

3, Rue du Tronquet – 76134 Mont Saint Aignan Cedex

« 2017 »

## Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du titre d'Ingénieur en Agriculture

### « Rôle du couvre-sol dans le développement du chancre bactérien dans les vergers d'abricotiers »

« Manon Peyré »

Encadrée par :

« Luciana Parisi – Chargée de recherche »

« Isabelle Gattin – Chargée de recherche »

INRA - Unité de Recherche Pathologie Végétale

CS 60094 - Domaine Saint Maurice

67 Allée des Chênes

84143 MONTFAVET cedex - FRANCE





## Projet Ingénieur non confidentiel

Nom de l'entreprise : INRA d'Avignon

Adresse : 67 allée des Chênes 84140 Montfavet

Représentée par : Cindy Morris

Fonction : HDR et directrice du laboratoire

### **Titre du Projet Ingénieur : Rôle du couvre-sol dans le développement du chancre bactérien dans les vergers d'abricotiers**

#### **Autorisations d'utilisation du Projet Ingénieur**

**Consultation sur place :**

Etudiants UniLaSalle

oui

non

Personnes extérieures

oui

non

Mention du titre du Projet Ingénieur dans une présentation ou publication de UniLaSalle

oui

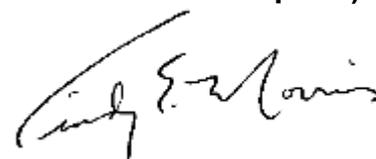
non

**Date :**

28 August 2017

**Signature**

**(Représentant de l'entreprise)**





**Direction des Etudes et des Formations**

**Centre de documentation**

FICHE SIGNALÉTIQUE

**PROJET INGENIEUR**

<i>AUTEUR</i>	Manon Peyré
<i>TITRE EN FRANCAIS</i>	<b>Rôle du couvre-sol dans le développement du chancre bactérien dans les vergers d'abricotiers</b>
<i>TITRE EN ANGLAIS</i>	<b>The goal of ground cover in the development of bacterial canker in apricot orchard</b>
<i>RESUME</i>  (250 mots maximum)	<p>Le genre <i>Pseudomonas</i>, inclut plusieurs espèces de bactéries phytopathogènes, comme les <i>Pseudomonas syringae</i> qui provoque la bactériose, maladie conduisant généralement à la mort des arbres fruitiers. A l'heure actuelle, les moyens de lutte contre <i>P. syringae</i> sont très réduits ou inexistants. Ainsi, des méthodes alternatives ou le rôle de certains éléments comme la présence de réservoirs de la bactérie sont en cours d'étude. Partant de l'hypothèse que le couvre-sol pourrait être une source d'inoculum de <i>P. syringae</i>, l'objectif du stage est de savoir si le couvre-sol joue un rôle dans le développement du chancre bactérien en verger d'abricotier. Les prélèvements de couvre-sol et des feuilles ont été réalisés dans un verger expérimental au domaine de Gotheron dans la Drôme. Tous les échantillons ont été analysés en biochimie (test oxydase et fluorescence), en microbiologie (dénombrement sur milieux TSA et KBC), en biologie moléculaire (PCR, gel d'électrophorèse, séquençage) et en bio-informatique. Ces différentes étapes ont permis de sélectionner les bactéries <i>P. syringae</i> et de déterminer les phylogroupes ainsi que les clades, et de pouvoir comparer les génomes des bactéries. Le couvre-sol en inter-rang dans les vergers d'abricotier comporte en grande majorité des populations du phylogroupe 2. Le phylogroupe 2 comprend plusieurs clades avec des bactéries pathogènes de l'abricotier. L'arbre quant à lui comporte principalement des populations du phylogroupe 1, dont le rôle dans le développement de la maladie reste à préciser. Le couvre-sol ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans le développement de la bactériose de l'abricotier.</p>



<i>TUTEUR DE PROJET :</i> <i>Nom et fonction</i>	Luciana Parisi, Chargée de recherche, INRA
<i>ORGANISME DE STAGE :</i> <i>Nom et adresse</i>	INRA - Unité de Recherche Pathologie Végétale  CS 60094 - Domaine Saint Maurice  67 Allée des Chênes  84143 MONTFAVET cedex - FRANCE
<b><i>IMPERATIF</i></b>	
<b><i>NOMBRE DE PAGES</i></b>	31 pages
<b><i>MOTS CLES SIGNIFICATIFS DU PROJET INGENIEUR</i></b> <b><i>(10 mots clés <u>minimum</u>)</i></b>	<i>Pseudomonas syringae</i> , couvre-sol, verger, abricotier, dénombrement, PCR, phylogroupe, clade, séquençage, bio-informatique
<b><i>PI CONFIDENTIEL</i></b>  <b><i>Durée de la confidentialité</i></b>  <b><i>Date de levée de la confidentialité</i></b>	<b>NON</b>  .....  .....



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier M. Marc Bardin, directeur de l'unité de Pathologie Végétale de l'INRA d'Avignon, Mme Cindy Morris, directrice de l'équipe MISTRAL, Mme Odile Berge, chercheur de l'équipe MISTRAL, de m'avoir accueillie au sein de l'équipe bactériologie en tant que stagiaire pour mon projet d'ingénieur.

Mes remerciements s'adressent en particulier à mes responsables de stage, Mme Luciana Parisi, qui a su se montrer disponible pour moi malgré ses soucis de santé et Mme Cindy Morris qui m'a aidée tout au long du stage pour l'analyse de mes résultats. Toutes deux m'ont parfaitement intégrée dans leur domaine de compétences, et m'ont fait profiter de leur expérience professionnelle. Luciana et Cindy m'ont offert l'opportunité de devenir autonome dans un laboratoire et m'ont ouvert l'esprit concernant mon projet professionnel.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Mmes Charlotte Chandeysson et Magali Eygrier techniciennes de laboratoire, et Mme Caroline Guilbaud, assistante ingénieure, qui m'ont encadrée lors de ce stage. Caroline, Charlotte et Magalie, merci pour votre aide et vos conseils si précieux lors des prélèvements et des analyses des échantillons. Merci encore pour votre bonne humeur quotidienne et tous nos moments de rire.

Je souhaite également remercier Jean-François Bourgeay, technicien de laboratoire pour son aide lors des prélèvements. Jean-François, un énorme merci pour ton aide concernant mon stage mais surtout pour mon avenir. Je n'oublierai jamais toutes nos discussions et tes conseils si précieux.

Mes pensées vont également à Christelle (reine du logiciel R), Christel, Cécile, Véronique, Claudine, Pascale, Grégory et Yousra pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé et pour leur bonne humeur quotidienne.

Je remercie aussi le GIS Fruit pour son soutien financier sans lequel le stage n'aurait pu avoir lieu, mais également Laurent Brun et Christophe Gros (INRA de Gotheron) d'avoir participé au projet et de permettre cette collaboration entre les deux centres INRA. Toutes mes pensées vont aussi vers mes deux tutrices Muriel Millan (CTIFL de Balandran) et Véronique Marie-Jeanne (Enseignant-chercheur à AgroSup Montpellier) pour m'avoir guidée lors de ce stage.

Pour finir, je souhaite exprimer ma gratitude à l'ensemble des chercheurs, techniciens, assistants ingénieurs et membres de l'administration de l'INRA d'Avignon de m'avoir intégrée à leur équipe pendant ces 6 mois.



# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux et des figures

## Chapitre 1 : Introduction

1. L'abricotier .....	1
2. La production d'abricots .....	2
3. Le chancre bactérien .....	4
4. Qui est <i>Pseudomonas syringae</i> ? .....	6
5. Le rôle et les effets du couvre-sol .....	8
6. Objectifs du stage et démarches associées .....	9

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Échantillonnage .....	10
2. Traitement des échantillons .....	12
3. PCR Phylogroupes, Box PCR, PCR PG02d et PCR <i>cts</i> .....	14
4. Séquençage .....	18
5. Traitement des données en bio-informatique .....	18

## Chapitre 3 : Résultats

1. Qualité de la technique de caractérisation des souches de <i>P. syringae</i> .....	19
2. Caractéristique de la microflore du couvre-sol .....	19
3. Etat des lieux des feuilles dans le verger CapRed et PerpheClim .....	23
4. Arbre phylogénétique .....	23
Discussion .....	26
Conclusion et perspectives .....	30
Références bibliographiques	
Annexes	



## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AOC : Appellation Origine Contrôlée

°C : Degrés Celsius

CFU : ColonyForming Unit

CTIFL : Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes

dNTP : dATP, dTTP, dCTP, dGTP

GenBank : base de données de séquence génétique

GIS : Groupement d'Intérêts Scientifique

INA : IceNucleation Active

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

KBC : King B Céphalexin

m<sup>2</sup> : mètre carré

MF : Matière fraîche

P : Pseudomonas

*P. syringae* : *Pseudomonas syringae*

PACA : Provence-Alpes-Côte d'Azur

PAMDB : Plant Associated and Microbes Data Base (Base de données sur les plantes et les microbes)

pb : paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

PPV : *PlumPoxPotyvirus*

pv : Pathovar

TP1 : Tampon phosphate

TSA : Tryptone Soja Agar

UERI : Unité Expérimentale Recherches Intégrées

UV : Ultra-Violet



## Liste des figures

- Figure 1a** : Abricotier infecté par *P. syringae* : Apparition des points de gomme en hiver
- Figure 1b** : Abricotier infecté par *Pseudomonas syringae* : Formation en été du chancre plus ou moins étendu
- Figure 1c** : Badigeon cuprique sur abricotier.
- Figure 2** : Arbre bayésien construit sur la base des séquences partielles de *cts*, *gyrB*, *gapA* et *rpoD* regroupant 216 espèces et sous-espèces de *P. syringae*
- Figure 3** : Représentation des sites d'infection et des symptômes de *Pseudomonas syringae* sur une plante idéale
- Figure 4** : Représentation schématique des voies de contamination de *Pseudomonas syringae*
- Figure 5** : Cycle de vie hypothétique de *Pseudomonas syringae*
- Figure 6** : Schéma du verger CapRed à l'UERI de Gotheron
- Figure 7** : Schéma du verger Perpheclim à l'UERI de Gotheron
- Figure 8** : Pigment fluorescent de *Pseudomonas syringae* sous lumière ultra-violet
- Figure 9** : Test oxydase effectué sur les colonies de *Pseudomonas syringae*
- Figure 10** : Exemple de profils « Box PCR » et de la PCR multiplex M1
- Figure 11** : Cinétique (exprimée en log<sub>10</sub> de CFU par gramme de matière végétale) de la population bactérienne totale (violet), de la population de *Pseudomonas syringae* totale (noir), de la population du phylogroupe 2 (bleu), du phylogroupe 1 (rouge) et le seuil de détection (gris) des 9 points du verger CapRed du temps 1 à 4 (temps de prélèvement depuis 2015).
- Figure 12** : Représentation de la population de *Pseudomonas syringae* et des différents phylogroupes dans le verger CapRed du temps 1 à 5 (temps de prélèvement depuis 2015 à aujourd'hui).
- Figure 13** : Représentation de la population de *Pseudomonas syringae* et des différents phylogroupes au niveau des feuilles dans le verger CapRed pour les arbres 1 à 5 et dans le verger PerpheClim pour les arbres 9 à 13.



## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Influence de la teneur en eau hivernale de rameaux détachés de pêcher sur les infections bactériennes provoqués artificiellement

**Tableau 2** : Composition des différents milieux et tampons utilisés

**Tableau 3** : Caractéristiques des amorces nucléotidiques

**Tableau 4** : Protocole de la Box PCR, de la PCR phylogroupe 2 clade 2d et de la PCR *cts*

**Tableau 5** : Répartition des 1635 souches identifiées dans les différents phylogroupes

**Tableau 6** : Analyse statistique descriptive et ANOVA à 1 facteur de l'état des arbres (sain ou malade) sur le couvre-sol en fonction des deux vergers selon la population de *Pseudomonas syringae* totale, la population de PG01 et PG02 et la population de *Pseudomonas syringae* non identifié.

**Tableau7** : Résultats de la régression linéaire et de l'ANOVA à 1 facteur sur l'effet du couvre-sol sur l'arbre (Ps : *Pseudomonas syringae* totale, CS : Couvre-sol, F : Feuille)



## Chapitre 1 : Introduction

### 1. L'abricotier

#### ❖ Caractérisation taxonomique

L'abricotier, de son nom latin *Prunus armeniaca* appartient au genre *Prunus* et à la famille des *Rosaceae*. Cette famille est largement représentée dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord, et inclut des plantes herbacées vivaces, des arbustes et des arbres. Elle est la 19<sup>ème</sup> plus grande famille de plantes et est composée d'environ 3 100 espèces (Judd *et al.*, 1999). Son aspect économique est très important dans le monde. En effet, la famille des *Rosaceae* est composée de nombreux arbres à fruits comme l'abricotier, le poirier, le pommier, le cerisier mais aussi de nombreuses espèces ornementales (site : [www.biologievegetale.be](http://www.biologievegetale.be)). En 2011, la production mondiale de cette famille s'élevait à 140 millions de tonnes de fruits.

#### ❖ Description botanique

L'abricotier est un arbre qui peut, selon les variétés, être auto fertile ou auto stérile. Dans le deuxième cas, les arbres doivent se situer à proximité d'arbres pollinisateurs compatibles et se développent également au contact d'insectes pollinisateurs (abeilles, papillons, ...) (site : [www.abricotsdenosregions.com](http://www.abricotsdenosregions.com)).

Ces arbres peuvent atteindre 3 à 6 mètres de hauteur et sont taillés en gobelet ou en palmette. La floraison apparaît début mars et laisse entrevoir des fleurs blanches à roses sur les branches, avant l'apparition des feuilles (site : [www.tela-botanica.org](http://www.tela-botanica.org)). Le fruit se développe progressivement avant d'arriver à maturation en été.

L'abricotier est toujours cultivé sur un porte-greffe, en règle générale un prunier, plus résistant que l'abricotier d'un point de vue agronomique. Les variétés Franc pêcher ou Montclar, régulièrement utilisées dans la région PACA donnent une grande vigueur à l'abricotier (Michel Gautier, 2001).

Le greffon peut être installé à différentes hauteurs allant de 0,20 à 1,20 m par rapport au sol. Ces hauteurs variées permettent une meilleure protection de l'arbre face à certains agents pathogènes comme *P. syringae*. La hauteur conseillée dans la région PACA est de 0,60 m (conversation personnelle avec Laurent Brun, UERI Gotheron et Responsable équipe Idéotypes abricotiers).



## ❖ Principales maladies dans les vergers d'abricotiers

Les vergers d'abricotiers sont sensibles à plusieurs agents phytopathogènes, ce qui engendre une forte diminution des rendements et donc une perte économique pour les producteurs.

Pendant la période hivernale, les champignons ascomycètes comme *Monilia laxa*, ont la capacité de se développer dès le mois de Février. Ce champignon provoque la moniliose, attaque les bourgeons dès le stade bouton rouge et dessèche les fleurs par la suite. Le champignon se multiplie sous forme de spores et infecte par la suite les fruits. Des chancres se forment progressivement et seront source d'inoculum pour l'année à venir (Warlop, F., 2003).

L'abricotier est également sujet aux attaques du virus *PlumPoxPotyvirus* (PPV) responsable de la sharka (virus de quarantaine). Ce virus se localise dans les tissus végétaux et déclenche de légères tâches sur les feuilles, des déformations sur les fruits et entraîne la mort des arbres. Les fruits sont donc non commercialisables et les arbres malades sont automatiquement arrachés (Dicenta, F. et Audergon, J. M., 1994). Les pucerons ainsi que d'autres insectes piqueurs sont les vecteurs de ce virus (Audergon et al., 1994).

Selon Gautier, M., 2001, « la principale maladie bactérienne qui sévit sur l'abricotier est le chancre bactérien dont les agents responsables sont *Pseudomonas syringae* et *Pseudomonas viridiflava* ». Ces phytopathogènes occasionnent des chancres bactériens sur les charpentières, une perte de rendement dans les vergers et peuvent entraîner la mort de certains arbres.

