Master **P**roductions **V**égétales et **I**ndustries **A**groalimentaires (**PVIA**)
Université de Picardie Jules Verne

MORGAINT Bénédicte
Année 2014-2015

Mémoire de stage de Master 2

Identification et caractérisation des *Pseudomonas* associées à la bactériose de l'abricotier en vallée du Rhône.

Stage encadré par : Luciana Parisi
Tuteur universitaire : Karine Pageau
Entreprise : INRA centre de Recherche PACA
Domaine Saint Maurice
Unité de Recherche de Pathologie Végétale
67, allée des chênes, CS 60094
84143 Montfavet Cedex

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier Luciana Parisi qui m'a donné ma chance malgré mon manque d'expérience en microbiologie et m'a permis de découvrir et de prendre goût à la bactériologie. Merci pour votre gentillesse, votre compréhension et votre disponibilité. Et sans oublier, un petit clin d'œil à Filou!

Merci également à toute l'unité de pathologie végétale et plus particulièrement à l'équipe MISTRAL : Cindy, Odile, Christelle, Charlotte, Caroline, Jean-François et Benoit. Merci pour tous ces conseils, toute ces conversations sur tout et n'importe quoi (mais surtout en bactériologie) et votre bonne humeur constante.

Une mention particulière pour toi Caro, sans qui je n'aurais jamais pu terminer ce stage dans de bonnes conditions. Merci du fond du cœur pour ce temps que tu m'as accordé pour m'aider à boucler mes manips qui n'en finissaient pas, pour avoir analysé avoir moi ces box (qui se finissait en fous rires nerveux et en tarte au citron) et des fois aussi, simplement pour parler de tout et de rien.

Un grand merci également à Marie-Lisa Brachet du CTIFL, pour le temps qu'elle nous a accordé pour la recherche de nos informations manquantes et pour ses conseils.

Merci à Véronique Marie-Jeanne d'avoir accepté d'être mon tuteur de Montpellier SupAgro, et pour sa relecture très rapide de ce rapport.

Un grand merci à l'équipe de Gotheron pour tous les prélèvements qu'ils ont effectué dans le verger CapRed ainsi que pour la visite très instructive du domaine.

Je remercie également le GIS Fruits, qui, grâce à son soutien financier m'a permis de réaliser ce stage enrichissant sur tous les points.

Enfin, merci à ma famille et mes amis qui m'ont soutenue dans cette traversée de la France « juste » pour réaliser un stage qui me plaisait vraiment.

Table des matières

Abréviations 1

Introduction 2

Présentation de l'organisme d'accueil 3

Le sujet 4

I. Bibliographie – La bactériose de l'abricotier.....5

I.1. *Prunus armeniaca* Linné, l'abricotier 5

I.1.1.Caractérisation taxonomique 5

I.1.2. Origines et propagation de l'abricotier 5

I.1.3. Description botanique 6

I.1.4. Les principaux bio-agresseurs de l'abricotier 6

I.2. La bactériose, un facteur limitant de la production d'abricots 6

I.2.1. La production d'abricots dans le monde et en France 6

I.2.2. Premières observations, situation mondiale et dégâts économiques de la bactériose de l'abricotier 7

I.2.3. Facteurs de prédisposition à la maladie.....8

I.2.4. Les symptômes.....9

I.2.5. Sources d'inoculum et voies de contamination 10

I.3. *Pseudomonas syringae* : une bactérie phytopathogène 10

I.3.1. Le genre *Pseudomonas* 10

I.3.2. L'espèce *syringae* 11

I.3.2.a. Les pathovars (pv) 11

I.3.2.b. Un cycle épiphyte 12

I.3.2.c. Des bactéries glaçogènes 12

I.3.2.d. Des bactéries pathogènes 13

I.3.2.e. Taxonomie et outil permettant la détection des phylogroupes 13

II. Matériels et méthodes 15

II.1. Lieu d'échantillonnage 15

II.2. Matériel prélevé 16

II.2.a. Racines 16

II.2.b. Tiges 17

II.2.c. Terre 17

II.2.d. Débris de culture 17
II.2.e. Sur symptômes 17
II.3. Traitements des échantillons 18
II.3.a. Racines / Tiges 18
II.3.b. Terre / Débris de culture/ Symptômes 18
II.3.d. Traitement des souches CTIFL 19
II.4. Suivi des colonies 19
II.5. PCR 20
II.6. Box-PCR 21
II.7. Séquençage 21
II.8. Traitement des données en bio-informatique 22
III. Résultats et interprétations 22
III.1. Gotheron 22
III.1.a. Comptages sur TSA et KBC 22
III.1.b. Détection par PCR 23
III.2. CTIFL 24
III.3. Box-PCR 25
III.4. Séquençage 25
IV. Discussion 28
Conclusions et perspectives 30

Abréviations

ADNr : **A**cide **Dé**soxyribonucléique **R**ibosomique

BEt : **B**romure d'**ET**idhium

CAP ReD : **C**erisier **A**bricotier **P**runiers - **Ré**duction des intrants et **D**urabilité des systèmes de production

CTIFL : **C**entre **T**echnique **I**nterprofessionnel des **F**ruits et **L**égumes

Cts : **C**itrate **S**ynthase

DEPHY : réseau de **D**émonstration, **E**xpérimentation et **P**roduction de références sur les systèmes économes en phytosanitaires

dNTPs : **D**ésoxy**N**ucléotides-**T**ri-**P**hosphates

ECA : **E**nroulement **C**hlorotique de l'**A**bricotier

INRA : **I**nstitut **N**ational de la **R**echerche **A**gronomique

KB : Milieu **B** de **K**ing

KBC : Milieu **B** de **K**ing additionné de **C**ycloheximide, de **C**éphalexine et d'acide borique

MISTRAL : **MI**crobiologie des agroéco-**S**ystèmes : **TRA**nsfert de connaissances sur **L**'histoire de vie d'agents phypathogènes vers la protection des plantes et les processus climatiques

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

PG : **P**hylo**G**roupe

TSA : Milieu **T**ryptone **S**oja **A**gar

UERI : **U**nité **E**xpérimentale **R**echerche **I**ntégrée

Introduction

La production d'abricots tient une place importante en France avec 190 000 tonnes de fruits produits en 2013. Cette production est concentrée dans le sud de la France incluant la Vallée du Rhône (FranceAgriMer, 2015). Entre 1967 et 1973 les premiers dégâts graves et caractéristiques du chancre bactérien ont été observés sur vergers d'abricotiers (Prunier and Cotta, 1987). Depuis, les bactérioses posent des problèmes pour le rendement des abricots et plus spécifiquement les bactérioses à *Pseudomonas syringae* (Lefèvre et al., 1999; Kotan and Sahin, 2002; Karimi-Kurdistani and Harighi, 2008; Bultreys and Kaluzna, 2010; Donmez and Karlidag, 2010).

Il est nécessaire d'identifier et de caractériser les agents phytopathogènes responsables de ces bactérioses afin de développer des méthodes de lutte adéquates. Dans ce contexte , l'équipe Mistral de l'INRA d'Avignon a proposé une classification de *P. syringae*, espèce d'une grande diversité, en 13 phylogroupes (Berge et al., 2014) et a développé les outils moléculaires associés) permettant de détecter par PCR les souches de chaque groupe phylogénétique. Des questions de distributions différentielles des phylogroupes au sein de différents réservoirs et de leurs implications diverses dans le développement de la maladie sont également posées.

Dans ce contexte, le stage proposé portait sur l'identification et la caractérisation des *Pseudomonas* associées à la bactériose de l'abricotier en vallée du Rhône. L'objectif étant de décrire la diversité des populations de *P. syringae* au niveau intra-parcellaire et à un stade précoce dès l'implantation d'un verger (parcelle de Gotheron), au niveau parcellaire mais à un stade plus avancé de la vie d'un verger (sur symptômes déclarés et bien identifiés) et à une échelle spatiale plus large dans la vallée du Rhône (souches du CTIFL).

Présentation de l'organisme d'accueil

L'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) est un établissement public à caractère scientifique et technologique. Il existe 18 centres Inra en France. Pour réaliser mon stage j'ai intégré le centre Inra Provence-Alpes-Côte d'Azur à Avignon, et, plus précisément l'équipe MISTRAL (MIcrobiologie des Agroéco-Systèmes : TRAnsfert de connaissances sur L'histoire de vie d'agents phypathogènes vers la protection des plantes et les processus climatiques) de l'unité Pathologie Végétale. Les recherches effectuées au sein de cette unité sont principalement focalisées sur l'étude des maladies virales, fongiques et bactériennes des fruits et légumes du bassin méditerranéen afin de développer des méthodes de lutte efficaces et raisonnées dans un contexte de production agronomique durable et de haute qualité. Pour cela, des partenariats étroits sont mis en place. L'unité est composée de 42 agents permanents et comporte des laboratoires spécialisés en microbiologie et sérologie, ainsi que des services communs tels qu'un laboratoire de microscopie optique et électronique, des installations expérimentales pour la mise en place d'essais en serre et champ, un atelier pour la maintenance des équipements et l'hébergement d'une plateforme régionale de biologie moléculaire.

Deux équipes de recherche composent cette unité : l'équipe virologie et l'équipe MISTRAL. Les programmes de recherche de l'équipe virologie sont basés sur l'étiologie des maladies virales des cultures maraîchères et ornementales, l'épidémiologie des maladies virales et la recherche et le développement de méthodes de lutte de ces maladies.

L'équipe MISTRAL, a été créée le 2 Janvier 2012, et résulte de la fusion des équipes de mycologie et de bactériologie. Les principaux axes de recherche se basent sur des stratégies de protection intégrée des cultures horticoles, maraichères ou fruitières, sur la dissémination et les flux de micro-organismes phytopathogènes et sur les perspectives de protection biologique par conservation. L'objectif principal de l'équipe est de concevoir des dispositifs innovants de protection durable ce qui nécessite d'approfondir les connaissances sur l'écologie des micro-organismes phytopathogènes à dissémination aérienne et aquatique, et sur l'épidémiologie des maladies qu'ils provoquent sur les cultures maraichères et fruitières. Les modèles biologiques étudiés sont des agents phytopathogènes à fort impact économique, à large spectre d'hôte et ayant des capacités de dissémination aérienne et aquatique sur de longues distances tels *Botrytis cinerea* (champignon) et *P. syringae* (bactérie).

Le sujet

Les principaux objectifs de mon stage sont de mieux identifier l'origine et la diversité des populations bactériennes de *P. syringae*, responsables de la bactériose de l'abricotier. Mes missions ont été réparties sur deux études qui sont complémentaires.

Une première partie de mon travail est de rechercher et d'identifier les *P. syringae* présents dans les différents compartiments de l'écosystème agricole, dans le cadre du projet Déphy Ecophyto CAP ReD (réseau de Démonstration, Expérimentation et Production de références sur les systèmes économes en phytosanitaires, Cerisier Abricotier Pruniers - Réduction des intrants et Durabilité des systèmes de production) et ce dès la plantation du verger (verger expérimental à l'UERI (Unité Expérimentale Recherche Intégrée) de Gotheron. Des échantillons de sol, de couvre-sol, de résidus culturaux, et des plants d'abricotier seront analysés afin d'identifier les sources possibles de l'inoculum bactérien qui permet à la maladie de s'installer et de se développer. Les populations de *P. syringae* présentes dans les autres parcelles d'abricotier de l'UERI de Gotheron seront également analysées sur la base de prélèvements réalisés directement sur symptômes déclarés. Ici on souhaite observer à quel degré se situe la variabilité de l'agent pathogène (diversité des phylogroupes, abondance de *P. syringae*) sur les différentes parcelles de l'unité, déterminer quelles sont les souches potentiellement épidémiques, et déterminer si la souche pathogène témoin (41A) inoculée les années précédentes est détectée.

Une deuxième partie portera sur l'analyse de populations de *P. syringae* collectées en vergers d'abricotiers (montrant des signes de la maladie) par le CTIFL (Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes) en 2011 et 2012 dans la vallée du Rhône. Durant ces deux années le CTIFL, a effectué un travail de prospection sur 52 vergers et 75% des échantillons, sur la base des tests classiques d'identification, sont considérés comme potentiellement *P. syringae*. En 2012, l'étude a été réalisée sur 13 parcelles où une variabilité de population avait été suspectée lors de l'étude 2011. Neuf de ces parcelles sont communes aux deux années. Les échantillons qui ont pu être conservés ont été extraits et stockés en congélation. Cet échantillonnage a permis de déterminer les différents phylogroupes détectés. Ici, l'objectif est de pouvoir identifier une éventuelle population pour savoir s'il existe une ou quelques souches épidémiques pouvant provoquer le développement de la maladie dans cette zone géographique, ou s'il existe une grande variabilité de l'agent pathogène.

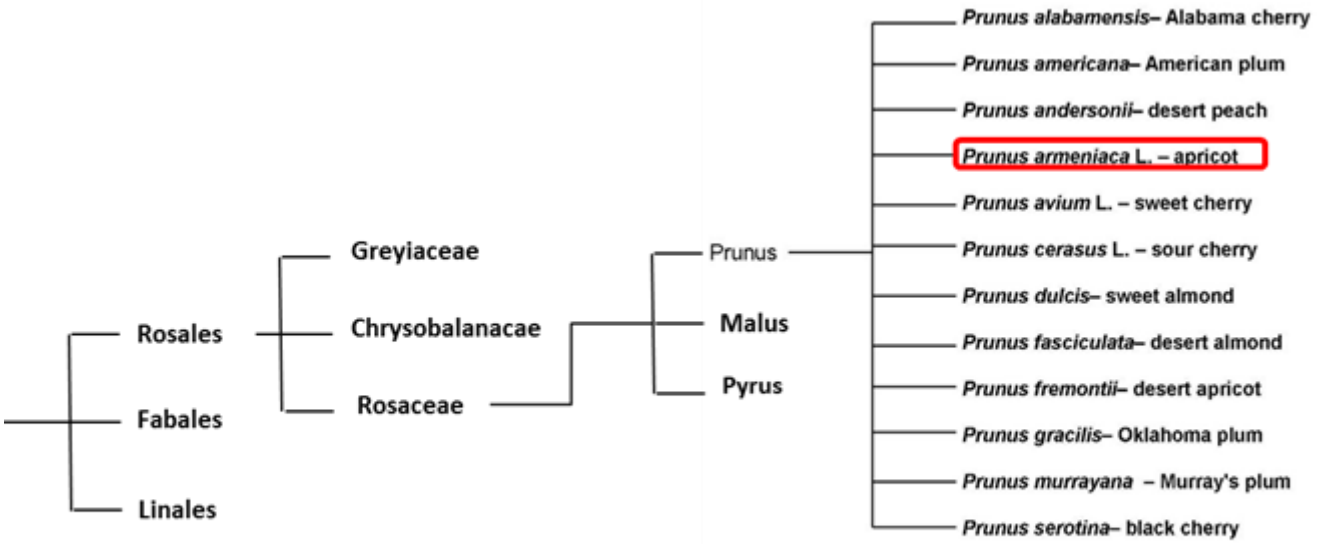


Figure 1 : Arbre phylogénétique de Prunus armeniaca L., l'abricotier. Source : site internet 1

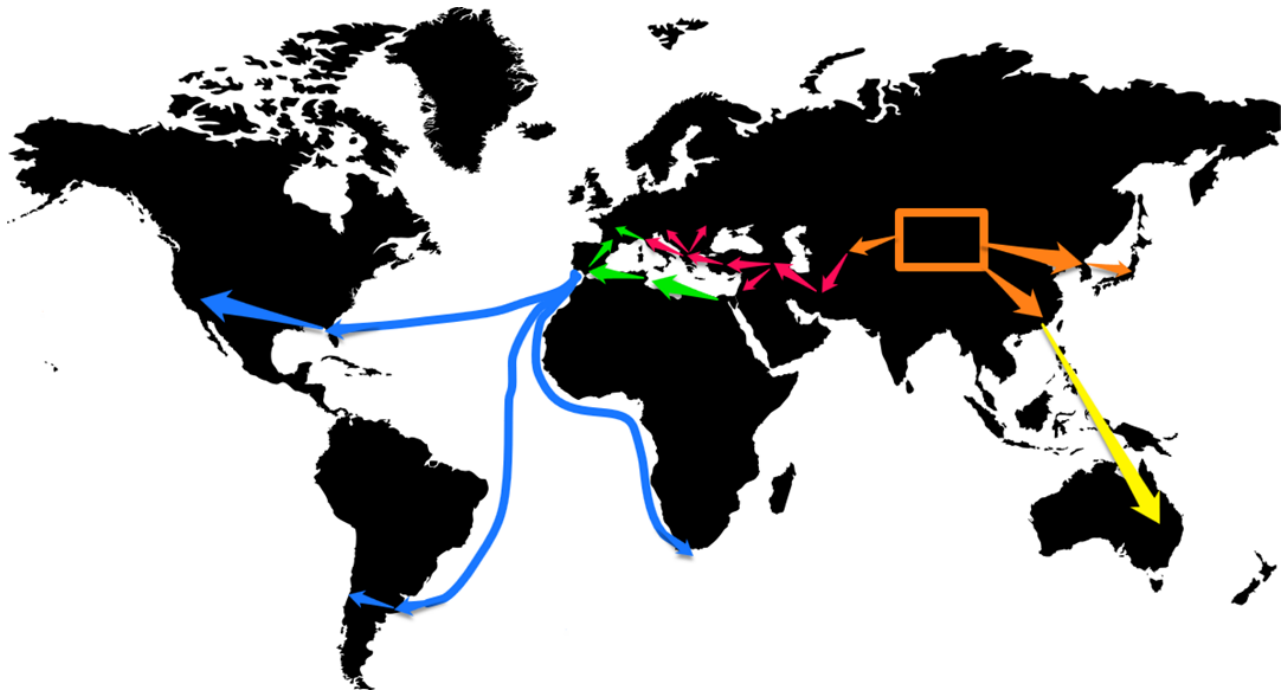


Figure 2 : Propagation de l'abricotier au cours du temps. En orange : Avant -500, en Chine, Asie centrale, en rose : entre -500 et 500 : introduction en Europe, en vert : entre 500 et 1492: introduction en France, en bleu : entre 1492 et 1770 : introduction en Amérique du Nord, en jaune : introduction en Australie. Source : Site internet 2

I. Bibliographie – La bactériose de l'abricotier

I.1. *Prunus armeniaca* Linné, l'abricotier

I.1.1.Caractérisation taxonomique

L'abricotier (*Prunus armeniaca* L.) appartient au genre *Prunus* et à la famille des *Rosaceae* (*Prunoideae*) et à l'ordre des *Rosales* (Rehder, 1949). (Figure 1)

La famille des rosacées est la 19ème plus grande famille de plantes (Hummer and Janick, 2009) et inclut plus de 100 genres et espèces (Judd *et al*., 1999) comprenant de nombreuses espèces comestibles, ornementales, médicinales ou encore quelques cultures de bois (Janick, 2005). Les rosacées ont une place économique importante, marquée essentiellement par la production de fruits dont elles sont leader. Par exemple, en 2005, la production mondiale en fruits de rosacées était d'environ 113 millions de tonnes (Janick, 2005).

Le genre *Prunus* quant à lui regroupe les fruits à noyaux tels que le cerisier (*Prunus avium* et *Prunus cerasus*), le pêcher (*Prunus persica* L. Batsch) et le prunier (*Prunus domestica* et *Prunus salicina*). Les abricotiers sont regroupés dans la section *Armeniaca* qui compte à ce jour cinq espèces, dont *Prunus armeniaca*, l'abricotier commun (Janick, 2005).

I.1.2. Origines et propagation de l'abricotier

L'histoire connue de l'abricotier commence il y a 5000 ans en Chine avec une première référence à son fruit par l'empereur Yu (2205-2198 av J.C.) (Janick, 2005). L'intensification de sa culture a commencé environ en 600 avec des cultivars définis qui se sont développés (Faust *et al.* 1998).

Bien que l'Arménie ait longtemps été réputée comme le pays d'origine de l'abricotier (qui lui doit son nom « *Prunus armeniaca* »), il semblerait que ce pays n'ait été qu'une voie d'entrée en Europe, car peu d'arbres de cette espèce n'y ont été retrouvés à l'état sauvage. (Faust *et al*. 1998; Janick, 2005; Yilmaz and Gurcan, 2012). C'est le botaniste russe Vavilov, qui détermina en 1951 trois principales zones d'origine : la Chine centrale (Chine et le Tibet), l'Asie centrale (du Tien-Shan au Cachemire) et le centre du Proche-Orient : Iran, Caucase, Turquie (Janick, 2005; Yilmaz and Gurcan, 2012).

