UB0246	100	50	100	10	4
UB0390	100	50	100	1	3,1

Annexe 2 : Tableau représentant la caractérisation phénotypique de 786 souches et la diversité génétique du complexe de *P. syringae*

(Berge et al., 2014)

Phylogenetic affiliation	Number of strains	Levan +	Oxidase +	Potato soft rot	HR on tobacco+	Fluorescence on KB medium +	Aesculin degradation +	Sucrose utilization+	D(-) Tartrate utilization +	1 NA ^b +	Broad host-range toxin ^c +	Pathogenicity ^d +	Avirulent ^e	Mean disease severity ≥ 2.0 ^f
Total	763	41	0	10	73	98	97	73	32	65	51	28	53	12
PG^a 01	88	39	0	0	92	85	92	91	58	33	2	16	60	1
PG 01a	48	45	0	0	90	100	100	88	78	24	4	14	53	2
PG 01b	40	33	0	0	95	68	83	95	35	43	0	18	68	0
PG 02	323	50	0	0	72	100	100	95	10	85	90	43	41	25
PG 02a	3	0	0	0	100	100	100	100	33	67	67	33	33	0
PG 02b	140	67	0	0	98	100	99	95	4	90	87	44	30	19
PG 02c	91	7	0	0	7	100	100	93	9	68	96	0	89	0
PG 02d	87	70	0	0	100	100	100	98	20	93	91	89	6	62
PG 02e	2	0	0	0	50	100	100	100	0	100	100	0	100	0
PG 03	10	70	0	0	80	70	20	90	0	20	0	0	90	0
PG 04	6	83	0	0	100	100	100	100	0	100	17	0	67	0
PG 05	4	50	0	0	75	75	25	75	25	50	0	25	50	0
PG 07	81	46	0	98	62	100	100	9	96	33	0	47	37	11
PG 07a	79	46	0	97	61	100	100	9	96	33	0	48	37	11
PG 07b	2	50	0	100	100	100	100	0	100	50	0	0	50	0
PG 08	5	80	0	40	100	100	80	0	100	0	100	0	80	0
PG 09	28	11	0	0	68	100	100	14	32	4	0	0	71	0
PG 09a	23	9	0	0	65	100	100	13	26	4	0	0	70	0
PG 09b	4	25	0	0	75	100	100	25	50	0	0	0	75	0
PG 09c	1	0	0	0	100	100	100	0	100	0	0	0	100	0
PG 10	167	34	0	0	98	100	100	84	11	94	51	10	66	3
PG 10a	71	8	0	0	97	100	100	82	23	94	1	7	80	1
PG 10b	77	58	0	0	100	100	100	86	3	94	91	1	62	0
PG 10c	1	0	0	0	100	100	100	0	0	100	0	0	100	0
PG 10d	8	13	0	0	100	100	100	75	0	100	75	50	25	13
PG 10e	8	50	0	0	88	100	100	100	0	100	100	75	13	38
PG 10f	1	100	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0
PG 10g	1	0	0	0	0	100	100	100	0	0	0	0	100	0
PG 11	3	0	100	0	67	100	100	0	33	0	100	67	33	0
PG 12	2	0	0	0	0	100	100	0	50	0	0	0	100	0
PG 12a	1	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	100	0
PG 12b	1	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	0	100	0
PG 13	46	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	0	78	0
PG 13a	44	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	0	77	0
PG 13b	2	0	0	0	0	100	100	0	100	0	0	0	100	0

Values are the percent of *P. syringae* strains giving positive reactions for the different phenotypes. Arginine dihydrolase production was negative for all strains.

^aPG = *P. syringae* phylogroup.

^bINA = ice nucleation activity of at least 10^6 cells at -8°C .

^cProduction of a broad host range toxin was evaluated with the test habitually used to reveal syringomycin-like toxins based on the capacity to produce an inhibition zone of growth of *Geotricum candidum*.

^dStrains were considered to be pathogenic on the cantaloupe indicator plant if at least half (6/12) of the seedlings showed compatible reactions.

^eAvirulent strains did not induce any disease reaction on cantaloupe seedlings.

^fFrequency of strains for which the mean disease severity on cantaloupe seedlings was ≥ 2.0 .

doi:10.1371/journal.pone.0105547.t002

RÉSUMÉ

La bactérie *Pseudomonas syringae* est un modèle d'étude pour la gestion et la prédiction de maladies émergentes par les agents pathogènes des plantes, actuel enjeu majeur pour la recherche agronomique. Connue comme pathogène de nombreuses cultures et ayant des réservoirs dans les habitats non-agricoles, *P. syringae* est devenue depuis 10 ans un pathogène important notamment chez le kiwi où elle est responsable de bactérioses très graves. Des études préliminaires montrent qu'en plus de l'agent de cette bactériose (*P. syringae* pv *actinidiae*), classé dans le phylogroupe 1 de *P. syringae*, un phylogroupe éloigné (PG13) est aussi présent dans les arbres de kiwi malades. Ce phylogroupe contient également des souches de *P. syringae* issues de substrats environnementaux, considérées comme non pathogènes mais peu étudiées dans leur relation avec les plantes. L'objectif de mon stage est de caractériser ce phylogroupe afin de savoir s'il peut être impliqué dans l'émergence et/ou le développement de maladies des plantes. L'observation de symptômes sur des plants de kiwi, l'étude de la dynamique de croissance sur kiwi, la réalisation de gammes d'hôtes et les tests d'inhibition par les composés phénoliques sont les expérimentations que j'ai menées au cours de mon stage pour étudier différents paramètres impliqués dans le caractère de pathogénicité. Par ces expérimentations, nous avons pu observer que les souches du phylogroupe 13 ne provoquent pas de symptômes mais qu'elles ont la capacité de mener une vie endophyte. Ce phylogroupe apparaît particulièrement homogène comparés aux autres et se caractérise par des souches qui résistent toutes aux composés phénoliques, une adaptation potentielle à la vie endophyte. Des hypothèses sur le rôle de ces bactéries sont discutées.

Mots-clés : *Pseudomonas syringae* – Phylogroupe 13 – Bactériose du kiwi – Emergence de maladies - Pathogénicité

ABSTRACT

The bacterium *Pseudomonas syringae* is a study model for managing and prediction of emergent diseases by plant pathogens, a major current challenge for agricultural research. Known as a pathogen for many crops and having reservoirs in non-agricultural habitats, *P. syringae* has become for 10 years an important pathogen, especially on the kiwifruit where it is responsible for bacterial canker very severe. Preliminary studies show that in addition to *P. syringae* pv *actinidiae*, agent of this bacterial canker classified in the phylogroup 1, a distant phylogroupe (PG13) is also present in diseased kiwi trees. This phylogroup also contains strains of *P. syringae* from environmental substrates, considered non-pathogenic but their relationship with plants is little studied. The aim of my works is to characterize this phylogroup in order to know if it would be involved in the emergence and/ or the development of diseases. The observation of symptoms on kiwifruit, the study of dynamic growth on kiwifruit, the realization of host ranges and inhibition tests to phenolic compounds are the experiments I have effectuated during my internship to study the different parameters related to pathogenic character. For these experiments, we observed that strains of phylogroup 13 do not cause symptoms, but they have the capacity to lead an endophyte life. Strains of this phylogroup are particularly uniform and also all appear to stand more to phenolic compounds, unlike other phylogroups, a potential adaptation to endophyte life. Some hypotheses on the role of these bacteria are discussed.

Keywords: *Pseudomonas syringae* – Phylogroup 13 – Bacterial canker of kiwifruit – Emergence of diseases – Pathogenicity