## **2. La production d'abricots**

### ❖ En France

L'abricotier est une culture fruitière très répandue en France. Cette culture est plus particulièrement implantée dans le Sud-Est de la France (Rhône-Alpes, Languedoc Roussillon et Provence-Alpes-Côte d'Azur). En effet, les abricotiers s'adaptent mieux dans des régions où les saisons sont nettement tranchées avec un hiver froid et continu, un printemps sec et un été ensoleillé (Gautier, M., 2001).



La France se place au 7<sup>ème</sup> rang mondial et au 2<sup>ème</sup> rang européen en 2016 avec une production de 111 700 tonnes sur 12 800 hectares (site : [www.rnm.franceagrimer.fr](http://www.rnm.franceagrimer.fr)).

La production d'abricots est très variable et dépend des aléas climatiques et de l'état sanitaire des vergers. L'abricot français doit faire face également à la concurrence espagnole, ce qui en fait un fruit moins commercialisé que les autres comme la fraise ou la cerise par exemple (site : [www.rnm.franceagrimer.fr](http://www.rnm.franceagrimer.fr)).

Cependant, après la pomme, l'abricot est le deuxième fruit le plus consommé par les français pendant la période estivale. Ce succès a permis de développer des projets de recherche afin d'obtenir une production qui se prolonge de juin à août avec des variétés plus au moins tardives. Selon le site « abricots de nos régions », ces nouvelles variétés permettent « de découvrir des qualités aromatiques différentes, mais aussi de nouvelles saveurs, teintes et de renforcer la résistance naturelle du fruit ».

#### ❖ En Provence – Alpes - Côte-d'Azur (PACA)

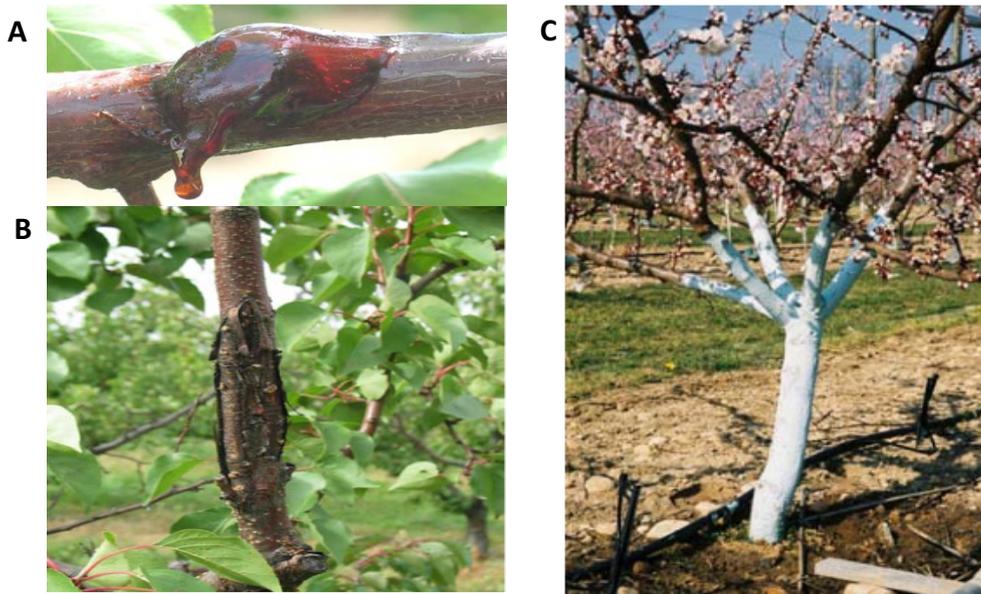
La région PACA est la première région française productrice de fruits et légumes avec 41 000 hectares consacrés à ce domaine (site : [www.abricotsdenosregions.com](http://www.abricotsdenosregions.com)). Pour valoriser cette force, de nombreux labels sont développés dans cette région. La qualité des pommes et des poires des Alpes-de-haute Durance est reconnue par un label Rouge, les figues de Solliès et les raisins Muscat du Ventoux par un AOC (Appellation Origine Contrôlée).

Dans un futur proche, les abricots du Vaucluse vont être valorisés par le label « Savourez le Vaucluse » (site : [www.paca.chambres-agriculture.fr](http://www.paca.chambres-agriculture.fr)).

La région PACA cherche à valoriser l'économie locale et à lutter contre la mauvaise alimentation.

Cette région, fière de sa filière fruits et légumes, essaie de promouvoir au maximum la vente directe afin de rapprocher producteurs et consommateurs. Selon le site [www.paca.chambres-agriculture.fr](http://www.paca.chambres-agriculture.fr), la région souhaite « satisfaire le citoyen exigeant en quête d'authenticité et de qualité ».

Cependant, malgré tous les efforts déployés, la production 2016 d'abricots a été entachée par l'apparition du chancre bactérien.



**Figure 1** : Arbre infecté par *Pseudomonas syringae*, différents symptômes (A = Apparition des points de gomme en hiver ; B = Formation en été du chancre plus ou moins étendu) et méthode préventive (C = Badigeon cuprique).

Source : Lemontey, J-M., 2004

### 3. Le chancre bactérien (bactériose)

#### ❖ Définition et dégâts occasionnés dans les vergers

Le chancre bactérien ou bactériose est une maladie infectieuse causée par *Pseudomonas syringae* (une bactérie du genre *Pseudomonas*). La bactériose de l'abricotier (Figure 1a et 1b) est une maladie en recrudescence, qui peut provoquer, certaines années, de fortes mortalités d'arbres dans les vergers jeunes. C'est également une maladie endémique pouvant provoquer des mortalités récurrentes de charpentières ou d'arbres entiers au fil des années dans des vergers plus âgés. Elle constitue un réel frein à la culture de l'abricotier dans certaines régions exposées à la maladie (plateau ardéchois, Baronnies dans la Drôme, grès et sols argileux de la moyenne vallée du Rhône) (Gaignard et Luisetti, 1993). L'incidence de cette maladie est très peu répertoriée en France. Cependant, Kotan et Sahin, 2002, ont reporté que 80% des abricotiers dans les vergers en Turquie étaient touchés par cette maladie.

La bactériose affecte d'autres cultures fruitières [par exemple : l'actinidia dans plusieurs pays européens et en Nouvelle Zélande (Reglinsky *et al.*, 2014), le cerisier en Serbie (Gavrilović *et al.*, 2012)] et peut conduire à des pertes économiques importantes (Parisi *et al.*, 2015).

La culture du Kiwi, en particulier, est très fortement impactée par le chancre. La Nouvelle-Zélande a estimé une perte économique de 310 à 410 millions de dollars de 2012 à 2017 dans les vergers de Kiwi (Vanneste, 2012).

#### ❖ Prédilection à la maladie

La bactériose est une maladie dépendante des stress biotiques et abiotiques. Les principaux facteurs influant sur l'apparition de cette maladie dans les vergers sont la chaleur ou la sécheresse, les gelées tardives, le pH du sol et les nutriments. Ces facteurs peuvent changer progressivement au cours des saisons ou années et prédisposent les plantes ou les arbres à certaines maladies (Atkinson et Urwin, 2012).

Vigouroux *et al.*, (1997) ont mis en évidence l'influence du froid sur les pêchers et les abricotiers.

**Tableau 1** : Influence de la teneur en eau hivernale de rameaux détachés de pêcher sur les infections bactériennes provoqués artificiellement : la déshydratation diminue les lésions bactériennes sur les rameaux

Source : Vigouroux *et al.*, (1997)

<b>Traitement des rameaux</b>	<b>% eau MF (30 rameaux)</b>	<b>Lésions bactériennes (32 rameaux) mm</b>
<b>Frais</b>	53,3	11,5
<b>Déshydratés</b>	52,0	5,2

En effet, lorsque les températures descendent en dessous de 0°C, les tissus des tiges sont le siège d'un phénomène physique où l'eau circule de l'intérieur vers l'extérieur des cellules et inversement lorsque les températures augmentent.

L'eau située dans les cellules végétales va se rendre dans les espaces intercellulaires et prendre en glace. Ce phénomène donne un aspect vitreux aux rameaux.

Quand le climat se réchauffe, l'eau est directement et rapidement aspirée vers les cellules. Cependant, si les rameaux présentent une petite blessure, les bactéries épiphytes vont profiter de ce phénomène d'aspiration de l'eau pour s'introduire à l'intérieur des espaces intercellulaires et infecter la plante. Si les espaces intercellulaires sont auparavant infectés par des bactéries, ce phénomène va faciliter l'entrée des bactéries dans les cellules végétales et donc accélérer l'apparition des nécroses.

La position du verger a également un impact sur la prolifération de la bactériose : les vergers situés en versant, en altitude ou latitude différente, sont plus ou moins exposés au froid et donc plus ou moins sensible à la maladie (Vigouroux *et al.*, 1997).

Le domaine expérimental de Gotheron étudie depuis plusieurs années la diminution de la teneur en eau des branches et des rameaux des abricotiers. Ainsi la déshydratation des branches et rameaux (expérience en laboratoire) permet une diminution des lésions bactériennes (Tableau 1) ; ces conclusions ont été également vérifiées en vergers expérimentaux (Vigouroux *et al.*, 1997).

L'agriculture intensive du 20<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> siècle a impacté négativement l'agriculture d'aujourd'hui. En effet, les sols montrent une salinité, une acidification plus élevées et sont pollués par divers produits phytosanitaires ; cela nuit à la santé des cultures (Singh, 2000). L'utilisation des herbicides comme le glyphosate peut avoir aujourd'hui de graves conséquences sur les pathogènes des plantes (Bartoli *et al.*, 2015). Par exemple, Bartoli *et al.*, 2015 ont émis l'hypothèse que des bactéries comme *P. syringae* peuvent réussir à s'adapter et à affiner leur capacité à altérer les bonnes conditions de santé des plantes suite à de lourdes utilisations d'herbicide. Ainsi, *P. syringae* pourrait métaboliser les composants aromatiques des plantes comme les composants phénoliques qui sont une des défenses d'une plante face à une attaque de pathogènes.

Le pH du sol a également une influence sur la santé des plantes puisque, lorsque le pH est faible, cela augmente la sensibilité des arbres fruitiers face à *P. syringae* (Melakeberhan *et al.*, 1995).



La teneur en nutriments est également un facteur influençant les attaques pathogènes. On constate que, lors de fortes chaleurs estivales, le taux de transpiration des plantes augmente, et la plante ou l'arbre se retrouve en stress déclenchant une assimilation croissante de sels et des métaux lourds. Or, une forte disponibilité en nitrogène et une plus faible présence en magnésium favorisent le développement des maladies bactériennes (Snoeiijers *et al.*, 2000). Par exemple, l'augmentation du taux de calcium, de nitrogène et d'acide indolacétique augmente la sensibilité des pêchers à *Pseudomonas syringae pv. syringae* (Cao *et al.*, 2006).

#### ❖ Moyens de lutte

A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode de lutte complètement efficace contre la bactériose de l'abricotier et aucun cultivar résistant. Seules des méthodes préventives sont mises en place dans le but de limiter les dégâts dans les vergers. On distingue (d'après le dossier de recherche de Lemontey, J-M. (2007)) :

- ✚ Le choix de variété peu sensible à la bactériose
- ✚ Les traitements cupriques, c'est-à-dire, à base de cuivre
- ✚ Le choix de la variété du porte-greffe et la hauteur de greffage
- ✚ Le badigeonnage du tronc de l'arbre avec un mélange peinture acrylique et cuivre (Figure 1c)
- ✚ La limitation des interventions de taille

#### 4. Qui est *Pseudomonas syringae* ?

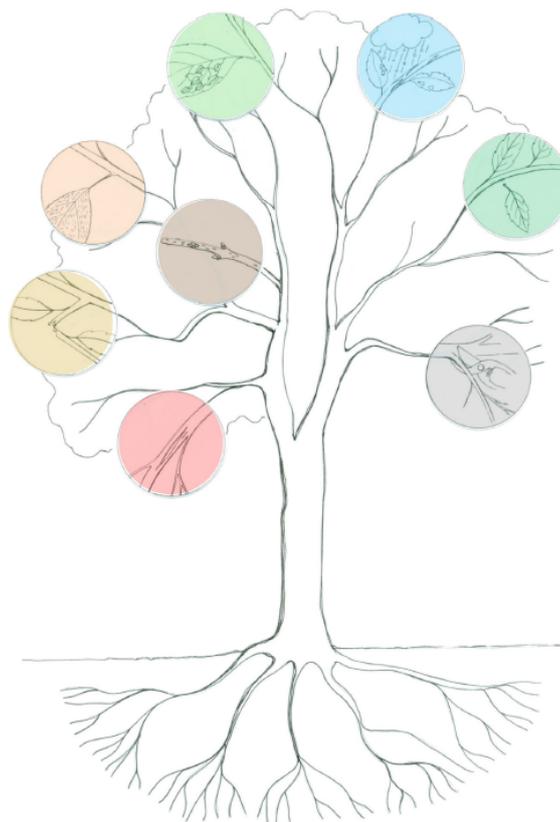
*P. syringae* sont des bactéries aérobies strictes (Gaignard et Luisetti, 1993) qui incluent plusieurs espèces phytopathogènes. Leur petite taille, environ 1 µm, facilite leur entrée par des ouvertures naturelles, comme les stomates (Gaignard et Luisetti, 1993).

La bactériose de l'abricotier peut être due à la présence de différents types de *P. syringae* ; la variabilité de ce groupe de bactéries est très importante sur les plans génétiques et phénotypiques (Morris *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2008). Berge *et al.*, 2014 ont étudié la variabilité de *P. syringae* dans le but de déterminer le lien de parenté entre les bactéries de ce complexe et ont déterminé 13 phylogroupes, eux-mêmes subdivisés en clades (Figure 2).



**Figure 3 :** Représentation des sites d'infection et des symptômes de *Pseudomonas syringae* sur une plante idéale. (a) *P. syringae* forme un biofilm à la surface de la feuille lors de la phase épiphyte. (b) *P. syringae* entre progressivement dans la plante, début de la phase endophyte. (c) *P. syringae* infecte la plante, phase endophyte pathogène.

Source : Gant *et al.*, 2006



**Figure 4 :** Représentation schématique des voies de contamination de *Pseudomonas syringae*. De gauche à droite en partant du bas : dégâts causés par le froid, branches cassées par le vent ou les dommages mécaniques, lenticelles, trichomes brisés, stomates, plaies causées par la grêle, cicatrices foliaires et blessures causées par l'élagage.

Source : Lamichhane *et al.*, 2014

Chez l'abricotier, les *P. syringae* du phylogroupe 2 (PG02) seraient les plus fréquemment rencontrées et les plus agressives (Parisi *et al.*, 2015). Néanmoins, deux autres bactéries appartenant au complexe *P. syringae* provoquent la bactériose de l'abricotier : *P. viridiflavya* et *P. morsprunorum* (Lemontey, 2007).