Ce seront les déplacements lors des guerres perso-romaines et/ou les échanges commerciaux avec l'Asie (via la célèbre route de la soie) qui semblent expliquer l'introduction des abricotiers en Europe et Afrique du nord (Faust *et al*., 1998). Les variétés françaises sont issues pour la plupart d'Afrique du Nord ou d'Europe de l'Est (Bourguiba *et al*., 2012). Son

importation en France se serait faite par deux voies de transport: par la vallée de la Loire en provenance d'Italie et par le Roussillon depuis la Catalogne (Janick, 2005). (Figure 2)

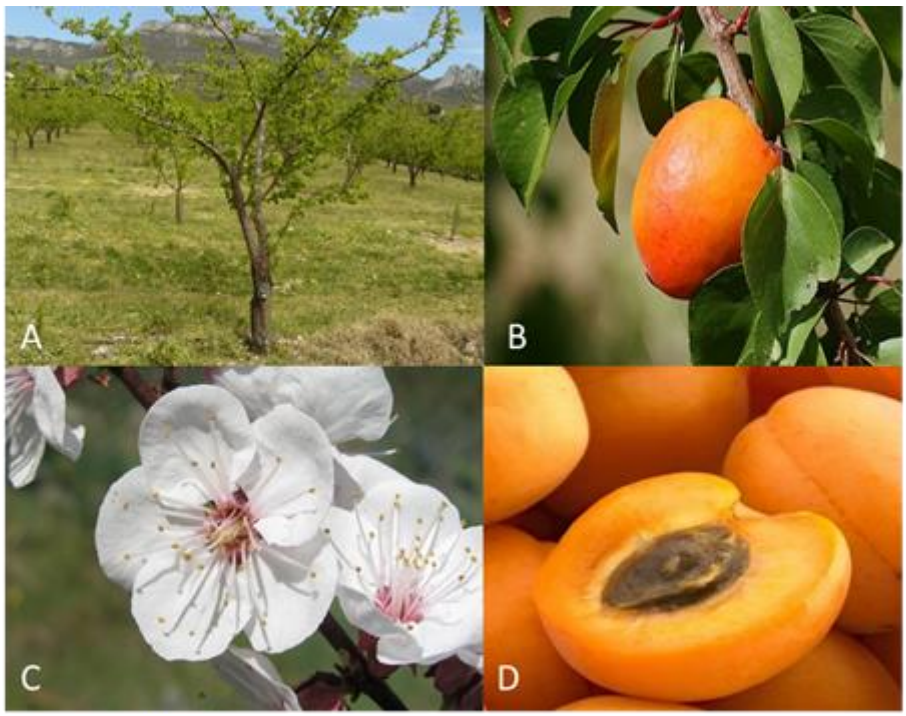


Figure 3 : Description botanique de l'abricotier. A : Abricotier dans son verger. B : Le fruit : l'abricot encore sur l'arbre. C : Fleur d'abricotier. D : Abricot ouvert.

MALADIES CRYPTOGAMIQUES	
Moniliose	*Monilia laxa* (Mandrin and Weydert, 2013) *Monilia fructicola Batra* (Mandrin and Weydert, 2013) *Monilia fructigena* (Mandrin and Weydert, 2013)
Oïdium	*Podosphaera tridactyla* (Dagba and Chaussabe, 2011)
Maladie criblée	*Coryneum beijirinckii* (Dagba and Chaussabe, 2011)
MALADIES BACTERIENNES	
Bactériose	*Pseudomonas synringae* (Lamichhane et al., 2014)
Maladie des tâches bactériennes	*Xanthomonas arboricola pv pruni* (Garcin and Bresson, 2009)
MALADIE A PHYTOPLASME	
Phytoplasme de l'enroulement chlorotique de l'abricotier	*Candidatus phytoplasma prunorum* (Dagba and Chaussabe, 2011)
MALADIE VIRALE	
Sharka	*Plum pox virus* (Decroocq and Candresse, 2007; Yilmaz and Gurcan, 2012)
ARTHROPODES RAVAGEURS	
Forficule	*Forficula auricularia L.* (Dagba and Chaussabe, 2011)
Petite mineuse	*Anarsia lineatella* (Audemard, 1987)
Tordeuse orientale	*Cydia molesta* (Audemard, 1987; Dagba and Chaussabe, 2011)
Psylle vecteur de l'enroulement chlorotique de l'abricotier	*Cacopsylla pruni* (Audemard, 1987; Dagba and Chaussabe, 2011)

Tableau 1 : Tableau synthétique des bio-agresseurs de l'abricotier.

I.1.3. Description botanique

L'abricotier est une espèce vigoureuse, majoritairement autofertile qui peut atteindre plus de six mètres de haut en situation favorable. Le port peut être érigé ou de forme retombante. Il a une croissance sympodiale (croissance caractérisée par la dégénérescence apicale d'un bourgeon obligeant la tige à croître en « zigzag ») et est multiplié par greffage (porte-greffe de type *Prunus*). Sa floraison est précoce (entre février et avril), le rendant sensible aux gels de printemps. Les fleurs, assez grandes, blanches ou roses pâle, apparaissent avant les feuilles (Yilmaz and Gurcan, 2012). Le fruit, l'abricot, est une drupe (fruit charnu à noyau) comestible à épiderme duveteux, de couleur jaune orangé. Le noyau, non adhérent à la chair, contient une amande (Janick, 2005).

Les fruits sont principalement consommés frais, mais peuvent être cuits. La forte teneur en sucre les rend appropriés pour le séchage. En Chine, ils sont conservés par salage (Faust *et al*., 1998). Ils sont également utilisés pour la confection de pâtes de fruits, de liqueurs ou bien de nectars. (Figure 3)

I.1.4. Les principaux bio-agresseurs de l'abricotier

L'abricotier est sujet à de nombreux bio-agresseurs d'origines variées, s'attaquant aussi bien aux feuilles, qu'aux fleurs, rameaux, charpentières et également aux fruits. L'impact économique d'une attaque peut ainsi vite devenir préjudiciable pour l'agriculteur.

Les principaux stress biotiques touchant l'abricotier sont des maladies d'origine cryptogamiques, virales, bactériennes ou dus à des phytoplasmes. Des attaques d'arthropodes ravageurs peuvent également nuire à la production. Une synthèse des principaux bio-agresseurs de l'abricotier est référencée dans le tableau 1.

En France, actuellement, les principaux bio-agresseurs limitant de la production d'abricots sont le dépérissement bactérien causé par *P. syringae* et la moniliose causée par différentes espèces de *Monilia* (Lichou and Jay, 2012).

I.2. La bactériose, un facteur limitant de la production d'abricots

I.2.1. La production d'abricots dans le monde et en France

La production mondiale d'abricots est localisée dans les zones tempérées et est globalement en hausse. Entre 2003 et 2012 elle a progressé de 35 %, atteignant 3,99 millions de tonnes au total (Hummer and Janick, 2009 ; FranceAgriMer, 2015).

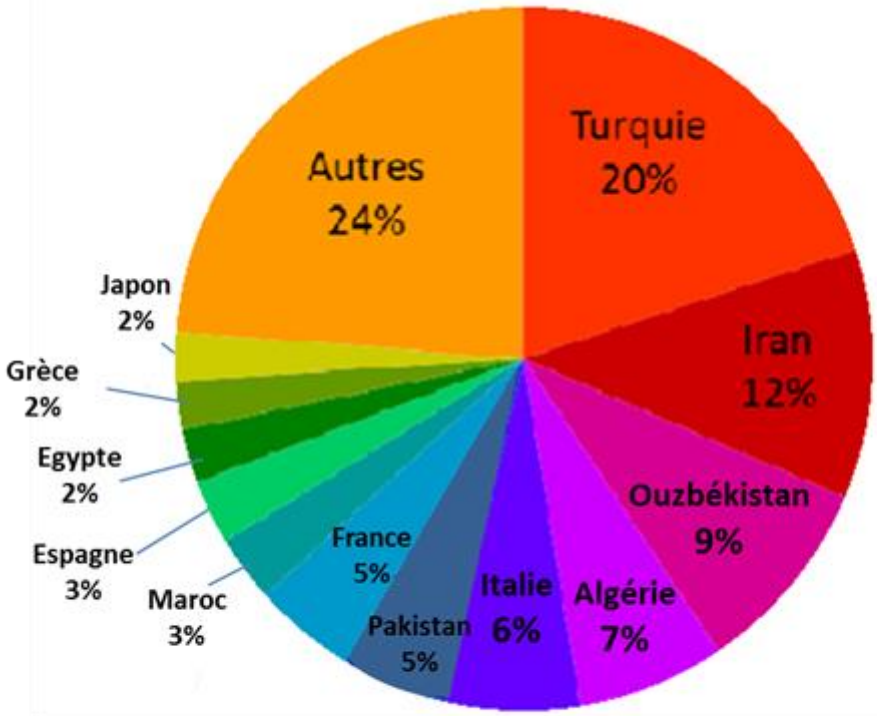


Figure 4 : Répartition de la production d'abricots dans le monde en 2012 (3,99M tonnes). Source : Agrimer

Les principaux producteurs sont la Turquie, l'Iran, l'Ouzbékistan qui produisent respectivement 20 %, 12 % et 9 % de la production d'abricots mondiale. La Turquie doit sa place de leader à ses volumes conséquents, que ce soit en abricots frais, secs ou destinés à la transformation, mais aussi grâce à ses prix à l'export très compétitifs qui sont plus de 2 fois moins élevés que ceux de la France ou de l'Italie.

La production d'abricots en France est concentrée dans le Languedoc-Roussillon, la Provence, les Pyrénées Orientales et la vallée du Rhône. En 2013, la France était le 7ème pays producteur, avec 190 000 tonnes de fruits récoltées soit 5% de la production mondiale. Elle est le 2ème plus gros producteur européen après l'Italie mais leader européen pour le marché de l'abricot frais. La moitié des fruits qui transitent à travers le monde provient d'Europe, et 18% d'entre eux sont d'origine française (soit 45 300 tonnes en 2013). Ainsi, la France est un opérateur majeur sur le marché mondial de l'abricot (FranceAgriMer, 2015). Figure 4

I.2.2. Premières observations, situation mondiale et dégâts économiques de la bactériose de l'abricotier

En France, les premiers dégâts graves et caractéristiques d'infections bactériennes sur vergers d'abricotiers ont été observés entre 1967 et 1973. Après une période de rémission, la maladie est réapparue dans de nombreux jeunes vergers depuis 1981 (Prunier and Cotta, 1987).

La bactériose sur abricotier n'est pas une maladie présente qu'en France, on la retrouve à travers le monde et ce, depuis des périodes concomitantes avec son apparition en France (Prunier and Cotta, 1987). Plus récemment, différentes publications ont fait état de grosses pertes en vergers d'abricotiers dans le monde. Par exemple, durant les printemps et étés 1999 et 2001, 80% des abricotiers cultivés dans les provinces d'Erzurum, d'Erzincan et d'Artvin en Turquie ont été touchées par la maladie (Kotan and Sahin, 2002). Dans une autre région Turque, à Malatya, 20% des arbres présentaient des symptômes de bactériose (Donmez and Karlidag, 2010). Depuis 2005, le dépérissement bactérien est également observé dans les régions du Kurdistan en Iran (Karimi-Kurdistani and Harighi, 2008). En Italie la présence de la maladie est observée sur près de 30% des vergers d'abricotiers (Bultreys and Kaluzna, 2010).

D'un point de vue économique, la bactériose est à l'heure actuelle la maladie qui cause le plus de pertes dans les vergers d'abricotiers. Depuis 1995, en Vallée du Rhône beaucoup de dégâts ont été observés allant jusqu'à la disparition de vergers entiers. Pour les années 1996 et 1997, 180 000 arbres ont été perdus en Ardèche, 100 000 dans les Baronnies (Drôme), et 30 à 40 000 dans le Gard (Lefèvre *et al.*, 1999).

Variétés très sensibles (1)	Primaris Frisson Ravicille Bergeron Tardirouge	Faralia Wondercot Ravilong Perle cot	Priabel Orangered Lilly cot Hargrand
Variétés moyennement sensibles (2)	Big Red Bergecot Spring blush	Vertige Ravival Primaya	Sweet Red Orange rubis
Variété peu sensibles (3)	Flopria Farely Farfia	Farbaly Fardao Farclo	Latica Farhial Magic cot

Tableau 2 : Niveau de sensibilité à la bactériose de quelques variétés d'abricotiers. (1) : au moins 50% d'arbres morts, (2) : entre 25 et 50% d'arbres morts, (3) : pas d'arbre mort - moins de 30% de charpentières mortes. Source : Delaunay and Leon Chapoux, 2010.

I.2.3. Facteurs de prédisposition à la maladie

Comme pour toutes les maladies des plantes, les facteurs abiotiques jouent un rôle important dans l'épidémiologie. Ces facteurs tendent à affaiblir la santé des plantes et les prédisposent à une attaque bactérienne (Lamichhane *et al.*, 2014).

Le choix du matériel végétal utilisé et notamment les variétés utilisées pour l'implantation d'un nouveau verger peuvent influencer le développement de la maladie. S'il n'existe à ce jour aucune variété résistante, il a été mis en avant des variétés d'abricotiers plus ou moins sensibles à la bactériose (Gaignard, and Luisetti, 1993; Lemontey, 2007; Lichou, 2007). Le tableau 2, issu des expérimentations menées par Delaunay V. (SEFRA) et Leon Chapoux M. (CTIFL) en 2010 répertorie le degré de sensibilité d'une liste non exhaustive de variétés d'abricotiers.

Le choix du porte greffe est également un élément majeur car il est le lien entre le sol et la variété choisie et peut influencer l'apparition de la maladie (Dunquesne and Gall, 1975). Il a été démontré que les arbres greffés sur porte-greffe de pêchers Rubira® ou Montclar® présentaient la meilleure résistance à la maladie (Lemontey, 2007; Lichou, 2007; Lichou *et al.*, 2007).

La hauteur de greffage semble aussi avoir un impact épidémiologique. Un greffage réalisé à 60 cm limite les attaques de bactériose et ne porte pas atteinte aux aspects qualitatifs et quantitatifs de la production. Un greffage plus haut est plus protecteur contre les dégâts dus à la bactériose mais diminue le rendement de l'abricotier (Lefèvre *et al.*, 1999; Minodier, 2006; Lemontey, 2007; Lichou, 2007; Buléon, 2010).

De façon plus générale, les pratiques culturales telles que la saison de la taille, l'irrigation, la fertilisation et la conduite de l'entre-rangs peuvent améliorer notablement la santé des vergers (Young, 1987; Gaignard, and Luisetti, 1993; Lefèvre *et al.*, 1999; Lemontey, 2007; Lichou, 2007).

De plus, la nature du sol (pH acide, sol argileux), sa texture (sables grossiers), une forte teneur en eau et une plantation profonde semblent sensibiliser le verger pour une attaque de bactériose (Young, 1987; Vigouroux and Bussi, 1994; Lefèvre *et al.*, 1999; Lamichhane *et al.*, 2014).

De nombreuses études ont également mis en évidence l'influence des conditions climatiques sur l'apparition de la maladie (Klement *et al.*, 1974; Gaignard, and Luisetti, 1993; Lefèvre *et al.*, 1999) et la corrélation entre la teneur en eau de l'arbre, l'exposition à une température négative et l'apparition de nécroses (Klement *et al.*, 1974, 1984; Vigouroux and Bussi, 1994; Lamichhane *et al.*, 2014).

Figure 5 : Quelques symptômes de la bactériose sur abricotier. A : à gauche : un chancre bactérien, à droite : point de gomme. B : Tissus nécrosés. C : jeune bourgeon desséché.

I.2.4. Les symptômes

Les symptômes provoqués par *P. syringae*, ne sont caractéristiques qu'au début de leur apparition : les tissus infectés et gorgés d'eau (« water soaking ») prennent un aspect huileux aux contours de la lésion ; ces tissus altérés brunissent rapidement et peuvent être confondus avec des dégâts ayant d'autres origines (champignons, troubles physiologiques dus à des stress) (Gaignard, and Luisetti, 1993). Leur apparition s'étale de la fin de l'hiver jusqu'à la fin de l'été. La bactériose provoque deux principaux symptômes sur abricotier: le développement de chancres au niveau du bois (plage de tissus nécrosés) et le dépérissement au niveau des feuilles (flétrissement soudain, apoplexie) (Klement, 1977; Kennelly *et al.*, 2007; Bultreys and Kaluzna, 2010). Les dégâts bactériens peuvent être observés sur fleurs, fruits, feuilles, jeunes pousses, charpentières et tronc (Gaignard, and Luisetti, 1993; Kennelly *et al.*, 2007).

Durant l'hiver, les bactéries envahissent le phloème, les tissus corticaux et le cambium (Klement, 1977). A la fin de l'hiver, l'apparition de points de gomme est observable, de couleur rougeâtre à la base de rameaux, brindilles ou bouquets de mai ; on parle également de syndrome de sève bouillonnante. En pelant l'écorce, on trouve des plages de tissus nécrosés brun-rouge avec une forte odeur de fermentation (Prunier and Cotta, 1987; Lemontey, 2007; Kennelly *et al., 2007).*

Au printemps, suite à l'invasion des tissus corticaux du tronc ou des charpentières par la bactérie au cours de l'hiver, les parties atteintes se nécrosent. Certaines branches ne débourrent pas et d'autres émettent des pousses qui flétrissent rapidement conduisant parfois au dessèchement total de l'arbre et donc à sa mort (Klement, 1977; Prunier and Cotta, 1987; Kennelly *et al.*, 2007). Des écoulements de gomme à partir du point d'infection peuvent être visibles. En 2004, des brunissements et des nécroses des bourgeons de bois jeune ont été observés (Lemontey, 2007).

C'est en été que l'on observe la formation de chancres plus ou moins étendus sur les organes atteints. Un chancre se forme si la nécrose tissulaire ne ceinture pas l'organe infecté et que les tissus sains voisins essaient d'envahir le phloème nécrotique (Klement, 1977; Prunier and Cotta, 1987; Gaignard, and Luisetti, 1993; Lemontey, 2007; Kennelly *et al.*, 2007). Un flétrissement brutal de charpentières ou d'arbres entiers peut avoir lieu (Klement, 1977; Lemontey, 2007). De petites lésions nécrotiques peuvent apparaitre sur les feuilles et les fruits (Prunier and Cotta, 1987). Figure 5

P. syringae n'entraîne pas systématiquement la mort de la plante infectée mais peut réduire la longévité des arbres, diminuer leur production (Gaignard, and Luisetti, 1993) et également altérer la croissance ainsi que la qualité des produits récoltés et donc leur valeur commerciale (Wimalajeewa, 1985).

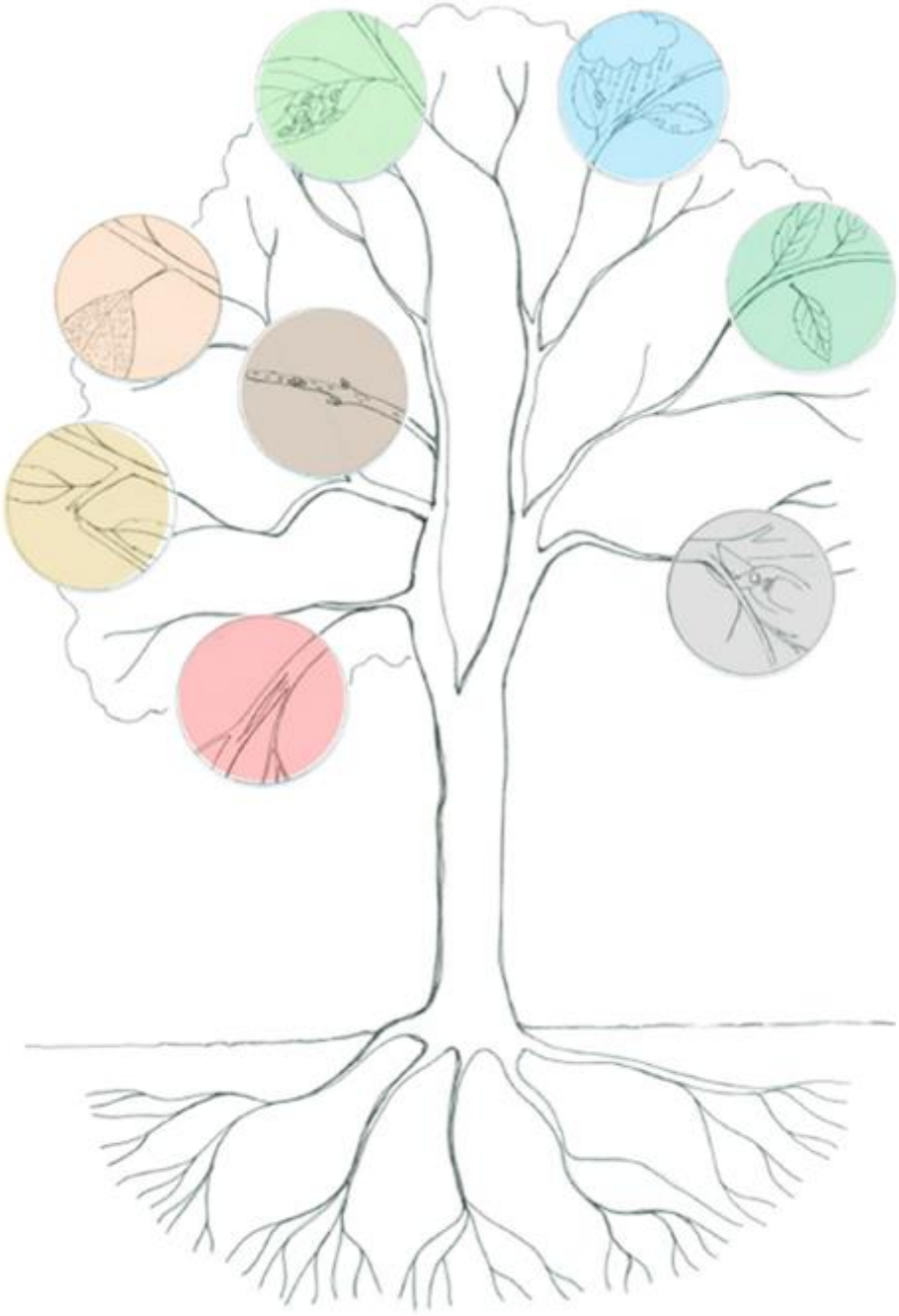


Figure 6 : Représentation des voies d'entrée de la bactérie. Dans le sens horaire, en partant en bas à gauche: dommages causés par le gel, la rupture de la branche à cause du vent ou des dommages mécaniques, lenticelles, trichomes brisés, stomates, plaies causés par la grêle, cicatrices foliaires et blessures causées par l'élagage. Source : Lamichhane et al. 2014

I.2.5. Sources d'inoculum et voies de contamination

Les sources d'inoculum sont un point important dans l'épidémiologie de la bactériose causée par *P. syringae*. La source immédiate d'inoculum est représentée par les populations épiphytes de *P. syringae* sur les plantes asymptomatiques (Hirano and Upper, 1990; Lamichhane *et al.*, 2014) comme l'a démontré par exemple, Young en 2004 sur l'olivier. L'établissement de populations bactériennes dans les tissus asymptomatiques (phase endophyte des bactéries) pourrait être une autre importante source d'inoculum. Cette infection latente a pu être observée dans des tissus ne présentant aucun signe de la maladie chez le poirier (Whitesides and Spotts, 1991). *P. syringae* a également été retrouvée dans le couvre-sol, les résidus de culture et les mauvaises herbes des vergers contaminés (Lamichhane *et al.*, 2014) ; mais également dans les bourgeons dormants (Crosse, 1956) , le pollen (Vanneste *et al.*, 2011), l'eau de pluie et d'arrosage, la litière des prairies alpines et dans la neige (Morris *et al.*, 2010).