#### ❖ Cycle infectieux

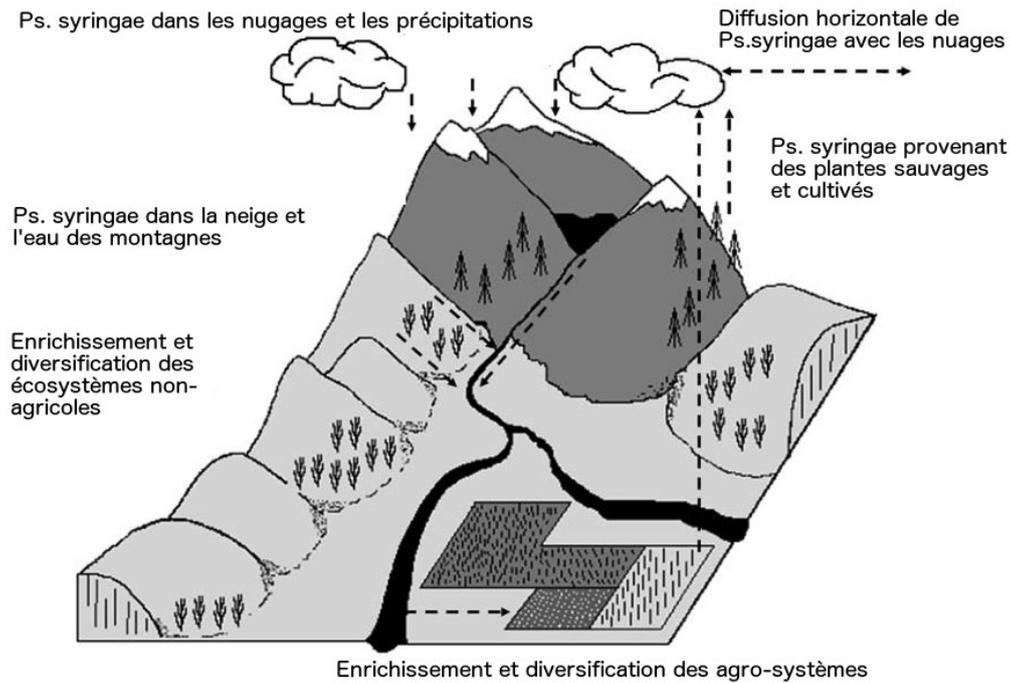
*P. syringae* a 4 caractéristiques importantes dans le cycle de l'infection :

- ✚ Une vie épiphyte sur les plantes
- ✚ Un pouvoir pathogène (Figure 3)
- ✚ Un pouvoir glaçogène (Figure 3)
- ✚ Une capacité à survivre dans des milieux très divers

Lors de la phase épiphyte, la bactérie est présente à la surface du végétal (feuilles en particulier), sans déclencher l'apparition des symptômes liés à cette maladie (Borschinger *et al.*, 2015 ; Morris *et al.*, 2008). *P. syringae* va ensuite profiter des entrées naturelles ou des blessures (provoquées par la pluie, grêle, taille,... : Figure 4) pour pénétrer dans les tissus, c'est le début de la phase endogène.

Une fois à l'intérieur des tissus de la plante, cette bactérie peut se multiplier et s'installer dans une phase endogène pathogène qui endommage le végétal. *P. syringae* possède un pouvoir glaçogène, c'est-à-dire qu'elle peut provoquer la prise en glace de l'eau à des températures supérieures à la normale. Si elle est présente dans les tissus de la plante, les dégâts de gel se déclencheront à des températures supérieures (-2 à -3 °C) par rapport aux températures de solidification (environ -7°C) et seront plus importants qu'en absence de bactéries. Les phénomènes de gel et dégel successifs favorisent la pénétration lors de la phase épiphyte et la progression de la bactérie lors de la phase endophyte (Gaignard et Luisetti, 1993).

*P. syringae* exerce ce phénomène de prise en glace grâce à une protéine INA (Ice Nucleation Active) qui se trouve sur la membrane externe de la cellule. La protéine forme un oligomère.



**Figure 5 :** Cycle de vie hypothétique de *Pseudomonas syringae* : Les bactéries contenues dans les nuages et l’atmosphère sont déposées par la pluie et la neige. La neige est un lieu de stockage de *P. syringae* mais la durée de survie dépend des conditions environnementales et du biotype de la bactérie. La pluie et la neige fondue se dirigent vers les lacs et les cours d’eau qui sont des lieux de prolifération et vecteurs de dissémination. L’eau de ces vecteurs transporte *P. syringae* vers les plantes sauvages et agricoles. Ces niches exposent *P. syringae* à des conditions environnementales différentes qui peuvent contribuer soit à la diminution de certains biotypes de la bactérie ou au contraire à la multiplication.

Source : Morris *et al.*, 2008

Elle est composée de trois domaines distincts (N-terminal, domaine central et C-terminal). Le domaine central représente 50 à 80 acides aminés en répétition de 16. (Garnham *et al.*, 2011).

La prise en glace n'est pas la seule arme de l'espèce *Pseudomonas*. En effet, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont capables de produire des toxines dangereuses pour les plantes. *P. syringae* est capable de produire de la syringomycine, qui est un peptide lysant les membranes des plantes hôtes (Corbaz, 1990).

Par rapport au cycle de vie de la bactérie, il apparaît que la grande majorité de la diversité de *P. syringae* se trouve dans des réservoirs agricoles et non agricoles (Demba Diallo *et al.*, 2012 ; Monteil *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2010).

Parmi les réservoirs environnementaux de *P. syringae*, les réseaux hydrographiques d'eau douce sont des porteurs constants de populations de la bactérie (Figure 5) (Morris *et al.*, 2010). Les prairies et leur litière hébergent quant à elles, des populations très denses et particulièrement diverses (Monteil *et al.*, 2012). Les souches de *P. syringae* trouvées dans la litière et dans les autres substrats en dehors des plantes cultivées ont des pouvoirs pathogènes très variés vis-à-vis des plantes cultivées (Monteil *et al.*, 2012 ; Morris *et al.*, 2010), mais une partie de cette métapopulation n'a pas de pouvoir pathogène du fait de l'absence naturelle du système de sécrétion des facteurs de virulence (du système type III de sécrétion) (Demba Diallo *et al.*, 2012). Ces populations variées de *P. syringae* sont enrichies par les précipitations et protégées par le manteau neigeux en hiver (Monteil *et al.*, 2011)

## **5. Le rôle et les effets du couvre-sol**

Aujourd'hui les agriculteurs doivent relever plusieurs défis : produire plus, tout en respectant l'environnement et ses ressources. Le plan Ecophyto a permis au monde agricole de réfléchir sur des méthodes alternatives dans le but de diminuer la consommation des produits phytosanitaires. En outre, les plantes « compagnes » ou couvre-sol font de plus en plus leur apparition dans les vergers ou en association avec les cultures de rente comme le colza ou le blé.

Le couvre-sol est compté parmi l'un des nombreux leviers agronomiques existants et procure de nombreux avantages à la culture ou aux arbres présents.



Selon Creamer et Baldwin, 2000, le rôle premier d'un couvre-sol est de piéger l'azote du sol pour le restituer aux cultures présentes mais aussi d'améliorer la qualité structurale du sol en limitant l'érosion et en améliorant les propriétés physico-chimiques du sol.

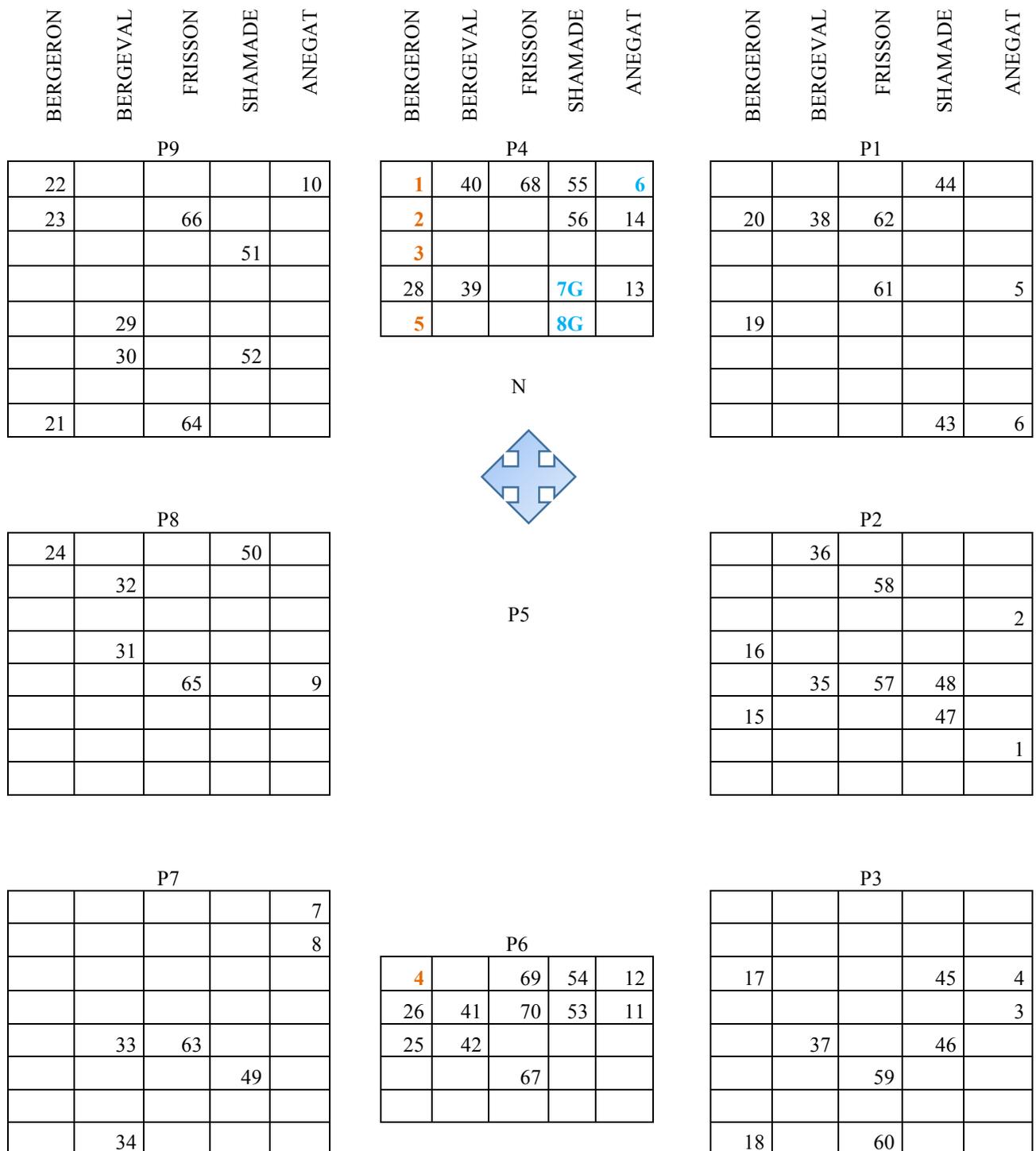
Vukicevich *et al.*, 2016 a démontré que le couvre-sol peut également influencer la communauté microbienne du sol positivement et négativement. En effet, les exsudats racinaires (carbone, acide organique, amino-acide, sucre, ...) captent les champignons, mais aussi certaines bactéries pathogènes, ce qui limite la contamination des arbres et des cultures en présence du couvre-sol. L'implantation d'un couvre-sol de la famille des *Brassicaceae* réduit l'abondance des agents pathogènes grâce à son effet de biofumigation.

Les plantes « compagnes » permettent de réduire également la prolifération des adventices, la présence des bioagresseurs, l'utilisation de pesticides et de fertilisants ; la consommation d'eau et d'énergies fossiles (Valantin-Morison *et al.*, 2014).

Il semblerait qu'au niveau du verger, les couvre-sols plantés en inter-rang et la litière (feuilles mortes tombées au sol) soient des sources potentielles d'inoculum de *P. syringae*, tout comme les eaux d'irrigation (Monteil, 2014) et le sol. Cependant, leur importance relative dans la conservation et la dispersion de populations bactériennes n'est pas connue.

## 6. Objectifs du stage et démarches associées

Ce stage a été réalisé au sein de l'équipe MISTRAL (Microbiologie des agroécosystèmes : TRAnsfert de connaissances sur L'histoire de vie d'agents phytopathogènes vers la protection des plantes et les processus climatiques) à l'INRA d'Avignon, unité Pathologie Végétale. Il est inscrit dans le programme Bactériose abricot (2014-2017) dont **l'objectif général est de déterminer le rôle de différents réservoirs potentiels de *P. syringae*, dont le couvre-sol dans le développement du chancre bactérien dans les vergers d'abricotiers.** Ce stage est financé par le GIS Fruits (Groupement d'Intérêts Scientifiques) et est soutenu par l'UERI de Gotheron le CTIFL et SupAgro Montpellier.



**Figure 6** : Schéma du verger CapRed à l'UERI de Gotheron : 70 arbres ont été numérotés de 1 à 70 de manière aléatoire afin de suivre l'évolution bactérienne. Les arbres numérotés de 1 à 5 en orange correspondent aux 5 arbres asymptomatiques et ceux numérotés 6, 7G et 8G en bleu représentent 3 arbres symptomatiques

Les objectifs principaux de ce stage sont :

- d'évaluer les relations entre les bactéries présentes dans le couvre-sol et celles présentes sur les arbres
- de suivre l'évolution de la charge en bactéries totale et en *P. syringae* du couvre-sol en fonction du temps sur 5 prélèvements de 2015 à aujourd'hui

Ces différents critères ont été estimés grâce à des prélèvements dans les vergers de l'INRA et de l'UERI de Gotheron.

Ces échantillons ont été ensuite traités par une analyse biochimique et moléculaire afin de caractériser les bactéries *P. syringae*, suivi par une analyse en biologie moléculaire par PCR et électrophorèse sur gel d'agarose.

## **Chapitre 2 : Matériel et Méthode**

### **1. Echantillonnage**

#### ❖ Lieu d'étude

Le projet a été réalisé dans les départements du Vaucluse et de la Drôme en collaboration avec l'UERI de Gotheron. Laurent Brun, Freddy Combe et Christophe Gros ont travaillé avec l'équipe MISTRAL afin de fournir des échantillons de couvre-sol, de tissus et de matériel végétal provenant de deux vergers d'abricotiers dans la Drôme à Saint-Marcel-lès-Valence.

L'INRA d'Avignon dispose également d'un verger d'abricotiers expérimental sur le site de Montfavet. Ce verger a permis d'effectuer les études préliminaires.

#### Le verger de Gotheron

L'UERI de Gotheron a mis à notre disposition un verger qui a été implanté en janvier 2015 sur une surface de 9000 m<sup>2</sup>, sur un sol du type « Diluvium alpin » (alluvions fluvio-glaciaires).

Il s'agit d'un sol acide à faible teneur en matière organique. Des apports de matière organique et un amendement minéral basique calcique ont été réalisés avant plantation.

Le verger (Figure 6) a été mis en place dans le cadre du programme Déphy-Ecophyto CAP ReD: Cerisiers Abricotiers Pruniers – Réduction des intrants et Durabilité des systèmes de production (coordination :CTIFL).

Abricotiers 30 plants / rang - Distance entre les rangs = 5m				
Distance sur rang = 3,10m	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	
90m	Stella	Stella	Stella	90m
	Rouge du Roussillon	Bakour	Bergeron 9	
	Rouge du Roussillon	Bakour	Bergeron 10	
	Rouge du Roussillon	Bakour	Bergeron 11	
	Rouge du Roussillon	Bakour	Bergeron 12	
	Rouge du Roussillon	Bakour	Bergeron 13	
	Stark	Bergeron	Stark	
	Orangered	Bergeron	Orangered	
	Orangered	Bergeron	Orangered	
	Orangered	Bergeron	Orangered	
	Stark	Bergeron	Stark	
	Orangered	Farbaly	Orangered	
	Orangered	Farbaly	Orangered	
	Stark	Farbaly	Stark	
	Bakour	Farbaly	Rouge du Roussillon	
	Bakour	Farbaly	Rouge du Roussillon	
	Bakour	Stark	Rouge du Roussillon	
	Bakour	Orangered	Rouge du Roussillon	
	Bakour	Orangered	Rouge du Roussillon	
	Bergeron	Orangered	Bakour	
	Bergeron 14	Stark	Bakour	
	Bergeron	Orangered	Bakour	
	Bergeron	Orangered 15	Bakour	
	Bergeron	Stark	Bakour	
	Farbaly	Rouge du Roussillon	Farbaly	
	Farbaly	Rouge du Roussillon	Farbaly	
	Farbaly	Rouge du Roussillon	Farbaly	
	Farbaly	Rouge du Roussillon	Farbaly	
	Farbaly	Rouge du Roussillon	Farbaly	
	Stella	Stella 16	Stella	

Arbres prélevés

**Figure 7** : Schéma du verger Perpheclim à l'UERI de Gotheron avec les arbres prélevés en bleu.

Les variétés utilisées sont auto-fertiles et issues du programme de sélection variétale INRA-CEP :

- **Bergeval**, production fin juin, sensible au chancre bactérien, fruit sensible à la pluie sur récolte, résistant sharka ;
- **Shamade**, production fin juin, sensible au chancre bactérien, résistant sharka ;
- **Bergeron** (témoin référence), production mi-juillet, sensible au chancre bactérien ;
- **Anégatcov**, production 20-25 juillet, très sensible au chancre bactérien, résistant à la sharka ;
- **Frisson cov**, production fin juillet, très sensible au monilia à la fleur et au chancre bactérien.

Le verger est composé de 9 parcelles de 25 à 40 abricotiers chacun, réparti de la manière suivante (Figure 6) :

- Deux parcelles de références (REF B1 et REF B2), greffées sur du Montclar à 60 cm, conduites en gobelet avec une stratégie phytosanitaire classique
- Deux parcelles ECOPHYTO 1 B1 et B2, greffées sur du Montclar à 110 – 120 cm, conduites en « petit » gobelet, stratégie phytosanitaire sans traitement cuprique ni insecticide
- Deux parcelles ECOPHYTO 2 B1 et B2, greffées sur du Montclar à 110 – 120 cm, conduites en palmette, stratégie phytosanitaire sans traitement cuprique ni insecticide
- Deux parcelles ECOPHYTO 3 B1 et B2, greffées sur du Montclar à 110 – 120 cm, conduites en palmette, stratégie phytosanitaire sans traitement cuprique ni insecticide mais protégées par une bâche anti-pluie et anti-grêle
- Une parcelle témoin conduite en gobelet sans aucune stratégie phytosanitaire, séparée des autres parcelles pour quantifier la pression phytosanitaire

L'INRA de Gotheron dispose également d'un verger d'abricotiers « Perpheclim » (Figure 7) qui est intégré dans un programme de recherche étudiant les effets du climat sur les arbres fruitiers. Ce verger a été implanté en 2015 en même temps que le verger CapRed. Cependant, les abricotiers des deux vergers ne proviennent pas du même pépiniériste. PerpheClim ne reçoit aucun traitement, ce verger a été installé dans le but d'observer l'adaptation des abricotiers greffés à 60cm face aux changements climatiques.

**Tableau 2 :** Composition des différents milieux et tampon utilisés

<b>Milieu King B (KB)</b>	<b>Quantité</b>	<b>Tampon phosphate (TP1)</b>	<b>Quantité</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,75 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,75 g
Protéose peptone n°3	15 g	H <sub>2</sub> O	1 L
Glycérol	10 ml		
Agar DIFCO	15 g		
H <sub>2</sub> O	1 L		
<b>Tryptone soja agar (TSA)</b>	<b>Quantité</b>	<b>Milieu KBC</b>	<b>Quantité</b>
Tryptone caséine soja	3 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
Agar DIFCO	15 g	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
H <sub>2</sub> O	1 L	Protéose peptone n°3	15 g
		Glycérol	10 ml
		Agar DIFCO	16 g
		H <sub>2</sub> O	900 mL
		Après autoclave :	
		Acide borique 1,5%	100 mL
		Céphalexine	80 mg dilués dans eau
		Cycloheximide	200 mg dilués dans l'éthanol

## Le verger de Montfavet

Le verger de l'équipe MISTRAL est composé de 30 abricotiers greffés sur du Montclar à 60 cm en gobelet sans stratégie phytosanitaire.

### ❖ Matériel prélevé

La variété Bergeron étant la variété la plus représentée chez les arboriculteurs et sensible à la bactériose, il a été décidé d'effectuer la comparaison bactérienne couvre-sol/arbre sur cette variété.

Dans le verger de Montfavet, les 30 arbres Bergeron (répartis en 3 lots de 10 arbres) ont servi de tests pour les manipulations préliminaires. Les prélèvements ont été effectués en février sur bourgeons (environ 50 par lot) et tissus symptomatiques (point de gomme et chancres).

Dans le verger CapRed, 5 arbres asymptomatiques de variété Bergeron et 3 arbres symptomatiques de variétés Anegat et Shamade ont été prélevés au niveau du couvre-sol et des feuilles (environ 50 par arbre) pour les arbres Bergeron et seulement au niveau du couvre-sol pour les arbres Anegat et Shamade.

Dans le verger PerpheClim, 5 arbres asymptomatiques de variété Bergeron (arbres 9 à 13) et 3 arbres symptomatiques de variétés Bergeron, Orangered et Stella ont été prélevés au niveau du couvre-sol et des feuilles pour les arbres 9 à 13 et seulement au niveau du couvre-sol pour les arbres 14 à 16 (Figure 6).

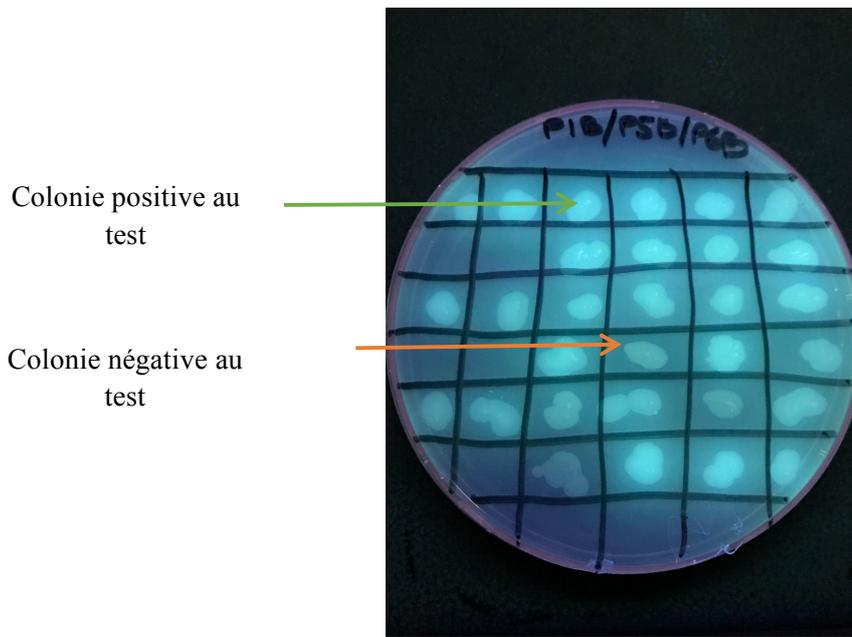
En fonction de la présence et de l'état d'avancement des symptômes sur les arbres 1 à 16, de l'écorce, des charpentières ou des rameaux ont été prélevés au couteau ou au sécateur. L'UERI de Gotheron réalisant des notations du verger CapRed, seuls de l'écorce et des petits rameaux ont été coupés.

Les matériels (sécateur, gants, couteau et ciseaux) étaient désinfectés à l'alcool à 70° afin d'éviter les contaminations d'arbre en arbre.

## **2. Traitement des échantillons**

### ❖ Couvre-sol, feuilles et tissus

Pour chaque échantillon, le couvre-sol et les feuilles sont pesés, environ 15 à 20g du couvre-sol ont été gardés et environ 5g pour les feuilles. Dans chaque sachet, 50 mL de tampon phosphate (TP1) (Tableau 2) sont ajoutés puis passés au broyeur homogénéisateur (Stomacher®) pendant 4 minutes afin d'extraire les bactéries du matériel végétal vers le tampon.



**Figure 8** : Pigment fluorescent de *Pseudomonas syringae* sous lumière ultra-violet.

Une gamme de dilution est réalisée au 1/10<sup>ème</sup> jusqu'à 10<sup>-5</sup>, 100 µL de chaque dilution sont ensuite étalés sur milieu semi-sélectif (KBC) pour détecter la présence de *P. syringae* et 20 µL sont déposés sur milieu nutritif (TSA) pour dénombrer la flore totale (Tableau 2).

Pour les tissus symptomatiques, les échantillons sont rincés à l'eau du robinet puis rapidement à l'alcool à 70° et à l'eau stérile. L'écorce est délicatement découpée avec un scalpel stérile puis déposée sur milieu KBC.

Le milieu KBC est un milieu semi sélectif pour l'isolement de *P. syringae* et comprend en plus des éléments carbonés sels, agar, de l'acide borique de la céphalexine (antibiotique inhibiteur des bactéries gram+) et de cycloheximide (inhibiteur des champignons et de certaines cellules eucaryotes).

Le TSA est un milieu non sélectif et permet de cultiver la flore totale dans les échantillons. La présence de cycloheximide dans ce milieu permet d'inhiber principalement la croissance des champignons.

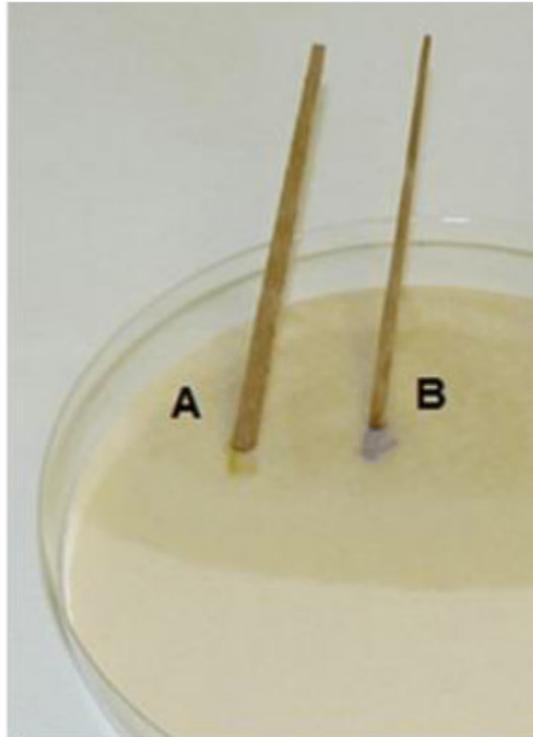
#### ❖ Lecture des échantillons

Après 72h à l'étuve à 25°C, les boîtes de KBC sont contrôlées sous UV. En effet, le milieu KBC est carencé en fer (plus particulièrement la protéose pectone n°3). Face à cette carence, les bactéries *P. syringae* produisent de la pyoverdine, une enzyme qui est fluorescente sous les UV. Cette étape permet de réaliser une première sélection (Figure 8).

Les colonies sur les boîtes de TSA et KBC sont comptées afin de déterminer la flore totale et la flore potentiellement *P. syringae*. Les colonies ressemblant à *P. syringae* sur milieu KBC sont ensuite repiquées sur milieu KB (30 colonies par boîte) pour les analyses biochimiques et moléculaires. Les bactéries PSY-like sont sélectionnées en fonction de la forme (ronde), du rebord (non dentelé), de la couleur (blanc translucide) et de l'aspect (visqueux).

Après 48h à 25°C, chacune des 30 colonies passe au test oxydase. Ce test met en évidence la présence (ou non) de la chaîne respiratoire des bactéries du complexe enzymatique IV : cytochrome-oxydase et permet de sélectionner les bactéries *P. syringae* qui ont une réponse négative (Figure 9).

Le test oxydase est réalisé avec une solution composée de Tetra-méthyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride à 1% dans de l'eau distillée stérile. On imbibe un buvard de cette solution et chaque colonie est déposée sur celui-ci à l'aide d'un cure-dent ou d'une ose.



**Figure 9** : Test oxydase effectué sur les colonies (A = Oxydase + ; B = Oxydase -) qui met en évidence la chaîne respiratoire des bactéries du complexe enzymatique IV : cytochrome-oxydase (absente chez *P. syringae*).

**Tableau 3** : Caractéristiques des amorces nucléotidiques.

		Séquence
Sens	<b>PG1 F</b>	3'-AGA ACT TCT GTT GCT GAC AGT ACG-5'
	<b>PG2 F</b>	3'-AGC AGC GAT TTA TTT TGT CTT GA-5'
	<b>PG3 F</b>	3'-AAG CGT GCC AAA GAG CTT CT-5'
	<b>PG4 F</b>	3'-CAC CTG ACT TAC TGA TCA AT-5'
	<b>PG9 F</b>	3'-CAT TGC AGG AAC TGA TGA AC-5'
	<b>PG13 F</b>	3'-GGA TGT TCT ACG ACA ACC TG-5'
	<b>Scha F</b>	3'-CGA CCT GCT TTC GAT CA-5'
Anti-sens	<b>PG1 Rv</b>	5'-CAA TAC CGT CAT CGC GCT GGA CA-3'
	<b>PG2 Rv</b>	5'-ATG ATC GCG TAC CTG ATG TC-3'
	<b>PG3 Rv</b>	5'-CTT GGC CGA AGG TCA TTG AC-3'
	<b>PG4 Rv</b>	5'-ACA GGC ACG CAT ATA TCG TT-3'
	<b>PG9 Rv</b>	5'-GGT TCA ACT CTT CGA GAC AA-3'
	<b>PG13 Rv</b>	5'-AGC TGC GAG GTG ACG TTT GA-3'
	<b>SchaRv</b>	5'-TCA ATA CTC TGG AGA TCA G-3'

Le témoin positif fait virer la solution d'oxydase au violet très rapidement (moins de 5 secondes après dépôt), pour le témoin négatif, il n'y a aucun changement de couleur (Figure 9).

Ces différents tests (culture sur milieu KBC, fluorescence et oxydase) permettent de caractériser les isolats et de sélectionner au maximum ceux qui seront ensuite sélectionnés pour passer à l'étape de biologie moléculaire (qui permettra une caractérisation approfondie).

Une fois ce test effectué, les bactéries sélectionnées sont mises en plaque PCR 96 puis dans 200 µl de TP1 pour les PCR et dans 50 µL de glycérol pour la collection du laboratoire.

### 3. PCR Phylogroupes, Box PCR, PCRPG02d et PCR cts

La PCR classique est une réaction cyclique qui permet d'amplifier de manière exponentielle un fragment d'ADN cible par réaction enzymatique. La mesure de la PCR classique est effectuée en point final. La PCR comprend 3 étapes, où lors des différents cycles, la matrice ADN va être soumise à chaque fois à (1) une **dénaturation** (Passage d'un ADN double brin en ADN simple en rompant les liaisons hydrogènes), (2) **hybridation des amorces** (fixation des amorces sens et anti-sens aux brins d'ADN) et (3) à une **élongation** (polymérisation par l'enzyme polymérase).

#### ❖ PCR Phylogroupes

Ces PCR permettent d'identifier les bactéries *P. syringae* et leur appartenance aux phylogroupes 1-2-3-4-7/8-9-13

On peut ainsi identifier les souches des phylogroupes 1-3-9 grâce à la PCR multiplex M1, les phylogroupes 2-4-13 avec la PCR multiplex M2 et les phylogroupes 7 et 8 avec la PCR SchA.

Sont nécessaires à ces PCR : les suspensions bactériennes choisies auparavant, le mix PCR contenant : les amorces spécifiques (sens et anti-sens : tableau 3) qui permettent de cibler une région d'intérêt du génome, le tampon et le magnésium nécessaires pour un rendement optimal de la polymérase et des dNTP pour la synthèse de l'ADN. Dans certains kits PCR, comme c'est le cas pour le kit Multiplex Qiagen utilisé pour les PCR M1 et M2, le tampon, les dNTP et le magnésium sont fournis avec le kit.



La composition du mix multiplex M1 et M2 a été élaborée par Benoit Borschinger (Doctorant de 2013 à 2016) pour un échantillon de 12,5  $\mu\text{L}$  (volume final) :

- 2X Qiagen Multiplex PCR master Mix      6.25  $\mu\text{L}$
- 10X primer mix amorce)                      1.25  $\mu\text{L}$   
(Concentration initiale de 100mM, 10  $\mu\text{L}$  de chaque amorce + 500  $\mu\text{L}$  QSP)
- Eau milliQ stérile                              2.75  $\mu\text{L}$
- Solution Q                                         1.25  $\mu\text{L}$

La composition du mix SchA a été élaborée pour un échantillon de 25  $\mu\text{L}$  (volume final) :

- Tampon (5X green GoTaq flexi buffer)      5  $\mu\text{L}$
- $\text{MgCl}_2$  (25mM)                                 2  $\mu\text{L}$
- dNTPs (25mM)                                 0.2  $\mu\text{L}$
- 10X primer mix (100 mM)                    2  $\mu\text{L}$
- $\text{H}_2\text{O}$  milliQ (eau distillée stérile)        13.67  $\mu\text{L}$
- GoTaq G2 Flexi DNA pol (5u/ $\mu\text{L}$ )        0.13  $\mu\text{L}$

Les mix sont déposés dans des plaques (11.5  $\mu\text{L}$  pour les multiplex, 23  $\mu\text{L}$  pour la PCR SchA) auxquels seront ajoutées les suspensions bactériennes (1  $\mu\text{L}$  pour les multiplex et 2  $\mu\text{L}$  pour la PCR SchA). Ces produits sont ensuite déposés dans des thermocycleurs où les différentes étapes de la PCR seront réalisées.