La contamination de l'arbre par *P. syringae* se fait par différentes voies d'entrée. Les bactéries phytopathogènes n'étant pas capables de créer leur propre point d'entrée, elles doivent donc tirer parti des ouvertures d'origine naturelle ou accidentelle (Paulin *et al.*, 2001). Ainsi, les ouvertures naturelles (lenticelles, stomates, trichomes et hydathodes (tissus sécréteurs d'eau), cicatrices foliaires (chute des feuilles)et les blessures d'origine biotique (pratiques culturales et animaux) et abiotique (grêle, gel, vent) sont les principales voies de contamination (Prunier and Cotta, 1987; Lemontey, 2007; Lamichhane *et al.*, 2014). Les bourgeons et l'activation de l'infection latente par le froid sont d'autres moyens d'infection de la bactérie (Crosse, 1956; Hirano and Upper, 1990; Young, 2004; Lemontey, 2007; Lamichhane *et al.*, 2014). (Figure 6)

I.3. *Pseudomonas syringae* : une bactérie phytopathogène

I.3.1. Le genre *Pseudomonas*

On dénombre à ce jour 350 espèces, sous-espèces ou *pathovars* (*pv*) de bactéries phytopathogènes qui se répartissent en 21 genres (Paulin et al., 2001). Le genre *Pseudomonas* a été proposé par Migula en 1894 et a depuis été révisé à plusieurs reprises (Gaignard, and Luisetti, 1993; Kersters *et al.*, 1996; Paulin *et al.*, 2001). Ce genre bactérien est ubiquiste, il est capable de coloniser le sol, la rhizosphère, la phyllosphère, les tissus végétaux et animaux en décomposition, l'eau douce et l'eau de mer (Gaignard, and Luisetti, 1993; Peix *et al.*, 2009).

Les *Pseudomonas* appartiennent au groupe des Eubactéries non photosynthétiques et chimiotrophes, à l'ordre des Eubacteriales, et à la famille des Pseudomonadaceae (Buchanan, 1917; Winslow *et al.*, 1917).

C'est un bacille gram négatif mobile (1 à 3 flagelles) de 0,7-3 µm de longueur sur 0,7-1 µm d'épaisseur qui peut être isolé, en paires ou en chaînes (Gaignard, and Luisetti, 1993; Kersters *et al.*, 1996; Young, 2010). Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, blanches et lisses (Gaignard, and Luisetti, 1993).

Les *Pseudomonas* pathogènes sont classés en deux groupes en fonction de l'ADNr (acide désoxyribonucléique ribosomique). Le premier rassemble les bactéries qui n'accumulent pas le poly-β-hydroxybutyrate (réserve de carbone et d'énergie) et produisent un pigment fluorescent. On retrouve notamment dans ce groupe 1 *P. fluorescens*, *P. syringae* (dépérissement de l'abricotier, du marronnier..), et *P. cichorii* (*maladie* des tâches noires du tabac, de la salade..). Le second groupe rassemble des bactéries phytopathogènes accumulant le poly-β-hydroxybutyrate et ne produisant pas de pigment fluorescent avec par exemple *P. gladioli* (agent de la pourriture molle des champignons, de l'oignon) (Gaignard, and Luisetti, 1993; Kersters *et al.*, 1996; Peix *et al.*, 2009; Young, 2010).

I.3.2. L'espèce *syringae*

C'est en 1902 que l'espèce *syringae* a été nommée pour la première fois. La bactérie a été isolée à partir de lésions sur lilas (*Syringa vulgaris*) et, identifiée comme appartenant au genre *Pseudomonas* d'où son nom : *Pseudomonas syringae* (Van Hall, 1902).

I.3.2.a. *Les pathovars (pv)*

Une particularité de la classification des bactéries phytopathogènes, est l'ajout d'une division à l'espèce: le pathovar. Il résulte de la spécificité de certaines bactéries pour leur espèce végétale hôte. Différents pathovars d'une même espèce bactérienne sont nommés en fonction de leur pouvoir pathogène sur une gamme d'hôtes.

En 1986 Bradbury dénombre 52 pathovars dans l'espèce *P. syringae*, signalés phytopathogènes. Parmi ces pathovars, 2 sont associés à la bactériose de l'abricotier : *syringae* et *morsprunorum* (race 1) (Gardan *et al.*, 1973; Prunier and Cotta, 1987; Bultreys and Kaluzna, 2010). Une troisième bactérie est associée à la maladie : *P. viridiflava* (Gardan *et al.*, 1973). Bien que désignée par un nom d'espèce différent, *P. viridiflava* appartient au complexe d'espèces *P. syringae* et est inclus dans certains phylogroupes de l'espèce (Young, 2010; Parkinson *et al.*, 2011; Bartoli *et al.*, 2014; Berge *et al.*, 2014).

P. syringae pv syringae et *P. viridiflava* sont associés aux dégâts les plus sévères, entrainant la destruction totale ou partielle des arbres (Prunier and Cotta, 1987).

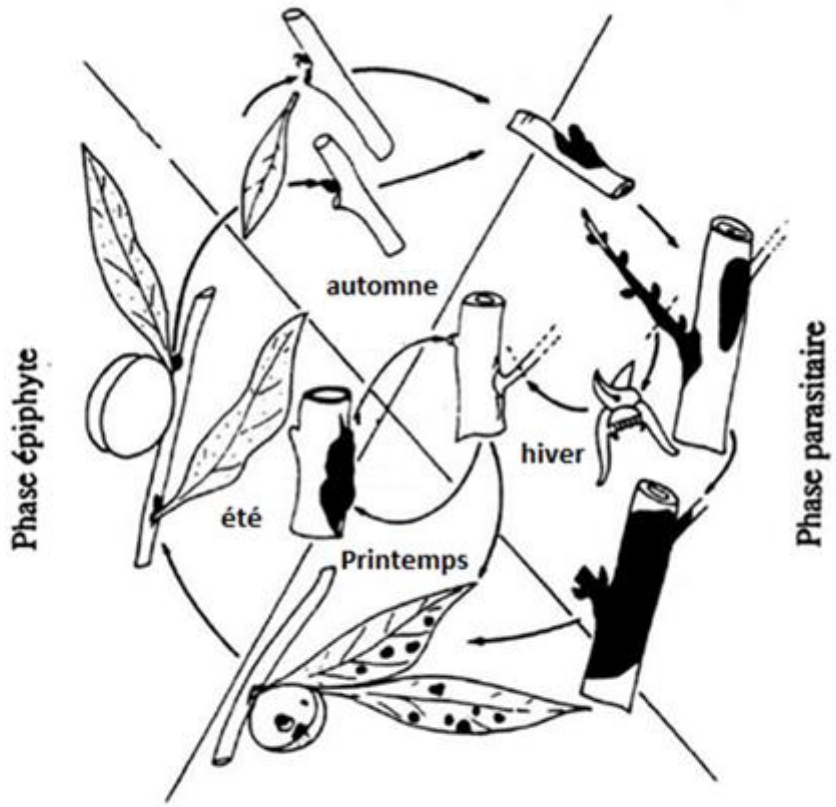


Figure 7 : Cycle biologique de P syringae pv persicae sur pêcher Source : Luisetti 1984

I.3.2.b. Un cycle épiphyte

Le cycle de *P. syringae* est caractérisé par une phase épiphyte (vie active des populations à la surface des organes de la plante) pouvant encadrer des périodes d'infection. Ainsi, une phase épiphyte peut succéder à une phase pathogène et réciproquement. A titre d'exemple, le cycle biologique de *P. syringae pv persicae* sur pêcher est présenté en figure 7.

Ce caractère épiphyte de *P. syringae* a été démontré pour la première fois par Crosse en 1959, sur cerisier, où *P. syringae. pv morsprunorum* a été retrouvé sur des feuilles asymptomatiques. Il suggère que ces bactéries pourraient constituer un inoculum capable d'être à l'origine de l'infection des tiges et des branches (Crosse, 1956). La présence épiphyte de l'espèce *P. syringae* a été confirmée sur abricotier par Wimalajeewa en 1985.

C'est au printemps et à l'automne que les populations bactériennes sont les plus importantes : jusqu'à 470 000 bactéries/feuille. En été, leur nombre à tendance à diminuer : 10 000 bactéries/feuille (Bordjiba and Prunier, 1991). Les changements de température et d'humidité influent sur la multiplication des bactéries, expliquant ces variations (Hirano and Upper, 1990, 2000).

Ces populations épiphytes constituent une source d'infection pour les plantes, dont la réussite dépend en grande partie de la qualité et de la quantité de l'inoculum (Gaignard, and Luisetti, 1993; Hirano and Upper, 2000).

I.3.2.c. Des bactéries glaçogènes

L'eau extra pure peut être maintenue à l'état de liquide (état de surfusion) jusqu'à la température de -40°C. Cependant, dans la nature l'eau contient de nombreuses particules. Parmi ces particules il y a des noyaux de cristallisation ou noyaux glaçogènes (d'origine minérale ou biologique) qui provoquent une rupture de surfusion de l'eau à des températures plus hautes. Ainsi, à des températures inférieures à 0 ° C, la nucléation de la glace peut se produire à cause d'une particule solide (poussières, bactéries, etc.) qui sert de catalyseur pour la formation de glace (Gaignard, and Luisetti, 1993; Lamichhane *et al.*, 2014).

En 1974, Maki *et al.*, démontrent qu'une bactérie de l'espèce *P. syringae* est un initiateur de prise de glace à partir de -2 °C. Plus tard, 80% des souches de certains pathovars de *P. syringae* et 30% des souches de *P. viridiflava* sont caractérisées comme bactéries glaçogènes (Gaignard, and Luisetti, 1993).

La sensibilité des plantes au gel est augmentée si elles abritent une grande population de bactéries glaçogènes car le point de congélation des tissus végétaux augmente en leur présence (-2°C au lieu de -7°C) (Hirano and Upper, 2000). Hirano et Upper ont démontré en 1990 que

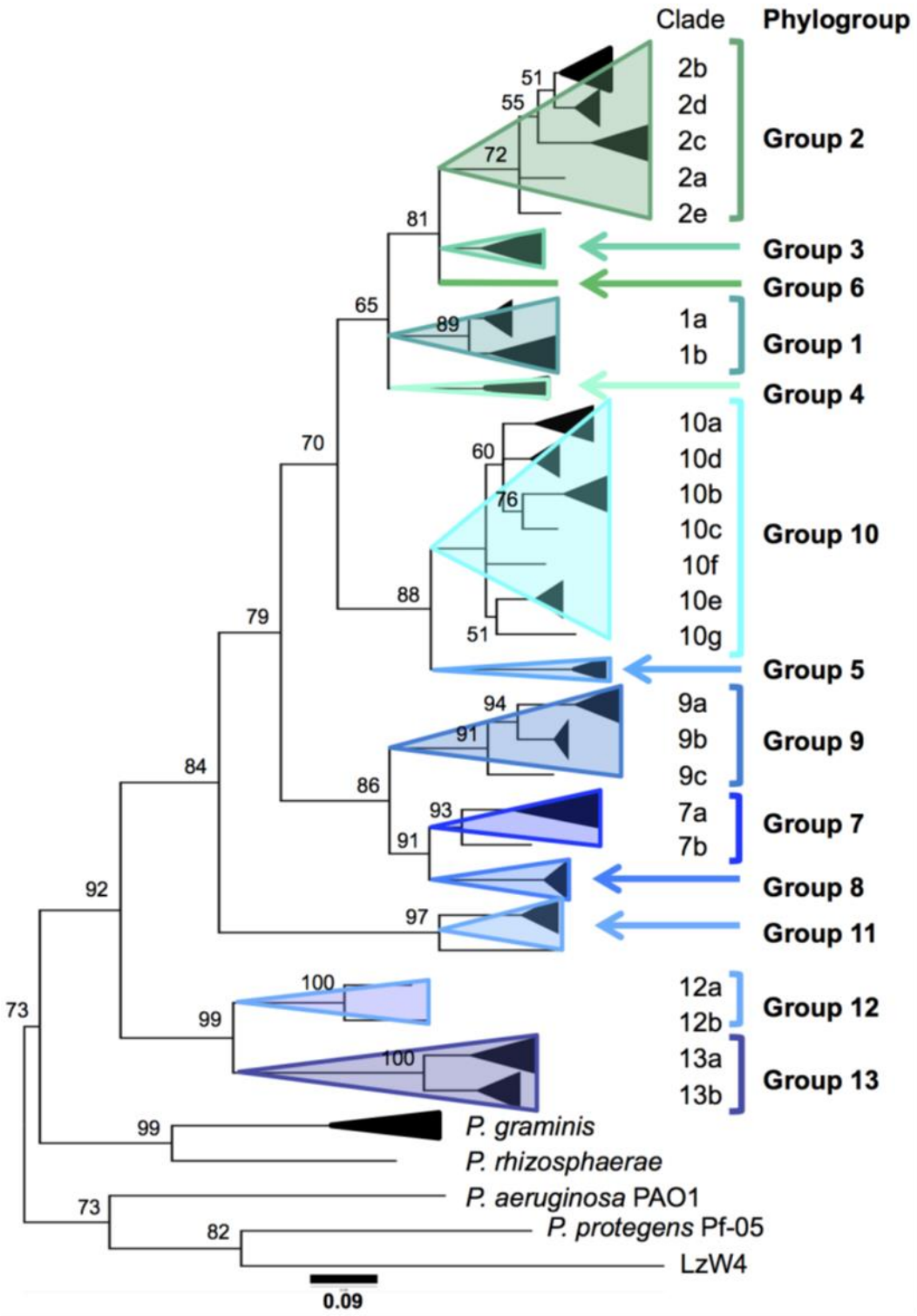


Figure 8.: Arbre phylogénétique de P. syringae définissant 13 phylogroupes et 23 clades, basé sur les séquences des gènes cts, gyrB et rpoD de 216 souches de P. syringae. Source : Berge et al., 2014

la quantité de dégâts dus au gel à une température donnée augmente directement avec l'augmentation du nombre de bactéries glaçogènes sur cette plante.

I.3.2.d. Des bactéries pathogènes

La production de toxines est un élément important du pouvoir pathogène de ces bactéries. Vers 1970, des travaux sur les toxines de *P. pv syringae* sont entrepris. Trois toxines sont déterminées : la syringomycine identifiée sur pêcher, en 1968, la syringotoxine, exclusivement sur *Citrus* en 1981 et la syringostatine sur lilas en 1989 (Gaignard, and Luisetti, 1993). La syringomycine est la toxine déterminante du pouvoir pathogène chez les *Prunus*. Elle perturbe les fonctions physiologiques et biochimiques au niveau des membranes plasmiques des cellules végétales et contribue significativement au niveau de la virulence de la bactérie (Xu and Gross, 1988).

P. syringae pv morsprunorum race 1 produit la coronatine, une toxine qui entraine des chloroses, inhibe l'élongation des racines et la production de chlorophylle, et a des effets sur la production d'éthylène (Bultreys and Kaluzna, 2010).

Les bactéries phytopathogènes produisent également des pectinases, des enzymes extracellulaires capables de dégrader les composants des parois des cellules végétales. Par exemple, chez *P. viridiflava* une pectate lyase a été mise en évidence par Liao et Wells (1987) ainsi que des cellulases (Liao and Wells, 1987; Liao *et al.*, 1988).

I.3.2.e. Taxonomie et outil permettant la détection des phylogroupes

P. syringae est aujourd'hui reconnue comme un complexe d'espèces issues d'habitats terrestres et aquatiques (Morris *et al*., 2010). La classification de ces espèces a d'abord été établie sur la base des phénotypes (caractéristiques physiologiques et écologiques) et puis sur les génotypes (hybridation de l'ADN, analyse phylogénétique de gènes de ménage, séquences) (Young, 2010). Une étude récente menée par Berge *et al.*, 2014 présente les résultats de la caractérisation phénotypique et génotypique de 763 souches de *P. syringae* recueillies auprès d'un large panel d'habitats dans lesquels cette bactérie a été décrite à ce jour. Grâce à des analyses phylogénétiques basées sur le gène de ménage de la citrate synthase (*cts*), 23 clades répartis dans 13 phylogroupes (PG) ont été caractérisés.

Ainsi, Berge *et al.*, 2014 ont décrit ces 13 phylogroupes à partir d'un échantillon des souches qui ont été analysées en *cts* (Figure 8). Le PG 1 de *P. syringae* contient de nombreuses souches issues de plantes malades, mais aussi issus de nombreux habitats et des substrats environnementaux. Deux clades composent ce phylogroupe. Parmi les souches du clade 1a on retrouve *P. pv. tomato* agent causal du chancre bactérien chez la tomate. Le clade 1b comprend

P. avellanae et *P. pv. actinidiae*, respectivement responsable du chancre bactérien chez le noisetier et le kiwi. Les souches de ce clade, ainsi que des souches du PG 3, contiennent un opéron catéchol qui regroupe des gènes pour la dégradation de composés aromatiques. Des études génomiques ont de plus montré que les souches issues de ce phylogroupe contiennent le plus grand nombre de gènes codant pour des déterminants de virulence.

Le PG 2 est le phylogroupe le plus répandu et ubiquiste. Cinq clades le composent. Le clade 2a contient en plus de la souche *PsyCit7* isolée d'un oranger asymptomatique, une souche issue de la pluie et une d'un bassin d'irrigation. Le clade 2b comprend la souche *P. pv syringae* ainsi que de nombreuses souches isolées à partir de tous les substrats de l'environnement. Le clade 2c est dominé par des souches non-pathogènes de *P. syringae* isolées sur plantes et substrats environnementaux. Le clade 2d est étroitement lié génétiquement au clade 2b. Le clade 2e est actuellement représenté par deux souches isolées à partir d'eau fraîche et de neige. Les souches de ce phylogroupe sont en moyennes plus agressives, glaçogènes et produisent de la syringomycine-like. Ces souches comportent également de nombreux gènes codant pour des phytotoxines.

Le PG 3 contient des souches isolées à partir de sources environnementales, des agents pathogènes de plantes ligneuses mais également des agents pathogènes d'autres types de plantes telles que le soja et le haricot commun.

Le PG 4 comporte peu de souches, isolées à partir de diverses sources (plantes sauvages, pluie, neige et litière végétale). Toutes les souches de ce phylogroupe sont glaçogènes.

Le PG 5 comprend des souches pathogènes de plantes.

Le PG 6 ne contient que des souches isolées de cultures malades, surtout des Astéracées et la papaye.

Le PG 7 représente la plupart des souches de *P. viridiflava*, deux pathovars de *P. syringae* : *pv. ribicola et pv. primulae* et de nombreuses souches issues des réservoirs de l'environnement. Presque toutes les souches de ce phylogroupe sont capables de causer la pourriture molle à des tranches de pommes de terre. Ce phylogroupe se compose de deux clades.

Le PG 8 contient des souches qui pourraient également être appelés *P. viridiflava*. Ces souches partagent de nombreuses caractéristiques avec celles PG 7.

Le PG 9 contient des souches issues les habitats aquatiques et peu sont glaçogènes. Trois clades composent ce phylogroupe.

Le PG 10 comporte des souches qui proviennent de réservoirs environnementaux en dehors des zones cultivées. Cependant ces souches induisent une réaction d'hypersensibilité chez le tabac, sont glaçogènes pour la plupart, et possèdent des gènes pour les toxines de syringomycine-like. Sept clades composent ce phylogroupe.

ECO1 B2

22				10
23		66		
			51	
	29			
	30		52	
21		64		
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)

REF B1

	40	68	55	
			56	14
28	39			13
27				
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)

ECO3 B1

			44	
20	38	62		
		61		5
19				
			43	6

ECO2 B2

24			50	
	32			
	31			
		65		9

ECO1 B1

	36			
		58		
				2
16				
	35	57	48	
15			47	
				1

ECO3 B

				7
				8
	33	63		
			49	
	34			
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)

REF B2

	40	68	55	
			56	14
28	39			13
27				
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)

ECO2 B1

17			45	4
				3
	37		46	
		59		
18		60		
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)

Figure 9 : Plan du verger d'abricotiers CapRed. (1)Rangée d'abricotiers de variété Bergeron, (2)Rangée d'abricotiers de variété Bergeval, (3) Rangée d'abricotiers de variété Frisson, (4) Rangée d'abricotiers de variété Shamade, (5) Rangée d'abricotiers de variété Anegat. La numérotation de 1 à 70 représente les points de prélèvement pour les racines et les tiges.

Le PG 11 représente les bactéries *P. cichorii*.

Le PG 12 est composé de souches isolées à partir de l'eau d'un canal d'irrigation. Deux clades composent ce groupe phylogénétique.

Le PG 13 comprend de nombreuses souches issues de substrats non végétaux.

Ce travail permettant de décrire la diversité de *P. syringae*, a été suivi par la mise en place d'un outil de biologie moléculaire permettant l'analyse rapide des populations de *P. syringae* associées aux végétaux et aux compartiments de l'écosystème cultivé.

Ce fut le travail de C. Guilbaud, technicienne du laboratoire et B. Borschinger, actuellement doctorant à l'unité de pathologie végétale à l'Inra d'Avignon qui ont mis au point respectivement des amorces spécifiques pour la détection de *P. syringae (*appelées amorces *Psy)* ainsi que l'identification de certains phylogroupes caractérisés. L'objectif étant, à partir d'isolats issus d'échantillons divers, de déterminer l'appartenance ou non à l'espèce *P. syringae*, et en déterminer leur phylogroupe d'appartenance. Les amorces ayant été testées individuellement et en multiplex, quatre conditions PCR ont été retenues. Une première PCR simplex (PCR qui utilise une paire d'amorces pour amplifier une séquence spécifique) avec l'amorce *Psy*. Deux PCR multiplex (PCR qui utilise des paires multiples d'amorces pour amplifier simultanément un grand nombre de séquences) contenant pour la multiplex 1 les amorces des phylogroupes : 1, 3 et 9, et pour la multiplex 2 les amorces des phylogroupes : 2, 4, 13. Une dernière PCR regroupant les phylogroupes 7 et 8 sans distinction possible. Ces deux phylogroupes, trop proches sur le plan génétique, il n'a pas été permis de déterminer des amorces spécifiques pour chacun d'entre eux. (unpublished data).

II. Matériels et méthodes

II.1. Lieu d'échantillonnage

La parcelle CAP ReD de Gotheron sur laquelle a eu lieu la majorité des prélèvements (racines, tiges, débris de culture et terre) a été plantée les 12 et 13 janvier 2015 (Figure 9). Elle est composée de 5 variétés d'abricotiers autofertiles sur porte-greffe Montclar : Bergeval, Shamade, Bergeron, Anegat et Frisson.

- ***Bergeval :*** production fin juin, sensible au chancre bactérien, fruit sensible à la pluie sur récolte
- ***Shamade :*** production fin juin, sensible au chancre bactérien, résistant au virus de la sharka
- ***Bergeron*** (témoin référence) : Production mi-juillet, sensible au chancre bactérien
- ***Anégat*** : production 20-25 juillet, très sensible au chancre bactérien

- **Frisson :** production fin juillet, très sensible au monilia à la fleur et au chancre bactérien.

La parcelle est subdivisée en 9 sous-parcelles, selon différentes conditions d'expérimentation :

- ***Système de base Référence* :** Greffage à 60 cm. 2 parcelles de 20m x 30 m, avec une distance de plantation de 5m x 4m, soit 6 rangs de 5 arbres (un cultivar par rang). Conduite classique en gobelet. Stratégie phytosanitaire classique producteur.

Les 3 systèmes Ecophyto présentés après sont représentés par 2 parcelles de 20m x 24m, avec une distance de plantation de 4m x 2.5m, soit 6 rangs de 5 arbres (un cultivar par rang).

- ***Système Ecophyto 1* :** Greffage à 110-120 cm. Conduite en « petit » gobelet. Stratégie phytosanitaire avec suppression des cuivres pour le chancre bactérien, et suppression des insecticides vis-à-vis des forficules (car greffage haut).
- ***Système Ecophyto 2* :** Greffage à 110-120 cm. Conduite en « palmette » avec palissage. Stratégie phytosanitaire avec suppression des cuivres pour le chancre bactérien et suppression des insecticides vis-à-vis des forficules.
- ***Système Ecophyto 3* :** Greffage à 110-120 cm. Conduite en « palmette » avec palissage + protection mécanique. Stratégie phytosanitaire avec suppression des cuivres pour le chancre bactérien, suppression des insecticides vis-à-vis des forficules, suppression des insecticides contre le psylle vecteur de l'ECA (enroulement chlorotique de l'abricotier) et suppression des fongicides pour les maladies liées à une humectation du végétal (toutes sauf oïdium).
- ***Témoin non traité* :** Greffage à 60 cm. 1 parcelle élémentaire de 20m x 30 m, distance de plantation 5m x 4m, soit 6 rangs de 5 arbres (un cultivar par rang). Conduite classique en gobelet. Aucune application phytosanitaire. Parcelle séparée des autres parcelles dont l'objectif est de quantifier la pression phytosanitaire.
- ***Parcelle du milieu non plantée***

II.2. Matériel prélevé

II.2.a. Racines

Le jour de la plantation de CAP ReD, 70 échantillons de racines sont prélevés (trois racines de 5 à 10cm par arbre puis déposés dans sachet stérile. Une désinfection du sécateur à l'alcool à 70° est réalisée entre chaque arbre afin de ne pas contaminer les échantillons

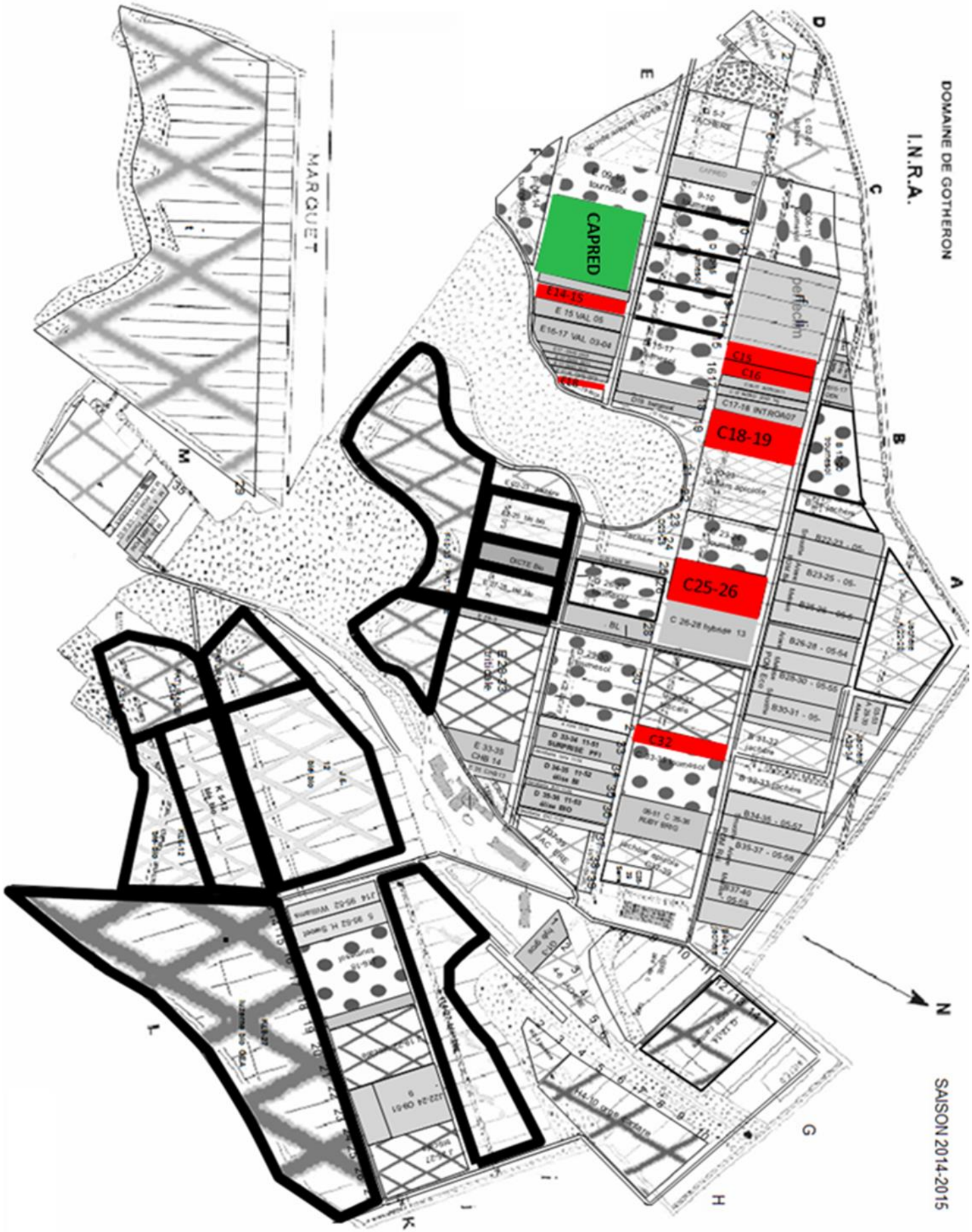


Figure 10 : Plan du domaine de Gotheron. En vert : le verger d'abricotiers Cap Red. En rouge : Les différentes parcelles d'abricotier où ont été effectués les prélèvements sur symptômes.

entre eux. Le choix des prélèvements se fait par variété, hauteur de greffage, et répartis en fonction de la position de la greffe (effectuée sur œil dormant ou scion).

II.2.b. Tiges

Sur les mêmes arbres, 70 échantillons de tiges représentatifs de la variété sont prélevés le 14/01/2015 (trois portions de trois rameaux de 10cm, selon le même protocole que les racines.

II.2.c. Terre

Le 20/02/2015 un prélèvement de la terre est réalisé au sein des 9 sous-parcelles de CAP ReD, de façon aléatoire. Le sol est « raclé » sur 0.5cm pour éviter les gros cailloux et débris. Le prélèvement est réalisé à l'aide d'un transplantoir et 4 à 5 transplantoirs sont échantillonnés puis déposé dans un sachet stérile. La profondeur maximale du prélèvement dans le sol est de 10cm L'outil est nettoyé à l'eau, désinfecté à l'alcool à 70° et séché entre chaque prélèvement.

II.2.d. Débris de culture

Les prélèvements des débris de culture ont été réalisé le 20/02/2015. Cinq points de prélèvements regroupés en un échantillon au sein de chaque sous-parcelle sont effectués. Ces 5 points sont prélevés dans un rayon de 4m autour de chaque prélèvement de terre, dans les inters rangs. Ici le prélèvement est manuel. Entre chaque échantillon les mains sont lavées, désinfectées à l'alcool à 70° et séchées.

II.2.e. Sur symptômes

Ces échantillons sont prélevés le 13/04/2015 sur des arbres présentant des symptômes déclarés de la maladie (points de gomme, chancres). Ils sont réalisés sur l'ensemble des parcelles d'abricotiers du domaine de Gotheron. La parcelle CAP ReD n'a pas été échantillonnée car aucun symptôme n'est visible au moment du prélèvement. Selon les parcelles et l'état des arbres, les échantillons varient (écorce, charpentière, rameau). Si cela est possible la branche malade est entièrement prélevée. Si non, avec un premier outil (couteau ou sécateur), la surface du symptôme est découpée, puis les tissus malades sont récupérés avec un second outil (couteau ou sécateur). S'il y a présence d'exsudats, ceux-ci ainsi que les tissus environnants sont prélevés pour analyser l'ensemble. Entre chaque prélèvement les outils sont désinfectés. Lors du prélèvement, le numéro de parcelle, de rang, d'arbre, le type de symptôme et de prélèvements sont notés. Figure 10

Milieu B de King (KB)		Tampon phosphate (TP_1)	
K_2HPO_4	1,5 g		
$MgSO_4$, $7H_2O$	1,5 g	$K_2H\ PO_4$	8.75
protéose peptone n°3	15 g	$KH_2\ PO_4$	6.75
glycérol	10 ml	H_2Od qsp	1 L
agar	15 g		
H_2O d qsp	1 L		

Milieu KBC	Tryptone soja agar (TSA)	
1. Préparer 900 ml de milieu KB avec 16 g d'agar 2. Après autoclavage, laisser refroidir le milieu à 50°C environ. 3. Ajouter (pour 1L de milieu): 100 ml de solution d'acide borique à 1,5% (autoclavée séparément), 200 mg de cyclohexymide (dans l'éthanol) et 80 mg de céphalexine (dans l'eau distillée	TSB	3 g
	agar	15 g
	H_2O d qsp	1 L

Figure 11 : Composition des différents milieux et tampons utilisés lors des manipulations.

II.3. Traitements des échantillons

La figure 11 donne les compositions des différents milieux de culture et tampons utilisés.

II.3.a. Racines / Tiges

Les racines et tiges sont lavées à l'eau courante, puis rincées à l'eau permutée stérile. Trois tronçons de chaque échantillon, prélevés au milieu de ceux-ci sont déposés sur milieu KBC afin de pouvoir détecter la présence de *P. syringae*. 72h après ensemencement les colonies sont contrôlées sous UV afin de mettre ou non en évidence leur fluorescence. Les *Pseudomonas syringae* produisent des pigments jaunes-verts fluorescents : les pyoverdines. Ces pigments jouent pour la bactérie le rôle d'un sidérophore : ils captent les ions ferriques, indispensables pour la croissance des bactéries. Les boites sont notées pour leur absence/ présence de bactéries et pour leur fluorescence puis les colonies sont repiquées sur milieu KB (30 colonies/boites quadrillées pour suivi des colonies).

II.3.b. Terre / Débris de culture/ Symptômes

A partir des échantillons, des solutions mères (10^0) sont préparées comme suit.

Pour la terre, 10g sont prélevés dans chaque sachet, en essayant de les récupérer dans l'ensemble du sachet afin qu'une partie de chaque sous-échantillons soit prise. La terre est ensuite placée dans des flacons avec 60mL d'eau stérile puis passée au vortex.

Pour les débris de culture, un morceau de chaque tige / plateau de tallage de chaque débris d'une sous-parcelle est prélevé ; ces morceaux sont regroupés en sachet et pesés (soit un sachet par sous-parcelle). Après ajout de 50mL de TP1, les sachets sont broyés au stomacher 4 min. Le stomacher est un broyeur à double action de malaxage et d'agitation pour homogénéiser les échantillons.

Les échantillons prélevés sur symptômes sont décortiqués afin d'extraire les tissus malades et environnants. Si des points de gomme sont présents ils sont prélevés et traités systématiquement. Ces sous-échantillons sont mis en sachets et pesés. Après ajout de 30mL de TP1, les sachets sont passés au stomacher 4 min.

A partir de cette solution mère (concentration 10^0) une série de dilution de dix en dix a été réalisée jusqu'à une concentration de 10^{-4}.

Trois gouttes de 20µL de chaque solution sont déposées sur milieu TSA (tryptone soja agar) contenant 200mg/mL de cycloheximide. Le TSA est un milieu non sélectif de *P. syringae*. La présence de cycloheximide permet d'inhiber le développement des champignons, flore très présente et envahissante dans les échantillons.

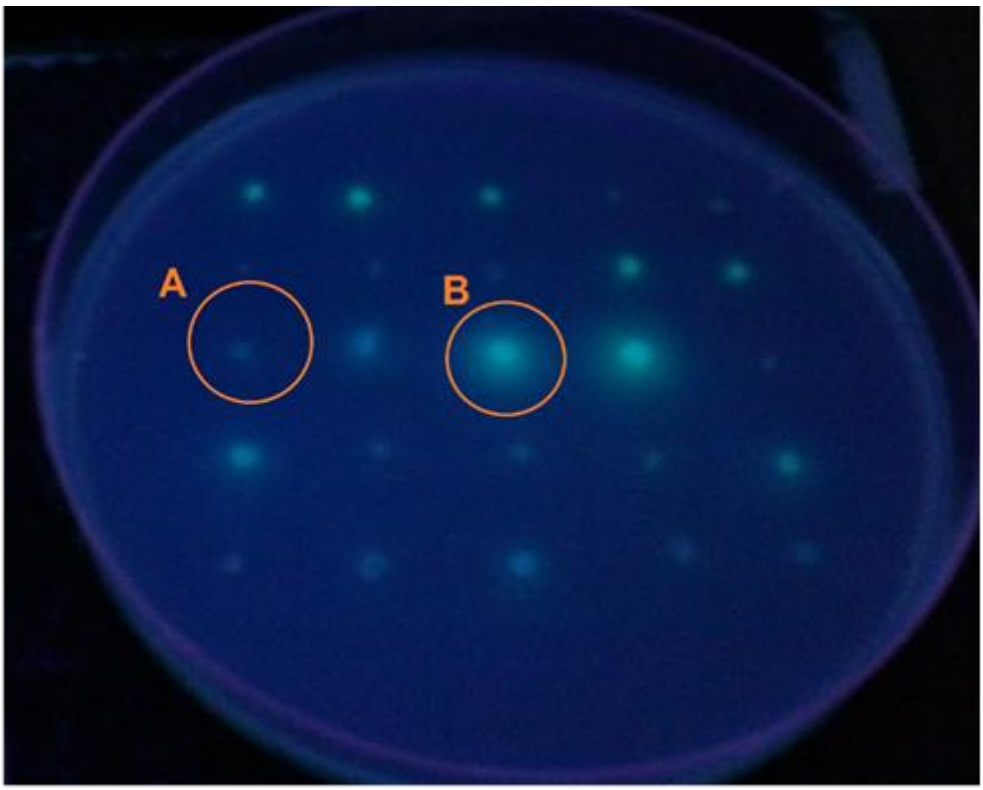


Figure 12 : Exemple d'un test de fluorescence sur Psy. En A, un isolat négatif à ce test (non fluorescent), en B, un isolat positif à ce test (fluorescent).

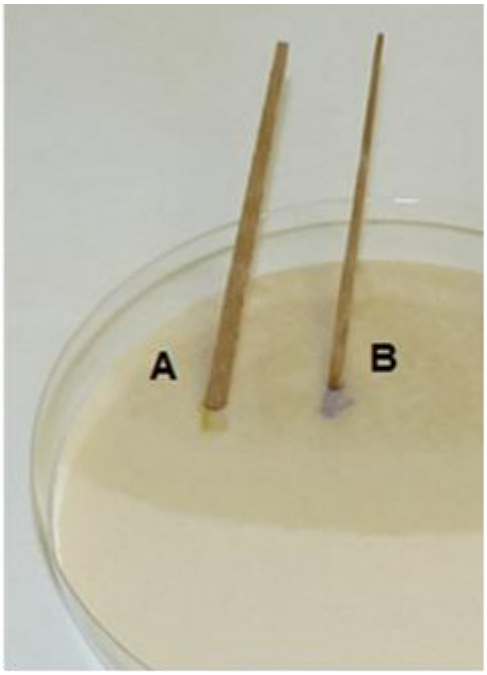


Figure 13 : Exemple d'un test oxydase. En A : un isolat négatif à ce test, en B : un isolat positif à ce test

100µL de chaque solution sont déposés sur milieu KBC *(*milieu B de King additionné de cycloheximide (antifongique), acide borique (antiseptique), et céphalexine (inhibiteur des bactéries gram+)), milieu sélectif de *Ps* syringae, puis étalé à l'aide d'un râteau.

Après 48H à température ambiante (25°C), les boites de milieu TSA et KBC sont comptées. Les dénombrements sont effectués sur la boîte correspondant à la dilution permettant de visualiser distinctement au moins 30 colonies isolées. Les colonies *P.* syringae « *like* » sont prélevées des boites KBC et repiquées sur milieu KB (30 colonies/boites quadrillées pour suivi des colonies).