Les produits PCR sont ensuite conservés soit à 4° soit à -20°C en attendant d'être analysés, afin d'éviter la dégradation de l'ADN.

Les réactions d'amplification sont réalisées sur un thermocycleur Eppendorf mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Allemagne).



#### ❖ Box PCR

La Box PCR est une PCR qui permet d'obtenir un profil pour chaque bactérie et de les comparer entre eux, à l'image d'empreintes digitales. Ceci grâce à l'amplification des éléments REP (pour Repetitive Extragenic Palindromic Element) qui sont des amorces consensuelles, homologues de séquences répétées. Dans un génome bactérien, ces éléments représentent environ 0.5 à 1 %. Un ensemble de ces séquences palindromiques alignées constitue une séquence consensus REP. Le fait que ces éléments soient conservés au sein d'une même espèce (malgré l'existence de variations infra-spécifiques), place cette PCR parmi les meilleures méthodes utilisées pour la classification bactérienne.

Les souches choisies pour être identifiées avec la BOX PCR sont celles appartenant au même phylogroupe (identifiées grâce aux PCR phylogroupes). La Box PCR est très sensible, il faut donc purifier les souches sur KB. Après 48h de culture à 24°C, une colonie bactérienne sur chaque boîte est mise en suspension dans 100 µL d'eau stérile. Chaque suspension est dosée à une DO<sub>580</sub> de 0.06 au colorimètre soit 10<sup>8</sup> bactéries/mL.

Composition du mix Box PCR préparée pour un échantillon en volume final de 25 µL (mix + ADN):

- Taqhotstart                    0.13 µL
- dNTPs 25mM 0.5 µL
- Primer Box A1R            0.5 µL de la solution à 100pMol/µL  
Séquence Primer Box A1R: (5' - CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3')
- Eau distillée                17.87 µL
- MgCl<sub>2</sub>                        1.5 µL

Tampon 10X 2.5 µL. Pour la réaction Box PCR, 23µL de mix sont déposés dans chaque puits avec 2 µL de suspension bactérienne (concentration 10<sup>8</sup> bactéries /mL).

#### ❖ PCR PG02d

Cette PCR permet la détection des bactéries du phylogroupe 2 clade 2d de *P. syringae*. Toutes les colonies identifiées en PG02 grâce à la PCR multiplex M2 sont testées avec cette PCR. Cette étape permet d'affiner la classification des bactéries du phylogroupe 2 (PG02) et de ne pas envoyer inutilement des bactéries du même clade au séquençage.



Mix PCR pour un échantillon de 25µL de volume final :

- Tampon (5X green GoTaq flexi buffer) 5 µL
- MgCl<sub>2</sub> (25mM) 1.5 µL
- dNTPs (25mM) 0.2 µL
- Amorces 2d-1Fwd (10µM) 1 µL  
(5'-TGC TTT TCG CTC CGT TGC CC-3')
- Amorces 2d-3Rv(10µM) 1 µL  
(5'-AGT CGC CAG TTC ATC AAG AT-3')
- H<sub>2</sub>O milliQ (eau distillée stérile) 14.17 µL
- GoTaq G2 Flexi DNA pol (5u/µL) 0.13 µL

Pour la réaction PCR PG02d, 23µL de mix sont déposés dans chaque puits avec 2 µL de suspension bactérienne.

#### ❖ PCR *cts*

Cette PCR permet d'amplifier l'un des gènes de ménage qui permettra la construction d'arbres phylogénétiques. Un *gène de ménage* est un gène qui s'exprime dans tous les types cellulaires et dont les produits assurent les fonctions indispensables à la survie des cellules. Ils ne subissent donc pas ou très peu de régulation, d'où l'intérêt de les utiliser dans la phylogénie. Le citrate synthase est une enzyme qui joue un rôle dans le cycle de Krebs afin de condenser le résidu acétyle en citrate. Une fois, le cycle de Krebs fini, le citrate synthase se retrouve dans tout l'organisme. Le séquençage du gène de ménage *cts* (citrate synthase) est utilisé dans cette étude pour placer les souches dans l'arbre phylogénétique de *P. syringae*. Il permet aussi de vérifier la pertinence de l'appartenance aux différents phylogroupes déterminée par PCR pour les souches séquencées.

Les produits PCR ayant amplifié sont ensuite envoyés au séquençage pour y être analysés.

La recette de mix PCR *cts* pour 1 échantillon de 25µL volume final est la suivante :

- Tampon (5X green GoTaq flexi buffer) 5 µL
- MgCl<sub>2</sub> 25mM 2 µL
- dNTPs 25mM 0.5 µL
- Primer Cts-Fp 1 µL of the solution 10pMol/µL  
(Séquence : 5'-AGT TGA TCA TCG AGG GCG C(AT)G CC -3')



- Primer Cts –Rp 1  $\mu$ L of the solution 10pMol/ $\mu$ L  
(Séquence: 5'-TGA TCG GTT TGA TCT CGC ACG G -3')
- Eau distillée stérile 13.37  $\mu$ L
- GoTaq G2 Flexi DNA pol (5u/ $\mu$ L) 0.13  $\mu$ L

Le tableau 4 présente les programmes des PCR PG02d, BOX PCR et PCR *cts*.

❖ Lecture des résultats PCR :

Après les PCR, un ratio de 1:5 de tampon de charge est ajouté dans les puits pour les PCR Multiplex 1 et 2, PCR PG02d et BOX PCR. Le tampon de charge est composé de bleu de bromophénol, de xylène cyanol et de glycérol. Il permet d'alourdir notre échantillon et donc de faciliter le chargement des puits sur le gel d'agarose.

On réalise un gel d'agarose à 1.5% et on dépose dans les puits 5  $\mu$ L des produits PCR

La migration est réalisée dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE, entre 100 à 135 volts pendant 30 minutes à 1h selon la taille des produits à amplifier.

Les gels sont ensuite mis pendant 20 minutes dans un bain de BEt (Bromure d'éthidium) qui est un colorant fluorescent sous UV. Les bandes sont visualisées sous ultraviolet à 320 nm.

La figure 10 présente des exemples de gels obtenus.

#### 4. Séquençage des produits de la PCR *cts*

Le séquençage d'ADN est une technique qui permet de déterminer l'ordre successif des nucléotides d'un fragment d'ADN donné.

Cette technique nécessite l'utilisation d'un gène de référence (gène de ménage) pour l'expression d'un gène ciblé. Le gène de ménage est présent dans toutes les cellules de l'organisme.

Le séquençage des souches n'est pas effectué à l'INRA mais par la société Genoscreen.

#### 5. Traitement des données en bio-informatique

Genoscreen analyse les produits PCR grâce au séquençage et envoie les résultats sous forme de chromatogramme. Ceux-ci sont tout d'abord traités avec le logiciel CHROMAS LITE afin de « nettoyer » les séquences des accroches d'amorces illisibles et de modifier les séquences des nucléotides non identifiés.

**Tableau 5 :** Répartition des 1635 souches identifiées dans les différents phylogroupes.

	PG1	PG2	PG3	PG4	PG7/8	PG9	PG10	PG13	INC	Non PSY
Nombre	512	715	7	0	19	10	0	27	212	133
Pourcentage	31,1	43,5	0,4	0	1,2	0,6	0	1,6	12,9	8,1

Les séquences nettoyées sont ensuite traduites dans un fichier FASTA sous Word pour le bon fonctionnement des étapes suivantes.

Ce fichier détaille les séquences de chacune des souches, et est ensuite utilisé pour (1) aligner toutes les séquences entre elle et (2) réaliser l'arbre phylogénétique.

Le projet « bactériose de l'abricot » étant mené depuis 3 ans, des souches ont été auparavant identifiées, vérifiées et vont servir de référence afin de classer les souches isolées lors de ce stage. Ainsi, toutes les séquences confondues sont alignées grâce au logiciel DAMBE version 5.6.8 puis analysées visuellement. L'arbre phylogénétique est ensuite réalisé à l'aide du logiciel MEGA-V6 pour mettre en évidence la proximité des séquences.

### **Chapitre 3 : Résultats**

#### **1. Qualité de la technique de caractérisation des souches de *P. syringae***

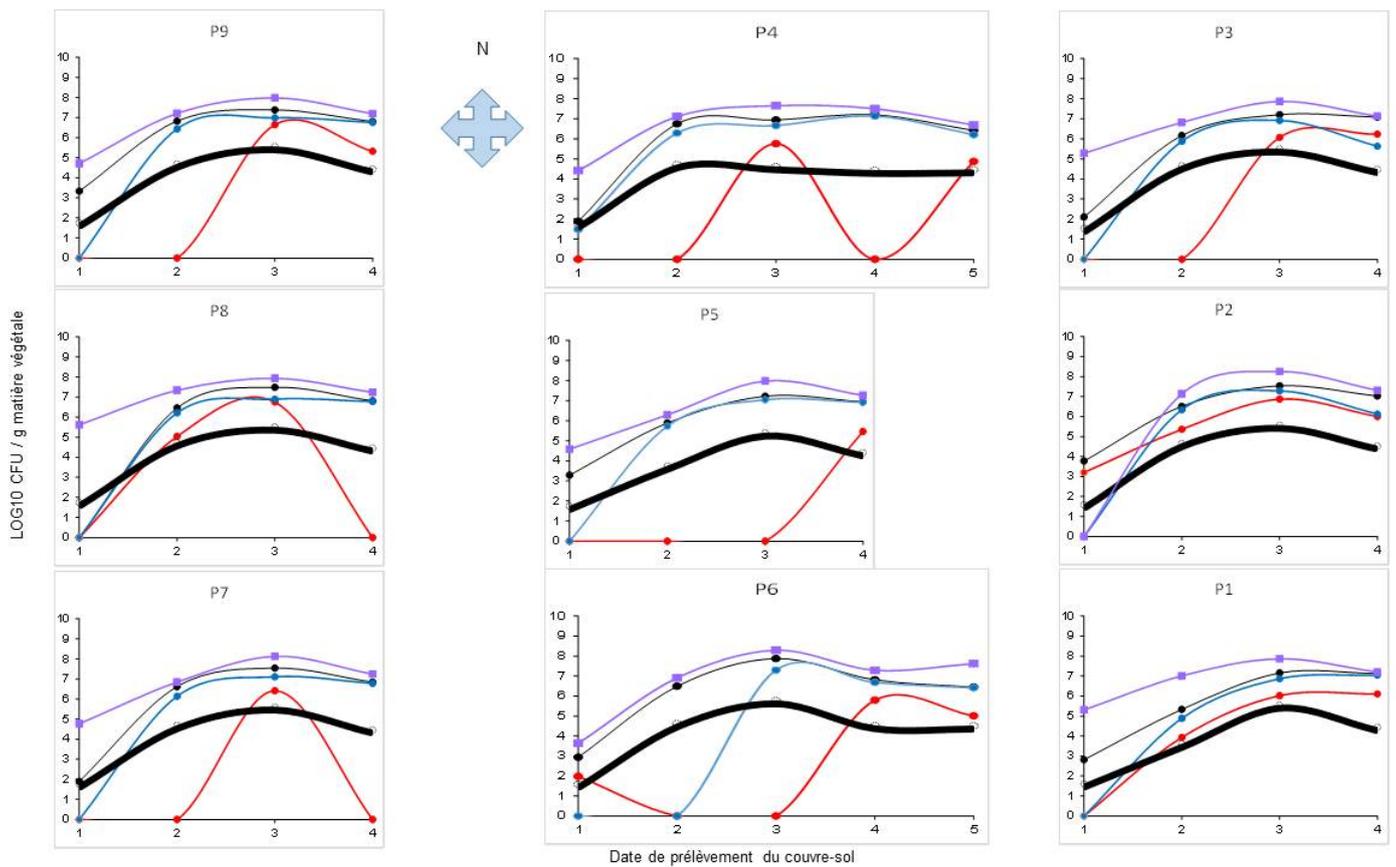
Lors de ce stage, 1635 souches ont été identifiées à l'aide de PCRs Multiplex en 4 mois soit 409 par mois. Ces résultats respectent bien l'estimation de l'équipe Mistral qui est de 400 à 500 souches identifiées par mois. Sur ces 1635 souches candidates, 92% soit 1502 souches ont été identifiées comme *Pseudomonas syringae*. Ces résultats indiquent que les colonies sont bien sélectionnées visuellement en amont sur les boîtes de pétri. Sur toutes ces souches, les phylogroupes 1 et 2 sont largement représentés (Tableau 5). Ainsi les analyses qui vont suivre sont focalisées sur ces deux phylogroupes.

#### **2. Caractéristique de la microflore du couvre-sol**

##### **❖ Comptage sur TSA et KBC**

Les dénombrements sur TSA et KBC du couvre-sol et des feuilles ont permis de caractériser la microflore totale en unité formant colonie (CFU) et la microflore en *P. syringae* en CFU Psy-like (colonies ayant l'aspect des *P. syringae*). Les échantillons de couvre-sol et de feuille sont composés d'une diversité microbienne riche en flore totale et en *P. syringae*. Bien que la proportion de *P. syringae* dans la population totale est faible elle est toujours présente sur le couvre-sol et sur les feuilles. Ces résultats montrent bien le caractère ubiquiste de cette bactérie.

Sur les arbres symptomatiques prélevés, la présence de *P. syringae* a été mise en évidence grâce au dénombrement sur TSA et KBC. Ces résultats rejoignent les références bibliographiques qui mettent en avant la responsabilité de *P. syringae* dans la bactériose de l'abricotier.



**Figure 11 :** Cinétique (exprimée en log<sub>10</sub> de CFU par gramme de matière végétale) de la population bactérienne totale (violet), de la population de *Pseudomonas syringae* totale (noir), de la population du phylogroupe 2 (bleu), du phylogroupe 1 (rouge) et le seuil de détection (gris) des 9 points du verger CapRed du temps 1 à 4 (temps de prélèvement depuis 2015). Le temps 5 n'est représenté que sur les parcelles 4 et 6, seul lieu de prélèvement. Le seuil de détection représente la présence d'une bactérie sur une boîte de KBC en fonction des dilutions

#### ❖ Détection par PCR

L'analyse moléculaire a permis de gagner en précision au niveau des résultats et de déterminer les phylogroupes auxquels la bactérie appartenait sur chaque échantillon. Avec respectivement 31,1% et 43,5%, les phylogroupes 1 et 2 (PG01 et PG02) sont les plus représentés dans notre panel d'échantillon. Ces deux phylogroupes sont caractéristiques de *P. syringae*. A plus faible pourcentage, les échantillons sont composés des phylogroupes 7/8 et 13 respectivement à hauteur de 1,2% et 1,6% (Tableau 5). La présence des phylogroupes 7/8 peut s'expliquer par la présence de *P. viridiflava* qui est issu des réservoirs environnementaux et également pathogène sur différents végétaux.