II.3.d. Traitement des souches CTIFL

Les souches CTIFL 2011 ont été reçues en boites de Petri. Elles ont été triées en fonction de leur croissance, puis repiquées sur KBC pour suivi des colonies.

Les souches de 2012, reçues en Cryo-tubes ont été repiquées sur milieu KB et mises en plaque de 96 puits, pour les PCR directement.

II.4. Suivi des colonies

Après 24h de culture sur milieu de culture la présence/absence d'émission de fluorescence est testée grâce à une lampe UV (Figure 12).

Le caractère oxydase est testé après 48h de culture (Figure 13). Le test oxydase consiste à prélever l'isolat, le déposer à l'aide d'un cure-dent stérile sur un papier filtre imbibé de réactif oxydase (Tetra-methyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride dilué à 1% dans de l'eau). Ce test permet de mettre en évidence la présence (ou non) du complexe enzymatique IV : cytochrome-oxydase (cytochrome C^{19}) dans la chaîne respiratoire des bactéries. Les colonies oxydase positive (coloration violette) révèlent la présence et l'expression de cette enzyme.

D'après la bibliographie, *P. syringae* se caractérise par une fluorescence marquée et une absence de réaction au test oxydase. Cependant, des résultats récents issus de travaux des membres de l'équipe (unpublished data) révèlent que ces caractéristiques ne sont pas constantes en fonction des souches. L'ensemble des isolats, quels que soient leurs résultats, seront donc analysés par PCR (polymerase chain reaction) afin de déterminer s'ils appartiennent à l'espèce *P. syringae* et définir leur phylogroupe d'appartenance.

Les isolats bactériens sont ensuite mis en plaques pour la suite des analyses et pour leur conservation. Une plaque de 96 puits contenant 150µL de tampon phosphate TP1 (ou d'eau) est préparée pour la suite du traitement des isolats. Une seconde plaque contenant du TP1 et du glycérol (concentration en glycérol final de 20%), identique, est préparée pour la conservation des souches CTIFL 2011 et 2012.

Multiplex 1 et 2 (avec kit multiplex QIAGEN)	**Scha** (avec kit promega)
Pour une réaction (11µL): 2X QIAGEN : 6µL Mix d'amorces : 1,2µL (= 10µL de chaque amorce sens/faux-sens + QSP 500µL d'eau distillée) Eau distillée : 2,6µL Solution Q : 1,2µL	Pour une réaction (23µL): TP5X Green : 5µL $MgCl_2$ 25mM: 2µL dNTP 25mM : 0,2µL Mix d'amorces : 2µL (= 40µL d'amorces sens/anti-sens Scha + QSP 400µL d'eau distillée) GoTaq : 0,13µL Eau distillée : 13,7µL
Programme : 95°C 15min 94°C 30sec 61°C 1min30 } x 30 72°C 1min30 72°C 1min 30 40°C ∞	Programme : 94°C 4min 94°C 30sec 54°C 30sec } x30 72°C 1min 72°C 8min 40°C ∞
+ 2µL de suspension bactérienne	

Tableau 3 : Protocole des PCR multiplex et Scha

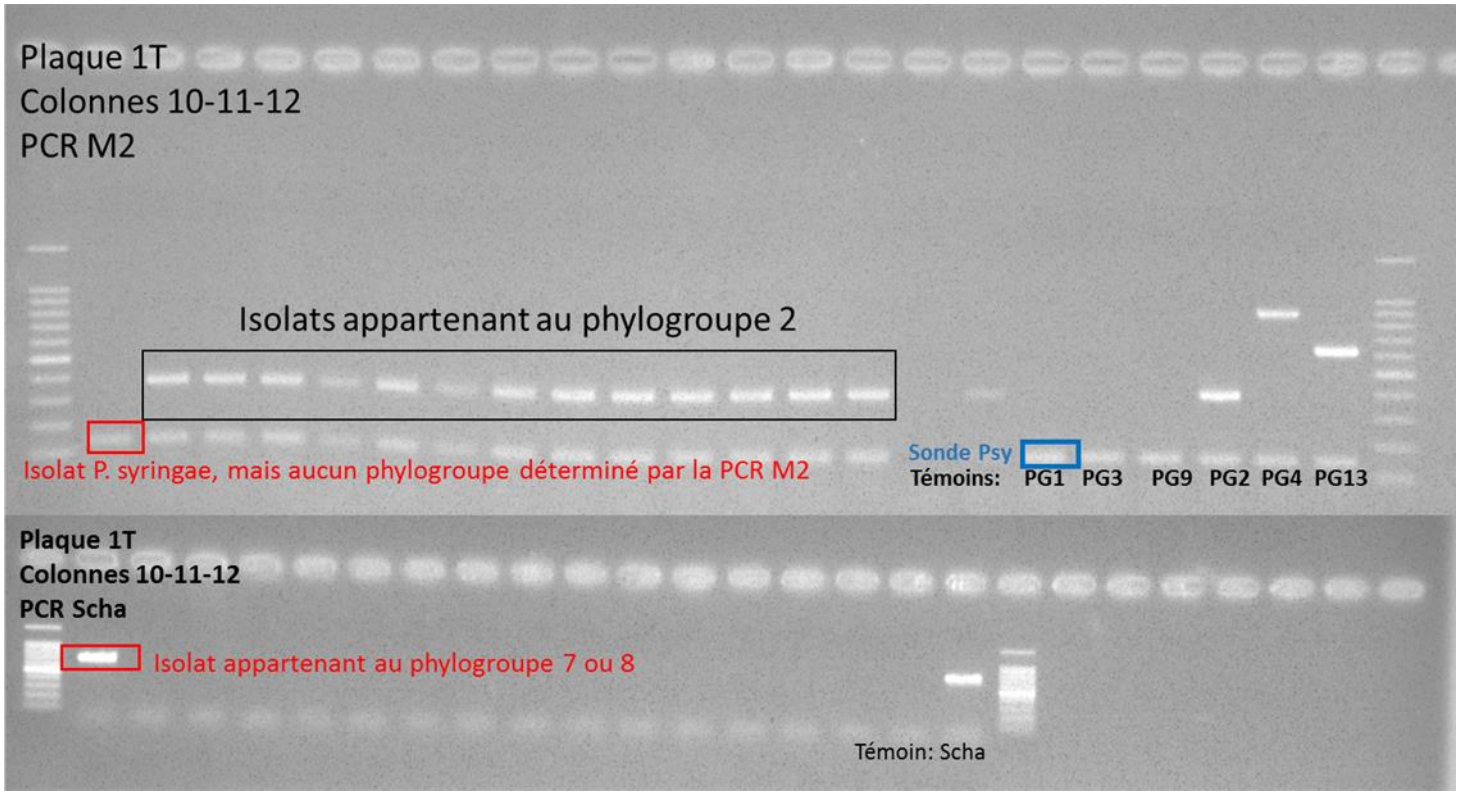


Figure 14 : Exemple de gels issus des PCR obtenues.

II.5. PCR

La PCR est une technique d'amplification du matériel génétique mise au point en 1985, par Karry Mullis. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Il s'agit de synthétiser de manière répétitive et à partir d'une paire d'amorces ADN, un brin complémentaire au brin d'ADN présent dans les échantillons.

Quatre réactifs sont essentiels à la PCR : l'ADN (ici les isolats bactériens), deux amorces (sens et anti-sens) qui vont encadrer la séquence à amplifier, la Taq Polymérase qui est une enzyme ayant une action optimale à 72°C et qui résiste à des températures plus hautes, et enfin les dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates) qui sont les bases azotées indispensables à la PCR pour la synthétise des brins complémentaires d'ADN. Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes : dénaturation, hybridation, élongation. Des amplicons (ADN double-brins bornés par les amorces et correspondants au fragment d'ADN recherché) apparaissent et vont se multiplier au cours des différents cycles.

Trois PCR différentes vont être appliquées à nos isolats : deux PCR multiplex et une PCR simplex ; chacune ayant pour but de détecter les *P. syringae* et d'en déterminer le phylogroupe. La PCR multiplex 1 contient la sonde *Psy*, permettant de détecter les isolats de *P. syringae* ainsi que les amorces permettant de détecter les isolats appartenant aux PG1, PG3 et PG9. La PCR multiplex 2 contient la sonde *Psy*, permettant de détecter les isolats de *P. syringae* ainsi que les amorces permettant de détecter les isolats appartenant aux PG2, PG4 et PG13. La PCR Scha, contient une paire d'amorces permettant de détecter indistinctement les PG 7 et 8. Les protocoles utilisés sont détaillés dans le tableau 3. A la fin des PCR multiplex, 3µL de tampon de charge sont ajoutés. Le tampon de charge est déjà présent dans le mix de la PCR Scha.

Les produits de PCR (5µl) sont ensuite transférés individuellement dans différents puits de gels d'agarose à 1,5% et mis à migrer par électrophorèse à 100 volts pour les multiplex, et 120 volts pour la PCR Scha. Cette électrophorèse permet de faire migrer les acides nucléiques au travers du gel et, la vitesse de migration étant dépendante de la masse moléculaire, et donc du nombre de bases d'ADN, la présence et la taille des amplicons pourront être vérifiées au moyen d'un marqueur de taille (mélange standard de fragments de différentes tailles). La vitesse de migration étant dépendante de la taille de la cuve utilisée, il faut laisser migrer les multiplex suffisamment longtemps pour permettre de séparer les amplicons des différents phylogroupes afin de visualiser l'ensemble des bandes. Avant visualisation, les gels sont mis dans un bain de BEt (bromure d'éthidium) qui est un produit intercalant des bases des acides nucléiques et qui

PROTOCOLE Box-PCR (avec le kit multiplex QIAGEN)
Pour une réaction (23µL + 2µL suspension bactérienne): 2X QIAGEN : 12,5µL Primer Box A1R : 0,5µL de la solution à 100pMol/µL (Primer : BoxA1R : 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') Eau distillée : 7,5µL Solution Q : 2,5µL
Programme : 96°C 15min 94°C 1min 53°C 1min x30 65°C 8min 65°C 10min

Tableau 4 : Protocole des Box-PCR

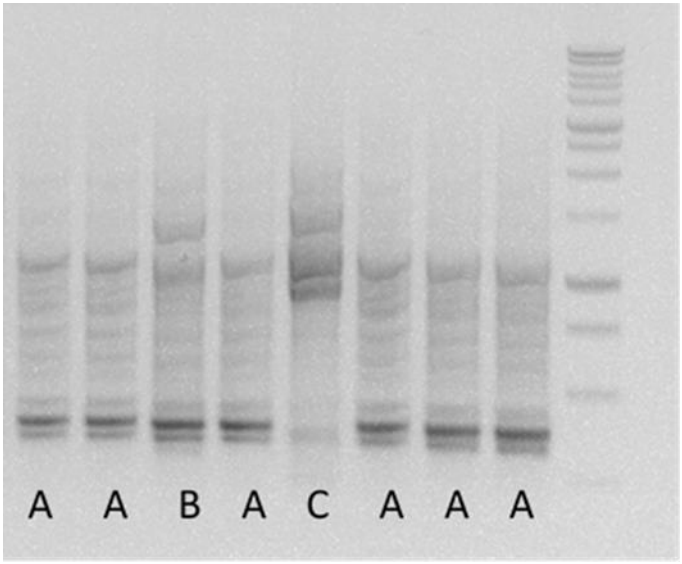


Figure 15 : Exemple de profils de Box-PCR. Ici, trois profils sont identifiés : A, B, C.

Protocole PCR cts
Pour une réaction (23µL) : Tampon 5X green : 5 µL MgCl2 : 2 µL Dntps : 0,5 µL cts-fwd PCR 10µM : 0,5 µL cts-rev PCR 10µM : 0,5 µL Eau : 14,37 µL GoTaq : 0,13µL
Programme : 96 ° : 5 min 94° : 30 sec 62° : 1 min 30 x35 72° : 2 min 72° : 7 min

Tableau 5 : Protocole de la PCR cts

est révélé par fluorescence sous illumination UV. Les bandes sont visualisées sous lumière ultraviolette (320 nm). La figure 14 présente un exemple de gels obtenus.

II.6. Box-PCR

La box-PCR est une technique de biologie moléculaire permettant de définir l'empreinte génétique des bactéries. Elle est basée sur l'amplification de plusieurs séquences répétitives et non codantes du génome. Les produits d'amplifications sont ensuite séparés par électrophorèse et leurs profils électrophorétiques sont comparés entre eux afin d'établir la similarité ou non des isolats et d'identifier les clones.

Le choix des souches utilisées pour réaliser les box PCR est fait selon les résultats des PCR présentées précédemment. Les box-PCR nécessitent des souches pures et des concentrations d'ADN similaires. Par conséquent, une purification et mise en suspension contrôlée des souches est effectuée préalablement. A partir des isolats, une purification sur milieu KB est effectuée. Après 48H de culture, une colonie bactérienne de chaque boite est mise en suspension afin d'obtenir une concentration de 2.10^8 bactéries/mL. Cette concentration est évaluée par une valeur de 0,12 au colorimètre à une DO de 580nm.

Le tableau 4 présente le protocole de Box-PCR utilisé. A la fin de la PCR on ajoute 2,5µL de tampon de charge (Blue/Orange 6X Loading Dye) et on dépose 5µL de produit PCR sur gel d'agarose à 1,5% + 1% BEt. La migration est réalisée à 80 volts pendant environ 1h35. La figure 15 présente un exemple de profil box obtenu.

II.7. Séquençage

Le séquençage d'un gène ou d'un fragment d'ADN, correspond à la détermination de la succession des nucléotides le composant. Les gènes de ménage sont souvent utilisés pour le séquençage car ils s'expriment dans tous les types cellulaires, leurs produits assurent des fonctions indispensables à la survie des cellules, et ils ne subissent pas de régulation. Le gène de ménage choisi ici est le *cts* qui code pour la citrate synthase, une enzyme intervenant dans le cycle de Krebs et qui est indispensable à la survie de la bactérie. Dans la séquence de ce gène, des mutations, spécifiques aux différents phylogroupes de *P. syringae* sont présentes.

Les souches à séquencer sont sélectionnées en fonctions des profils box-PCR obtenus : un isolat par profil est séquencé. Cette étape nécessitant des souches pures, une purification est effectuée. Une amplification par PCR du gène *cts* (650pb), est réalisée avant l'envoi des souches à séquencer à un sous-traitant. Le tableau 5 représente le protocole de la PCR.

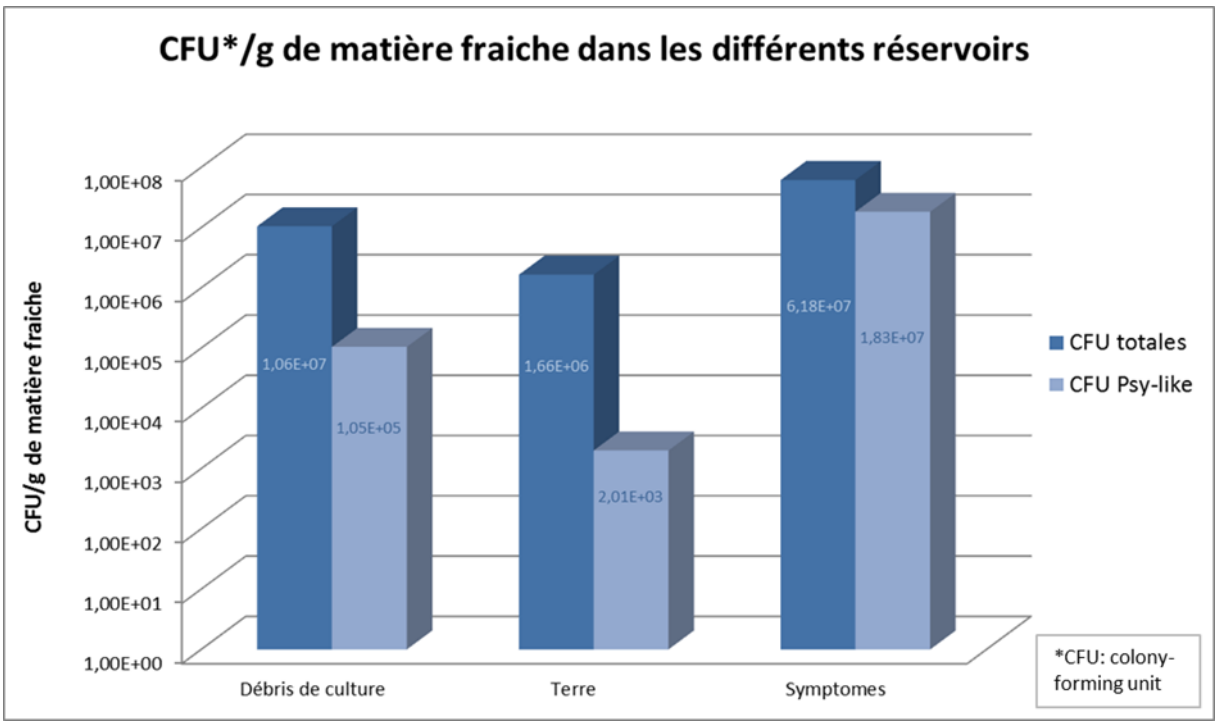


Figure 16 : Graphique comparatif des CFU totales et Psy-like au sein des différents réservoirs

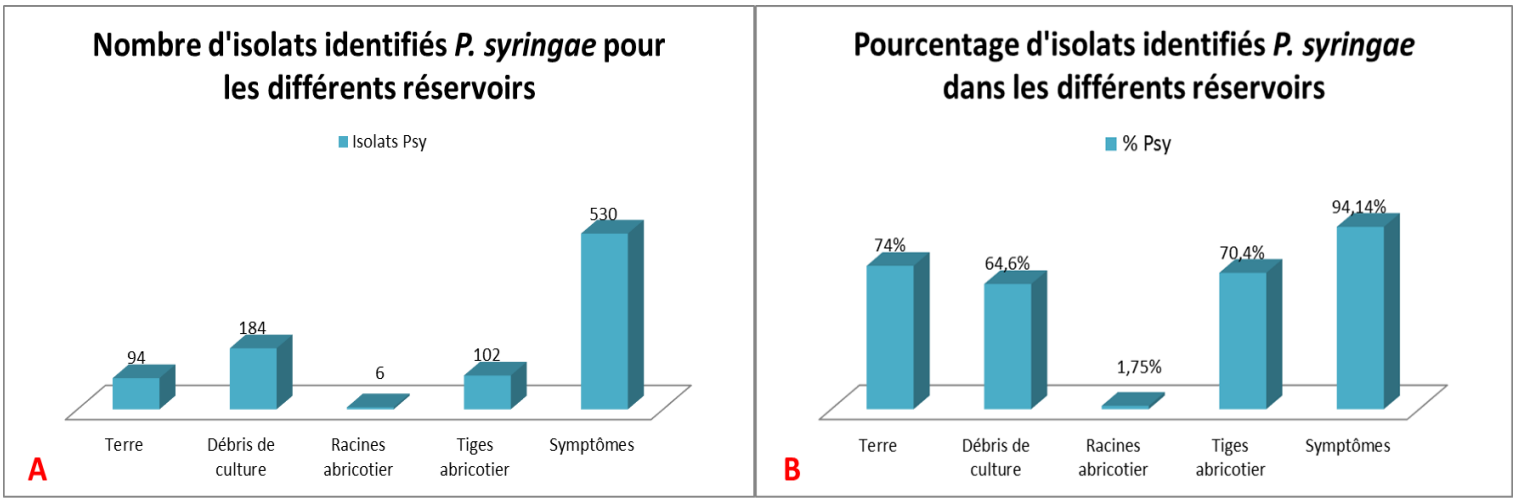


Figure 17 : Détermination du nombre et du pourcentage d'isolats P. syringae . A : Nombre d'isolats identifiés P. syringae pour les différents réservoirs. B : Pourcentage d'isolats identifiés P. syringae dans les différents réservoirs.

II.8. Traitement des données en bio-informatique

Les résultats des séquençages sont reçus sous forme de chromatogrammes à partir desquels la séquence nucléotidique est lue et décrite. Avant tout traitement des séquences, il faut éliminer les parties des chromatogrammes non lisibles (ADN parasite ou bruit de fond) ainsi que les accroches d'amorces, et vérifier la correspondance de la séquence de nucléotides avec le chromatogramme. C'est avec le logiciel « Chromas Lite 2.1.1 » que cette étape est réalisée. Il permet également d'exporter les séquences au format FASTA pour qu'elles puissent ensuite être utilisées avec un logiciel d'alignement.

Les séquences obtenues sont nommées, et des séquences connues de souches de références sont ajoutées afin d'être traitées avec le logiciel « DAMBE version 5.6.8 » qui permet leur alignement. Les séquences alignées peuvent ensuite servir pour réaliser l'arbre phylogénétique (logiciel MEGA5). Celui-ci met en évidence la proximité génétique des souches analysées avec celles de références

III. Résultats et interprétations

III.1. Gotheron

A Gotheron, les prélèvements ont été effectués sur le verger Cap Red pour la terre, les débris de culture, les racines, et les tiges d'abricotiers et sur l'ensemble des parcelles pour les prélèvements sur symptômes. Il s'agit ici d'identifier les réservoirs de *P. syringae* et d'étudier la variabilité de cet agent pathogène. L'étude d'un verger dès sa plantation est donc d'un grand intérêt pour le suivi des populations de *P. syringae*.

III.1.a. Comptages sur TSA et KBC

Le protocole de traitement des échantillons de terre, de débris de culture et sur symptômes a permis le comptage des CFU totales (colony-forming unit) et des CFU *Psy*-like (toutes les colonies ayant l'aspect des *P. syringae*). Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 16. Ces résultats mettent en avant la richesse et la diversité microbienne trouvées dans la terre et les débris de culture. En effet, la proportion de *P. syringae* est plus faible dans ces compartiments bien que leurs CFU totales soient assez similaires avec celles comptées sur symptômes. Ces compartiments semblent ainsi être des sources d'inoculum de *P. syringae*. Au niveau des prélèvements sur symptômes déclarés, la majorité des bactéries retrouvées est *P. syringae*. Ces résultats appuient les données bibliographiques affirmant la responsabilité de *P. syringae* dans la bactériose de l'abricotier.

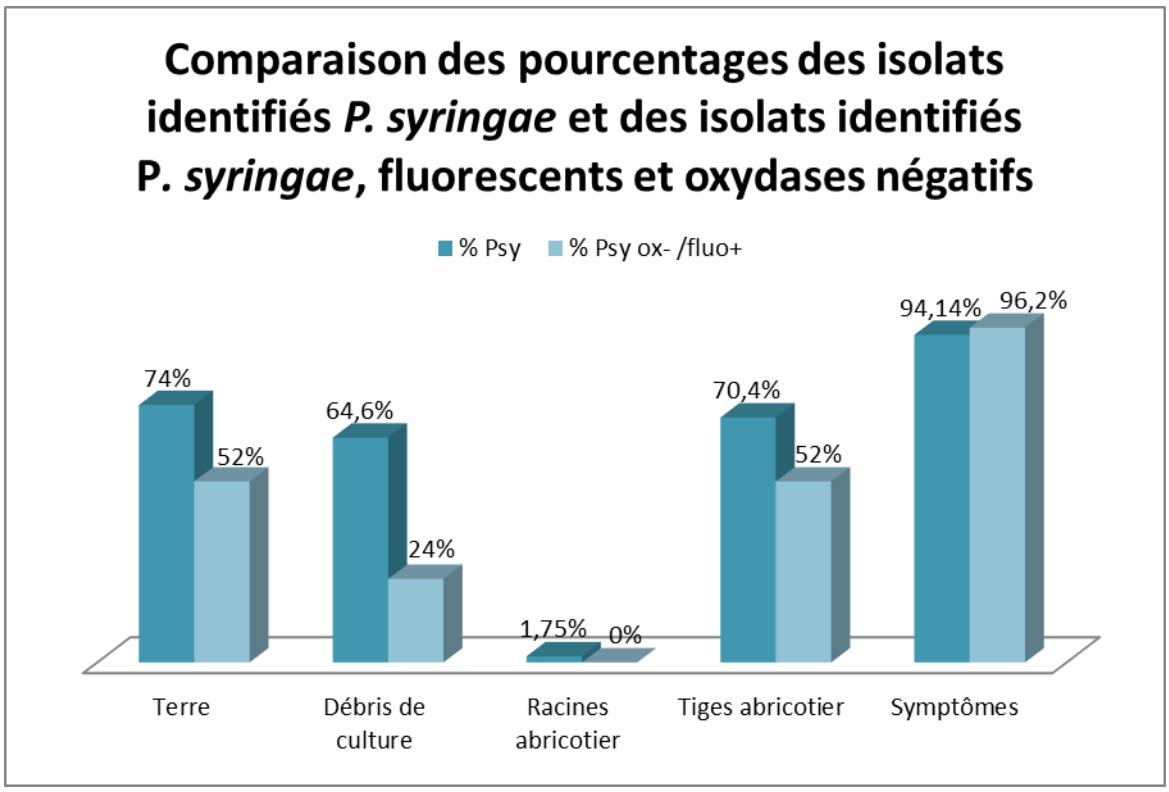


Figure 18 : Graphique de comparaison des pourcentages des isolats identifiés P. syringae par méthodes moléculaires et des isolats identifiés P. syringae par méthodes biochimiques et moléculaires.

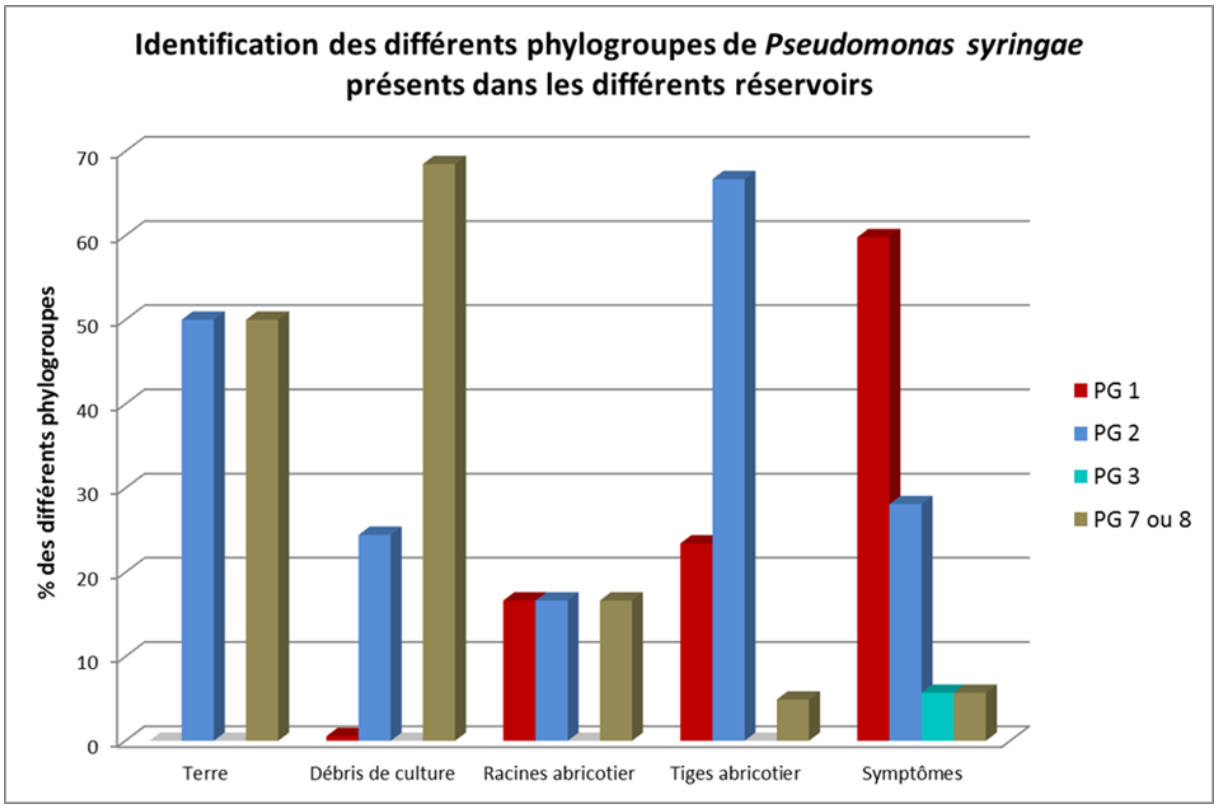


Figure 19 : Graphique représentant les pourcentages des différents phylogroupes de P. syringae identifiés au sein des différents réservoirs.

III.1.b. Détection par PCR

Les techniques moléculaires utilisées ont ensuite permis de déterminer le nombre d'isolats *P. syringae* au sein des différents réservoirs. La figure 17 présente ces résultats. Ainsi, c'est au niveau des symptômes que le plus grand nombre de *P. syringae* est retrouvé (530), puis des débris de culture (184), des tiges d'abricotier (102), de la terre (94) et enfin des racines (6). Proportionnellement à la totalité des isolats obtenus c'est au niveau des symptômes que l'on retrouve le plus de *P. syringae* : 94,14%. Viennent ensuite la terre, les tiges d'abricotier et les débris de culture. Seulement 1,75% des isolats issus des racines sont identifiées comme étant *P. syringae*. Les tissus symptomatiques se révèlent être le plus important réservoir de *P. syringae* avec une très faible diversité microbienne (bactéries autres que *P. syringae*). La terre, les tiges d'abricotiers et les débris de culture semblent être d'importants réservoirs à *P. syringae* avec une diversité microbienne plus importante. Quant aux racines, la faible proportion de *P. syringae* laisse penser qu'elles ne sont pas une source d'inoculum.

La question de sélectionner ou non les souches à partir des tests biochimiques réalisés (test oxydase et fluorescence) peut ici se poser. Une comparaison des pourcentages des isolats identifiés *P. syringae* uniquement par les techniques moléculaires et de ceux identifiés *P. syringae* par concordance des techniques moléculaires et biochimiques est réalisée en figure 18. Pour l'ensemble des échantillons, la sélection par tests biochimiques aurait entrainé une perte de souches de *P. syringae* plus ou moins importante selon le substrat. Notons qu'au niveau des débris culturaux seulement 24% de nos isolats *P. syringae* aurait été conservé en tenant compte des tests biochimiques réalisés. Ces résultats confortent donc le choix de traiter les isolats directement par PCR, limitant la perte de matériel bactérien. Sur symptômes, il y a peu de variation entre les deux méthodes d'identification de *P. syringae* ce qui est intéressant en termes de diagnostic.

La classification des isolats purifiés dans différents phylogroupes met en évidence la variabilité des proportions de ces phylogroupes au sein des différents réservoirs (figure 19). Ainsi, au niveau des compartiments terre et débris de culture, d'importantes proportions de PG7/8 sont retrouvés. Cela peut s'expliquer par la présence de *P. viriflava* dans le PG 7, qui est une bactérie pectinolytique et qui, de ce fait, présente un fort caractère saprophyte, mais qui est aussi pathogène sur différents végétaux dont l'abricotier. De plus, les PG 7/8 sont décrits dans la bibliographie comme étant généralement issus de réservoirs environnementaux, ce qui est concordant avec ces résultats. La similitude des résultats obtenus en termes de phylogroupes retrouvés pour les échantillons de racines avec ceux de la terre ou des débris de culture et la faible proportion de *P. syringae* mise en avant précédemment suggère qu'il s'agit sûrement de résidus de surface non éliminés lors du lavage des racines. Au niveau des prélèvements sur

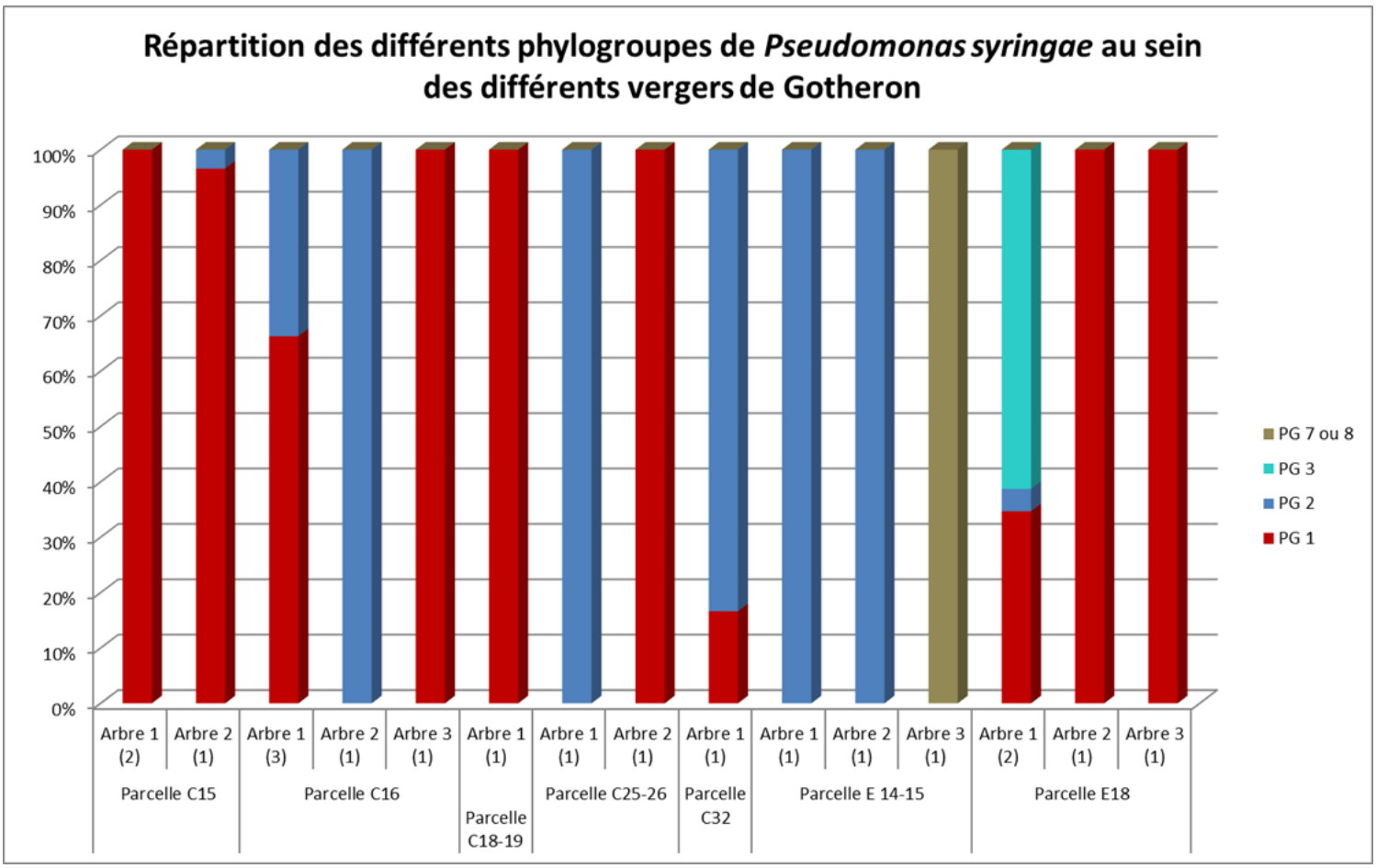


Figure 20 : Comparaison de la répartition des différents phylogroupes de P. syringae au sein des différentes parcelles. Arbre 1, Arbre 2, … : numéro de l'arbre prélevé. (1), (2)… : nombre de prélèvement effectués, Parcelle C15, C16… : nom de la parcelle

	Département	Nombre d'isolats	Psy	Non Psy	PG 1	PG 2	PG 3	PG 7 ou 8	PG 4/9/10/13	PG inconnu
2011	07- Ardèche (9 communes)	59	59	0	9	40	1	6	0	3
	26-Baronnies (4 communes)	22	22	0	0	22	0	0	0	0
	26-Drôme des collines (8 communes)	30	29	1	15	13	0	0	0	1
	26-Drôme provencale (2communes)	12	12	0	3	8	0	0	0	1
	26-Plaine de Valence (6 communes)	57	55	2	7	48	0	0	0	0
	38- Isère (1 commune)	4	4	0	4	0	0	0	0	0
	TOTAL	184	181 (98,4%)	3 (1,6%)	38 (21%)	131 (72,4%)	1 (0,5%)	6 (3,3%)	0	5 (2,8%)
2012	07- Ardèche (4 communes)	22	18	4	6	12	0	0	0	0
	26-Baronnies (1 commune)	4	4	0	0	4	0	0	0	0
	26-Drôme des collines (3 communes)	18	17	1	9	7	0	0	0	1
	26-Drôme provencale (1 commune)	10	10	0	0	3	0	7	0	0
	26-Plaine de Valence (2 communes)	22	19	3	1	16	0	2	0	0
	38- Isère (1 commune)	3	0	3	0	0	0	0	0	0
	30 - Gard (1 commune)	4	0	4	0	0	0	0	0	0
	TOTAL	83	68 (81,9%)	15 (18,1%)	16 (23,5%)	42 (61,8%)	0	9 (13,2%)	0	1 (1,5%)
	TOTAL 2011/2012	267	249 (93,2%)	18 (6,8%)	54 (21,7%)	173 (69,5%)	1 (0,4%)	15 (6%)	0	6 (2,4%)

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des résultats issus des prospections du CTIFL en 2011 et 2012

symptômes, des PG 7/8 et 3 sont retrouvés et sont issus du même échantillon. Le PG 2 est retrouvé dans l'ensemble des compartiments, dans des proportions plus ou moins importantes, suggérant son ubiquité. La bibliographie appuie cette donnée car il a été décrit au niveau d'échantillons prélevés sur plantes et différents substrats végétaux. De la même façon, les souches du PG 1 sont souvent issues de plantes malades. Nos résultats confirment cette donnée car la majorité des PG 1 sont retrouvés dans les symptômes et en moindre quantité dans les tiges. Nos premiers résultats concordent donc bien avec les données bibliographiques existantes.

La figure 20 représente la répartition des différents phylogroupes de *P. syringae* au sein des différents vergers de Gotheron (prélèvements sur symptômes déclarés). Au sein des différentes parcelles de Gotheron, dans tous les phylogroupes identifiés : 1, 2, 3 et 7/8, il existe des pathovars phytopathogènes reconnus. Cette étude ayant été effectuée sur des prélèvements réalisés sur symptômes déclarés, ces résultats confortent nos résultats précédents et nous amènent à dire que les tissus symptomatiques sont très certainement une grande source d'inoculum. Néanmoins, on retrouve au sein de ces vergers majoritairement les phylogroupes 1 et 2. Nous savons également que la 41A, souche testée et reconnue pathogène, appartenant au PG 2 a été inoculée sur le domaine de Gotheron. L'importante proportion de PG 2 retrouvée est peut-être due à cette inoculation. Un séquençage de ces souches est donc nécessaire pour savoir s'il s'agit bien de la 41A ou s'il s'agit d'autres souches du même phylogroupe d'appartenance présentes naturellement à Gotheron. On retrouve sur un seul arbre de la parcelle E14-15 des *P. syringae* de PG 7/8. Cette parcelle est une parcelle d'introduction. Les arbres composant ce verger viennent donc d'ailleurs. Il est probable que la bactérie était présente dans l'arbre lors de son introduction, et ne soit pas retrouvée ailleurs à Gotheron. Enfin, l'homogénéité des résultats observée arbre par arbre soulève l'hypothèse que les souches bactériennes pourraient être arbre ou symptôme spécifique : un phylogroupe est présent au sein d'un même symptôme et provoquerait la maladie. Cette hypothèse est à vérifier sur un échantillonnage plus important.

III.2. CTIFL

Ayant reçu les souches CTIFL en boites ou en cryotubes, aucun comptage des isolats sur milieu KBC et TSA n'a pu être effectué.