Après analyse, le phylogroupe 2 est de manière flagrante présent sur le couvre-sol et le phylogroupe 1 se situe sur les feuilles. Cependant, nous remarquons quelques discordances au niveau des résultats sur les feuilles. En effet, les arbres 9 à 13 (arbres sains) du verger PerpheClim comportent du phylogroupe 02 sur le couvre-sol mais aussi sur l'arbre (feuilles). Or, selon les références bibliographiques, le phylogroupe 2 est composé de 5 clades (a,b,c,d,e) avec 2a souches retrouvées dans l'eau, 2b issues des substrats environnementaux, 2c souches non pathogènes isolées des substrats environnementaux et des plantes, 2d souches très proches de 2b et 2e souches isolées dans la pluie et la neige. Le clade PG02 2b est potentiellement pathogène de l'abricotier. Ainsi la présence du PG02 sur les arbres sains ne serait pas synonyme de maladie, puisque dans ce cas, *P. syringae* est présent sous une forme non pathogène des végétaux. Toutefois, en hiver, les symptômes de la bactériose ne se sont pas encore totalement exprimés.

Concernant les arbres 1 à 5 (arbres sains) et les arbres 6 à 8 et 14 à 16 (arbres symptomatiques), le phylogroupe 01 est présent au niveau de l'arbre. Cet agent est responsable de la bactériose de l'actinidia et des noisetiers.

#### ❖ Cinétique de *P. syringae* dans le temps

Cette partie regroupe les résultats de deux autres stagiaires en Master (Bénédicte Morgaint et Benjamin Haim) présents depuis le début du projet. La cinétique de *P. syringae* (Figure 11) est établie sur le verger CapRed en 9 points qui correspondent aux 8 parcelles et la zone enherbée au milieu du verger (Figure 6). Les résultats présentent 4 temps de prélèvement en automne 2015-2016 et au printemps 2016-2017 afin de voir des différences de population bactérienne ou de symptômes sur les arbres. Le temps 5 est représenté seulement sur les parcelles 4 et 6, parcelles de références dans le verger, en avril 2017.



En effet, lors de ce stage, les analyses se sont basées sur la variété Bergeron dans les parcelles de référence greffée à 60 cm avec un traitement cuprique.

Le seuil de détection a été calculé pour chaque temps en prenant en compte la présence d'une bactérie sur une boîte KBC en fonction des dilutions 0, -1, -2, -3 et -4. Toutes les valeurs en dessous de ce seuil de détection ne sont pas à prendre en compte dans l'analyse des données.

Lors du temps 1, en 2015, les abricotiers venaient d'être implantés ainsi que le couvre-sol qui a été semé 6 semaines avant les prélèvements. A ce moment-là, la différence entre la population totale et la population de *P. syringae* est présente sur toutes les parcelles, cela indique une grande diversité de microorganismes dans le couvre-sol.

La population de *P. syringae* PG01 et PG02 dans le couvre-sol est faible pour les parcelles P2, P4 et P6 à nulle pour les parcelles P1, P3, P5, P7 et P9. La parcelle P8 n'était composée d'aucune bactérie *P. syringae*.

Au fur et à mesure des prélèvements, la population de *P. syringae* PG02 augmente significativement depuis le temps 2 au temps 4 pour être à peu près au même niveau que la population totale de *P. syringae* et de bactéries totales. Ainsi, ces graphiques montrent que le couvre-sol est en très grande partie composé de *P. syringae* plus particulièrement de PG02.

En ce qui concerne le PG01, la population apparaît plus timidement que le PG02 à partir du temps 2 pour toutes les parcelles sauf pour la parcelle 5 où le PG01 apparaît au temps 3. Le PG01 est toujours au-dessus du seuil de détection au temps 4 mais est toujours plus faible que le PG02.

Les résultats du temps 5 montrent que la population en *P. syringae*, totale et en PG02 suivent une même tendance au cours du temps et est environ égal à  $6/7 \log_{10}$  par gramme de matière végétale.

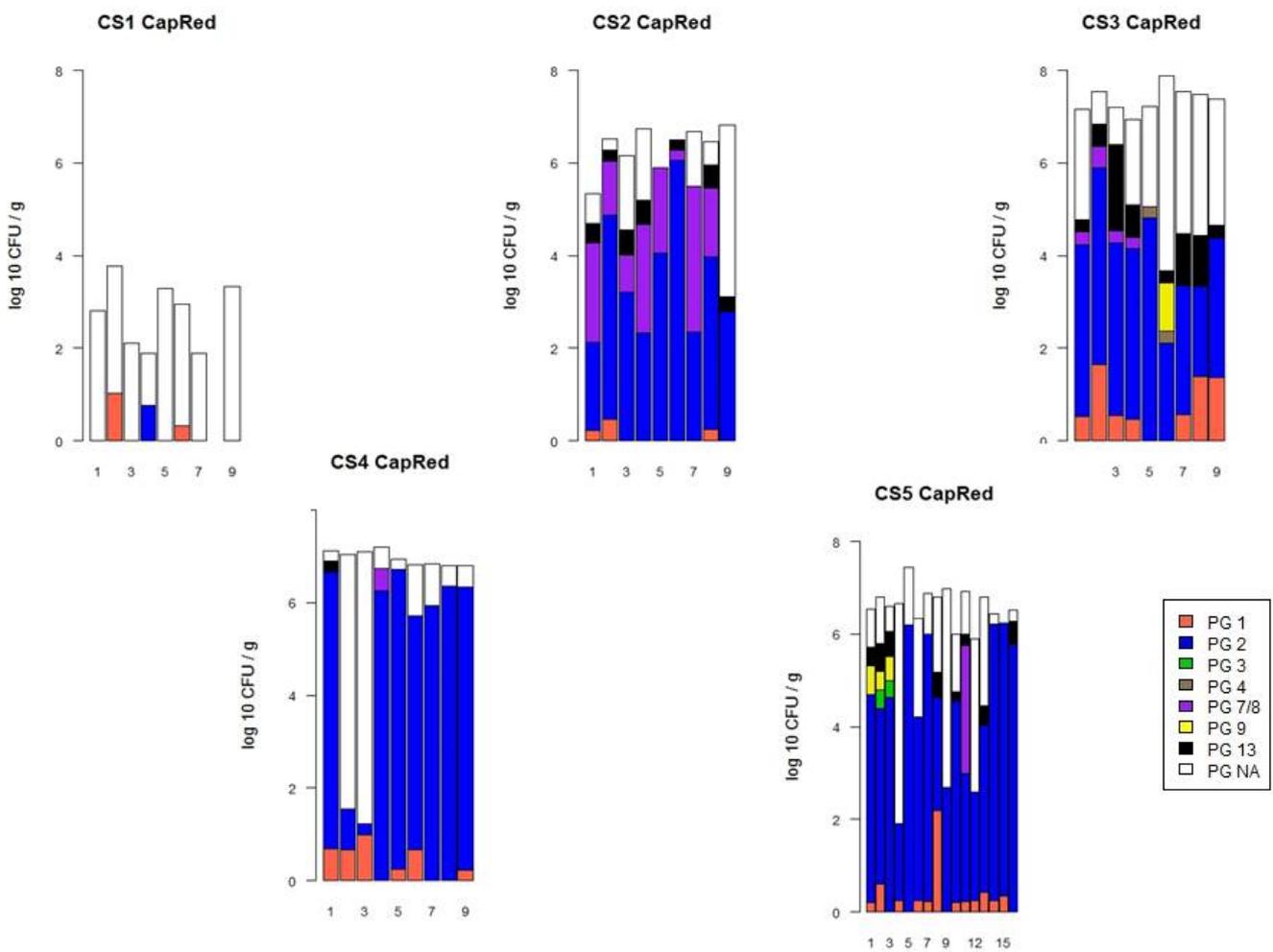
La progression du PG01 au cours du temps est très fluctuante mais reste toujours plus faible que la progression du PG02.

#### ❖ Dynamique de *P. syringae* dans le couvre-sol

Lors du temps 5, 16 arbres (feuilles et couvre-sol) ont été prélevés sur le verger CapRed et Perpheclim. Le but de prélever ces deux éléments est de savoir s'il existe une interaction entre un arbre malade et le couvre-sol et un arbre sain et le couvre-sol.

**Tableau 6 :** Analyse statistique descriptive et ANOVA à 1 facteur de l'état des arbres (sain ou malade) sur le couvre-sol en fonction des deux vergers selon la population de *Pseudomonas syringae* totale, la population de PG01 et PG02 et la population de *Pseudomonas syringae* non identifié.

p-value	CAPRED	PERPHECLIM
ANOVA 1 facteur	0,929134	0,625082
	0,424531	0,581349
	0,515337	0,826550
	0,162748	0,533970



Axe des abscisses = Numéro des arbres prélevés

**Figure 12 :** Représentation de la population de *Pseudomonas syringae* et des différents phylogroupes dans le couvre-sol du verger CapRed du temps 1 à 5.

Pour cela, une analyse statistique descriptive a tout d'abord calculé les moyennes, les minimums, les maximums et les écart-types des arbres malades et sains sur chaque verger pour la population de *P.syringae* totale, la population de PG01 et PG02 et la population de *P. syringae* non identifiés (Tableau 6 et annexe 1). Puis, une ANOVA à un facteur a été réalisée dans le but de voir si les arbres malades ou sains avaient un effet sur le couvre-sol.

Pour les deux vergers, les hypothèses sont les suivantes avec  $\alpha = 5\%$  :

- H0 : L'état de l'arbre n'a pas d'effet significatif sur le couvre sol
- H1 : L'état de l'arbre a un effet significatif sur le couvre-sol

Pour le verger CapRed, les valeurs de la p-value (Tableau 6) sont comprises entre 0,162748 et 0,929134. Pour le verger Perpheclim, les valeurs sont comprises entre 0,533970 et 0,826550. Ces valeurs étant supérieures à 0,05, l'hypothèse 1 est rejetée et l'hypothèse 0 est acceptée.

Ainsi, l'état de l'arbre (sain ou malade) n'a pas d'effet significatif sur le couvre-sol se situant à proximité concernant la population de *P. syringae*, de PG01, de PG02 et de *P. syringae* non identifiés.

❖ Structure de la population *P. syringae* dans le couvre-sol

La figure 12 illustre très bien la dominance du phylogroupe PG02 dans le couvre-sol. Au temps 1, le jeune couvre-sol est pauvre en *P. syringae*. De plus, le point 8 n'est pas représenté sur le graphique car le couvre-sol ne contenait aucune bactérie *P. syringae*.

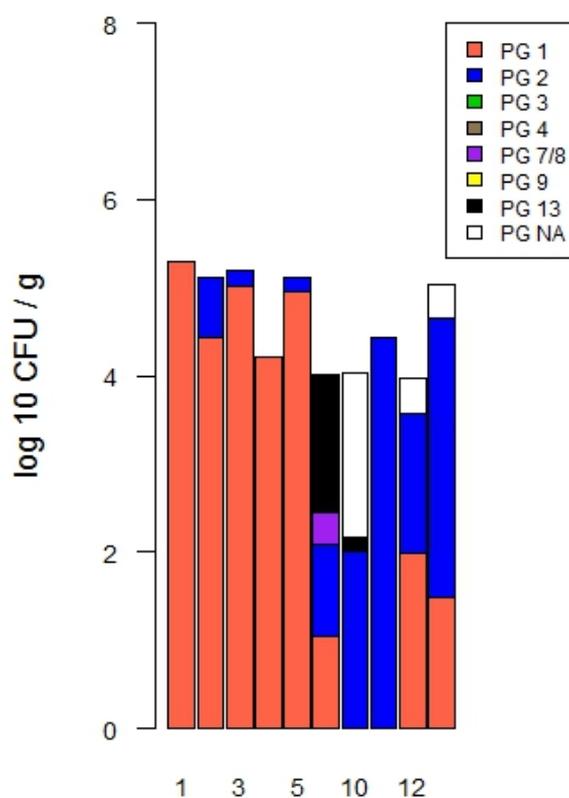
Ces graphiques montrent également que la proportion de PG02 augmente progressivement avec le temps. Au temps 5, nous pouvons voir qu'il n'y a pas de différence de distribution des phylogroupes entre les arbres sains (1-2-3-4-5-9-10-11-12-13) et les arbres malades (6-7-8-14-15-16). Ces observations rejoignent les résultats de l'ANOVA à un facteur.

Le temps 5 ayant été effectué sur deux vergers (CapRed et Perpheclim), une ANOVA à un facteur a été réalisée afin de savoir si le verger avait un impact sur le couvre-sol avec les hypothèses suivantes pour  $\alpha = 5\%$  :

- H0 : Le verger n'a pas d'effet significatif sur le couvre sol
- H1 : Le verger a un effet significatif sur le couvre-sol

p	Verger
Anova 1 facteur	Ps 0,037468
	PG1 0,474927
	PG2 0,147584
	Ni 0,060129

## F1 CapRed/PerpheClim



**Figure 13 :** Représentation de la population de *Pseudomonas syringae* et des différents phylogroupes au niveau des feuilles dans le verger CapRed pour les arbres 1 à 5 et dans le verger PerpheClim pour les arbres 9 à 13.

**Tableau 7 :** Résultats de la régression linéaire et de l'ANOVA à 1 facteur sur l'effet du couvre-sol sur l'arbre (Ps : *Pseudomonas syringae* totale, CS : Couvre-sol, F : Feuille).

Effet du CS sur F	R <sup>2</sup>	p-value
<b>Ps totale sur les deux vergers</b>	0,4941	0,0010
CapRed	0,3318	0,0600
PerpheClim	0,4748	0,0568
<b>PG1 sur les deux vergers</b>	0,1144	0,0697
CapRed	0,5877	0,0140
PerpheClim	0,2780	0,1616
<b>PG2 sur les deux vergers</b>	0,0031	0,2690
CapRed	0,0429	0,4385
PerpheClim	0,1603	0,1792

Avec une p-value inférieure à 0,05 pour la population totale de *P. syringae* (Ps), H1 est accepté, le verger a un effet significatif sur le couvre-sol. Cependant, avec des p-values supérieures à 0,05 pour PG1, PG2 et Ni, H0 est accepté, le verger n'a pas d'effet sur le couvre-sol.

### 3. Etat des lieux des feuilles dans le verger CapRed et Perpheclim

Lors du temps 5, les arbres 1 à 5 dans le verger CapRed et les arbres 9 à 13 dans le verger Perpheclim ont été prélevés au niveau des feuilles en même temps que le couvre-sol. Après analyse par PCR, on peut constater que la présence du *P. syringae* PG01 est dominante sur les feuilles dans le verger CapRed et au contraire *P. syringae* PG02 est dominant sur les feuilles dans le verger Perpheclim. La diversité des phylogroupes sur les feuilles est très faible car seuls PG01, PG02, PG13 et PG7/8 sont présents (Figure 13).

#### ❖ Relation couvre-sol / feuille

Une régression linéaire ainsi qu'une ANOVA à 1 facteur sous R a permis de montrer l'effet ou non du couvre-sol sur l'arbre et donc, à terme, de permettre de déterminer si le couvre-sol est source d'inoculum pour les arbres se situant à proximité.

Les hypothèses sont les suivantes avec  $\alpha = 5\%$  :

- H0 : Le couvre-sol n'a pas d'effet significatif sur l'arbre
- H1 : Le couvre-sol a un effet significatif sur l'arbre

Avec des p-values supérieures à 0.05, et des R<sup>2</sup> très faible (Tableau 7), le couvre-sol n'a pas d'effet sur l'arbre concernant PG02. L'hypothèse 0 est donc acceptée. Pour le phylogroupe 1, il semblerait que le couvre-sol a seulement un effet significatif dans le verger CapRed avec une p-value inférieure à 0,05. Néanmoins, ce résultat est à approfondir car le phylogroupe 1 est peu représenté dans le couvre-sol. Concernant la population totale en *P. syringae*, le couvre-sol a un effet significatif sur les arbres dans leur globalité. Cependant, ce résultat n'est pas propre à un verger en particulier (CapRed ou Perpheclim) puisque la p-value est supérieure à 0,05.

### 4. Arbre phylogénétique

Un arbre phylogénétique (Annexe 2) sur la base de la séquence partielle du *cts* a été réalisé lors de ce stage dans le but de mettre en évidence la proximité des souches au niveau génétique et de comparer les génomes des bactéries présentes sur le couvre-sol et les feuilles (Annexe 2).