Le tableau 6 récapitule les résultats des prospections réalisées par le CTIFL en 2011 et 2012, dans différents départements de la vallée du Rhône. Le nombre d'isolats réalisés en 2011 est plus important qu'en 2012. Et, si le pourcentage d'isolats identifiés *P. syringae* en 2011 est plus important qu'en 2012, on retrouve les mêmes phylogroupes (1,2, 7/8) les deux années avec

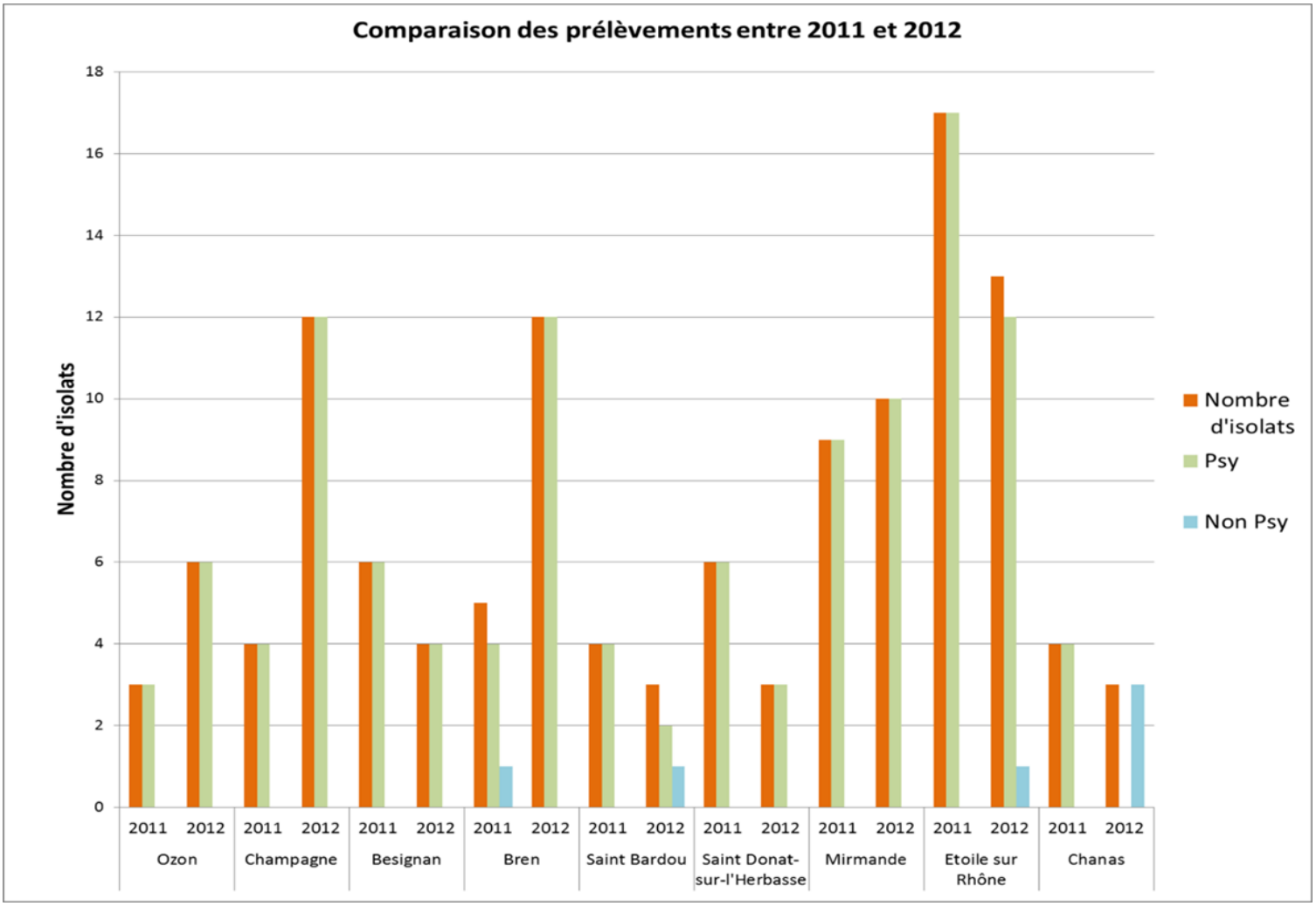
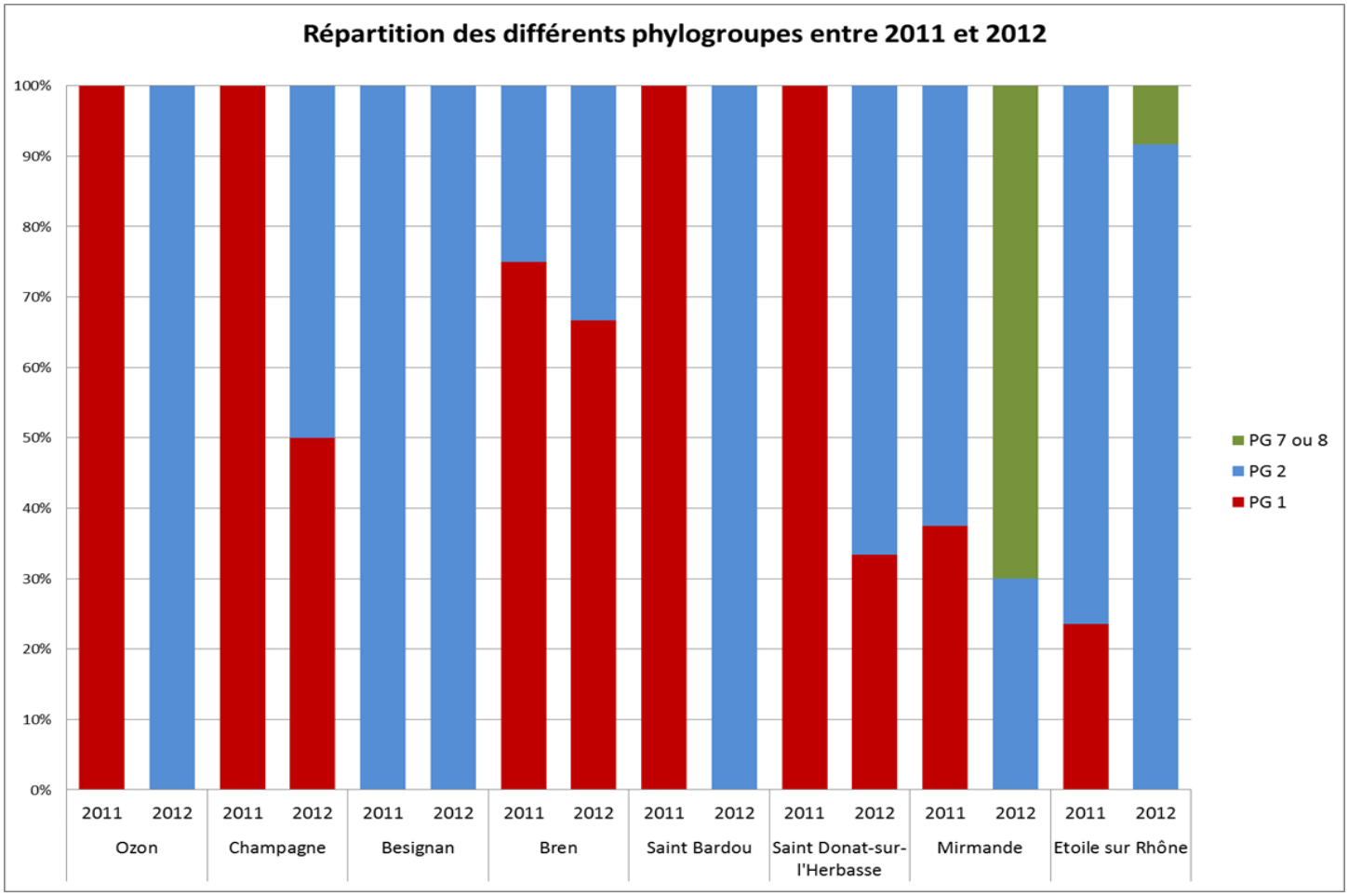


Figure 21 : Comparaison des résultats issus des points de prélèvements en commun en 2011 et 2012.

Figure 22 : Comparaison de la répartition des différents phylogroupes P. syringae sur les points de prélèvements en commun en 2011 et 2012.



des proportions similaires. Notons néanmoins qu'une souche appartenant au PG 3 est identifiée en 2011 en Ardèche.

Ainsi, les échantillonnages de 2011 et 2012, ont permis d'identifier 93,2% d'isolats *P. syringae* par les techniques de biologie moléculaire parmi ceux retenus par le CTIFL grâce aux techniques biochimiques. Cependant, le PG 2 est dominant pour les souches du CTIFL, alors qu'à Gotheron c'est le PG 1 qui est le plus représenté.

Parmi les différents lieux de prospection de 2011 et 2012, neuf vergers ont été échantillonnés sur ces deux années consécutives. La figure 21 compare le nombre d'isolats effectués et leur identification *P. syringae.* D'une année à l'autre, pour ces mêmes points de prélèvement, même si l'échantillonnage n'est pas équivalent, les résultats semblent assez similaires quant aux proportions de *P. syringae.*

La figure 22 met en évidence la répartition des phylogroupes entre 2011 et 2012 pour ces points de prospection. Seuls deux villages ont des résultats remarquables : Bésignan et Bren où les proportions des différents phylogroupes présents sont similaires pour ces deux années. Pour l'ensemble des autres points de prospection, aucune corrélation dans le temps des populations *P. syringae* n'est apparente.

III.3. Box-PCR

Afin d'éviter de séquencer des souches clonales, des box-PCR sont réalisées. Une souche de chaque profil box est envoyée au séquençage. Pour chaque échantillon traité, un isolat *P. syringae* de chaque phylogroupe déterminé est sélectionné. Ainsi, 152 souches bactériennes sont traitées en box-PCR, et 56 profils ont été identifiés La 41A, souche reconnue épidémique est également traitée comme témoin. Le tableau 7 répertorie les profils dont les produits PCR *cts* ont été envoyés au séquençage. Notons que 50 souches ont finalement été séquencées ou ont permis d'obtenir des séquences exploitables. En effet, des contaminations sont apparues et ont pris le dessus sur nos souches bactériennes lors de la conservation ou des techniques de mise en collection. Soit les souches bactériennes n'étaient pas distinguables des contaminants, soit les séquences obtenues n'étaient pas exploitables.

III.4. Séquençage

Un arbre phylogénétique sur la base de la séquence *cts* est réalisé. La figure 23 présente cet arbre. Cet outil permet de mettre en évidence la proximité des souches au niveau génétique, et plus précisément au niveau d'une séquence du gène *cts*. Des séquences de souches de références de chaque pathovar (normalement pathogène du végétal dont il a le nom) ont également été ajoutées.

Nom de profil box-PCR	Phylogroupe	Nombre de souche
Profil 01	2	15
Profil 02	2	10
Profil 03a	1	13
Profil 03b	1	12
Profil 04	7/8	2
Profil 05	7/8	1
Profil 06	2	1
Profil 07	2	9
Profil 08	3	1
Profil 09	2	1
Profil 10	7/8	3
Profil 11	1	1
Profil 12a	2	4
Profil 12b	2	7
Profil 13	2	3
Profil 15	2	1
Profil 16	2	1
Profil 17	7/8	1
Profil 18	7/8	1
Profil 19	7/8	1
Profil 22	2	1
Profil 23	7/8	1
Profil 24	2	1
Profil 27	2	1
Profil 29	2	1
Profil 30	3	1
Profil 31	7/8	1
Profil 32	1	5
Profil 33	2	1
Profil 34	1	1
Profil 35	2	1
Profil 36	2	4
Profil 37	2	1
Profil 39	7/8	2
Profil 47	1	1
Profil 48	1	1
Profil 50	2	2
Profil 51	7/8	1
Profil 52	7/8	2
Profil 53	7/8	1
Profil 54	7/8	1
Profil 55	2	2
Profil 56	7/8	1
Profil 57	7/8	1
Profil 58	2	1
Profil 60	2	1
Profil 61	2	1
Profil 64	7/8	2
Profil 65	2	1
Profil 66	7/8	1

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des profils box-PCR obtenus, le nombre de souches répertoriées pour chaque profil et leur phylogroupe d'appartenance.

Nous observons grâce à cet arbre, une bonne correspondance au niveau des phylogroupes d'appartenance de nos souches, entre nos résultats des différentes PCR et ceux du séquençage.

L'étude de l'arbre phylogénétique révèle que six souches, représentées par trois profils box-PCR appartiennent au phylogroupe 2a. Les souches d'un de ces profils sont identiques au niveau de la séquence du gène *cts* analysée avec la souche de référence : PsyCit7. Elles sont issues des échantillons de tige et de débris de culture. La pathogénicité éventuelle de ces souches peut poser question. En effet, Wilson et al., 2002 ont démontré l'utilisation de PsyCit7 comme agent de lutte biologique contre la moucheture de la tomate provoquée par *P. syringae pv tomato*.

Trente souches, représentant 12 profils de box-PCR, appartiennnent au phylogroupe 2b. Ce phylogroupe comprend les souches 41A et BEA1 qui sont des souches testées et reconnues phytopathogènes. On y trouve également la souche de référence *P. syringae : P. syringae pv syringae*. Les sept souches du profil box 12b groupent avec la souche de référence *P. pv avellanae*, qui correspond au pathogène du noisetier. La souche du profil 22 en est très proche. Ces souches sont issues des échantillons de terre, des tiges et du CTIFL. Si ces souches sont identiques ou proches du pathogène du noisetier au niveau de la séquence *cts* analysée, on peut se poser la question quant à sa pathogénicité ou non sur abricotier. Dix souches (représentant sept profils box) sont identiques sur la séquence *cts* analysée avec la 41A, la BEA1 et *P. pv syringae*, et 12 souches (représentant trois profils) en sont très proches. On peut émettre l'hypothèse que les dix souches ayant ces sept profils groupés soient des souches épidémiques. Cependant, malgré le fait que ces souches soient identiques au niveau de la séquence du gène *cts* analysée, elles ont des profils box-PCR différents, on ne peut donc pas s'avancer sur la pathogénicité de ces souches car le gène *cts* n'est pas lié au pouvoir pathogène. Ces souches sont retrouvées dans l'ensemble des compartiments : terre, débris de culture, tige, symptômes et également dans les échantillons du CTIFL. Cependant, la majorité proviennent d'échantillons issus du végétal.

Neuf souches représentant sept profils appartiennnent au phylogroupe 2c. Ce phylogroupe semble ne pas être pathogène (Berge et al., 2014). Ces souches sont issues des débris de culture et des tiges.

On observe 25 souches représentant deux profils qui appartiennent au phylogroupe 2d. Un profil représentant 10 souches est identique au niveau de la séquence du gène *cts* analysée avec le pathogène de l'érable (*P. syringae. pv aceris*) et un autre, représentant 15 souches avec le pathogène du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*). L'ensemble des souches sont issues des prélèvements du CTIFL et sur symptômes. Ici encore on peut se poser la question de la pathogénicité de ces souches sur abricotier.

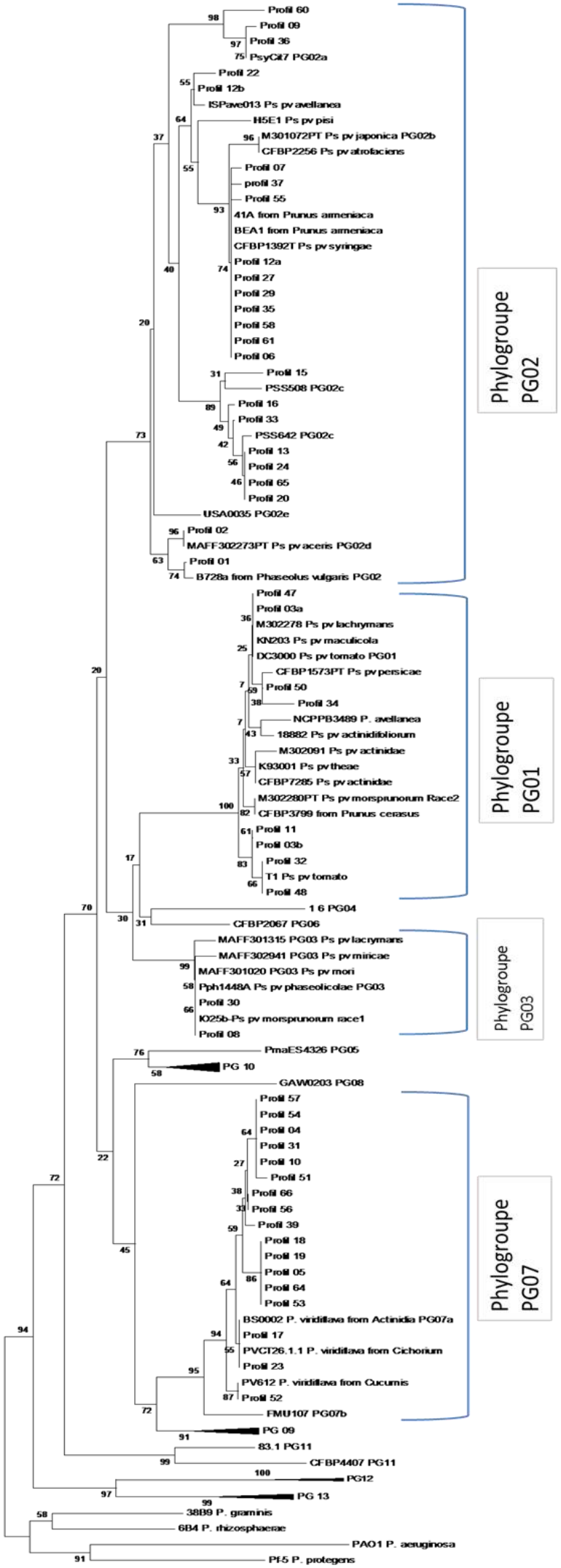


Figure 23 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences cts des échantillons obtenus à Gotheron et des prospections du CTIFL

L'ensemble de ces résultats confortent les données précédentes et mettent à nouveau en avant le caractère ubiquiste du phylogroupe 2. Quant à la pathogénicité de ces souches, seul un test de pouvoir pathogène pourrait mettre en évidence ou non leur caractère épidémique.

Huit profils box-PCR, représentant 36 souches qui appartiennent au phylogroupe 1 sont détectés. Cinq de ces profils, représentant 22 souches, sont groupés avec les pathogènes du concombre, du pêcher ou de la tomate. On les retrouve au niveau des échantillons de tiges, des débris de culture, des symptômes et du CTIFL. Le fait qu'on les retrouve partout pourrait suggérer que ce sont des souches épidémiques. Néanmoins qu'elles soient identiques au niveau de la séquence *cts* analysée avec des souches pathogènes d'autres végétaux repose la question de la pathogénicité de ces souches sur abricotier. De plus, si on ne sait pas si elles sont pathogènes, ces souches sont issues essentiellement des prélèvements sur symptômes et des prospections du CTIFL, dans des proportions importantes (grand nombre d'isolats au sein d'un même profil box). On peut émettre l'hypothèse qu'il existe au sein du phylogroupe 1 des souches pathogènes, sans pouvoir les définir. Notons également qu'aucune séquence *cts* n'est identique à celle de *P. pv morsprunorum* race 2, qui est reconnu uniquement pathogène sur cerisier (Freigoun and Crosse, 1975) contrairement à la race 1, pathogène sur cerisier, prunier et abricotier et appartenant au phylogroupe 3 (Wormald, 1932).

Deux profils box-PCR, représentant deux souches qui appartiennent au PG 3 sont issus d'échantillons du CTIFL et de prélèvements sur symptômes. Ces deux souches sont identiques au niveau de la séquence *cts* avec *P. pv morsprunorum* race 1, reconnu pathogène sur abricotier. Ces souches, provenant des prélèvements sur symptômes et des prospections du CTIFL, nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'elles sont pathogènes, mais seul un test du pouvoir pathogène pourrait le confirmer.

L'ensemble des échantillons identifiés par la PCR Scha (PG 7/8) appartiennent au PG 7. Vingt-trois souches correspondant à dix-sept profils box-PCR appartiennent à ce groupe phylogénétique. Elles sont issues pour la majorité d'échantillons de terre et débris de culture, ce qui concorde avec nos résultats précédents. Trois profils, représentant quatre souches, ont des séquences *cts* identiques à celle de *P. viridiflava*, et sont issues de différents végétaux : kiwi, endive et melon. Ces souches ayant une grande proximité génétique avec les pathogènes du kiwi, de l'endive et du melon, on peut se poser la question de leur pathogénicité sur abricotier.

IV. Discussion

A Gotheron, au sein du verger Cap Red, une grande diversité de *P. syringae* est observée dans les différents compartiments étudiés. Cependant nous n'avons pas pu analyser les symptômes des arbres de ce jeune verger, afin de déterminer si oui ou non, les souches que l'on retrouve dans ces compartiments sont retrouvées dans les tissus symptomatiques et émettre l'hypothèse que ce sont des souches épidémiques. A la fin du printemps, des symptômes se sont déclarés sur deux arbres de ce jeune verger, prouvant que des souches pathogènes sont déjà présentes, mais nous n'avons pas pu récupérer des échantillons à temps pour les analyser. Ce verger sera suivi, et les prochains symptômes déclarés seront analysés.

Nos résultats montrent que la terre et les débris de culture (ici il s'agit d'orge) semblent être d'importantes sources d'inoculum par leurs fortes proportions de *P. syringae* potentiellement pathogènes (PG 2) et être ainsi responsables du déploiement de la maladie sur les arbres fruitiers. Afin de limiter les épidémies, quelques précautions peuvent être envisagées : les débris de culture pourraient être enlevés ou certains précédents culturaux évités. Une autre source importante d'inoculum semble être les arbres eux-mêmes. En effet, si dans les racines on ne trouve que peu voir pas de bactéries, un grand nombre de bactéries est présent dans les tiges, et ce dès la plantation. De plus, les phylogroupes retrouvés : 1, 2 et 3, sont décrits dans la bibliographie comme comportant des souches pathogènes des arbres fruitiers (Berge *et al.*, 2014). Ces jeunes arbres, issus de plants certifiés remettent ainsi en question la liste des organismes contrôlés lors du schéma de certification dont *P. syringae* ne fait actuellement pas partie. Peut-être des étapes permettant la détection de la bactérie au cours de la procédure devraient être ajoutées. Durant nos expérimentations, nous n'avons pas eu accès au porte-greffe car cela est destructeur pour l'arbre. Il est possible que ce porte-greffe soit aussi une source d'inoculum. Dans la bibliographie du début de la description de la bactériose à *P. syringae* il est décrit que le porte-greffe peut avoir une incidence sur l'infection, et que la bactérie peut passer du porte-greffe au greffon (William and Peterson, 1967; Lyskanowska, 1979). Cette piste, délaissée depuis quelques années, mériterait donc d'être explorée.

Concernant les différentes parcelles échantillonnées sur le domaine de Gotheron, différents phylogroupes semblent coexister au cours du temps dans le même verger et provoquent des symptômes similaires entre eux. Il se pourrait que ces phylogroupes soient arbre ou symptôme spécifiques compte tenu du fait que la majorité des échantillons ressortent avec un phylogroupe déterminé par arbre ou par symptôme. C'est-à-dire, qu'un phylogroupe coloniserait un arbre et serait responsable de la maladie.

Les résultats des prospections dans la vallée du Rhône réalisées par le CTIFL sont très différents de ceux obtenus à Gotheron. En effet, à Gotheron, le phylogroupe dominant est le

PG1 tandis que pour le CTIFL le phylogroupe dominant est le PG2. Ces résultats sont comparables pour les deux années de prospection, et une dominance du PG1 est observée pour la Drôme des collines. Le PG 3 n'est retrouvé que deux fois dans l'ensemble des échantillons : sur symptômes à Gotheron et parmi les prospections du CTIFL. Cela suggère que les souches appartenant à ce phylogroupe sont rares. L. Parisi, (communication personnelle), appuie cette hypothèse, car, ayant analysé les populations de *P. syringae* dans trois vergers de la Drôme tout au long de l'année 2014, sur la plante (feuilles, bourgeons, tiges) et sur le couvre-sol, elle ne l'a jamais rencontré. Cependant, il se pourrait que les souches de ce phylogroupe ne se trouvent que sur symptômes déclarés, et dans ce cas l'échantillonnage effectué (à Gotheron et par le CTIFL) est trop faible pour conclure.

Les résultats obtenus ne nous permettent pas à ce jour de déterminer si une souche est épidémique ou non. Certaines souches aux séquences *cts* identiques ont des profils Box-PCR différents. En effet, les souches peuvent être identiques sur une partie seulement de leur génome, et le gène *cts* n'est pas lié au pouvoir pathogène. Dans l'absolu, la box-PCR peut être un outil de comparaison plus fiable en termes de proximité génétique, mais est un outil contraignant. Il faut prendre en compte d'éventuelles contaminations : une contamination avec un microorganisme non *P. syringae* qui n'apparait ni dans les PCR M1/M2/Scha, ni dans le *cts* peut avoir lieu. Dans ce cas, on se retrouve avec un profil box unique, et seul un séquençage du génome complet peut faire ressortir cette contamination. Enfin, c'est un outil difficile à mettre en œuvre : purifications, dosages, comparaisons de profils.

D'un point de vue pratique, beaucoup de souches ont été perdues et n'ont donc pas pu être exploitées. La grande majorité (échantillons de tiges) provient d'un isolement qui mériterait plus d'étapes de purification. Des contaminants ont inhibé la croissance des *P. syringae* identifiés au départ. Lors des isolements effectués pour les box-PCR, plusieurs *P. syringae* ont pu être détectés (sur milieu de culture, puis en PCR) pour un même échantillon, appartenant ou non au même phylogroupe. Cela montre la difficulté et la nécessité de l'étape de purification, ainsi que la rigueur de travail à avoir.

D'un point de vue général, peu de *P. syringae* n'ont pas été identifiés et pas d'erreur quant aux phylogroupes d'appartenance n'a été décelé en comparant les résultats des PCR et ceux des séquençages réalisés. Les phylogroupes de *P. syringae* décrit dans la littérature sont donc bien identifiés grâce aux méthodes de biologie moléculaire utilisées. .

Conclusions et perspectives

Deux problématiques principales ont été posées lors de ce stage. En premier lieu, il s'agissait de savoir s'il y avait un inoculum de *P. syringae* potentiellement pathogène présent dans l'écosystème cultivé avant même la plantation d'un verger. En deuxième lieu, nous avons voulu savoir si la plante elle-même, lors de la plantation, pouvait être porteuse de bactéries potentiellement pathogènes. Pour répondre à ces questions, nous nous sommes appuyés sur les travaux de Berge et al. (2014) pour caractériser la diversité de la bactérie.

Les résultats ont permis de mettre en avant la grande diversité de *P. syringae* au sein des différents compartiments. Les souches appartenant au PG1, décrites dans la littérature comme issues principalement de plantes malades ont été échantillonnées dans les tiges de plantes apparemment saines lors de leur plantation, sur symptômes déclarés et lors des échantillonnages du CTIFL. Les souches appartenant au PG2, phylogroupe ubiquiste, sont retrouvées dans l'ensemble des réservoirs échantillonnés présentant des populations de *P. syringae*, c'est-à-dire la terre, les débris culturaux, les tiges, les symptômes ainsi que lors des prospections du CTIFL. Les bactéries du PG7, comportant des souches pathogènes et données comme colonisant essentiellement les réservoirs de l'environnement, ont en effet été échantillonnées en majorité dans la terre et les débris de culture. Elles ont également été identifiées en moindre quantité sur symptômes déclarés à Gotheron et lors des échantillonnages du CTIFL. Les souches du PG3, rares mais potentiellement pathogènes sur plantes ligneuses, ont été retrouvées sur symptômes et lors des prospections du CTIFL. Ces observations corroborent l'hypothèse de l'existence de distributions différentielles de ces phylogroupes au sein des différents compartiments.

Concernant l'hypothèse d'implications diverses des phylogroupes dans le développement de la maladie, les résultats obtenus ne nous permettent pas d'émettre des conclusions sur le pouvoir pathogène des souches isolées, mais permettent de formuler des hypothèses. Ainsi, la grande proportion de souches appartenant au PG1 issues des échantillons sur symptômes soulève la question de leur pouvoir pathogène. Certaines d'entre elle pourraient être responsables de la maladie, bien qu'elles soient différentes au niveau du *cts* de la souche de référence de *P. syringae* pv *mors-prunorum* race 2, pathogène sur cerisier.

Actuellement, la majorité des souches pathogènes connues appartiennent au PG2, dont les souches témoins testées et reconnues épidémiques sur abricotier : la 41A et la BEA1. Nos résultats ont confirmé le caractère ubiquiste des souches issues de ce phylogroupe. La grande proportion de souches de ce phylogroupe issue des échantillons sur symptômes et des prospections du CTIFL nous permet de conforter l'hypothèse que certaines de ces souches sont bien épidémiques.

Les résultats obtenus lors de ces six mois de stage sont encourageants, et les questions posées méritent d'être approfondies et les prospections poursuivies afin d'enrichir les données déjà exploitées.

Quelques perspectives sont déjà envisagées. Tout d'abord, le verger CapRed continuera d'être suivi, et les prochains symptômes déclarés feront l'objet d'échantillonnage. Le but étant d'identifier une éventuelle corrélation entre les souches identifiées au niveau des réservoirs déjà échantillonnés et les tissus symptomatiques. Retrouverons-nous les mêmes souches que celles détectées lors de notre travail ?

Les souches perdues et qui n'ont pas pu être séquencées ont soulevé le problème d'un protocole qui doit être amélioré. Des étapes supplémentaires de purification des souches vont donc être ajoutées afin d'éviter de perdre à nouveau du matériel bactérien.

Enfin, la durée de mon stage ne m'a pas permis de réaliser un test du pouvoir pathogène sur une gamme d'hôtes des souches hypothétiquement épidémiques. Il est prévu que ce type de test soit effectué sur un échantillon des souches, en fonction de leur origine et de leur phylogroupe d'appartenance.

Bibliographie :

Audemard, H. (1987). Lutte biologique et intégrée en vergers de pommiers, poiriers et abricotiers. *Entomophaga 32*, 59–71.

Bartoli, C., Berge, O., Monteil, C., Guilbaud, C., Balestra, G.M., Varvaro, L., Jones, C., Dangl, J.L., Baltrus, D.A., Sands, D.C., et al. (2014). The Pseudomonas viridiflava phylogroups in the P. syringae species complex are characterized by genetic variability and phenotypic plasticity of pathogenicity-related traits. *Environmental Microbiology 16*, 2301–2315.

Berge, O., Monteil, C.L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D.C., and Morris, C.E. (2014). A user's guide to a data base of the diversity of Pseudomonas syringae and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLOS ONE 9*, 1–15.

Bordjiba, A., and Prunier, J.P. (1991). Establishment of an epiphytic phase by three species of Pseudomonas on apricot trees. *Acta Horticulturae 293*, 487-494.

Bourguiba, H., Audergon, J.-M., Krichen, L., Trifi-Farah, N., Mamouni, A., Trabelsi, S., D'Onofrio, C., M Asma, B., Santoni, S., and Khadari, B. (2012). Loss of genetic diversity as a signature of apricot domestication and diffusion into the mediterranean basin. *BMC Plant Biology 12*, 1-16.

Buchanan, R.E. (1917). Studies on the nomenclature and classification of the bacteria. 3.The families of Eubacteriales. *Journal of Bacteriology 4*, 347–350.

Buléon, S. (2010). Abricotier - Bactériose - Influence de la hauteur de greffage - Verger à Empurany. *Compte-rendu d'essai Chambre Agriculture Ardèche*, 1-2

Bultreys, A., and Kaluzna, M. (2010). Bacterial cankers caused by Pseudomonas syringae on stone fruit species with special emphasis on the pathovars syringae and morsprunorum race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology 92 - Supplement 1*, 21–33.

Crosse (1956). Bacterial canker of stone fruits. II. Leaf scar infection of cherry. *The journal of horticultural science and biotechnology 31*, 212–224.

Dagba, M., and Chaussabe, A.L. (2011). Bulletin de santé du végétal- Rhône-Alpes. *Cultures fruitières 11*.

Decroocq, V., and Candresse, T. (2007). Résistance génétique au virus de la sharka chez les Prunus : Sélection conventionnelle et nouvelles stratégies. *Innovations Agronomiques 1*, 111–121.

Delaunay, V., and Leon Chapoux, M. (2010). Abricotier - Sensibilité variétale à la bactériose.

Donmez, M.F., and Karlidag (2010). Identification of resistance to bacterial canker (Pseudomonas syringae pv. syringae) disease on apricot genotypes grown in Turkey. *European Journal of Plant Pathology 126*, 241–247.

Dunquesne, J., and Gall, H. (1975). L'influence des porte-greffes sur la sensibilité de l'abricotier aux bactérioses. *Phytoma 1*, 22–26.

Faust, M., Surányi, D., and Nyujtö, F. (1998). Origin and dissemination of apricot. *Horticultural Reviews 22*, 263–319.

FranceAgriMer (2015). Analyse de nouveaux marchés potentiels pour l'abricot frais français. *Synthèses FranceAgriMer - Filière fruits et légumes*, 1-4.

Freigoun, S.O., and Crosse, J.E. (1975). Host relations and distribution of a physiological and pathological variant of Pseudomonas morsprunorum. *Annals of Applied Biology's 81*, 317–330.

Gaignard, J.L., and Luisetti, J. (1993). Pseudomonas syringae, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agronomie 13*, 333–370.

Garcin, A., and Bresson, J. (2009). Sensibilité des arbres à noyau au Xanthomonas. *Infos-Ctifl 254*, 30–35.

Gardan, L., Prunier, J.P., Luisetti, J., and Bézelgues, J.J. (1973). Responsabilité de divers Pseudomonas dans le dépérissement bactérien de l'Abricotier en France. *Revue de Zoologie Agricole et de Pathologie Végétale* 112–120.

Hirano, S.S., and Upper, C.D. (1990). Population biology and epidemiology of Pseudomonas syringae. *Annual Review of Phytopathology 28*, 55–77.

Hirano, S.S., and Upper, C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on Pseudomonas syringae - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews 64*, 624–653.

Hummer, K.E., and Janick, J. (2009). Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. In *Genetics and Genomics of Rosaceae*, K.M. Folta, S.E. Gardiner (eds). New York, USA: Springer, 1–17.

Janick, J. (2005). The origins of fruits, fruit growing, and fruit breeding. *Plant Breeding Reviews 25*, 255–320.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., and Teven, P.F. (1999). In *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, pp. 290–306.

Karimi-Kurdistani, G., and Harighi, B. (2008). Phenotypic and molecular properties of Pseudomonas syringae pv. syringae the causal agent of bacterial canker of stone fruit trees in Kurdistan province. *Journal of Plant Pathology 90*, 81–86.

Kennelly, M.M., M. Cazorla, F., de Vicente, A., Ramos, C., and W. Sundin, G. (2007). Pseudomonas syringae- Diseases of fruit trees- Progress toward understanding and control. *Plant Disease 91*, 4–17.

Kersters, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M., and Schleifer, K.H. (1996). Recent changes in the classification of the Pseudomonads: an overview. *Systematic and Applied Microbiology 19*, 465–477.

Klement, Z. (1977). Bacterial canker and dieback disease of apricots (Pseudornonas syringae van Hall). *European Journal of Plant Pathology 7*, 57–69.

Klement, Z., Rozsnyay, D., and Arsenijevic, M. (1974). Apoplexy of apricots. III. Relationship of winter frost and the bacterial canker dieback of apricots. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 9*, 35–45.

Klement, Z., Rozsnyay, D., Balo, E., Panczel, M., and Prileszky, G. (1984). The effect of cold on development of bacterial canker in apricot trees infected with Pseudomonas syringae pv. syringae. *Physiological Plant Pathology 24*, 237–246.

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

Lefèvre, M., Luneau, P., Edin, P., Lichou, J., Soing, P., Minodier, R., Audergon, J.M., and Vigouroux, A. (1999). Le dépérissement bactérien de l'abricotier. *Infos CTIFL 152*, 38–41.

Lemontey, J.M. (2007). La bactériose de l'abricotier : symptômes et dégâts. *Rapport Synagri Rhône Alpes*, 1-7.

Liao, C.H., and Wells, J.M. (1987). Diversity of pectolytic, fluorescent Pseudomonads causing soft rots of fresh vegetables at produce markets. *Postharvest Pathology and Mycotoxins 77*, 673–677.

Liao, C.H., Hung, H.Y., and Chatterjee, A.K. (1988). An extracellular pectate lyase is the pathogenicity factor of the soft-rotting bacterium Pseudomonas viridiflava. *Molecular Plant-Microbe interactions 1*, 199–206.

Lichou, J. (2007). Comportement du matériel végétal en verger. *Compte-rendu des Journées suisses de l'abricot*, 5 et 6 juillet 2007, en Valais, Suisse, 1-12.

Lichou, J., and Jay, M. (2012). Le chancre bactérien de l'abricotier. In *Monographie Abricot*, CTIFL (ed). 405-419.

Lichou, J., Jay, M., Moulon, B., Pinet, C., and Chamet, C. (2007). Atouts et particularités de quelques variétés récentes d'abricot. *Compte-rendu des Journées suisses de l'abricot*, 5 et 6 juillet 2007, en Valais, Suisse, 13-30.

Lyskanowska, K. (1979). Bacterial canker of sweet cherry (Prunus avium) in Poland. IV. Etiology of the necrosis of cherry buds in nursery stock production and attempts of chemical control. *Journal of Phytopathology, 96*, 222–230.

Maki, L.R., Galyan, E.L., Chang-Chien, M.M., and Caldwell, D.R. (1974). Ice Nucleation Induced by Pseudomonas syringae. *Applied Microbiology 28*, 456–459.

Mandrin, J.F., and Weydert, C. (2013). Monilioses sur abricots et pêches. Les conditions favorables au développement. *Infos-Ctifl 295*, 27–31.

Minodier, R. (2006). Abricotier - Bactériose - Influence de la hauteur de greffage. *Compte-rendu d'essai Chambre Agriculture Ardèche*, 1-2

Morris, C.E., Sands, D.C., Vanneste, J.L., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C., and Glaux, C. (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*, e00107–e00110.

Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., and Elphinstone, J. (2011). Rapid phylogenetic identification of members of the Pseudomonas syringae species complex using the rpoD locus. *Plant Pathology 60*, 338–344.

Paulin, J.P., Ridé, M., and Prunier, J.P. (2001). Découverte des bactéries phytopathogènes il y a cent ans: controverses et polémiques transatlantiques. *Sciences de la vie 324*, 905-914.

Peix, A., Ramirez-Bahena, M.H., and Velazquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus Pseudomonas. Infection, *Genetics and Evolution 9*, 1132–1147.

Prunier, J.P., and Cotta, J. (1987). Le dépérissement bactérien (Pseudomonas spp.) de I'abricotier: situation en France. *EPPO Bulletin 17*, 251–256.

Rehder, A. (1949). Bibliography of cultivated trees and shrubs hardy in the cooler temperate regions of the Northern Hemisphere, 270.

VanHall, C.J.J. (1902). Beschrijving van Pseudomonas Syringae nov. spec. In *Bijdragen Tot de Kennis Der Bakterieele Plantenziekten*, 191–198.

Vanneste, J.L., Giovanardi, D., Yu, J., Cornish, D.A., Kay, C., Spinelli, F., and Stefani, E. (2011). Detection of Pseudomonas syringae pv. actinidiae in kiwifruit pollen samples. *New Zealand plant protection 64*, 246–251.

Vigouroux, A., and Bussi, C. (1994). Une action possible des sols sur la prédisposition des pêchers au dépérissement bactérien par modification de la teneur en eau hivernales des tiges. *Agronomie 14*, 319–326.

Whitesides, S.K., and Spotts, R.A. (1991). Frequency, distribution, and characteristics of endophytic Pseudomonas syringae in pear trees. *Phytopathology 81*, 453–457.

William, M.D., and Peterson, D.H. (1967). Transmission of Pseudomonas syringae in peach trees by bud propagation. *Plant Disease Reporter 51*, 666–668.

Wilson, M., Campbell, H.L., Ji, P., Bones, J.B., and Cuppels, D.A. (2002). Biological control of bacterial speck of Tomato under field conditions at several locations in North America. *Phytopathology 92*, 1284-1292

Wimalajeewa, D.L.S. (1985). A study of populations of Pseudomonas syringae pv. syringae on stone fruits in Victoria. *Plant Pathology 34*, 248–254.

Winslow, C.E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C., Rogers, L.A.J., and Smith, G.H. (1917). The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of Bacteriology 5*, 505–566.

Wormald, H. (1932). Bacterial diseases of stone-fruit trees in Britain: IV. The organism causing bacterial canker of plum trees. *Transactions of the British Mycological Society 17*, 157–169.

Xu, G.W., and Gross, D.C. (1988). Evaluation of the role of syringomycin in plant pathogenesis by using TnS mutants of Pseudomonas syringae pv. syringae defective in syringomycin production. *Applied and Environnemental Microbiology 54*, 1345–1353.

Yilmaz, K.U., and Gurcan, K. (2012). Genetic diversity in apricot. In *Genetic Diversity in Plants*, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0185-7, 249-270.

Young, J.M. (1987). Orchard management and bacterial diseases of stone fruit. New Zealand *Journal of experimental agriculture 15*, 257–266.

Young, J.M. (2004). Olive knot and its pathogens. *Australasian Plant Pathology 33*, 33–39.

Young, J.M. (2010). Taxonomy of Pseudomonas syringae. *Journal of Plant Pathology 92*, S1.5–S1.14.

Sitographie :

Site internet 1 : Taxonomy - BioWeb [consulté le 22/06/2015]. Disponible sur : http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2009/schember_sama/taxonomy.htm

Site internet 2 : Atlas of Fruits history [consulté le 02/07/2015]. Disponible sur : http://www.fruitsatlas.com/?page_id=18

« Identification et caractérisation des *Pseudomonas* associées à la bactériose de l'abricotier en vallée du Rhône. »

«Identification and characterization of *Pseudomonas* associated with bacterial canker on apricot in Rhone Valley »

MORGAINT Bénédicte

Résumé

En vallée du Rhône, la production d'abricots tient une place économique importante. Cependant, des difficultés apparaissent en vergers d'abricotiers à cause des bactérioses causées par *Pseudomonas syringae).* Afin de développer des méthodes de luttes adéquates, identifier et caractériser les agents phytopathogènes responsables de la maladie apparait nécessaire. Une classification de *P.syringae* en 13 groupes phylogénétiques (Berge *et al., 2014)* et le développement des outils moléculaires associés a été réalisé. Grâce à ces outils, étudier la distribution différentielle des phylogroupes de *P.syringae* dans différents réservoirs et leur implication dans l'établissement de la maladie est possible. L'objectif de cette étude est de décrire la diversité des populations de *P.syringae* au niveau intra-parcellaire et à un stade précoce (dès l'implantation d'un verger), au niveau parcellaire mais à un stade plus avancé de la vie d'un verger et à une échelle spatiale plus large dans la vallée du Rhône.

Abstract :

In the Rhone valley, apricot production has an important economic place. However, difficulties appears in apricot orchards because of bacterial diseases caused by *Pseudomonas syringae*. To develop adequate methods of control, it is necessary to identify and characterize plant pathogens responsible for disease. A classification of *P.syringae* into 13 phylogenetic groups (Berge *et al.*, 2014) and the development of associated molecular tools was conducted. With these tools, consider the differential distribution of phylogroupes of *P.syringae* in different reservoirs and their involvement in the establishment of the disease is possible. The objective of this study was to describe the diversity of *P.syringae* populations at the intra-plot level and at an early stage (from the establishment of an orchard), at plot level but at a later stage in the life of an orchard and at a wider spatial scale in the Rhone Valley.