Des séquences de souches de référence identifiées (TAT = Tige Abricot Tunnel) par l'équipe MISTRAL ont été ajoutées dans cet arbre afin d'effectuer les comparaisons et d'avoir des points de repère entre les souches du couvre-sol (CS5), des feuilles (F1), des bourgeons (BGA1) et des tiges (TGA).

Cet arbre a montré une bonne correspondance des phylogroupes des différentes souches entre nos résultats en biologie moléculaire par PCR et ceux du séquençage. Seul le phylogroupe 10 est uniquement révélé par séquençage. En effet, la méthode de détection par PCR pour ce phylogroupe n'est pas encore développée.

Le phylogroupe 2 plus particulièrement le clade b, qui comprend les références 41A et CC457, est connu pour être pathogène de l'abricotier et causer la bactériose. Au niveau du couvre-sol, les souches séquencées sont majoritairement identifiées dans le clade b et c. Le clade c étant non pathogène, il n'a aucun effet dans le développement de la bactériose. Néanmoins, les statistiques ont démontré plus haut que le couvre-sol n'avait pas d'effet sur l'arbre et aucune contamination du couvre-sol vers l'arbre n'est effectuée.

Le couvre-sol reste un environnement très riche en *P. syringae*. En effet, le phylogroupe 1, 7, 10 et 13 sont également présents. 8 souches ont été classées dans le phylogroupe 10, qui est de plus en plus détecté dans les substrats environnementaux et les plantes.

Il serait donc intéressant de développer la méthode de biologie moléculaire par PCR afin d'identifier le phylogroupe 10 dans les étapes qui précèdent le séquençage.

Le phylogroupe 1 est essentiellement représenté sur les feuilles, 6 souches ont été identifiées en PG01a. Ces souches sont proches des pathogènes des brassicacées (*P. syringae pv manulicola*) et des cucurbitacées (*P. syringae pv lachrymans*). On peut donc se poser la question de la pathogénicité de ces deux pathogènes sur l'abricotier.

Les phylogroupes 13 et 2 ont également été retrouvés sur les feuilles. Le phylogroupe 13 n'est pas pathogène pour l'abricotier, contrairement au phylogroupe 2. Lors du prélèvement, les feuilles étaient jeunes (post-bourgeons), il serait intéressant de prélever les feuilles à un stade plus avancé pour regarder l'évolution de la flore en *P. syringae*.

Le prélèvement des bourgeons et des tissus sur symptômes dans le verger des Garrigues a été réalisé lors des manipulations préliminaires. Ces premiers prélèvements ont été utiles afin de tester les protocoles envisagés au Domaine de Gothenon.



6 souches des bourgeons ont été identifiées en PG01a et 7 souches en PG02d. 10 souches des tissus ont également été classées dans le PG01a et 3 souches isolées sur chancres bactériens en PG02b.

Les recherches de Luciana Parisi concernant les tests de pathogénicité sur tige d'abricotier vont permettre dans l'avenir de savoir si ces souches retrouvées dans les bourgeons sont pathogènes ou non.

Le génome des souches de référence (TAT) prélevées sur les abricotiers avant plantation ne sont pas proches des souches sur les bourgeons (BGA1) et les tiges (TGA). On peut penser que *P. syringae* évolue au cours du temps.



## Discussion

### Prélèvements à Gotheron :

Dans les vergers CapRed et PerpheClim à Gotheron, l'équipe Mistral a fait le choix de prélever 16 arbres pour une question de moyens humains. En effet, lors des stages précédents, 70 arbres avaient été notés et prélevés. Cependant, la plupart de ces arbres présentaient des symptômes de la bactériose due à l'hiver très froid. Il était donc impossible pour l'équipe de traiter autant d'arbres au laboratoire.

Tous les arbres sains parmi ces 16 arbres ont été prélevés parmi les arbres greffés à 60 cm et de variété Bergeron. Cette variété est largement utilisée chez les arboriculteurs, et le greffage est le plus souvent réalisé à 20 cm. Ce choix a été fait dans le but de se rapprocher au plus près de la réalité du terrain.

Les arbres symptomatiques ont été prélevés sur des variétés plus sensibles comme Anegat ou Shamade afin de prélever sur symptômes déclarés comme les chancres.

Dans ce verger expérimental, deux parcelles sont protégées par des bâches anti-pluie. En effet, ce dispositif s'est montré efficace contre la tavelure de la pomme par exemple. Cette technique permet de limiter ou d'empêcher le développement des champignons et des bactéries, plus particulièrement en jouant une action sur la dissémination et l'humectation qui favorise la germination des spores. Ce dispositif s'est montré également efficace pour protéger contre l'éclatement des cerises. Le CTIFL pratique différentes études sur l'efficacité de ces bâches contre la bactériose du kiwi (*P. syringae pv actinidia*) et la moniliose de l'abricotier (*Monilia*). Ainsi, le domaine de Gotheron a souhaité tester cette technique sur deux petites parcelles du verger CapRed afin de voir si ce dispositif pouvait agir contre la bactériose de l'abricotier. Lors de notre notation sur ces deux parcelles, nous avons constaté qu'il existait quelques symptômes tels que des points de gomme ou des rameaux desséchés mais en moindre quantité par rapport aux autres parcelles sans bâches. Cependant, les arbres étant sous bâches, un dispositif d'irrigation a dû être installé près des arbres afin de maintenir une bonne irrigation. Les feuilles restaient tout de même légèrement plus petites que celles des autres arbres et un peu « fanées ». Les bâches anti-pluie auraient-elles un effet sur la photosynthèse et par conséquent une incidence sur la récolte des fruits ? Il serait donc intéressant de tester l'efficacité de ce système et d'étudier le développement de la population de *P. syringae* sur ces arbres.



Ce verger est également composé d'arbres greffés à 1.20 m. La plupart des arboriculteurs disposent d'abricotiers greffés à 20 cm par habitude. Cependant il a été montré que le greffage haut (à partir de 60cm) aurait une incidence sur l'apparition de la bactériose de l'abricotier. En effet, cette technique permet de diminuer la sensibilité des abricotiers à la bactériose, c'est-à-dire qu'il limite l'apparition des symptômes et surtout la mort de l'arbre entier. Il serait donc intéressant de comparer les différences d'apparition de la bactériose en fonction du greffage à 60 cm et à 1.20 m.

#### Les analyses de microbiologie, de biochimie et de biologie moléculaire

Le complexe de *P. syringae* est très diversifié et est composé de différentes souches de cette bactérie. Lors des prélèvements sur des substrats environnementaux et agricoles, plusieurs souches peuvent être présentes. Ainsi, l'analyse microbiologique a permis de dénombrer les bactéries totales sur TSA et les bactéries *P. syringae* sur KBC. Cette technique a permis également de sélectionner visuellement les bactéries PSY-like. Même si cette méthode est efficace puisque dans la présente étude elle a permis de sélectionner 93% de *P. syringae*, elle n'est cependant pas objective et peut changer en fonction de la personne qui effectue le dénombrement et les conditions de la sélection des bactéries.

L'analyse biochimique avec le test oxydase et la fluorescence complètent la sélection visuelle. En effet, avec ces deux tests, nous sélectionnons les bactéries oxydase négatives et fluorescentes. Ces deux méthodes permettent d'éliminer au maximum les bactéries qui ne sont pas *P. syringae pv syringae* afin de ne pas utiliser inutilement les produits PCR qui sont onéreux. Cependant, *P. syringae pv viridiflava* est également oxydase négative et fluorescente. Ainsi, il nous est impossible de détecter visuellement une différence entre *P. syringae pv syringae* et *P. syringae pv viridiflava*. Seule l'analyse par PCR permet de faire une distinction entre les deux.

L'analyse en biologie moléculaire par PCR et gel d'électrophorèse est très efficace et est spécifique à *P. syringae pv syringae*. Cette méthode permet de distinguer les différents phylogroupes sauf le phylogroupe 10. En effet, les amorces qui détectent ce phylogroupe ne sont pas encore fonctionnelles. Cependant, comme vu dans les résultats, ce phylogroupe augmente au fur et à mesure chaque année, ce qui permettra de développer les amorces au sein du centre INRA. La PCR et les gels d'électrophorèse restent tout de même des méthodes assez longues puisqu'il faut entre 4 et 5 heures par plaque PCR avant d'avoir les résultats.



## La bactériose de l'abricotier

L'objectif premier de ce travail était d'évaluer les relations entre les bactéries présentes dans le couvre-sol et celles présentes sur les arbres. Il s'agissait aussi d'étudier l'évolution de la charge en bactérie totale et en *P. syringae* en fonction du temps sur 5 prélèvements de 2015 à aujourd'hui.

*P. syringae* est qualifié d'ubiquiste grâce aux recherches de Cindy Morris et d'Odile Berge. Les différentes analyses lors de ce stage ont permis d'identifier clairement la population de bactéries présentes dans le couvre-sol et les feuilles. En effet, *P. syringae* PG02 est majoritairement présent dans le couvre-sol du verger et PG01 est présent sur l'arbre (feuilles et symptômes). Le phylogroupe 2 est responsable de la bactériose, plus particulièrement le clade 2b. Sur les feuilles, le PG02 a également été identifié. Néanmoins, les souches prélevées et isolées des feuilles étaient peut-être dans la phase épiphyte. Ainsi, la maladie ne s'était pas encore développée.

Grâce aux analyses statistiques, nous avons pu mettre en avant que les populations de *P. syringae* dans l'arbre pouvait ne pas avoir la même structure que celles du couvre-sol. Au contraire, le couvre-sol a un effet sur l'évolution du PG01 dans les arbres seulement dans le verger CapRed, ce résultat reste néanmoins à approfondir.

Le verger (CapRed ou PerpheClim) a une incidence sur la population totale en *P. syringae* du couvre-sol. On peut se poser la question si les pratiques culturales des arboriculteurs auraient un effet sur l'évolution bactérienne. En effet, les deux vergers sont différents par leur schéma de plantation et leur mode de conduite.

En regroupant les résultats des autres stagiaires, on a pu constater que la cinétique de la charge en bactérie totale et en *P. syringae* (PG01 et PG02) évolue avec le temps dans le couvre-sol. Au dernier temps de prélèvement, le phylogroupe 2 représente la majorité de la population totale en *P. syringae*. Lors de la dernière période de prélèvement, les feuilles prélevées en mars étaient très jeunes. Ainsi, il serait intéressant d'effectuer une autre période de prélèvement lorsque les feuilles ont atteint un stade de développement plus important.

A ce jour, nous pouvons dire que le couvre-sol ne joue pas un rôle dans le développement du chancre bactérien dans les vergers d'abricotiers. Cependant, il est encore impossible aujourd'hui de différencier les bactéries épiphytes des bactéries endophytes. En effet, les protocoles expérimentés à l'heure actuelle ne permettent pas de savoir ce qu'on prélève exactement et sont très lourds en temps de manipulation.



### Freins et limites

Dans les vergers expérimentaux de Gotheron, beaucoup de symptômes de la bactériose ont été constatés sur les arbres. Cependant, pour une question de main-d'œuvre et une gestion des échantillons au laboratoire, l'équipe a dû malheureusement faire un choix sur le nombre d'échantillons et donc d'arbres à prélever. Il serait donc intéressant de retourner dans ces vergers pour effectuer de plus amples analyses.

D'un point de vue des analyses, les analyses biochimiques, microbiologiques et moléculaires sont très efficaces mais nécessitent beaucoup de manutention. Les box-PCR nécessitent une étape de purification (poser à nouveau les bactéries en solution sur milieu), de dosage (DO = 0,8 pour chaque puit) et de comparaison des profils. Cette analyse s'effectuant à la fin juste avant le séquençage, est contraignante en temps. De plus, lorsqu'on réalise les prélèvements de colonies sur milieux, nous pouvons prélever deux souches (PG01 et PG02 par exemple) en même temps et les mettre dans le même puits sur une plaque PCR. Ces différences sont impossibles à détecter visuellement. Ces discordances peuvent fausser légèrement les résultats lors de l'analyse.



## Conclusions et perspectives

La bactériose est une maladie endémique souvent observée dans les vergers d'abricotiers dans le sud de la France mais aussi dans les pays étrangers tels que la Nouvelle Zélande sur l'actinidia. En 2009, une recrudescence de cette maladie est apparue. Les arboriculteurs se trouvent de plus en plus désemparés face à cette situation et perdent énormément d'un point de vue économique. A l'heure actuelle, aucun traitement phytosanitaire n'est efficace contre cette maladie, seules des méthodes préventives permettent de limiter les dégâts dans les vergers. Les centres de recherche et techniques tels que l'INRA et le CTIFL de Balandran travaillent sur cette thématique. Il s'agit, à l'heure actuelle, de savoir si le couvre-sol en inter-rang dans les vergers d'abricotiers a un effet sur le développement du chancre bactérien, c'est-à-dire vérifier si le couvre-sol est une source d'inoculum et contaminerait les arbres à proximité. Ces organismes cherchent également à évaluer la charge en bactérie *P. syringae* totale au cours du temps.

Le projet Bactériose de l'abricotier disposait de deux vergers sur le domaine expérimental de Gotheron. Du point de vue des analyses, les différentes techniques utilisées lors de ce projet sont très efficaces mais assez contraignantes en temps. Les résultats issus de ces analyses ont mis en avant les différences des populations de *P. syringae* entre le couvre-sol et l'arbre. En effet, le phylogroupe 1 est très présent sur l'arbre alors que le phylogroupe 2 est très présent sur le couvre-sol. Dans cette étude, il était important de prendre en compte la notion de clade (sous-division des phylogroupes). En effet, le clade c du phylogroupe 2 n'est pas pathogène pour l'abricotier. Ainsi, le phylogroupe 2 peut se retrouver sur l'arbre sans être pathogène, simplement parce que l'environnement convient à son développement.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont pu démontrer que le couvre-sol ne jouait pas un rôle dans le développement du chancre bactérien. Cependant, il serait intéressant d'étudier d'autres composantes telles que les techniques culturales des arboriculteurs, le transport de *P. syringae* par le vent et l'exposition des vergers aux vents.

Dans le futur, il serait aussi intéressant de pouvoir effectuer des collaborations avec des arboriculteurs de la région pour être dans des conditions réelles afin d'étudier différents facteurs sur l'apparition et le développement de la maladie, avec un suivi dans le temps. Une collaboration avec des pépiniéristes pourrait être également envisagée afin de savoir si les arbres sont contaminés dès le début ou non. Ceci permettrait, dans l'avenir, le développement d'un kit de détection de la maladie destinés aux pépiniéristes.



Dans les prochains projets au sein de l'INRA, il serait également intéressant de mettre en place la détection de *P. syringae* avec la qPCR. En effet, l'INRA d'Avignon dispose d'une plateforme de biologie moléculaire avec des équipements de pointe tels que la qPCR. Il faudrait, dans un premier temps, étudier la manière d'extraire l'ADN des bactéries à partir du matériel végétal et adapter un protocole de qPCR avec plusieurs lots d'amorces pour la détection des différents phylogroupes. Cette technique pourrait permettre à l'équipe de gagner en précision.

Enfin, dans l'optique de bien diagnostiquer cette maladie dans les vergers, il faudrait étudier d'autres méthodes de détection. En effet, le diagnostic visuel n'est jamais certain bien que tous les symptômes de la bactériose soient répertoriés.

## Références bibliographiques

- Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012).** The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.
- Audergon, J. M., Dosba, F., Karayiannis, I., & Dicenta, F. (1994).** Amélioration de l'abricotier pour la résistance à la sharka<sup>1</sup>. *EPPO bulletin*, 24(3), 741-748.
- Bartoli, C., Lamichhane, J. R., Berge, O., Guilbaud, C., Varvaro, L., Balestra, G. M., ... & Morris, C. E. (2015).** A framework to gauge the epidemic potential of plant pathogens in environmental reservoirs: the example of kiwifruit canker. *Molecular plant pathology*, 16(2), 137-149.
- Berge O, Monteil CL, Bartoli C, Chandeysson C, Guilbaud C, Sands DC, Morris CE. (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(9):e105547.doi:10.1371/journal.pone.0105547
- Borschinger, B., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J.F. et al. (2015)** A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *J Appl Microbiol* 120: 714-723.
- Cao, T., McKenry, M. V., Duncan, R. A., DeJong, T. M., Kirkpatrick, B. C., & Shackel, K. A. (2006).** Influence of ring nematode infestation and calcium, nitrogen, and indoleacetic acid applications on peach susceptibility to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology*, 96(6), 608-615.
- Corbaz, R. (1990).** *Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes*. PPUR presses polytechniques.
- Creamer, N. G., et Baldwin, K. R. (2000).** An evaluation of summer cover crops for use in vegetable production systems in North Carolina. *HortScience*, 35(4), 600-603.
- Demba Diallo M, Monteil CL, Vinatzer BA, Clarke CR, Glaux C, et al. (2012).** *Pseudomonas syringae* naturally lacking the canonical type III secretion system are ubiquitous in nonagricultural habitats, are phylogenetically diverse and can be pathogenic. *ISME J* 6: 1325–1335.
- Dicenta, F., & Audergon, J. M. (1994).** Utilisation de la technique d'immunoempreinte pour l'étude de la résistance à la sharka chez les Prunus<sup>1</sup>. *EPPO Bulletin*, 24(3), 749-753.
- Gaignard JL, Luisetti J. (1993).** *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte glaçogène et pathogène. *Agronomie*, 13, 333-370



**Garnham, C.P., Campbell, R.L., Walker, V.K., Davies, P.L., 2011.** Novel dimeric b-helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites. *BMC Struct. Biol.* 11, 36. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6807-11-36>.

**Gavrilović, V., Živković, S., Dolovac, N., Trkulja, N., Pfaf-Dolovac, E., Popović, T., and Ivanović, Z. (2012).** *Pseudomonas syringae* – Pathogen of Sweet Cherry in Serbia. *Pestic. Phytomed. (Belgrade)*, 27(2), 2012, 141–149

**Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., & Dangl, J. L. (2006).** Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 425-449.

**Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. (1999).** Plant systematics: a phylogenetic approach. *ecologiamediterranea*, 25(2), 215.

**Kotan, R., & Sahin, F. (2002).** First record of bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, on apricot trees in Turkey. *Plant Pathology*, 51(6), 798-798.

**Lamichhane, J.R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J.M., and Morris, C. (2014).** Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: seeing the forest for the trees. *Advances in agronomy* 126, 235-295.

**Melakeberhan, H., Jones, A. L., Hanson, E., & Bird, G. W. (1995).** Effect of low soil pH on aluminum availability and on mortality of cherry seedlings. *Plant disease*, 79(9), 886-892.

**Monteil, C. (2011).** *Ecologie de Pseudomonas syringae dans un bassin versant : vers un modele de transfert : des habitats naturels aux agro-systemes* (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).

**Monteil CL, Guilbaud C, Glaux C, Lafolie F, Soubeyrand S, Morris CE. (2012).** Emigration of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from leaf litter contributes to its population dynamics in alpine snowpack. *Environmental Microbiology*, 14(8): 2099–2112

**Monteil C, Bardin M, Morris CE. (2014).** Features of air masses associated with the deposition of *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by rain and snowfall. *ISME J* in press.

**Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA, Glaux C, Guilbaud C, et al. (2008).** The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J* 2: 321–334.



**Morris CE, Sands DC, Vanneste JL, Montarry J, Oakley B, et al. (2010).** Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe and New Zealand. *MBio* 1: 00107–00110.

**Parisi, L., Borschinger, B., Chandeysson, C., Bourgeay, J-F., Berge, O. & Morris, C. (2015).** Identification of the reservoirs of *Pseudomonas syringae* in *Prunus armeniaca* orchards. International workshop on bacterial diseases of stone fruits and nuts, Izmir, TUR, 2015-04-21-2015-04-24

**Reglinski, T., Vanneste, J. L., Wurms, K., Gould, E., Spinelli, F., & Rikkerink, E. (2014).** Using fundamental knowledge of induced resistance to develop control strategies for bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Induced plant responses to microbes and insects*, 158.

**Singh, R. B. (2000).** Environmental consequences of agricultural development: a case study from the Green Revolution state of Haryana, India. *Agriculture, ecosystems & environment*, 82(1), 97-103.

**Snoeijers, S. S., Pérez-García, A., Joosten, M. H., & De Wit, P. J. (2000).** The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6), 493-506.

**Valantin-Morison M., David C., Cadoux S., Lorin M., Celette F. Amossé C. & Basset A. (2014).** Association d'une culture de rente et espèces compagnes permettant la fourniture de services écosystémiques. *Innovations Agronomiques* 40, 93-112

**Vanneste, J. L., Spinelli, F., Fiorentini, L., Yu, J., Cellini, A., Cornish, D. A., ... & Felman, C. (2012).** Reducing susceptibility of kiwifruit plant to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* by manipulating the plant metabolism using elicitors and hormones. *A Snapshot of Psa*.

**Vigorous, A., Bussi, C., Chalvon, V., & Girard, T. (1997).** Bactériose du pecher et de l'abricotier. Influence combinée du froid et du sol. *Arboricul. Frut*, 511(3).

**Vukicevich, E., Lowery, T., Bowen, P., Úrbez-Torres, J. R., & Hart, M. (2016).** Cover crops to increase soil microbial diversity and mitigate decline in perennial agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development*, 36(3), 48.

**Warlop, F. (2003).** Lutte contre le monilia de la fleur de l'abricotier en Agriculture Biologique. *Arboriculture Fruitière*, (568), 53-55



## Livre

**Michel Gautier, La culture fruitière (les productions fruitières)**, Paris, Editions TEC&DOC, « Agriculture d'aujourd'hui », 2001, 665 pages

## Nétographie

**Abricot de nos régions. L'abricot en chiffre** [En ligne]. Disponible sur le site : <http://www.abricotsdenosregions.com/carte-identite/l-abricot-en-chiffres#content>.

(10/12/2016)

**Biologie végétale. Formation en biologie végétale.** [En ligne]. Disponible sur le site : <https://www.biologievegetale.be/index.php?rub=fiches-famille&idf=57#> (10/12/2016)

**FranceAgrimer.** Le marché de l'abricot en 2016 et synthèse filière fruits et légumes Février 2015 [En ligne]. Disponible sur : [www.rnm.franceagrimer.fr/bilan/abricot\\_rnm.pdf](http://www.rnm.franceagrimer.fr/bilan/abricot_rnm.pdf) et <http://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/36603/335579/file/SYN-FEL-2015-etude%20export%20abricot.pdf>. (10/12/2016)

**Lemontey, J-M. La bactériose de l'abricotier : symptômes et dégâts** [en ligne]. Rapport de recherche SEFRA. CRA RA, 2007, 7 pages. Disponible sur : [http://rhone-alpes.synagri.com/synagri/pj.nsf/TECHPJPARCLEF/03828/\\$File/plaquette%20bactériose.pdf?OpenElement](http://rhone-alpes.synagri.com/synagri/pj.nsf/TECHPJPARCLEF/03828/$File/plaquette%20bactériose.pdf?OpenElement) (26 / 12 / 2016).

**PACA Chambres agriculture. Nos marques** [En ligne]. Disponible sur : <http://www.paca.chambres-agriculture.fr/nos-produits/decouvrir-nos-terroirs/nos-marques-territoriales/nos-marques/>. (13/12/2016)

**Tela Botanica. L'abricotier**[En ligne]. Disponible sur le site : <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-53413-synthese>. (10/12/2016)



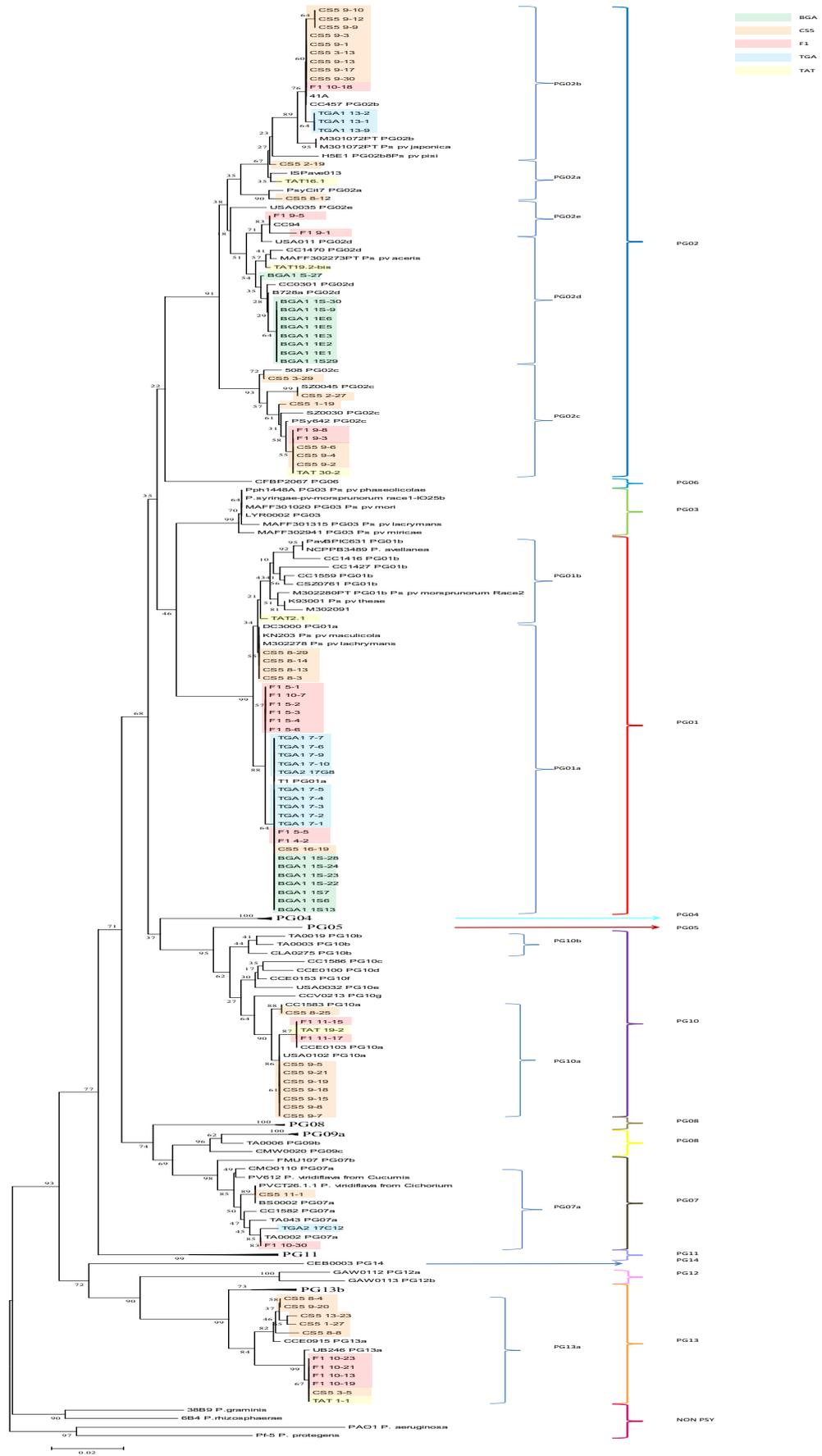
## Annexe 1

<b>CAPRED</b>					
<i>ETAT = Malade</i>					
	Moyenne	Min	Max	Ecart-type	N
Ps	6,433754	6,236936	6,536647	0,170508	3
PG1	4,686306	4,045757	5,031497	0,555291	3
PG2	6,353488	6,212113	6,474432	0,132348	3
Ni	4,174602	1,777544	5,633557	2,092185	3
<i>ETAT = Sain</i>					
	Moyenne	Min	Max	Ecart-type	
Ps	6,407430	5,892709	6,915319	0,460528	5
PG1	5,012841	4,494769	5,589380	0,504462	5
PG2	6,158593	5,494769	6,518799	0,463588	5
Ni	5,666182	5,015023	6,329743	0,532765	5

<b>PERPHECLIM</b>					
<i>ETAT = Malade</i>					
	Moyenne	Min	Max	Ecart-type	N
Ps	6,889807	6,802689	6,982353	0,089955	3
PG1	5,328563	4,284833	6,307839	1,013042	3
PG2	6,578121	6,358991	6,807992	0,224693	3
Ni	6,316492	5,995078	6,771499	0,405083	3
<i>ETAT = Sain</i>					
	Moyenne	Min	Max	Ecart-type	
Ps	6,761848	6,332539	7,435264	0,411944	5
PG1	4,999694	4,040482	5,738404	0,618796	5
PG2	6,504226	6,055600	7,356083	0,517555	5
Ni	6,096850	5,499935	6,657113	0,479352	5



# Annexe 2





## **Rôle du couvre-sol dans le développement du chancre bactérien dans les vergers d'abricotier.**

**Manon Peyré (2016-2017)**

### **Résumé**

Le genre *Pseudomonas*, inclut plusieurs espèces de bactéries phytopathogènes, comme les *Pseudomonas syringae* qui provoque la bactériose, maladie conduisant généralement à la mort des arbres fruitiers. A l'heure actuelle, les moyens de lutte contre *P. syringae* sont très réduits ou inexistant. Ainsi, des méthodes alternatives ou le rôle de certains éléments comme la présence de réservoirs de la bactérie sont en cours d'étude. Partant de l'hypothèse que le couvre-sol pourrait être une source d'inoculum de *P. syringae*, l'objectif du stage est de savoir si le couvre-sol joue un rôle dans le développement du chancre bactérien en verger d'abricotier.

Les prélèvements de couvre-sol et des feuilles ont été réalisés dans un verger expérimental au domaine de Gotheron dans la Drôme. Tous les échantillons ont été analysés en biochimie (test oxydase et fluorescence), en microbiologie (dénombrement sur milieux TSA et KBC), en biologie moléculaire (PCR, gel d'électrophorèse, séquençage) et en bio-informatique. Ces différentes étapes ont permis de sélectionner les bactéries *P. syringae* et de déterminer les phylogroupes ainsi que les clades, et de pouvoir comparer les génomes des bactéries.

Le couvre-sol en inter-rang dans les vergers d'abricotier comporte en grande majorité des populations du phylogroupe 2. Le phylogroupe 2 comprend plusieurs clades avec des bactéries pathogènes de l'abricotier. L'arbre quant à lui comporte principalement des populations du phylogroupe 1, dont le rôle dans le développement de la maladie reste à préciser. Le couvre-sol ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans le développement de la bactériose de l'abricotier.

**Mots clés :** *Pseudomonas syringae*, couvre-sol, verger, abricotier, dénombrement, PCR, phylogroupe, clade, séquençage, bio-informatique

## **The goal of ground-cover in the development of bacterial canker in apricot orchard.**

**Manon Peyré (2016-2017)**

### **Abstract**

The bacteria from the genus *Pseudomonas* are vascular, including several pathogenic species as *Pseudomonas syringae* who cause the bacterial canker. This disease usually lead the fruit trees to death. Currently, the means of fighting against *P. syringae* are reduced or nonexistent. So, alternative methods or the role of some elements as ground-cover are under study. On the assumption of ground-cover is a source of inoculum of *P. syringae*, the goal of this internship is to know if the ground-cover play a role in the development of the bacterial canker in Apricot orchards.

The sampling of ground-cover and leaves were realized in an experimental orchard in Gotheron (Drôme). All the samples were analyzed in biochemistry (oxidase test and fluorescence), in microbiology (count in culture TSA and KBC), in molecular biology (PCR, electrophoresis gel, sequencing) and in bioinformatics. These different steps allowed to select *P. syringae* bacteria and to determine phylogroups as well as clades, and to be able to compare the genomes of bacteria.

Ground-cover in inter-row in apricot orchard consist in a large majority of phylogroups 2. The phylogroups 2 consist of different pathogenic bacteria for apricot. The trees consist of the phylogroups 1, which the goal in the development of the disease must be clarify. So, Ground-cover don't play a role in the development of the bacterial canker in apricot orchard.

**Keywords:** *Pseudomonas syringae*, ground-cover, orchard, apricot, count, PCR, phylogroups, clade, sequencing, bioinformatics